·研究原著· 文章编号:1000-2790(2006)11-0964-04

亚硒酸钠对大鼠肾小球系膜细胞表达 p38MAPK 和 MCP-1 的影响

魏倩萍[1],邓华聪[1],赵 劼[2] (重庆医科大学:[1]附属第一医院内分泌科,[2]超声工程研究所,重庆 400016)

Role of sodium selenite in regulating expressions of p38MAPK and MCP-1 in rat mesangial cells

WEI Qian-Ping[1], *DENG Hua-Cong*[1], *ZHAO Jie*[2]

[1]Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital, [2]Institute of Ultrasound Engineering, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China

【Abstract】 **AIM**: To observe the effect of sodium selenite on expressions of p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in rat mesangial cell line HBZY-1, and to study the mechanism of sodium selenite in preventing diabetic nephropathy. **METHODS**: Cell line HBZY-1 was incubated with high glucose, high insulin, H_2O_2 and advanced glycosylation end products (AGEs), respectively (control group); simultaneously, the cell line HBZY-1 pre-treated with sodium selenite was also incubated with the above factors (experimental group). The expressions of p38MAPK and MCP-1 were detected and compared in the 2 groups. **RESULTS**: Four factors increased the expressions of p38MAPK and MCP-1 indepently; sodium selenite inhibited the expressions of p38MAPK and MCP-1 by the 4 factors distinctly. **CONCLUSION**: Sodium selenite can suppress the expressions of p38MAPK and MCP-1 in the cell line HBZY-1, which suggests that sodium selenite may play a significant role in the prevention of diabetic nephropathy by the inhibition of the expressions of p38MAPK and MCP-1 in the cell line HBZY-1.

【Keywords】 sodium selenite; p38 mitogen-activated protein kinase; monocyte chemoattractant protein-1; mesangial cells; diabetic nephropathy

【摘 要】目的:观察亚硒酸钠对大鼠肾小球系膜细胞系 HBZY-1 表达 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的影响,从而研究硒在防治糖尿病肾病(DN)中的作用机制. 方法:分别以高葡萄糖、高胰岛素、过氧化氢和糖基化终末产物(AGEs)刺激 HBZY-1 细胞;先给予 100 nmol/L 亚硒酸钠预处理后,再分别以上述 4 种刺激因素孵育 HBZY-1 细胞,分别检测 HBZY-1 细胞 p38MAPK 和 MCP-1 的表达并比较. 结果:4 种刺激因素均可作为独立因素,导致 HBZY-1 细胞 p38MAPK 和 MCP-1 表达量增加;亚硒酸钠能抑制上述 4 种因素所致的 p38MAPK 和 MCP-1 的表达. 结论:亚硒酸钠通过抑制 p38MAPK 和 MCP-1 在 HBZY-1 细胞的表达,从而有效防治 DN 的发生发展,表明硒在 DN 的防治过程中发挥积极作用.

【关键词】亚硒酸钠;p38 丝裂原活化蛋白激酶;单核细胞趋化蛋白-1;系膜细胞;糖尿病肾病

【中图号】R587.24 【文献标识码】A

0 引言

近年来国外研究表明单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1,MCP-1)与糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)有密切关系[1]. p38MAPK 是细胞信号传递的交汇点或共同通路[2-3],但它在 DN 发生中的作用及其与 MCP-1 关系仍不十分清楚. 硒是机体必需微量元素之一,其缺乏可加剧 DN 的氧化应激,并可产生拟高血糖病理状态,从而加剧 DN 的发生发展[4]. 但其是否作用于 p38MAPK 和 MCP-1 国内外未见文献报道. 我们分别给予高葡萄糖(HG)、高胰岛素(HI)、过氧化氢(H_2O_2)和糖基化终末产物(AGEs)孵育 HBZY-1 细胞,观察 HBZY-1 细胞 p38MAPK 和 MCP-1 的表达以及亚硒酸钠对 HBZY-1 细胞 p38MAPK 和 MCP-1 表达的影响. 从而明确二者在 DN 形成中的作用及硒在防治 DN 中的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠肾小球系膜细胞系(HBZY-1,中国典型培养物保藏中心 CCTCC);新生牛血清、RPMI 1640 培养液、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(二抗)(北京中山生物技术有限公司);亚硒酸钠(Karolinska Institute 赠送);柱离心式总 RNA 抽提试剂盒、RT-PCR 两步法试剂盒、PCR 相对分子量标准(TaKaRa 公司);PCR 引物合成(上海博亚生物技术有限公司),蛋白质相对分子量标记物(Bio-Rad 公司);磷酸化 p38MAPK 兔多抗((Promega 公司).

