

二甲双胍对高糖环境下人肾小管上皮细胞的保护机制^{*}乔青燕, 金惠敏[△], 顾燕红, 顾惠芳, 付顺昆, 潘丽华

(复旦大学附属浦东医院肾内科, 上海 201399)

摘要:目的 通过观察二甲双胍在高糖环境下对体外培养人肾小管上皮细胞(HK-2 细胞)的影响,探讨二甲双胍在高糖环境下对 HK-2 细胞的保护机制。方法 采用不同水平的二甲双胍及二巯代氨基酸吡咯烷(PDTC)高糖培养基,分别对 HK-2 细胞进行体外培养 24、48、72 h,然后利用噻唑蓝(MTT)及蛋白质印迹法(Western blot)检测 HK-2 细胞的不规则趋化因子(Fkn)蛋白表达水平。结果 和低糖去血清组比较,高糖去血清组细胞增殖受到抑制;分别加入不同水平的二甲双胍后可促进细胞增殖,其中加入 30 mmol/L 二甲双胍的 H+M30 组促细胞增殖作用最为明显;高糖培养基中加入 PDTC 也可逆转高糖抑制细胞增殖的作用。Western blot 结果显示,Fkn 蛋白表达在高糖去血清组中明显升高,随着加入的二甲双胍水平升高,Fkn 蛋白水平明显下降,在加入的二甲双胍水平为 30 mmol/L 及培养 72 h 时下降幅度最明显,且呈时间依赖性。结论 高糖状态可抑制 HK-2 细胞增殖,减少 Fkn 蛋白分泌,而 30 mmol/L 及以上水平的二甲双胍可通过抑制 Fkn 蛋白分泌来保护高糖诱导的 HK-2 增殖。

关键词:人肾小管上皮细胞; 二甲双胍; 不规则趋化因子; 糖尿病肾病

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.22.018 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)22-3328-03

Protective mechanism of metformin on human renal tubular epithelial cells under high glucose environment^{*}QIAO Qingyan, JIN Huimin[△], GU Yanhong, GU Hui fang, FU Shunkun, PAN Lihua

(Department of Nephrology, Affiliated Pudong Hospital of Fudan University, Shanghai 201399, China)

Abstract: **Objective** To investigate the protective mechanism of metformin on human renal tubular epithelial cells(HK-2) under high glucose environment through observing its effect in this environment. **Methods** The high glucose culture mediums with different concentrations of metformin and pyrrolidine dithiocarbamate(PDTC) were adopted to culture HK-2 cells in vitro for 24, 48, 72 h, and then the irregular chemokine(Fkn) protein expression level in HK-2 cells were detected by using MTT and Western blot. **Results** Compared with the low glucose serum deprivation group, the cell proliferation in the high glucose serum deprivation group was suppressed; adding different levels of metformin could promote the cellular proliferation, in which the effect of adding 30 mmol/L of metformin for promoting cellular proliferation was most obvious; adding PDTC in high glucose culture medium also could reverse the effect of high glucose for inhibiting cellular proliferation. The Western blot results showed that Fkn protein expression in the high glucose serum deprivation group was significantly increased, with the concentration increase of added metformin, the Fkn protein level was decreased significantly, in adding 30 mmol/L of metformin and culturing for 72 h, the descend range was the most obvious, moreover which showed a time dependence. **Conclusion** High glucose status can inhibit the proliferation of HK-2 cells, reduces the secretion of Fkn protein, while 30 mmol/L and above of metformin can protect the high glucose induced HK-2 proliferation by inhibiting Fkn protein secretion.

Key words: HK-2; metformin; Fkn; diabetic nephropathy

随着经济水平的不断提高,世界范围内糖尿病的发病率越来越高,糖尿病肾病作为糖尿病的主要微血管并发症亦随之出现明显增长^[1]。糖尿病肾病在病理学上主要表现为肾小球系膜细胞肥大、肾小球硬化、肾小管间质纤维化等,涉及的机制包括高血糖、氧化应激、高灌注等等^[2]。二甲双胍属于双胍类降血糖药物,在临床上用于治疗糖尿病已有多年历史^[3]。近期,多项研究发现二甲双胍除降血糖作用之外,尚有抗肿瘤、心血管保护作用、抗氧化应激及血小板活化作用^[4]。然而,关于二甲双胍对糖尿病肾病的肾脏保护作用,国内外研究较少,本研究探讨二甲双胍对于高糖诱导人肾小管上皮细胞(HK-2 细胞)的保护作用及其可能的作用机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 HK-2 细胞株购于 American Type Cell Culture; 低糖和高糖杜尔伯科改良伊格尔培养基(DMEM 培养基)、胰

