

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.20.002

GLO I 敲减对 AGEs 诱导人肾小球系膜细胞氧化应激的影响*

徐 莹,李 春,操 轩[△]
(湖北理工学院附属医院/湖北省黄石市中心医院肾内科 435000)

[摘要] **目的** 分析乙二醛酶 I (GLO I) 敲减对晚期糖基化终末产物(AGEs)诱导人肾小球系膜细胞(HRMCs)氧化应激的影响,并探讨其可能机制。**方法** 利用酶联免疫吸附试验(ELISA)分析糖尿病肾病(DN)患者尿液中 GLO I 的水平;小干扰 RNA(siRNA)对 HRMCs 中 GLO I 进行敲减,Western blot 验证敲减效果;H2DCFDA 荧光探针标记法检测细胞内 ROS 活性;Q-PCR 和 Western blot 检测 P22phox 表达;Western blot 检测 PI3K/AKT 信号蛋白和 p38 信号蛋白的活化。**结果** 与对照组(健康个体)相比,GLO I 在 DN 患者尿液中水平降低;GLO I 敲减可导致 AGEs 诱导的细胞 ROS 活性进一步增加,P22phox 基因和蛋白表达进一步增加,以及 AKT 和 p38 的磷酸化进一步增加。**结论** GLO I 敲减可使 AGEs 诱导的 HRMCs 氧化应激进一步增强,这可能与进一步上调 PI3K/AKT 和 p38 信号通路活性有关。

[关键词] 乙二醛酶 I;糖尿病肾病;氧化应激
[中图法分类号] R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)20-3427-04

Effect of knockdown of GLO I on AGEs-induced oxidative stress of human renal mesangial cells*
XU Ying ,LI Chun ,CAO Xuan[△]
(Department of Nephrology,Affiliated Hospital/Huangshi Municipal Central Hospital ,
Hubei Institute of Science and Technology ,Huangshi ,Hubei 435000,China)

[Abstract] **Objective** To analyze the effect of glyoxalase I (GLO I) knockdown on AGEs-induced oxidative stress of human renal mesangial cells,and to probe its possible mechanism. **Methods** The urine GLO I level in the patients with diabetes nephrosis (DN) was detected by ELISA. The knockdown of GLO I in HRMCs was conducted by RNA interference (RNAi) and its effect was validated by Western blot. The intracellular ROS activity was analyzed by H2DCFDA fluorescence probe labeling assay. The expression of P22phox was determined by Q-PCR and Western blot. The activation of PI3K/AKT signal and p38 signal was analyzed by Western blot. **Results** Compared with the control group,the level of urine GLO I in the DN patients was decreased. GLO I knockdown further increased AGEs-induced cellular ROS activity of HRMCs, further enhanced AGEs-induced P22phox gene and protein expression,and further increased the phosphorylation of AKT and p38. **Conclusion** GLO I Knockdown of GLO I can increase AGEs-induced oxidative stress of HRMCs,which is possibly related with further activating PI3K/AKT and p38 signal activity.

[Key words] glyoxalase I ;diabetes nephrosis;oxidative stress

糖尿病肾病(diabetes nephrosis,DN)是由糖尿病引起的肾脏损害,是糖尿病患者死亡的主要原因之一。DN 的发病机制非常复杂,涉及的因素也很多,目前研究发现代谢紊乱、肾素-血管紧张素-醛固酮系统的异常激活和氧化应激等均与 DN 的发生、发展有一定关系。氧化应激与 DN 关系极为密切,高浓度的葡萄糖可引起氧化应激^[1];同时,过量的糖可与长寿命的蛋白质(如胶原)结合,形成稳定的晚期糖基化终末产物(advanced glycationend products,AGEs),AGEs 随之可引起氧化应激^[2]。肾小球系膜细胞(renal mesangial cells,RMCs)是肾小球的固有细胞之一,可控制肾小球血流,并对肾小球毛细血管起支架和保护作用。糖尿病时,AGEs 的加速形成和累积可促进肾小球系膜细胞的氧化应激损伤,随后肾小球系膜扩张,发生肾小球硬化,逐渐演变为 DN^[3-4]。

乙二醛酶 I (glyoxalase I ,GLO I)是人体内主

* 基金项目:湖北省自然科学基金项目(2013CFC058)。 作者简介:徐莹(1985—),主治医师,硕士,主要从事肾脏疾病及血液净化方面的研究。 [△] 通信作者,E-mail:jingtian002@yeah.net。