收稿日期:2005-09-07; 接受日期:2006-03-20

基金项目:国家自然科学基金(30370670)

通讯作者:邓华聪. Tel:(023)68700611 Email:deng_huacong@yahoo.com.cn

作者简介:魏倩萍. 博士,副教授. Tel:(023)68485632 Fax:(023)68485632 Email:wqp68894940@163.com

1.2 方法

1.2.1 细胞系 HBZY-1 的培养 HBZY-1 细胞常规培养于 200 mL/L RPMI 1640 培养液中,培养条件为 37℃,饱和湿度 50 mL/L CO_2,每 2~3 日用 0.2 g/L 乙二胺四乙酸(EDTA)消化传代. HBZY-1 细胞长满培养瓶底 40% 后分为 9 组,以无血清培养液饥饿 24 h,然后按实验分组加入刺激(及干预)因素.

1.2.2 体外制备 AGEs 参考文献[5],按牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA) 50 g/L,与葡萄糖 90 g/L,0.5 mmol/L EDTA 及 0.2 mmol/L PBS (pH 7.4)混匀后过滤除菌,37℃恒温培养箱卵孵育 60 d. 0.1 mol/L PBS (pH 7.4)中透析 48 h,测定蛋白含量及荧光强度,分装后存于 -80℃冰箱保存备用.

1.2.3 实验分组 分别以一定浓度 HG, HI, H_2O_2 和 AGEs 刺激细胞系 HBZY-1 一定时间:先给予亚硒酸钠 100 nmol/L 预处理 HBZY-1 细胞 48 h 后,再分别以上述 4 种刺激因素(浓度、时间同前)孵育 HBZY-1 细胞,同时设对照组. 分组情况如下:① 对照组:用等体积 PBS 培养细胞;② HG 组:用 25 mmol/L 葡萄糖刺激 HBZY-1 细胞 72 h;③ HI 组:用 100 nmol/L 胰岛素刺激 HBZY-1 细胞 24 h;④ H_2O_2 组:用 100 μmol/L H_2O_2 刺激 HBZY-1 细胞 1 h;⑤ AGEs 组:用 100 mg/L AGEs 刺激 HBZY-1 细胞 6 h;⑥亚硒酸钠 + HG 组:依次以 100 nmol/L 亚硒酸钠和 25 mmol/L 葡萄糖分别刺激 HBZY-1 细胞 48 h 和 72 h;⑦亚硒酸钠 + HI 组:依次以 100 nmol/L 亚硒酸钠和 100 nmol/L 胰岛素分别刺激 HBZY-1 细胞 48 h 和 24 h;⑧ 亚硒酸钠 + H_2O_2 组:依次以 100 nmol/L 亚硒酸钠和 100 μmol/L H_2O_2 分别刺激 HBZY-1 细胞 48 h 和 1 h;⑨ 亚硒酸钠 + AGEs 组:依次以 100 nmol/L 亚硒酸钠和 100 mg/L AGEs 分别刺激 HBZY-1 细胞 48 h 和 6 h.

1.2.4 RT-PCR 法检测 MCP-1 mRNA 表达 以柱离心式总 RNA 抽提试剂盒提取细胞系 HBZY-1 总 RNA,测定总 RNA 浓度,计算纯度,$A_{260\,nm}/A_{280\,nm}$ 均在 1.8~2.0 之间. MCP-1 引物序列按文献[6]:上游引物: 5′-ATCACCAGCAGCAGGTGTCCCAAAGAAGCT-3′;下游引物:5′-AGAAGTGCTTGAGGTGGTTGTG-GAAAAGAG-3′,扩增片段长度 258 bp. β-actin 引物序列:上游引物:5′-TCCTCTGACTTCAACAGCGA-CACC-3′;下游引物:5′-TCTCTCTTCCTCTTGTGCTCT-TGG-3′,扩增片段长度 228 bp. 以两步法 RT-PCR 试剂盒进行反转录扩增,扩增条件:94℃变性 30 s,55℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,共 35 个循环,72℃最后延伸 7 min. 每次 PCR 反应至少重复 3 次. PCR 产物于 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳,结果经图象分析系统扫描存图,并对目的条带进行密度分析.

