

绞股蓝皂苷对晚期糖基化终末产物诱导人肾小球系膜细胞晚期糖基化终末产物受体表达及氧化应激水平的影响

王 艳, 唐 灵*, 周 康, 张秋艳

桂林医学院附属医院 老年内科, 广西 桂林 541001

摘要: 目的 观察绞股蓝皂苷(GP)对晚期糖基化终末产物(AGEs)诱导人肾小球系膜细胞(HMCs)中晚期糖基化终末产物受体(RAGE)表达及氧化应激水平的影响。方法 用含13% FBS的DMEM低糖培养液体外培养HMCs细胞,将细胞分为6组:对照组(DMEM培养液), AGEs组(200 mg/L), GP低、中、高剂量(25、75、150 mg/L)组和阳性对照组(氨基胍0.1 mmol/L)。培养72 h后,采用实时荧光定量PCR法检测各组细胞中RAGE mRNA的表达水平, Western blotting法检测RAGE蛋白表达水平。应用试剂盒检测各组细胞上清液中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)及细胞内微量还原型谷胱甘肽(GSH)活性。结果 AGEs显著促进HMCs中RAGE mRNA及蛋白表达($P < 0.01$), 增强细胞氧化应激水平。GP能有效抑制RAGE mRNA及蛋白表达, 增加上清液中SOD和细胞内GSH水平, 降低细胞上清液中MDA水平, 且呈浓度依赖效应, 与AGEs组比较差异显著($P < 0.01$)。结论 GP下调AGEs刺激后HMCs细胞RAGE的异常高表达, 同时改善细胞内氧化应激水平, 其可能的机制是GP阻断了RAGE介导的AGEs-RAGE-氧化应激信号通路, 表现为细胞上清液中MDA水平降低和SOD水平增加及细胞内GSH水平增加。

关键词: 绞股蓝皂苷; 糖尿病肾病; 晚期糖基化终末产物; 晚期糖基化终末产物受体; 氧化应激; 人肾小球系膜细胞

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)20-3060-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.20.017

Effect of gypenosides on RAGE expression and oxidative stress in human mesangial cells induced by AGEs

WANG Yan, TANG Ling, ZHOU Kang, ZHANG Qiu-yan

Department of Elderly Medicine, The Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of gypenosides (GP) on the expression of receptor for advanced glycosylated endproducts (RAGE) and the oxidative stress status of human mesangial cells (HMCs) induced by AGEs. **Methods** HMCs were cultured in DMEM of low glucose containing 13% fetal bovine serum *in vitro*, which were divided into six groups: normal control group (DMEM of low glucose containing 13% fetal bovine serum), AGEs group (AGEs 200mg/L), GP low-dose group (25 mg/L and AGEs 200 mg/L), GP mid-dose group (75 mg/L and AGEs 200 mg/L), GP high dose group: (150 mg/L and AGEs 200 mg/L), and aminoguanidine positive control group (0.1 mmol/L and AGEs 200 mg/L). The expression of RAGE mRNA levels of each group was detected using semi-quantitative RT-PCR method, protein expression levels by Western blotting after cultured 72 h. Simultaneously, the levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in cell supernatant, and intracellular glutathione trace (GSH) in cell were measured. **Results** AGEs could significantly promote the expression of RAGE and mRNA in HMCs ($P < 0.01$), and enhance cellular oxidative stress levels. GP could effectively inhibit the expression of RAGE and mRNA, increase the level of SOD in cell supernatant and GSH in cell, reduce the level of MDA in cell supernatant in a dose-dependent manner compared with the control group, the difference was significant ($P < 0.05$). **Conclusion** AGEs stimulation can induce the high expression of RAGE in HMCs and enhance the level of oxidative stress *in vitro*. GP can down the high expression of RAGE stimulated by AGEs, while improve the oxidative stress in cells, and its possible mechanism of GP may block AGEs-RAGE-oxidative stress signaling pathways mediated by RAGE, it shows the lower levels of MDA and SOD and higher levels of GSH in cell.

