

## 晚期糖基化终产物对人肾小管上皮细胞 增殖和凋亡的影响

李琳娜<sup>1</sup>, 王利娟<sup>1</sup>, 何可可<sup>2</sup>, 李海成<sup>1</sup>, 何金花<sup>1</sup>, 蒋建伟<sup>1</sup>, 刘 誉<sup>1</sup>

(1. 暨南大学医学院生物化学教研室, 广东广州 510632; 2. 中山大学第三附属医院放射科, 广东广州 510630)

**[摘要]** 目的: 研究晚期糖基化终产物(advanced glycation end products, AGEs)对人肾小管上皮细胞株(HKC)的细胞毒性作用。方法: 以体外培养的 HKC 细胞为研究对象, 采用 MTT 法测定不同质量浓度(0、50、100、200、400、800 mg/L) AGEs 对 HKC 生长的抑制作用, 应用流式细胞仪分析细胞的凋亡情况, RT-PCR 分析不同浓度 AGEs 处理 HKC 后其 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、HMGB1 基因的转录水平变化。结果: AGEs 质量浓度为 100、200、400、800 mg/L 时分别刺激 HKC 细胞 24 和 48 h 后, 均能显著抑制细胞的增殖, 且抑制作用具有时间和剂量依赖性。流式细胞仪分析发现, AGEs 能促使 HKC 发生凋亡, 凋亡率亦随 AGEs 浓度的增高而增加。RT-PCR 方法检测显示, AGEs 使 HKC 细胞 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、HMGB1 基因的表达上调。结论: AGEs 可抑制人肾小管上皮细胞的增殖, 并诱导其发生凋亡, 此作用可能与其上调 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 HMGB1 基因的表达有关。

**[关键词]** 晚期糖基化终产物; 细胞毒性; 人肾小管上皮细胞

**[中图分类号]** R318.16 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2008)02-0125-05

## Effects of advanced glycation end products on proliferation and apoptosis of human renal tubular epithelial cells

LI Lin-na<sup>1</sup>, WANG Li-juan<sup>1</sup>, HE Ke-ke<sup>2</sup>, LI Hai-cheng<sup>1</sup>, HE Jin-hua<sup>1</sup>, JIANG Jian-wei<sup>1</sup>, LIU Yu<sup>1</sup>

(1. Department of Biochemistry, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Department of Radiology, the Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

**[Abstract]** **Aim:** To investigate the cytotoxicity of human renal tubular epithelial cells(HKC) induced by advanced glycation end products(AGEs). **Methods:** The proliferative inhibition of HKC by AGEs at different concentrations (0, 50, 100, 200, 400, 800 mg/L) was accessed by using MTT assay. Cell apoptosis was analyzed by flow cytometry. The mRNA levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and HMGB1 were determined by RT-PCR. **Results:** AGEs at 100, 200, 400, 800 mg/L significantly inhibited proliferation of HKC after incubation with AGEs for 24 and 48 h, which showed good time-and dose-dependent fashions. AGEs were also found to cause apoptosis in HKC. The flow cytometry analysis showed that AGEs increased the proportion of apoptotic cells in a dose-dependent manner, while RT-PCR analysis demonstrated that the mRNA expression levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and HMGB1 in HKC cells were up-regulated by AGEs. **Conclusion:** AGEs can inhibit proliferation and also induce apoptosis in HKC. These effects may be related to the up-regulated expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and HMGB1 genes.

**[收稿日期]** 2007-10-24

**[基金项目]** 暨南大学引进人才启动基金资助项目(51204004)、广州市科技计划资助项目(2002J1-C0361)

**[作者简介]** 李琳娜(1983-),女,硕士研究生,研究方向:多基因疾病的分子生物学研究。通讯作者:刘 誉, Tel: 020-85220256; E-mail: xyulin07@126.com

[Key words] advanced glycation end products; cytotoxicity; human renal tubular epithelial cells

晚期糖基化终产物(advanced glycation end products, AGEs)是葡萄糖及其它还原糖与蛋白质、脂类以及核酸经非酶促糖基化反应后的终末产物<sup>[1]</sup>。AGEs 在糖尿病、动脉粥样硬化、阿尔茨海默病、衰老等疾病的发生发展过程中起着重要的作用。糖尿病肾病是糖尿病患者的常见并发症之一,其发生、发展与 AGEs 关系密切。近期的大量研究已证实糖尿病肾损伤同时也发生在肾小管。本研究以体外培养的人肾小管上皮细胞株(HKC)为研究对象,观察 AGEs 对 HKC 的生长抑制作用及其致凋亡的细胞毒性,通过测定 AGEs 对早期炎症因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和晚期炎症因子“高迁移率族蛋白 B1”(high-mobility group box1, HMGB1)表达的影响,探讨 AGEs 对 HKC 的毒性作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