酶、双抗购于 Gibco 公司;胎牛血清、细胞计数试剂盒(CCK)-8 及二甲双胍购于美国 Sigma 公司;不规则趋化因子(Fkn) CX3CL 一抗(兔抗鼠)、二抗(羊抗兔、HRP-IgG)和内部参照(β -actin)均购于美国 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HK-2 细胞使用 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育,待细胞贴壁生长进行常规培养,2~3 d 换液 1 次,养至细胞进入对数生长期,采用 0.25% 胰酶消化传代。

1.2.2 噻唑蓝(MTT)检测 将二甲双胍用 60 mmol/L 高糖培养基溶解,配成 100 mmol/L 母液,分别稀释至 1、5、10、20、30、60、90 mmol/L 等不同水平。在 37℃、5% CO₂ 培养箱中常规培养对数生长期的 HK-2 细胞,采用 0.25% 胰酶消化传代,96 孔板接种细胞数每孔 4 000 个,24 h 贴壁后换低糖无血

^{*} **基金项目:**上海市浦东新区医学领先人才项目(PWRI2012-05);上海市浦东新区卫生系统重点学科建设项目(PWZx2014-11);上海市医学重点专科建设项目(ZK2015A15)。

作者简介:乔青燕,女,主治医师,主要从事糖尿病肾病方面的研究。 [△] **通信作者,** E-mail: hmjgli@163.com。

清培养基培养 24 h 使其同步化,然后采用不同水平的二甲双胍及二巯代氨基甲酸吡咯烷(PDTC)对 HK-2 细胞进行体外培养 24、48、72 h。每组设定 3 复孔,继续培养 72 h 后,分别在每个孔加入 10 μ L 的 CCK-8 试剂,培养箱继续孵育 4 h 后,采用酶标仪在 460 nm 波长处检测吸光度(A)。细胞凋亡率(%)=($A_{\text{对照组}} - A_{\text{药物组}}$)/ $A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.2.3 蛋白质印迹法(Western Blot) 采用不同水平的二甲双胍及 PDTC 培养基,分别对 HK-2 细胞进行体外培养,孵育 72 h 后,收集细胞,裂解相应细胞提取蛋白,煮沸 10 min, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。将相应蛋白(每孔 30 μ g)进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),待溴酚蓝到达底部后进行转膜(聚偏氟乙烯膜)。用牛奶(5%脱脂牛奶)封闭(室温 1 h),然后将聚偏氟乙烯膜与 Fkn(1:1 000)抗体在 4 $^{\circ}$ C 恒温过夜(12~16 h)。用吐温三乙醇胺缓冲盐溶液(TBST)洗 3 次,每次 10 min,孵育二抗(室温 1 h),再用 TBST 洗 3 次,每次 10 min,采用化学发光显影。试验重复 3 次,取其平均值。