Key words: gypenosides; diabetic nephropathy; advanced glycation endproducts; receptor for advanced glycosylated endproducts; oxidative stress; human mesangial cells

收稿日期: 2015-04-09

基金项目: 广西自然科学基金项目(2013GXNSFAA019197); 桂林市科学研究与技术开发计划项目(20120121-1-1)

作者简介: 王 艳(1988—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为糖尿病及其并发症防治。E-mail: 377340247@qq.com

*通信作者 唐 灵(1967—), 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为糖尿病及其并发症防治。E-mail: tanglingem@163.com

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是由糖尿病引起的严重程度和危害性最大的慢性血管并发症, 其特点是微血管病变导致的肾小球硬化, 起病隐匿且进展缓慢, 在欧美国家已成为终末期肾病 (ESRD) 最常见的病因, 具体发病机制目前尚不明确。持续高血糖导致大量晚期糖基化终末产物 (AGEs) 的形成与积聚, AGEs 与晚期糖基化终末产物受体 (RAGE) 相结合, 激活 AGEs-RAGE 信号通路, 诱导氧化应激与炎症反应, 促进 DN 的发生与发展^[1-2]。目前针对 DN 现代医学尚无有效的治疗措施, 近年来研究显示, 我国传统中药对延缓 DN 发生发展有一定疗效。绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino 属多年生草本植物, 又名五叶参、七叶胆, 具有极高药用价值及保健作用, 民间称其为“不老长寿药草”, 亦有“南方人参”之美誉。其主要成分是绞股蓝皂苷 (GP), GP 可明显改善糖尿病大鼠肾脏的氧化应激水平^[3-4], 但具体机制尚不明确。GP 是否抑制 AGEs 生成及阻断 AGEs-RAGE 信号通路目前尚未见相关文献报道。故本实验以人肾小球系膜细胞 (HMCs) 为研究对象, 观察 GP 对 AGEs 诱导的 HMCs RAGE 表达及氧化应激水平的影响, 初步探讨 GP 改善 DN 的可能机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

GP (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 J0423AS), 大连美仑生物技术有限公司; 氨基胍盐酸盐 (批号 MKBP9234V), 美国 Sigma 公司。AGEs, 美国 Biovision 公司; DMEM 低糖培养基, 美国 Gibco 公司; 胎牛血清 (FBS), 南美 GEMINI 公司; 超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 和微量还原型谷胱甘肽 (GSH) 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; Trizol 试剂、 $2\times$ Taq PCR MasterMix 及 DNA Marker 均购自天根生化科技北京有限公司; 逆转录酶试剂盒和 PCR 引物均购自美国 Invitrogen 公司; 兔抗人 RAGE 抗体, 美国 ABGENT 公司; 辣根酶标记山羊抗兔 IgG, 北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 仪器

SW-CJ-2F 超净工作台, 苏洁净化设备有限公司; Axiovert 40C 倒置相差显微镜, Zeiss 公司; PCR 扩增仪, Bio-Rad 公司; TDL-80-2B 低速离心机, 上海安亭科学仪器厂; Legend Micro 17R 低温高速离心机, Thermo Scientific; DYY-6D 型电泳仪, 北

京市六一仪器厂; JS-780 培清全自动凝胶成像分析仪, 上海培清科技有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养

HMCs 细胞株由中南大学湘雅医学院中心实验室细胞库提供, 常规培养于完全培养基 (含 13% FBS 的 DMEM 低糖培养基) 中, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。2~3 d 后细胞贴壁达 80%~90% 时, 用 0.25% 的胰酶消化传代培养。所有细胞体外扩增不超过 10 代。

2.2 药物配制

AGEs 用含 13% FBS 的 DMEM 低糖培养基配制成质量浓度为 200 mg/L 的原液, 加入不同量的 GP, 配成含 GP 的 AGEs 溶液, 使 GP 的终质量浓度分别为 25、75、150 mg/L, 4 °C 保存备用。阳性药物氨基胍用高压后的去离子水溶解, 以含 13% FBS 的 DMEM 低糖培养基 (含 AGEs 200 mg/L) 配制成终浓度为 0.1 mmol/L 溶液, 滤过除菌, 4 °C 保存备用。