(1)主要试剂 DMEM 培养基(Gibico 公司)、胎牛血清(杭州四季青公司)、胰酶(Sigma 公司)、6 孔和 96 孔培养板(美国 Corning 公司)、MTT 和碘化丙啶(Sigma 公司)、Trizol 和 Taq DNA 聚合酶(上海申能博彩)、dNTP, Rnasin 和 Oligod T(TaKaRa 公司)、M-MLV 逆转录酶(Promage 公司);所用引物均由上海生工合成。

(2)细胞株 人肾小管上皮细胞株(HKC)由本教研室蒋建伟老师提供。

### 1.2 方法

(1)细胞培养 HKC 在含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液中,体积分数 5% CO<sub>2</sub>、95% 湿度、37 °C 条件下培养,细胞达 80% 融合后用 D-Hanks 液洗涤 1 次,加入质量分数为 0.25% 的胰酶消化适度后加入培养液终止消化,吹打成细胞悬液。1 000 r/min 离心 3 min,弃上清,按 1:4 规律传代。

(2)AGEs 的体外制备 按照文献[2]报道方法体外制备晚期糖基化牛血清白蛋白(BSA-AGEs)。反应液含体积分数 60% 小牛血清白蛋白(BSA),1.6 mol/L D-葡萄糖,0.1 mol/L 赖氨酸和 0.5 mol/L PBS,经 0.2  $\mu$ m 滤膜超滤除菌,于 50 °C 保温 4 d。反应混合物经葡聚糖凝胶 G-25 柱脱盐纯化,制备得 BSA-AGEs 冻干备用。取少量 BSA-AGEs 样品溶解于 PBS,在 440 nm/350 nm(发射波长/激发波长)

测定荧光值(AU),其 AGEs 含量每毫克蛋白质为 46.6 AU。

(3)MTT 检测细胞生长抑制率 取对数生长期的 HKC 细胞接种于 96 孔板,每孔细胞数为 5 000 个,保温 24 h 贴壁良好后加入终质量浓度为 0、50、100、200、400、800 mg/L 的 AGEs(AGEs 质量浓度 0 组设为空白对照组)。每个质量浓度设 3 个复孔,分别培养 24、48 h 后每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL) 20  $\mu$ L,于 37 °C 继续孵育 4 h 后终止培养。小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入 150  $\mu$ L 二甲基亚砷,振荡 10 min,使结晶物充分溶解。选择 570 nm 波长,在酶标仪上测定各孔吸光度(A)值。以 AGE 质量浓度 0 mg/L 时细胞活力为 100%,按下式计算各组细胞生长抑制率:细胞生长抑制率 =  $(1 - A_{(药物组均值)} / A_{(对照组均值)}) \times 100\%$ 。

(4)流式细胞仪检测 取对数生长期的 HKC 细胞以  $2.5 \times 10^5$ /mL 接种于 6 孔板,每孔 2 mL,培养 24 h 贴壁良好后加入不同终质量浓度(0、50、100、200、400、800 mg/L)的 AGEs,48 h 后收集细胞,用预冷 PBS 洗涤 2 次,体积分数为 70% 乙醇于 4 °C 固定过夜,以 20  $\mu$ g/mL RNase 37 °C 处理 30 min,加入碘化丙啶染色液至终质量浓度 50  $\mu$ g/mL,避光染色 30 min,经流式细胞仪进行细胞凋亡检测。

(5)RT-PCR 检测 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , HMGB1 mRNA 表达水平 取对数生长期的 HKC 细胞,培养 24 h 贴壁良好后分别加入终质量浓度为 0、50、100、200、400、800 mg/L 的 AGEs,作用 48 h 后收集细胞。用 Trizol 法抽提总 RNA,再进行逆转录(RT)及多聚酶链式反应(PCR)。PCR 反应体系:10  $\times$  PCR buffer (含 Mg<sup>2+</sup>) 2.5  $\mu$ L, dNTP 1  $\mu$ L,上下游引物各 0.75  $\mu$ L, Taq 酶 0.4  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L, 双蒸水 17.6  $\mu$ L。3 对引物及内参扩增条件均为:预变性 94 °C 5 min,变性 94 °C 45 s,退火 57 °C 40 s,延伸 72 °C 40 s,30 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。以  $\beta$ -actin 为内参照,检测基因及内参照的引物序列见表 1。