要的 α 羧基醛解毒酶,其主要作用为催化甲基乙二醛(MG)转化为乳酸,从而减少 AGEs 生成,起到对 AGEs 的解毒作用。GLO I 与糖尿病的视网膜损伤、大血管损伤和周围神经病变等有关^[5-7]。但目前关于 GLO I 在 DN 中的具体作用及分子机制的研究并不深入。基于此,本文首先检测了 DN 患者尿液中 GLO I 水平的变化,随后分析 GLO I 敲减对 AGEs 所诱导的人肾小球系膜细胞(human renal mesangial cells,HRMCs)氧化应激的影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人肾小球系膜细胞 HRMCs 购自美国 Scien Cell 研究实验室,培养于 DMEM 培养基[含 10%胎牛血清(FBS)、100 U/mL 青霉素和 100 μ g / mL 链霉素];FBS 购自以色列 BI 公司;AGEs 购自英国 Abcam 公司;RNA 提取试剂 Trizol 和转染试剂脂质体 Lipofectamine 2000 购自美国 Thermo Fisher 公司;H2DCFDA 试剂盒购自上海碧云天公司;P22phox 和 GAPDH 引物购自上海生工生物工程股份有限公司;定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction,Q-PCR)试剂盒购自日本 Takara 公司;总 p38 抗体、磷酸化 p38 (p-p38) 抗体、总 AKT 抗体、AKT 308 位苏氨酸磷酸化(308Thr)抗体,AKT 473 位丝氨酸磷酸化(473Ser)抗体、内参 β -actin 抗体、HRP 标记的二抗均购自美国 CST 公司;P22phox 抗体购自英国 Abcam 公司;GLO I 小干扰 RNA (siRNA)序列由江苏库美生物设计合成;ECL 化学发光试剂购自美国 Pierce 公司。

1.2 尿液标本收集 参与研究的 2 型糖尿病患者选自湖北省黄石市中心医院住院患者,在收集尿样之前患者均已知情同意。样本分类根据糖尿病患者的临床特征,共分为 4 个研究亚组:C 组(对照组)为无糖尿病的健康个体,共 35 例;DM 组为无糖尿病肾病的 2 型糖尿病患者,共 34 例,其尿清蛋白/肌酐比值(ACR)<30 mg/g;DN low 组为有微量蛋白尿(ACR 30~300 mg/g)的 2 型糖尿病肾病患者,共 18 例;DN high 组为有大量蛋白尿(ACR>300 mg/g)的 2 型糖尿病肾病患者,共 22 例。

1.3 尿液 GLO I 水平检测 GLO I 水平采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法(德国默克)测定,检测仪器为美国 Biorad 公司 iMARK 680 酶标仪。

1.4 脂质体转染 接种 HRMCs 于 24 孔板或 6 孔板中,无双抗培养基培养,待细胞密度达 70%左右,弃去培养基,每孔加入无血清无双抗培养基 200 μ L 或 500 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。24 孔板每孔加入 5 μ g siRNA、5 μ L Lipofectamine 2000 和 90 μ L 无血清无双抗培养基,6 孔板每孔加入 15 μ g siRNA、15 μ L Li-

pofectamine 2000 和 470 μ L 无血清无双抗培养基,37 $^{\circ}$ C 孵育 5 h 后更换为完全培养基,经相应处理后进行后续检测。

1.5 ROS 活性检测(H2DCFDA 荧光探针标记法) HRMCs 接种于 96 孔板内,不同处理因素处理 8 h 后,弃去细胞上清液,加入 200 μ L H2DCFDA 探针(浓度为 10 μ mol / L),37 $^{\circ}$ C 避光环境下继续孵育 20 min,荧光显微镜下检测细胞内 ROS 变化并成像记录。