2.3 分组及给药

将对数生长期的 HMCs 细胞以每瓶 5×10^5 个接种于 50 mL 培养瓶中, 置细胞培养箱中孵育过夜, 按照随机化原则分组: 对照组 (含 13% FBS 的 DMEM 培养基), AGEs 组 (AGEs 原液 200 mg/L), GP 低、中、高剂量 (含 GP 25、75、150 mg/L 的 AGEs 溶液) 组, 阳性对照组 (含氨基胍 0.1 mmol/L 的 AGEs 溶液)。各组细胞培养 72 h 后待用。

2.4 实时荧光定量 PCR 检测 RAGE mRNA 表达

Trizol 法提取各组细胞总 RNA, 并检测其浓度。按照逆转录试剂盒步骤合成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR 反应。RAGE 上游引物 5'-CAGGAATG-GAAAGGAGACCAA-3', 下游引物 5'-TAGCTTCC-CTCCGACACACA-3'; GAPDH 上游引物 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3', 下游引物 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'。PCR 反应条件: 预变性 94 °C、3 min, 变性 94 °C、30 s, 退火 1 min (RAGE 退火温度为 57 °C; GAPDH 退火温度为 59 °C), 复性 72 °C、30 s, 共 30 个循环, 延伸 72 °C、5 min。取 PCR 产物 5 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳 30 min 后, 于凝胶成像分析仪中拍照, sensiAnsys 凝胶图像分析软件分析电泳图片, 并测量各条带灰度值, 以 RAGE mRNA/GAPDH mRNA 表示各组 RAGE mRNA 表达水平。

2.5 Western blotting 检测 RAGE 蛋白表达水平

0.25%胰酶消化各组细胞,将细胞收集于 1.5 mL EP 管中,加入 150 μ L RIPA 细胞裂解液,冰上裂解 30 min,超声(超声 10 s 间隔 30 s,反复 3 次)使细胞充分裂解。12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 20 min,吸取上清液进行蛋白定量。配制 12%分离胶与 5%浓缩胶,取 30 μ g 蛋白,加入 5 $\times$ 缓冲液,沸水煮 10 min 使蛋白充分变性。聚丙烯酰胺电泳,100 V,2 h 后,4 $^{\circ}$ C 恒流 260 mA 下转膜 90 min 将蛋白转移到醋酸纤维膜上。5%脱脂奶粉封闭 1.5 h,分别与 GAPDH 鼠抗人单克隆抗体及 RAGE 兔抗人多克隆抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜每次 10 min,3 次后与相应的辣根过氧化物酶标记的二抗共同孵育 1 h,ECL 发光,显影,定影,压片。

2.6 SOD、MDA、GSH 检测

采用比色法、TBA 法检测细胞上清液中 SOD、MDA 水平,微量酶标法检测细胞内 GSH 水平。均严格按照试剂盒说明书操作。

2.7 统计方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计分析。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 对 HMCs RAGE mRNA 的影响

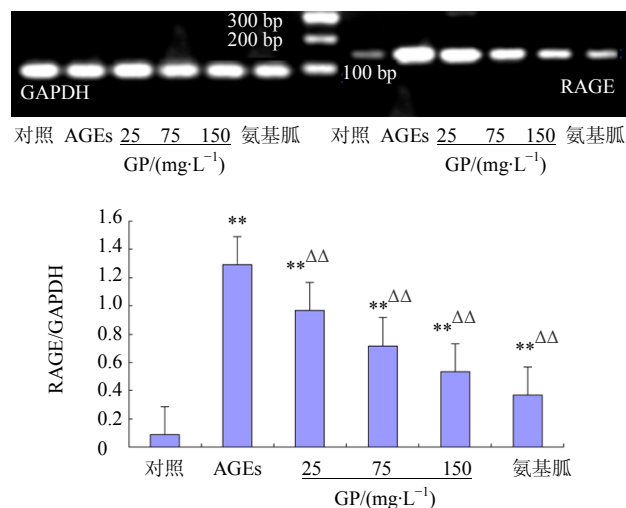
AGEs 刺激促使 HMCs 内 RAGE mRNA 高表达,与对照组比较,AGEs (200 mg/L) 诱导 HMCs 72 h 后,AGEs 组和各加药组 RAGE mRNA 表达量显著增高 ($P < 0.01$)。给予 GP 干预后,可显著下调 RAGE mRNA 表达,与 AGEs 组比较,各加药组 RAGE mRNA 表达量随 GP 剂量 (25~150 mg/L) 逐渐增加而下调,差异显著 ($P < 0.01$),并呈剂量依赖性。结果见图 1。