取 6  $\mu$ L PCR 产物于 2% 的琼脂糖凝胶中电泳 45 min,紫外灯下观察并拍照,用全自动图像处理系统对 PCR 电泳结果进行灰度值扫描,以目的基因的 PCR 条带与  $\beta$ -actin 条带的灰度值比值作为各基因 mRNA 的相对表达量。

表1 检测基因引物序列

基因	正向引物	反向引物	产物长度
IL-1 $\beta$	5'-CTGTCTCGCGTTGAAAGAT-3'	5'-CAGTTGGCATTGGTGTAGAC-3'	389 bp
TNF- $\alpha$	5'-CACACTGAACTGCTGGCAAC-3'	5'-GGCGATTACAGACACAACCTCC-3'	567 bp
HMGB1	5'-CTAGCCCTGCTCTGCTGCTA-3'	5'-AAATGGGCAAAAAGCAAAAAGA-3'	415 bp
$\beta$ -actin	5'-TGGGTCAGAAGGATTCCTATGT-3'	5'-CAGCCTGGATAGCAACGTACA-3'	276 bp

(6)统计学分析 各实验数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用SPSS 11.5统计软件进行单因素方差分析; $P < 0.05$ 时,差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 AGEs对HKC细胞的生长抑制作用

MTT结果显示,当AGEs质量浓度为50 mg/L、保温24和48 h后,抑制率与空白对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而当AGEs质量浓度为100、200、400、800 mg/L时,抑制率在24和48 h两时相点均显著低于对照组( $P < 0.01$ );而AGEs对HKC细胞生长的抑制作用随AGEs质量浓度的增加、作用时间的延长而增强(见表2)。

### 2.2 流式细胞仪检测

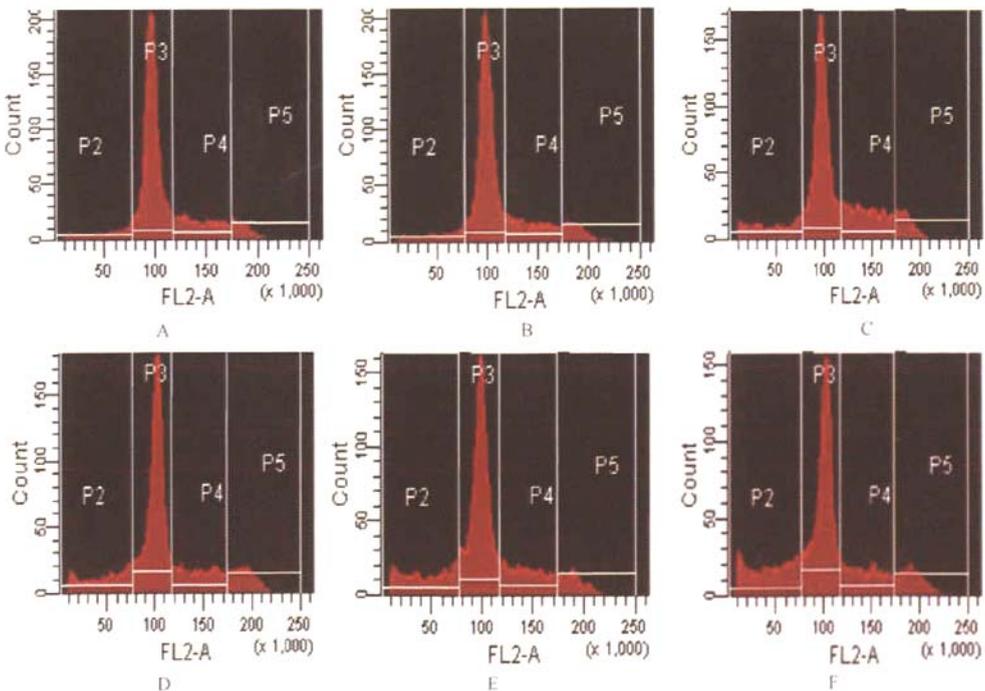
凋亡细胞DNA荧光强度降低,在G0/G1峰前出现一小于DNA二倍体含量的峰,此即亚二倍体