1.2.5 Western blot 法检测 p38MAPK 蛋白表达 培养的细胞系 HBZY-1,经 4℃胞浆蛋白提取液裂解,提取物在冰上孵育 2 h,然后12 000 *g* 4℃离心 10 min,沉淀加入 4℃预冷核蛋白提取液,震荡混匀,冰浴 1 h,再12 000 *g* 4℃离心 30 min,取上清为核蛋白,其蛋白浓度经考马斯亮蓝法定量. 磷酸化 p38MAPK 表达量采用 Western blot 法检测,核蛋白中加入等体积2×上样缓冲液煮沸 5 min. 进行 10 mol/L SDS-PAGE,将蛋白转至 PVDF 膜后用 5 g/L BSA 室温下封闭 2 h,分别用 1:2000 抗磷酸化 p38MAPK 兔多抗 4℃孵育过夜,用 PBS 充分洗涤,再用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 1:5000,37℃孵育 1 h,用 PBS 充分洗涤,DAB 显色试剂盒显色. 结果经图象分析系统对目的条带进行扫描存图并进行密度分析.

统计学处理:资料采用 SAS 8.0 进行统计分析,组间两两比较用非参数统计分析,$P<0.05$ 即认为有统计学差异.

2 结果

2.1 细胞系 HBZY-1 MCP-1 mRNA 表达 细胞系 HBZY-1 MCP-1 mRNA 表达以 β-actin 作为内参照物调整后进行半定量分析,HG,HI,H_2O_2 和 AGEs 均可作为独立因素使细胞系 HBZY-1 MCP-1 mRNA 表达量均明显增加($P<0.01$,表 1,图 1).

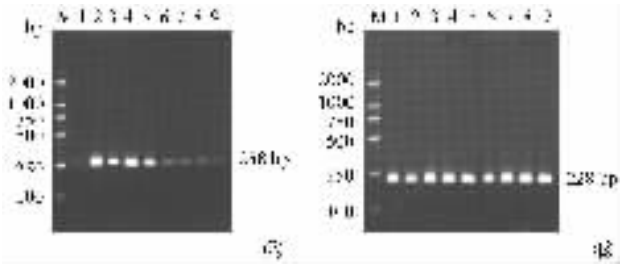
表 1 各组细胞系 HBZY-1 MCP-1 RT-PCR 和磷酸化 p38 MAPK Western blot 半定量结果 ($n=6, \bar{x}\pm s$)

组别	光密度	
	RT-PCR	Western blot
对照	0.3036 ±0.0188	0.2968 ±0.0140
HG	1.1794 ±0.0104[b]	1.5642 ±0.0553[b]
HI	1.0294 ±0.036[b]	1.4742 ±0.0420[b]
H_2O_2	1.005 ±0.0315[b]	1.4691 ±0.0506[b]
AGEs	0.8685 ±0.0123[b]	1.3592 ±0.0457[b]
亚硒酸钠 + HG	0.4593 ±0.0192[bd]	0.4501 ±0.0179[bd]
亚硒酸钠 + HI	0.3756 ±0.0177[bd]	0.3535 ±0.0143[bd]
亚硒酸钠 + H_2O_2	0.4109 ±0.0092[bd]	0.3775 ±0.0150[bd]
亚硒酸钠 + AGEs	0.3097 ±0.0191[d]	0.4292 ±0.0151[bd]

[b]$P<0.01$ *vs* 对照;[d]$P<0.01$ *vs* 相应刺激. HG:高葡萄糖组;HI:高胰岛素组;AGEs:糖基化终末产物组;H_2O_2:过氧化氢组.