3.2 对 HMCs RAGE 蛋白表达的影响

AGEs 刺激促使 HMCs 内 RAGE 蛋白高表达,与对照组比较,AGEs (200 mg/L) 诱导 HMCs 72 h 后,AGEs 组和各加药组 RAGE 表达量显著增高 ($P < 0.01$)。给予 GP 干预后,可显著下调 RAGE 蛋白表达,与 AGEs 组比较,各加药组 RAGE 蛋白表达量随 GP 剂量 (25~150 mg/L) 逐渐增加而下调,并呈剂量依赖性,差异显著 ($P < 0.01$)。结果见图 2。

3.3 各组细胞上清液中 SOD、MDA 及细胞中 GSH 水平比较

AGEs 刺激可明显增加细胞上清液中 MDA 水



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 AGEs 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$, 下同
** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs AGEs group, same as below

图 1 GP 对 HMCs RAGE mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig.1 Effect of GP on expression of RAGE mRNA in HMCs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

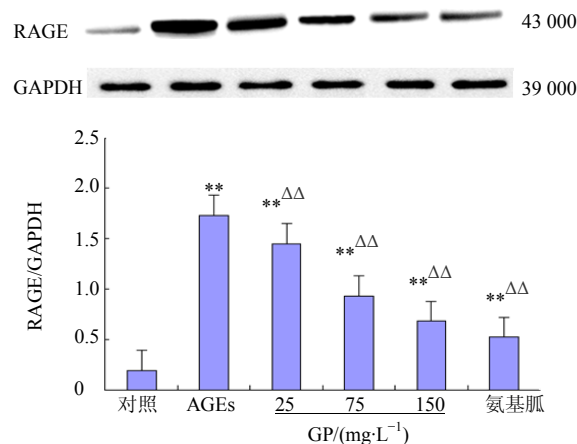


图 2 GP 对 HMCs RAGE 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 2 Effect of GP on expression levels of RAGE protein in HMCs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

平,降低上清液中 SOD 和细胞内 GSH 水平,增加细胞内氧化应激水平。与对照组相比,AGEs 组及不同剂量 GP 组 SOD、GSH 水平显著降低,MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$)。与 AGEs 组比较,各 GP 加药组 SOD、GSH 水平随着 GP 剂量 (25~150 mg/L) 逐渐增加而升高,MDA 水平下降,且呈剂量依赖性,差异显著 ($P < 0.01$)。结果见表 1。

4 讨论

DN 是糖尿病重要的微血管并发症之一,其病理改变主要表现为肾小球系膜细胞的增殖肥大、基底膜增厚及细胞外基质过度积聚,引起肾小球硬化,

表 1 各组细胞中 SOD、MDA 及 GSH 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 1 Comparison on SOD, MDA, and GSH levels in HMCs of each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/(mg·L ⁻¹)	SOD/(nmol·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	GSH/(μmol·g ⁻¹)
对照	—	78.3±8.9	1.80±0.15	6.93±0.16
AGEs	200	40.2±9.1**	5.70±0.22**	0.79±0.21**
GP	25	46.9±7.3**ΔΔ	5.16±0.12**ΔΔ	1.52±0.18**ΔΔ
	75	57.6±8.3**ΔΔ	4.79±0.25**ΔΔ	2.97±0.23**ΔΔ
	150	65.7±7.9**ΔΔ	3.56±0.31**ΔΔ	3.69±0.32**ΔΔ
氨基胍	0.1 mmol·L ⁻¹	69.1±7.5**ΔΔ	2.44±0.17**ΔΔ	4.91±0.15**ΔΔ