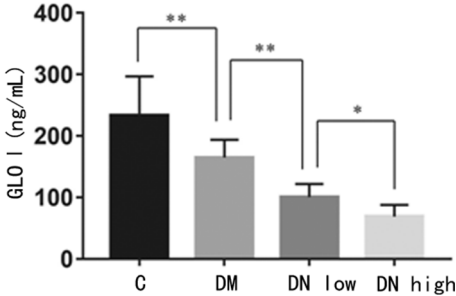
1.6 Q-PCR Trizol 法提取细胞总 RNA,经逆转录合成 cDNA。随后以 cDNA 为模板进行 Q-PCR 扩增反应,反应体系为 10 μ L:上、下游引物各 0.4 μ L、ddH₂O 3.2 μ L、SYBR Green 5.0 μ L、cDNA 1.0 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 3 min;95 $^{\circ}$ C 20 s,66 $^{\circ}$ C 10 s,3 次循环;95 $^{\circ}$ C 10 s,55 $^{\circ}$ C 15 s,70 $^{\circ}$ C 1 s,39 次循环,延伸末尾采集荧光;65~95 $^{\circ}$ C 溶解曲线分析,计算目的基因表达水平。

1.7 Western blot HRMCs 经不同处理因素处理 48 h 后,蛋白裂解液裂解细胞,提取总蛋白,经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,电转移至聚二偏氟乙烯(PVDF)膜上,在含 5%牛血清清蛋白(BSA)的 TBST 中封闭 1 h,加入一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,加入相应 HRP 标记的二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,最后进行 ECL 显影分析。

1.8 统计学处理 用 SPSS17.0 软件包进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 GLO I 检测 经 ELISA 检测,与 C 组比较,DM 组、DN low 组、DN high 组患者尿液中 GLO I 水平逐渐下降,其差异有统计学意义(图 1)。



** : $P < 0.01$, * : $P < 0.05$
图 1 4 组人群尿液 GLO I 水平检测(ELISA)

2.2 利用 siRNA 对 HRMCs 中 GLO I 进行有效敲减 为了分析和确认 GLO I 在 DN 中的作用,笔者选取肾小球系膜细胞 HRMCs,设计了 3 条针对 GLO I 的 siRNA(分别命名为 siGLO I-1、siGLO I-2 和 siGLO I-3),根据转染的 siRNA 将细胞分为:Blank 组

(未作任何处理)、NC 组(转染无意义 siRNA)、siGLO-1 组(转染 siGLO I-1)、siGLO-2 组(转染 siGLO I-2)、siGLO-3 组(转染 siGLO I-3)。结果发现:3 条 siRNA 均可实现对 HRMCs 中 GLO I 的敲减,其中以 siGLO I-3 的敲减效果最为明显(图 2)。因此,后续实验均选用 siGLO I-3。

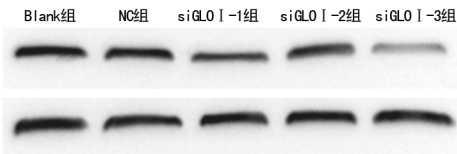


图 2 Western blot 验证 siRNA 对 GLO I 敲除效果

2.3 GLO I 敲减可进一步增强 AGEs 所诱导的 HRMCs 细胞内 ROS 活性 H2DCFDA 荧光探针标记检测发现:与 Blank 组比较,200 μg/mL 的 AGEs (AGEs 组)可导致 HRMCs 细胞氧化应激增加,HRMCs 细胞内 ROS 活性上升。而与 AGEs 组比较,siGLO I (AGE+siGLO I 3)则可进一步增强由 AGEs 所诱导的 HRMCs 细胞内 ROS 活性(图 3)。

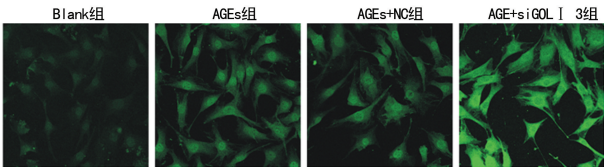
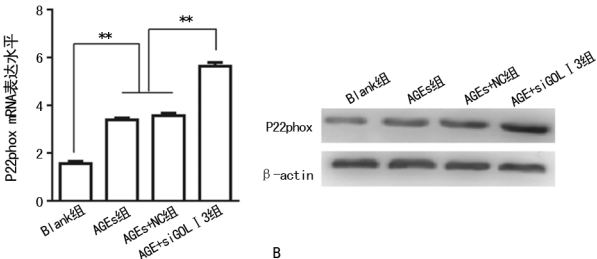