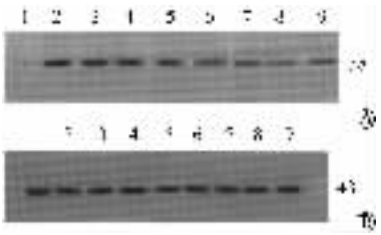
2.2 细胞系 HBZY-1 磷酸化 p38MAPK 蛋白表达 细胞系 HBZY-1 磷酸化 p38 MAPK 蛋白表达以 β-

actin 作为内参照物调整后进行半定量分，HG，HI，H_2O_2 和 AGEs 均可作为独立因素激活 p38MAPK，使细胞系 HBZY-1 磷酸化 p38 MAPK 蛋白表达明显增加($P<0.01$，表 1，图 2).



M：DNA marker；1：对照；2：HG；3：HI；4：H_2O_2；5：AGEs；6：selenite + HG；7：selenite + HI；8：selenite + H_2O_2；9：selenite + AGEs. A：MCP-1 mRNA；B：β-actin mRNA.

图 1 RT-PCR 法检测各组细胞系 HBZY-1 MCP-1 mRNA 和 β-actin mRNA 表达



1：对照；2：HG；3：HI；4：H_2O_2；5：AGEs；6：selenite + HG；7：selenite + HI；8：selenite + H_2O_2；9：selenite + AGEs. A：p38 MAPK；B：β-actin.

图 2 Western blot 法检测各组细胞系 HBZY-1 磷酸化 p38 MAPK 蛋白和 β-actin 蛋白表达

2.3 细胞系 HBZY-1 MCP-1 mRNA 表达 细胞系 HBZY-1 MCP-1 mRNA 表达 以 β-actin 作为内参照物调整后进行半定量分析. 亚硒酸钠预处理后，再分别给予以上 4 种刺激因素孵育细胞系 HBZY-1，可见 MCP-1 mRNA 表达量分别较相应未经亚硒酸钠预处理各组明显减少($P<0.01$，表 1，图 1).

2.4 细胞系 HBZY-1 磷酸化 p38MAPK 蛋白表达的影响 HBZY-1 细胞磷酸化 p38 MAPK 蛋白表达以 β-actin 作为内参照物调整后进行半定量分析. 先以亚硒酸钠预处理细胞系 HBZY-1 后，再分别给予上述 4 种刺激因素刺激细胞系 HBZY-1，可见磷酸化 p38 MAPK 蛋白表达量分别较相应未经亚硒酸钠预处理各组显著减少($P<0.01$)，但与对照组比较仍有显著差异($P<0.01$，表 1，图 2).

3 讨论

本研究结果显示 HG，HI，H_2O_2 和 AGEs 均可单独诱导细胞系 HBZY-1，使其 MCP-1 mRNA 表达量明显增加. 4 种刺激素诱导 HBZY-1 细胞 MCP-1 mRNA 表达增加的机制，结合文献和实验结果我们认为有以下几点：① 高糖有直接刺激 MCP-1 mRNA 及蛋白表达增高的作用，该作用是 PKC，MAPKs 所介导，这可能是 DN 时肾小球中单核巨噬细胞浸润的重要原因；② 大量 AGEs 可以和系膜细胞上的 AGEs 受体(RAGE)相互作用，使 IκB 磷酸化而导致 NF-κB 激活 新近的研究表明[8]，AGEs 与 AGEs 受体(RAGE)相互作用可消耗细胞内谷胱甘肽，产生大量的氧自由基，从而导致细胞内信号传导改变，激活核转录因子 NF-κB/AP-1. 同时 NF-κB 也是调节 RAGE 表达的一个启动子，它的位点 1 和位点 2 的激活可使 RAGE 表达上调，NF-κB 的激活作为一种正反馈，又进一步促进了 AGEs 与 RAGE 的结合，导致 NF-κB 的持续活化，而活化的 NF-κB 可以上调 MCP-1 mRNA 和蛋白表达，从而在糖尿病所致肾脏损害中发挥重要作用；③ 过氧化氢可导致系膜细胞氧化应激加剧，诱导细胞内 ROS 产生，从而迅速激活 NF-κB，上调 MCP-1 表达，在 DN 发生发展早期起重要作用[8]；④ HI 可能是通过激活 PKC，MAPKs 信号通路，引起系膜细胞氧化还原状态发生变化，使细胞内 ROS 产生增加，导致 NF-κB 激活，从而使 MCP-1 表达上调.