峰,又称细胞凋亡峰(AP峰),根据AP峰面积可分析得出细胞凋亡率。统计结果显示,AGEs质量浓度50 mg/L组与对照组无显著差异外( $P > 0.05$ ),其余各组与对照组相比均为 $P < 0.01$ ,且随着AGEs质量浓度的增高,HKC细胞凋亡比例也增高。流式结果见图1和表3。

表2 不同质量浓度AGEs对HKC细胞生长的抑制作用 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

$\rho$ (AGEs)/ (mg·L <sup>-1</sup> )	24 h		48 h	
	A值	抑制率/%	A值	抑制率/%
对照	0.98 $\pm$ 0.13		1.12 $\pm$ 0.18	
50	0.95 $\pm$ 0.08	3.06 $\pm$ 0.28 <sup>1)</sup>	1.08 $\pm$ 0.13	3.57 $\pm$ 0.36 <sup>1)</sup>
100	0.85 $\pm$ 0.11	13.26 $\pm$ 0.37 <sup>2)</sup>	0.92 $\pm$ 0.09	17.86 $\pm$ 0.26 <sup>2)</sup>
200	0.76 $\pm$ 0.07	22.45 $\pm$ 0.26 <sup>2)</sup>	0.81 $\pm$ 0.07	27.68 $\pm$ 0.24 <sup>2)</sup>
400	0.63 $\pm$ 0.09	35.71 $\pm$ 0.30 <sup>2)</sup>	0.69 $\pm$ 0.12	38.39 $\pm$ 0.33 <sup>2)</sup>
800	0.52 $\pm$ 0.12	46.94 $\pm$ 0.35 <sup>2)</sup>	0.58 $\pm$ 0.08	48.21 $\pm$ 0.27 <sup>2)</sup>

与对照组比较,1)  $P < 0.05$ , 2)  $P < 0.01$



A:对照; B:AGEs 50 mg/L; C:AGEs 100 mg/L; D:AGEs 200 mg/L; E:AGEs 400 mg/L; F:AGEs 800 mg/L

图1 不同质量浓度AGEs处理HKC细胞流式结果图

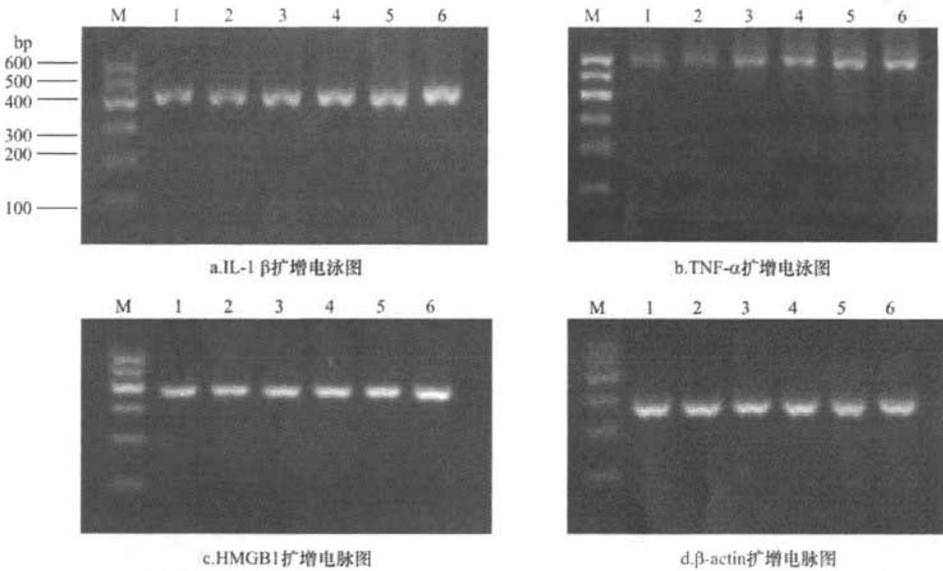
表 3 不同质量浓度 AGEs 处理 HKC 细胞后细胞凋亡率  
( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

$\rho(\text{AGEs})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	细胞凋亡率/%
对照	$2.2 \pm 1.5$
50	$2.5 \pm 2.3$
100	$7.1 \pm 1.8^{1)}$
200	$11.8 \pm 3.3^{1)}$
400	$17.8 \pm 2.6^{1)}$
800	$25.3 \pm 1.4^{1)}$