图 3 GLO I 敲减对 HRMCs 细胞内 ROS 活性的影响

2.4 GLO I 敲减可促进 AGEs 所诱导的 P22phox 表达 Q-PCR 和 Western blot 检测均发现:与 Blank 组比较,200 μg/mL 的 AGEs (AGEs 组)可诱导 P22phox 的表达,而 GLO I 敲减(AGE+siGLO I 3 组)可使 AGEs 所诱导的 P22phox mRNA 和蛋白表达均进一步增加(图 4)。结合 ROS 活性检测结果可知,GLO I 敲减可促进 AGEs 所诱导的 HRMCs 细胞氧化应激。



A:GLO I 敲减对 AGEs 作用下细胞 P22phox mRNA 表达的影响(Q-PCR, * : $P<0.01$);B:GLO I 敲减对 AGEs 作用下细胞 P22phox 蛋白表达的影响(Western blot)

图 4 GLO I 敲减对 AGEs 作用下 HRMCs 细胞 P22phox 的影响

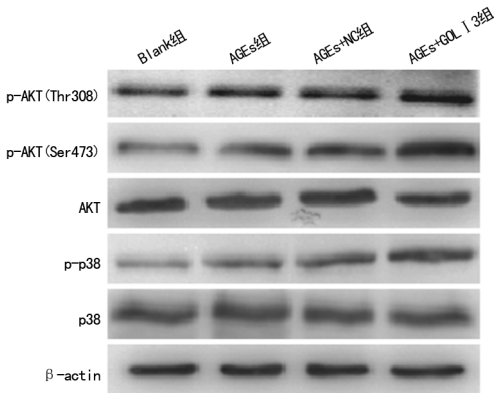


图 5 GLO I 敲减对 AGEs 诱导的 AKT 信号和 p38 信号蛋白的影响

2.5 GLO I 敲减可促进 AGEs 所诱导的 PI3K/AKT 信号和 p38 信号蛋白的活化 本研究利用 Western blot 检测了 GLO I 敲减对 AGEs 诱导的 PI3K/AKT 信号和 p38 信号的影响,结果发现:与 AGEs 组比较,GLO I 敲减可使 AGEs 诱导的 AKT 磷酸化和 p38 磷酸化进一步增加(图 5)。

3 讨 论

氧化应激是指机体在内源性或外源性有害因素的刺激下,体内高活性分子如 ROS 等产生过多,体内的抗氧化和氧化两大系统平衡失调,机体更加倾向于氧化,并最终导致组织及细胞损伤。氧化应激使机体处于高度易损状态,持续的氧化应激与多种疾病如高血压、溃疡性结肠炎、脑缺血再灌注损伤、阿尔海默茨症、肿瘤等密切相关^[8-13]。氧化应激在 DN 的发生、发展中也起着重要作用,葡萄糖本身可诱发氧化应激,葡萄糖与长寿命的蛋白质结合所形成的晚期糖基化终末产物(AGEs)也是诱发氧化应激的重要因素。当血糖正常时,AGEs 形成非常缓慢。在长期的高血糖糖化反应的作用下,引起原本形成非常缓慢的 AGEs 的加速形成和累积。AGEs 与糖尿病慢性并发症有关,也与其他疾病如衰老、老年痴呆等有相关性^[14-15]。AGEs 水平的上升也会导致肾小球系膜细胞的氧化应激,引起肾小球正常滤过功能的缺失,最终导致糖尿病肾病的发生、发展^[3-4]。

GLO I 作为甲基乙二醛(methylglyoxal, MG)最重要的降解酶之一,可降低作为非酶糖化反应中间体 MG 的含量,从而减少非酶糖化蛋白如 AGEs 的生成,可保护机体免受 AGEs 所致的慢性损伤。研究证实,在人体内皮细胞中过表达 GLO I 可逆转高糖所诱导血管生成减少和 AGEs 的累积^[16],GLO I 对高糖所致的神经损伤也具有保护作用^[17]。在 GLO I 转基因大鼠中,GLO I 对高糖诱导的肾脏损伤有明显保护作用,大鼠的各种肾损伤指标均明显降低^[18]。反

之,在非糖尿病大鼠中敲除 GLO I 基因后,会使大鼠肾脏表现出与 DN 相似的病理表现^[19],由此提示 GLO I 表达水平的改变与 DN 的发生密切相关。本研究则进一步表明:GLO I 在 DN 患者尿液中含量降低,同时在人肾小球系膜细胞 HRMCs 中,GLO I 敲减会增加 AGEs 作用下的细胞氧化应激,在机制研究中,则证明 PI3K/AKT 和 p38 信号途径与之相关,因此,GLO I 的确可能是与 DN 相关的重要分子。