MCP-1 介导糖尿病肾小球损伤. MCP-1 不仅对血液中单核细胞有很强的趋化活性，也能通过激活转录因子 NF-κB 和 AP-1 来诱导非炎症细胞产生细胞因子和黏附分子，在诱导单核细胞迁入内皮下间隙及渗入肾小球的过程中起重要作用[7-8]；同时，渗入到肾小球的单核巨噬细胞反过来又刺激局部肾小球细胞，在巨噬细胞衍化生长因子如 PDGF 和 TGF-β 等作用下导致系膜增生和细胞外基质聚集；此外通过炎症细胞因子作用，还可上调黏附分子和趋化因子的分泌，从而进一步有利于白细胞渗入到肾小球[7]. 近年来通过细胞实验及对人和实验动物 DN 的研究发现，MCP-1 在 DN 的发病机制中起重要作用.

p38MAPK 可被多种细胞外刺激激活，导致细胞生长、增殖、分化和调控某些因子表达[9-11]. 本研究以糖尿病时存在的 4 种应激因素孵育大鼠肾小球系膜细胞系 HBZY-1，可见 p38MAPK 被激活，磷酸化表达增加.

硒是机体必需微量元素之一，是谷胱甘肽过氧化物酶的重要组成部分，缺硒可出现拟高血糖症病理状态，引起白蛋白尿和肾小球硬化，从而加剧 DN 的发生发展；补充硒不仅可预防氧化应激，而且可防止肾脏损伤[4,12]. 本研究结果还显示，亚硒酸钠具有类似 p38 MAPK 抑制剂所产生的作用，其机制可能是：①

通过保护系膜细胞免遭氧化损伤而抑制 MCP-1 的分泌;②通过抑制 p38 MAPK 信号通路而抑制 MCP-1 在系膜细胞的表达. 表明亚硒酸钠可能通过抑制 p38MAPK 而延缓 DN 的发生发展,但亚硒酸钠是否通过抗氧化而抑制 p38 MAPK 亦或作用于信号通路的其它环节尚需进一步深入探讨,提示硒在防治 DN 发生发展过程中发挥着积极作用.

【参考文献】

[1] Banba N, Nakamura T, Matsumura M, et al. Possible relationship of monocyte chemoattractant protein-1 with diabetic nephropathy[J]. Kidney Int,2000,58(2):684-690.

[2] Sakai N, Wada T, Furuichi K, et al. Involvement of extracellular signal-regulated kinase and p38 in human diabetic nephropathy[J]. Am J Kidney Dis, 2005,45(1):54-65.

[3] Xu ZG, Kim KS, Park HC, et al. High glucose activates the p38 MAPK pathway in cultured human peritoneal mesothelial cells[J]. Int Soc Nep, 2003, 63(3):958-968.

[4] Reddi AS, Bollineni JS. Selenium-deficient diet induces renal oxidative stress and injury via TGF-(beta)1 in normal and diabetic rats [J]. Kidney Int, 2001,59(4):1342-1353.

[5] Makita Z, Vlassara H, Ceramic A, et al. Immunochemical detection of advanced glycosylation end products *in vivo*[J]. J Boil Chem, 1992, 267:5133-5138.

[6] Lynn EG, Siow YL, Karmin O. Very low-density lipoprotein stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 mesangial cells[J]. Kidney Int,2000,57(4):1472-1483.

[7] Christiane V, Ralph D, Fei J, et al. MCP-1 induces inflammatory activation of human tubular epithelial cells: involvement of the transcription factors, nuclear factor-[kappa] B and activating protein-1 [J]. Nephrology, 2002, 13(6):1534-1547.

[8] Ha HJ, Yu MR, Jin CY, et al. Role of high glucose-induced nuclear factor-[kappa] B avtivation in monocyte chemoattractant protein-1 expression by mesangial cells[J]. J Am Soc Nephrol,2002,13(4):894-902.

[9] Wilmer WA, Dixon CL, Hebert C. Chronic exposure of human mesangial cells to high glucose environments activates the p38MAPK pathway[J]. Int Soc Nep, 2001, 60(3):858-871.