1.3 统计学处理 采用统计学软件 SPSS17.0 进行相关分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同水平二甲双胍对高糖诱导 HK-2 的保护作用 将低糖培养基培养的细胞作为低糖去血清组(NG 组);将高糖培养基培养的细胞作为高糖去血清组(HG 组);将高糖培养基中加入 1、5、10、20、30、60、90 mmol/L 二甲双胍培养的细胞,分别作为 H+M1 组、H+M5 组、H+M10 组、H+M20 组、H+M30 组、H+M60 组及 H+M90 组;将高糖培养基中加入 PDTC 培养的细胞作为 H+PDTC 组。经 72 h 孵育后,NG 组的 CCK-8 A 值为 2.03 ± 0.22 ,HG 组的 CCK-8 A 值为 1.52 ± 0.12 ,H+M1 组的 CCK-8 A 值为 1.53 ± 0.13 ,H+M5 组的 CCK-8 A 值为 1.54 ± 0.11 ,H+M10 组的 CCK-8 A 值为 1.53 ± 0.19 ,H+M20 组的 CCK-8 A 值为 1.62 ± 0.16 ,H+M30 组的 CCK-8 A 值为 2.03 ± 0.23 ,H+M60 组的 CCK-8 A 值为 2.06 ± 0.26 ,H+M90 组的 CCK-8 A 值为 2.05 ± 0.22 。与 NG 组比较,HG 组细胞增殖受到抑制;分别加入不同水平的二甲双胍后可促进细胞增殖,其中,加入 30 mmol/L 二甲双胍的 H+M30 组促细胞增殖作用最为明显,H+M30 组 CCK-8 A 值与 NG 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。当加入的二甲双胍水平提高至 60 mmol/L 及 90 mmol/L 时,细胞增殖未见明显增加,H+M60 组、H+M90 组 CCK-8 A 值与 H+M30 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 二甲双胍、PDTC 对于高糖诱导 HK-2 细胞的保护作用 高糖培养基中加入 30 mmol/L 二甲双胍、高糖培养基中加入 PDTC、高糖培养基中加入 30 mmol/L 二甲双胍及 PDTC 均能逆转高糖诱导的细胞增殖抑制,差异有统计学意义($P < 0.05$),但在逆转高糖细胞增殖抑制方面的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 Western bolt 结果 加入不同水平二甲双胍及 PDTC 的高糖培养基分别对 HK-2 细胞进行体外培养 24、48、72 h,提取细胞蛋白,进行 Western bolt,结果显示 Fkn 在 HG 组明显升高,随着加入二甲双胍水平的升高,Fkn 蛋白水平的相对表达明显下降,加入二甲双胍水平为 30 mmol/L 的 H+M30 组的 Fkn 蛋白相对表达量最低,与 HG 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);H+M60 组、H+M90 组 Fkn 蛋白的相对表达量与 H+M30 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1。

经 24 h、48 h 及 72 h 孵育细胞后,结果显示,与 HG 组比

较,H+M30 组在 48、72 h 时均能明显抑制 Fkn 蛋白的相对表达,且呈时间依赖性,在 72 h 时抑制作用最为明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。

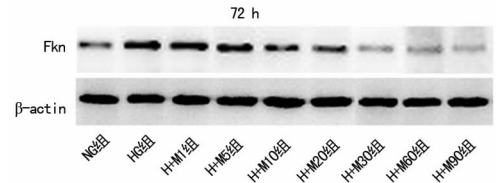


图 1 各组 Fkn 蛋白表达情况

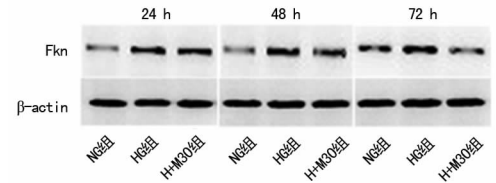


图 2 24、48 h 及 72 h 时 Fkn 蛋白表达情况

3 讨 论

大量研究发现,糖尿病肾病的发病机制主要是细胞外基质在肾小球过度积聚,导致肾小管出现纤维化,患者 C 反应蛋白(CRP)、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-6、单核细胞趋化蛋白(MCP)-1 表达水平易随蛋白尿的增加而上升^[5]。其中,肾小管纤维化作为慢性肾病发展成终末期的共同通路,其纤维化的严重程度可作为糖尿病肾病的预后指标,因此,早期防治肾小管间质纤维化对糖尿病肾病的转归意义重大。Goldberg 等^[6]发现,糖尿病肾病患者肾小管上皮细胞在高糖环境下可刺激肾小管上皮细胞合成大量胶原,释放大量的 TGF- β_1 ,导致其肾间质纤维化。二甲双胍作为经典的降糖药物,可以通过降低糖基化终产物的分泌,减轻患者的肾脏损伤;此外,二甲双胍还可以抑制患者 CRP、TNF- α 、IL-6、谷胱甘肽还原酶等的分泌,降低组织的炎症反应及氧化应激反应,恢复其纤溶功能,从而达到降低血小板聚集、黏附,改善微循环等目的^[7]。