最终可导致 ESRD 的发生,是糖尿病患者致残、致死的主要原因。DN 的发病机制复杂,目前尚未完全阐明,近年来国内外研究均表明 AGEs 的形成及氧化应激在 DN 发生发展中发挥着重要作用。AGEs 是机体在长期的高血糖状态下葡萄糖分子可与体内蛋白质发生非酶糖基化反应形成的产物。DN 的发生发展与 AGEs 的积聚关系密切。使用免疫组化的方法可在弥漫性或结节性改变的肾小球系膜、基底膜及小管基底膜和血管壁上大量检出 AGEs^[5]。研究发现 AGEs 可独立于高血糖引起系膜细胞的增殖及细胞外基质(ECM)的聚集,促使肾小球硬化的发生^[6-7]。此外,AGEs 还可通过与其细胞表面受体 RAGE 结合,形成 AGE-RAGE 系统,通过增强氧化应激、激活核因子-κB(NF-κB)信号途径,调节下游基因表达,刺激多种细胞因子和生长因子的表达,对肾小球及肾小管间质造成不可逆转的损伤,引起肾小球硬化^[8]。

氧化应激在 DN 的进展中起着核心作用^[9]。肾脏是氧化应激的靶器官,容易受到 ROS 攻击,造成氧化损伤,引起病理反应。MDA 是脂质过氧化进而形成的产物。SOD 活力高低间接反映了机体清除氧自由基的能力。GSH 是机体内最重要的非酶性抗氧化物,其水平的多少是衡量机体抗氧化能力大小的重要因素。因而本实验测定三者水平来反映细胞氧化应激水平。

有研究发现 AGEs 可直接刺激 ROS 的产生,降低抗氧化酶如 SOD 和氢氧化物酶的活性,减少谷胱甘肽水平^[10]。本研究显示,在 AGEs 诱导下,HMCs RAGE mRNA 及蛋白表达水平明显上调,同时抗氧化指标 SOD 和 GSH 水平下降,氧化指标 MDA 水平升高。表明 AGEs 刺激能促使 HMCs 内 RAGE 高表达,增强细胞内氧化应激水平。ROS 与蛋白质游离氨基和巯基结合形成 Amadori(AGEs 的前体)产物,其进一步修饰后形成 AGEs,所形成的 AGEs 在细胞

膜上与 RAGE 结合,活化 NF-κB,进一步激活 RAGE、IL-6、IL-1、TNF-α 等基因的转录^[11-12]。由此可见,AGEs-RAGE 系统与氧化应激关系密不可分,二者相互作用。有日本学者提出 AGEs-RAGE-氧化应激轴的观点,认为其参与糖尿病血管并发症,抑制该系统可能为 DN 提供一个有前景的靶向干预措施^[13]。

绞股蓝是我国传统中药,GP 为其主要成分,在我国主要分布于秦岭及长江以南广大地区,研究表明^[14]绞股蓝具有降血糖、调血脂、抗肿瘤、抗衰老、增强免疫、镇静止痛、防治糖皮质激素不良反应、保护心脏及抗溃疡等药理作用。近年研究发现 GP 在降血糖、防治 DN 方面有显著疗效^[15]。黄平等^[16]研究表明绞股蓝颗粒可抑制 DN 状态下异常活化的局部肾素血管紧张素系统,调节 DN 大鼠血糖、血脂代谢,减少尿蛋白保护肾功能,延缓 DN 的发展。本课题组前期发现 GP 可抑制 AGEs 诱导 HMCs 过度增殖,抑制系膜增殖及细胞外基质产生和积聚,从而延缓 DN 进程^[17]。进一步研究发现,给予不同剂量 GP 干预后,可下调 AGEs 刺激后系膜细胞 RAGE 的异常高表达,同时改善细胞内氧化应激水平。推测其可能的机制是 GP 阻断了 RAGE 介导的 AGEs-RAGE-氧化应激信号通路,表现为细胞上清液中 MDA 水平减低和 SOD 水平增加及细胞内 GSH 水平增加。