[10] Dai T, Natarajan R, Nast CC, et al. Glucose and diabetes: Effects on podocyte and glomerular p38MAPK, heat shock protein 25, and actin cytoskeleton[J]. Kidney Int, 2006,69(5):806-814.

[11] 张 坚,李圣青,戚好文,等. p38MAPK 在大鼠急性肺损伤模型中的表达及抗氧化剂 NAC 的影响[J]. 第四军医大学学报, 2004,25(15):1353-1355.

[12] Sheng XQ, Huang KX, Xu Hb, et al. New experimental observation on the relationship of selenium and diabetes mellitus[J]. J Biol Trace Elem Res, 2004,99(1-3):241-254.

编辑 甄志强

·经验交流· 文章编号:1000-2790(2006)11-0967-01

绒毛膜上皮癌 17 例的临床特征

樊晓君[1],姜晓波[1],齐晓娥[1],马向东[2],辛晓燕[2] ([1]兵器工业521医院妇产科,陕西 西安 710065,[2]第四军医大学西京医院妇产科,陕西 西安 710033)

【关键词】绒毛膜上皮癌;HCG;病理检查;化疗
【中图号】R737.31 【文献标识码】B

1 临床资料 2000-01/2004-12 收治绒毛膜上皮癌 17 例,年龄 22~58(平均 35.6)岁,既往均有妊娠史或葡萄胎病史. 有明确停经史者 6 例,不规则阴道流血 9 例,无明确停经史者 2 例;本病距先行妊娠最近者为妊娠合并绒癌 1 例,最远者 8 a;腹痛 3 例,咳嗽、咯血 1 例,黑便 1 例;HCG 升高 4 例;葡萄胎清宫后正规随访 1 例,未正规随访 5 例. 初次就诊查 HCG13 例,出现异常阴道出血未查 HCG 而误诊 3 例,依据 B 超提示最终明确诊断者 8 例(47.1%). 疑不全流产、胎盘残留等行诊断性刮宫者 10 例,(58.8%),第 1 次诊刮即送病检者 3 例,第 2 次诊刮送病检者 1 例,均经病理学证实为绒癌. 治疗前依据病检明确诊断者 4 例,术后病检明确诊断者 4 例. 未出现转移或仅出现肺转移经化疗加手术治疗效果明显者 13 例(其中 1 例 18 a 未复发);无转移经化疗预后差者 1 例,为妊娠合并绒癌;1 例出现肺转移,经化疗效果不明显,考虑与化疗剂量不足产生耐药;1 例出现肠转移,化疗加手术切除转移灶效果不佳,属于高危的晚期病例;1 例为子宫肌瘤合并绒癌,8 a 前有葡萄胎病史,因子宫肌瘤行全子宫切除术,术后 2 mo 出现盆腔巨大包块,再次手术,病检为绒癌,化疗效果差,属于复发型. 出院后平均随访 8 mo,治愈者 1 例,明显好转者 12 例,4 例手术加化疗预后较差.

2 讨论 本组 17 例均有妊娠史或葡萄胎病史,仔细询问病史有助于诊断. 更年期妇女出现症状应尽早诊刮、送病检. 绒癌早期临床表现无特异性,仅凭临床经验误诊率高. HCG 定量检测在绒癌诊断上有重要价值. 绒癌引起急腹症后并腹腔内大出血少见,易误诊为异位妊娠[1]. 盲目人流手术是导致绒癌子宫穿孔的原因之一. 早期恶性滋养细胞肿瘤患者治愈率达 90% 以上,应告知患者坚持治疗可治愈,建立治疗疾病的信心,勿中断治疗,防止发展为高危的晚期、耐药、复发病例[2]. 治疗上以化疗为主,手术为辅,早期治疗效果显著.

【参考文献】

[1] 杨莹香,杨秀飞,朱发令. 绒癌误诊为异位妊娠 1 例分析[J]. 实用妇产科杂志,2003,19(4):223-224.

[2] 向 阳. 耐药性滋养细胞肿瘤的化疗及其进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2004,20(3):129-130.

编辑 潘伯荣

收稿日期:2005-08-15; 接受日期:2005-11-26
作者简介:樊晓君. 主治医师. Tel:(029)88235185 Email:fan-xj@sohu.com