1)与对照组比较,  $P < 0.01$

### 2.3 RT-PCR 检测 IL-1、TNF- $\alpha$ 、HMGB1 基因 mRNA 表达

不同质量浓度 AGEs (50、100、200、400、800 mg/L) 作用 HKC 细胞 48 h 后均上调 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , HMGB1 基因 mRNA 的表达,其灰度比值与对照组的差异均有显著统计学意义 ( $P < 0.01$ )。AGEs 诱导 HKC 细胞表达上述 3 种基因的 mRNA 具有剂量依赖性,随着 AGEs 质量浓度增高,IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、HMGB1 基因的 mRNA 相对表达水平也明显增高,其中,AGEs 各质量浓度组的 HMGB1 基因 mRNA 表达均高于 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的表达水平 ( $P < 0.05$ ), 结果见图 2 和表 4。



M:Marker; 1:对照; 2:AGEs 50 mg/L; 3:AGEs 100 mg/L; 4:AGEs 200 mg/L; 5:AGEs 400 mg/L; 6:AGEs 800 mg/L

图 2 AGEs 对 HKC 细胞 IL-1、TNF- $\alpha$ 、HMGB1 的 mRNA 表达水平的影响

表 4 不同质量浓度 AGEs 对 IL-1、TNF- $\alpha$ 、HMGB1 基因 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

$\rho(\text{AGEs})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	灰度比值		
	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$	HMGB1
对照	$0.45 \pm 0.03$	$0.13 \pm 0.05$	$0.80 \pm 0.03$
50	$0.50 \pm 0.02^{1)}$	$0.19 \pm 0.03^{2)}$	$0.89 \pm 0.01^{3)}$
100	$0.66 \pm 0.02^{1)}$	$0.27 \pm 0.02^{2)}$	$0.97 \pm 0.02^{3)}$
200	$0.71 \pm 0.04^{1)}$	$0.33 \pm 0.03^{2)}$	$1.17 \pm 0.02^{3)}$
400	$0.79 \pm 0.01^{1)}$	$0.40 \pm 0.04^{2)}$	$1.30 \pm 0.04^{3)}$
800	$0.88 \pm 0.03^{1)}$	$0.45 \pm 0.02^{2)}$	$1.52 \pm 0.03^{3)}$

与各自对照组比较, 1)  $P < 0.01, 2) P < 0.01, 3) P < 0.01$

### 3 讨论

糖尿病肾病是糖尿病主要的慢性并发症之一,

已经成为导致终末期肾衰竭的主要原因之一。糖尿病肾病发病机制非常复杂,其发生发展与 AGEs 有着密切的关系。当机体处于糖尿病的病理变化时,持续高血糖能加速 AGEs 的形成,可通过以下两种途径引发糖尿病肾病:一形成胶原分子间交联,改变血管壁的结构;肾小球基底膜因糖基化,电荷消失,从而导致糖尿病肾病的发生;二 AGEs 与系膜细胞上 AGE 受体结合,刺激肾小球系膜细胞合成 TNF- $\alpha$ 、MCP-1、血小板衍生生长因子(PDGF)等炎症趋化因子,导致肾脏慢性炎症,从而加速糖尿病肾病发展<sup>[3]</sup>。过去的研究认为糖尿病肾病的病变主要是肾小球的硬化,但近期的研究已证实糖尿病肾损伤同时也发生在肾小管。在各种继发性和原发性肾小球疾病中,肾小管间质病变程度是反映肾功能下降