综上所述,GP 改善细胞内氧化应激水平可能通过阻断 AGEs-RAGE 信号通路,为 GP 防治 DN 提供了理论依据。此外,GP 是否通过阻断 DN 其他信号通路如 NF-κB、p38MAPK 等,改善细胞内氧化应激水平从而延缓 DN 进展尚不明确,有待进一步深入的研究。仅从体外实验角度探讨 GP 对 AGEs-RAGE 信号通路和氧化应激之间的作用是本实验的局限性,本课题组拟进行动物实验进一步深入探讨。

参考文献

- [1] Yan S F, Ramasamy R, Schmidt A M. The RAGE axis: a fundamental mechanism signaling danger to the vulnerable vasculature [J]. *Circ Res*, 2010, 106(5): 842-853.
- [2] Reiniger N, Lau K, McCalla D, *et al*. Deletion of the receptor for advanced glycation end products reduces glomerulosclerosis and preserves renal function in the diabetic OVE26 mouse [J]. *Diabetes*, 2010, 59(8): 2043-2054.
- [3] 郎志芳, 董琦, 韩继成. 绞股蓝皂甙对糖尿病大鼠肾脏氧化应激影响的研究 [J]. 牡丹江医学院学报, 2005, 26(4): 5-8.
- [4] 史琳, 宋东平, 潘明佳, 等. 绞股蓝皂苷成分的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(6): 456-464.
- [5] Wendt T, Tanji N, Guo J, *et al*. Glucose, glycation, and RAGE: implications for amplification of cellular dysfunction in diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(5): 1383-1395.
- [6] Zhang M H, Feng L, Zhu M M, *et al*. The anti-inflammation effect of *Moutan Cortex* on advanced glycation end products-induced rat mesangial cells dysfunction and high-glucose-fat diet and streptozotocin-induced diabetic nephropathy rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1): 591-596.
- [7] 侯绍章, 郑芳芳, 李媛, 等. 甘草酸对 AGEs 培养肾小球系膜细胞及 ECM 表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(5): 642-645.
- [8] Alexiou P, Chatzopoulou M, Pegklidou K, *et al*. RAGE: a multi-ligand receptor unveiling novel insights in health and disease [J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17(21): 2232-2252.
- [9] Arora M K, Singh U K. Oxidative stress: meeting multiple targets pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. *Curr Drug Targets*, 2014, 15(5): 531-538.
- [10] 姚美芬, 沈建国. AGE-RAGE 系统及氧化应激与糖尿病肾病 [J]. 国际泌尿系统杂志, 2008, 28(4): 524-527.
- [11] Morcos M, Schlotterer A, Sayed A A, *et al*. Rosiglitazone reduces angiotensin II and advanced glycation end product-dependent sustained nuclear factor-kappaB activation in cultured human proximal tubular epithelial cells [J]. *Horm Metab Res*, 2008, 40(11): 752-759.
- [12] Al-Malki A L. Oat attenuation of hyperglycemia-induced retinal oxidative stress and NF- κ B activation in Streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 983923.
- [13] Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T, *et al*. Agents that block advanced glycation end product (AGE)-RAGE (receptor for AGEs)-oxidative stress system: a novel therapeutic strategy for diabetic vascular complications [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2008, 17(7): 983-996.
- [14] 朴香兰, 吴倩. 绞股蓝研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(7): 1758-1760.
- [15] 陈丹, 黄平. 绞股蓝防治糖尿病肾病研究 [J]. 吉林中医药, 2011, 31(7): 686-687.
- [16] 黄平, 钱康. 绞股蓝颗粒对早期糖尿病肾病肾脏肾素-血管紧张素系统的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(3): 434-439.
- [17] 周康, 唐灵, 肖福英, 等. 绞股蓝皂苷对 AGEs 诱导人肾小球系膜细胞增殖及其 TGF- β 1、FN mRNA 表达的影响 [J]. 山东医药, 2014, 54(47): 9-12.