本试验发现,高糖去血清可抑制细胞增殖,高糖培养基分别加入不同水平的二甲双胍后可促进细胞增殖,其中,加入二甲双胍 30 mmol/L 的 H+M30 组促细胞增殖作用最为明显;此外,加入 PDTC 亦可以促细胞增殖。提示高糖可抑制 HK-2 细胞增殖,在高糖条件下加入 30 mmol/L 二甲双胍及 100 μ mol/L PDTC 均可促进细胞增殖。其原因可能是 HK-2 细胞在高糖状态下可激活 B 淋巴细胞瘤(BCL)-2 及 Caspase 家族蛋白,进一步释放细胞色素 C,引起 Caspase 酶原降解,诱导细胞发生凋亡。二甲双胍可通过降血糖、减少糖基化终产物和活性氧簇(ROS)的产生,抑制 HK-2 细胞 TGF- β_1 的分泌,从而达到抑制细胞增殖的目的。PDTC 作为 NF- κ B 抑制剂,可抑制 NF- κ B 激活,阻断高糖状态下 BCL-2 及其下游 Caspase 信号通路,从而促使细胞增殖^[8]。Western bolt 结果显示,Fkn 蛋白在 HG 组明显升高,随着加入的二甲双胍水平升高,Fkn 蛋白水平明显下降,其在 H+M30 组及培养 72 h 时下降幅度最明显,且呈时间依赖性。提示高糖可促进 Fkn 蛋白表达,而二甲双胍可抑制 Fkn 蛋白表达。其原因可能是高糖促进 HK-2 细胞的 ROS 生成,进而激活 Fkn 蛋白表达^[9];而二甲双胍可通过抑制 ROS 及糖基化终末产物的表达来抑制下游 Fkn 蛋白分泌。

综上所述,高糖状态可抑制 HK-2 细胞增殖,减少 Fkn 蛋白分泌,而 30 mmol/L 及以上水平的二甲双胍可通过抑制 Fkn 蛋白分泌来保护高糖诱导 HK-2 细胞增殖。(下转第 3331 页)

验。计数资料以例数或率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2 组患者空腹及三餐后 2 h 血糖水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1	2 组患者空腹及三餐后 2 h 血糖比较($\bar{x}\pm s$, mmol/L)				
组别	<i>n</i>	空腹	早餐后 2 h	午餐后 2 h	晚餐后 2 h
观察组	50	5.3±2.1	7.8±2.6	6.6±2.4	6.9±2.7
对照组	50	5.4±1.2	7.4±2.3	6.7±2.2	6.3±2.3
<i>t</i>		1.632	1.357	1.783	1.502
<i>P</i>		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

3 讨 论

目前,较多大型综合医院均已实现医院信息化管理,信息化血糖管理系统是住院糖尿病患者血糖管理的发展趋势。通过信息化血糖管理系统,医师能及时、快速地获得患者的血糖数据资料,对患者血糖的临界值作出快速响应,及时调整治疗方案^[5]。妊娠糖尿病患者由于糖代谢发生改变,且胎盘、胎儿对血糖变化的影响比较复杂,因此,临床上对产妇血糖的控制要求较高^[6]。本研究中,2 组患者空腹及三餐后 2 h 血糖水平差异无统计学意义($P>0.05$)。与普通床旁血糖仪检测比较,信息化血糖管理系统有较多优势:(1)通过对血糖数据的准确采集、下载、存储,可将其通过医院信息管理系统与电子病历整合,提供强大的数据分析和支持能力,满足临床对糖尿病管理的工具需求(临床分析、报告总结等)。同时,血糖数据快速、直观,临床医师可通过系统的移动端快速浏览结果,及时和患者沟通,调整降糖治疗方案。(2)可简化工作流程,信息电子化后可减少数据记录的时间和劳动力,有效降低护理人力成本^[7]。(3)科室管理人员可全面掌握病区内妊娠糖尿病患者降糖方案的实施情况、效果分析,从而进行质量控制。(4)可建立本院高血糖快速高效的会诊模式,其在改善医疗服务水平、提高医疗服务质量方面可发挥重要作用,能提升医院管理质量与医疗安全水平^[8]。

妊娠糖尿病是因多种因素导致胰岛素抵抗及胰岛 β 细胞分泌功能受限^[9],血糖控制不佳时会对母婴造成不同程度的危

害。因此,控制血糖成为控制病情发展的重中之重^[10]。胰岛素泵是目前最符合生理状态的胰岛素输注方式,可较好地模拟生理性胰岛素的分泌^[11]。根据信息化血糖管理系统存储的血糖波动分段设置基础率,可有效降低高、低血糖的发生率。因此,信息化血糖管理系统联合胰岛素泵治疗是目前住院妊娠糖尿病患者降糖治疗的较好模式,值得推广应用。

参考文献

[1] 刘彩丽.妊娠期糖尿病患者血糖检验分析[J].中国实用医刊,2016,43(8):96-97.