严重程度和判断预后最重要的指标之一<sup>[4]</sup>。

近年来随着人们对糖尿病肾病发病机制的进一步认识,确立了炎症反应在糖尿病肾病的病理过程中的作用,因而炎症学说成为研究热点之一,糖尿病是一种自然免疫和低度炎症性疾病,早期炎症因子是引起机体失控性炎症反应和组织损伤的关键因素,IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 都是与炎症反应相关的早期因子,参与机体炎症引起的多方面病理变化;同时这些炎症因子可通过自分泌和旁路分泌的作用方式使炎症效应不断扩大<sup>[5]</sup>。过去认为早期炎症因子是引起机体失控性炎症反应、组织损伤的关键介质,但早期炎症因子在体内持续时间很短。近期研究表明,高迁移率族蛋白 B1 (high-mobility group box1, HMGB1)是一种重要的晚期细胞因子,与炎症关系密切,同时也是细胞受损、细胞死亡过程中诱导免疫应答的关键信号<sup>[6]</sup>。HMGB-1 是 30 年前从细胞核中提纯得到的一种蛋白质,因其在电泳凝胶上的迁移率高而得名<sup>[7]</sup>。核 HMGB-1 作为 DNA 结合蛋白参与维持核小体结构、调节基因转录,膜相关 HMGB-1 则参与了神经轴突生长萌芽和分枝,平滑肌细胞及成纤维细胞移位,细胞增殖以及组织坏死后的再生修复,增强体内的免疫反应及杀菌活性等多种生物学效应。胞内 HMGB1 可通过活化细胞的主动分泌,坏死或受损细胞的被动释放而进入胞外,与细胞表面晚期糖基化终产物受体等结合后引发信号转导,诱导其他炎症介质的产生<sup>[8-9]</sup>。HMGB1 与早期促炎细胞因子相比具有出现晚、持续时间长的特点,与 TNF- $\alpha$  等重要炎症介质有着同等重要的促炎作用<sup>[10-12]</sup>,尤其是对慢性炎症反应和慢性组织损伤的影响。

本研究中,当 AGEs 刺激体外培养的人肾小管上皮细胞株 HKC48h 时,随着 AGEs 浓度的增高,肾小管上皮细胞的增殖受到抑制,同时,细胞凋亡率亦相应增加,证实了 AGEs 对肾小管上皮细胞的毒性作用。结果显示早期炎症因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  以及晚期炎症因子 HMGB1 的表达量均相应增加,且 HMGB1 的表达水平高于前两种因子,提示 HMGB1 在晚期的细胞炎症反应中起主导作用,对于糖尿病肾病的发展尤为重要。

综上所述,AGEs 可抑制肾小管上皮细胞株 HKC 的生长增殖,促进细胞的凋亡。IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、HMGB1 等早、晚期炎症因子的释放可能是 AGEs 对人肾小管上皮细胞株 HKC 产生毒性作用的重要机

制之一。

#### [参考文献]

- [1] BIERNAUS A, HOFMANN M A, ZIEGLER R, et al. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus [J]. *Cardiovasc Res*, 1998, 37(3):586-600.
- [2] BHATWADEKAR A D, GHOLE V S. Rapid method for the preparation of an AGE-BSA standard calibrator using thermal glycation [J]. *Clin Lab Anal*, 2005, 19(1): 11-15.
- [3] YAMAGISHI S, TAKEUCHI M, INAGAKI Y, et al. Role of advanced glycation end products (AGEs) and their receptor (RAGE) in the pathogenesis of diabetic microangiopathy [J]. *Clin Pharmacol Res*, 2003, 23(4): 129-134.
- [4] YANG J, DAI C, LIU Y. Hepatocyte growth factor gene therapy and angiotensin II blockade synergistically attenuate renal interstitial fibrosis in mice [J]. *Am J Soc Nephrol*, 2002, 13(10): 2464-2477.
- [5] 王海燕,刘平,张鸣和.肾脏病学[M].第2版.北京:人民卫生出版社,1996:468-473.
- [6] SCAFFIDI P, MISTELI T, BIANCHI M E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation[J]. *Nature*, 2002,418(6894): 191-195.
- [7] GOODWIN C H, JOHNS E W. Isolation and characterization of two calf-thymus chromatin non-histone proteins with high contents of acidic and basic amino acids[J]. *Eur Biochem*, 1973, 40(1): 215-219.
- [8] YAMADA S, MARUYAMA I. HMGB1, a novel inflammatory cytokine [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2007, 375(1):36-42.
- [9] 吴林青.高迁移率族蛋白 B1:从核蛋白到新的细胞因子[J].*国际免疫学杂志*, 2007, 30(2): 96-101.
- [10] PARK J S, ARCAROLI J, YUM H K, et al. Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box1 protein [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003,284(4):C870-879.
- [11] FIUZA C, BUSTIN M, TALWAR S, et al. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells [J]. *Blood*, 2003, 101(7): 2652-2660.
- [12] ROUHIAINEN A, KUJA-PANULA J, WILKMAN E, et al. Regulation of monocyte migration by amphoterin (HMGB1) [J]. *Blood*, 2004, 104(4): 1174-1182.

[责任编辑:李弘,朱颖娜]