[2] 苏可.妊娠期糖尿病与糖尿病合并妊娠患者的动态血糖变化趋势对比分析[J].中国妇幼保健,2014,29(25):4051-4052.

[3] 中华医学会妇产科学分会产科学组,中华医学会围产医学分会妊娠合并糖尿病协作组.妊娠合并糖尿病诊治指南(2014)[J].中华妇产科杂志,2014,49(8):561-569.

[4] 杨慧霞.妊娠合并糖尿病:临床实践指南[M].2版.北京:人民卫生出版社,2013:148-163.

[5] 李云倩,沈洁.妊娠糖尿病患者动态血糖的特征分析[J].临床荟萃,2012,27(12):1043-1046.

[6] 罗志聪,冉亚玲.40例糖尿病孕妇血糖检验结果的临床分析[J].中外健康文摘,2014,11(5):176-177.

[7] 吴岩,赵晓宇,张玲艳.院内糖尿病患者血糖信息化的应用[J].中国医药导报,2015,12(18):149-152.

[8] 伍洪,王羽飞,王力,等.基于信息化血糖即时检测管理系统的建立与应用[J].中国医学装备,2014,11(7):42-44.

[9] 张凡,李文坚,何军.动态血糖监测评估孕中晚期妊娠期糖尿病患者的血糖波动[J].临床医学,2012,32(10):8-10.

[10] 喻茜,牛晓虎,冯佩,等.孕早期空腹血糖值对妊娠期糖尿病的预测价值[J].护士进修杂志,2016,31(4):299-301.

[11] 计菁.胰岛素泵短期强化疗法在妊娠糖尿病治疗中的效果[J].中国计划生育学杂志,2015,23(7):480-483.

(收稿日期:2017-04-16 修回日期:2017-06-18)

(上接第 3329 页)

参考文献

[1] Zhuo L,Zou GM,Li WE,et al. Prevalence of diabetic nephropathy complicating non-diabetic renal disease among Chinese patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Eur J Med Res,2013,18(1):1-8.

[2] Arora K,Singh K. Molecular mechanisms in the pathogenesis of diabetic nephropathy: an update[J]. Vascu Pharmacol,2013,58(4):259-271.

[3] Alhaider AA,Korashy HM,Sayed-Ahmed MM,et al. Metformin attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats through modulation of oxidative stress genes expression[J]. Chem Biol Interact,2011,192(3):233-242.

[4] Rouabhia S,Milic N,Abenavoli L. Metformin in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: safety, efficacy and mechanism[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol,2014,8(4):343-349.

[5] Arora MK,Singh UK. Oxidative stress: meeting multiple

targets in pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Curr Drug Targets,2014,15(5):531-538.

[6] Goldberg R,Rubinstein AM,Gil N,et al. Role of heparanase-driven inflammatory cascade in pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Diabetes,2014,63(12):4302-4313.

[7] Rotondi M,Coperchini F,Pignatti PA,et al. Metformin reverts the secretion of CXCL8 induced by TNF-alpha in primary cultures of human thyroid cells: an additional indirect Anti-Tumor effect of the drug[J]. J Clin Endocrinol Metab,2015,100(3):E427-432.

[8] 李雅蓉,李兴. 脂联素对高糖环境下人心肌细胞凋亡及 Bax、Bcl-2 表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2012,10(1):37-39.

[9] Chang CY,Shen CY,Kang CK,et al. Taurine protects HK-2 cells from oxidized LDL-induced cytotoxicity via the ROS-mediated mitochondrial and p53-related apoptotic pathways[J]. Toxicol Appl Pharmacol,2014,279(3):351-363.

(收稿日期:2017-05-10 修回日期:2017-07-28)