总之,本研究表明 GLO I 的降低可以引起肾小球系膜细胞 HRMCs 的氧化应激,这可能是导致 DN 发生的关键原因之一。GLO I 可作为 DN 发生和治疗的潜在新靶点,用于 DN 的早期诊断和病情评估,但目前对于 GLO I 在 DN 中具体作用并未完全明确。虽然本研究证实了 GLO I 可影响 PI3K/AKT 信号和 p38 信号蛋白,但是 GLO I 导致 HRMCs 细胞氧化应激的机制远远没有阐明,后续将进一步分析 DN 患者血液和尿液 GLO I 的变化,并探讨 GLO I 与其他信号蛋白 ERK1/2 等的关系,以便为深入解析 GLO I 在 DN 中的作用奠定基础。

参考文献

- [1] BACEVIC M,BRKOVIC B,ALBERT A,et al. Does oxidative stress play a role in altered characteristics of diabetic bone? A systematic review[J]. *Calcif Tissue Int*, 2017,101(6):553-563.
- [2] YAMAGISHI S I,MAEDA S,MATSUI T,et al. Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes[J]. *Biochim Biophys Acta*,2012,1820(5):663-671.
- [3] YUAN Y,SUN H,SUN Z L. Advanced glycation end products (AGEs) increase renal lipid accumulation; a pathogenic factor of diabetic nephropathy (DN)[J]. *Lipids Health Dis*,2017,16(1):126.
- [4] ZHOU X E,WANG B C,ZHU L C,et al. A novel improved therapy strategy for diabetic nephropathy targeting AGEs[J]. *Organogenesis*,2012,8(1):18-21.
- [5] BERNER A K,BROUWERS O,PRINGLE R,et al. Protection against methylglyoxal-derived AGEs by regulation of glyoxalase 1 prevents retinal neuroglial and vasodegenerative pathology[J]. *Diabetologia*,2012,55(3):845-854.
- [6] WORTMANN M,PETERS A S,HAKIMI M,et al. Glyoxalase I (Glo1) and its metabolites in vascular disease[J]. *Biochem Soc Trans*,2014,42(2):528-533.
- [7] JACK M,WRIGHT D. Role of advanced glycation end-products and glyoxalase I in diabetic peripheral sensory neuropathy[J]. *Trans Res*,2012,159(5):355-365.
- [8] HUANG X,SUN M,LI D,et al. Augmented NADPH oxidase activity and p22phox expression in monocytes underlie oxidative stress of patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Diabetes Res Clin Pract*,2011,91(3):371-380.
- [9] SINHA N,DABLA P K. Oxidative stress and antioxidants in hypertension-a current review[J]. *Curr Hypertens Rev*,2015,11(2):132-142.
- [10] WANG Z,LI S,CAO Y,et al. Oxidative stress and carbonyl lesions in ulcerative colitis and associated colorectal cancer[J]. *Oxid Med Cell Longe*,2016:9875298.
- [11] CHENG Y Y,RONG J H. Therapeutic potential of Heme oxygenase-1/Carbon monoxide system against Ischemia-Reperfusion injury[J]. *Curr Pharm Des*,2017,23(26):3884-3898.
- [12] YOUSSEF P,CHAMI B,LIM J,et al. Evidence supporting oxidative stress in a moderately affected area of the brain in Alzheimer's disease[J]. *Sci Rep*,2018,8(1):11553.
- [13] GILL J G,PISKOUNOVA E,MORRISON S J. Cancer, oxidative stress, and metastasis[J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*,2016(81):163-175.
- [14] ROWAN S,BEJARANO E,TAYLOR A. Mechanistic targeting of advanced glycation end-products in age-related diseases[J]. *B B A*,2018,1864(12):3631-3643.
- [15] DRENT H,SU ZUI,KRIJNEN W P,et al. Association between advanced glycation end-products and functional performance in Alzheimer's disease and mixed dementia[J]. *Int Psychogeriatr*,2017,29(9):1525-1534.
- [16] AHMED U,DOBLER D,LARKIN S J,et al. Reversal of hyperglycemia-induced angiogenesis deficit of human endothelial cells by overexpression of glyoxalase 1 in vitro[J]. *Ann N Y Acad Sci*,2008(1126):262-264.
- [17] JACK M M,RYALS J M,WRIGHT D E. Protection from diabetes-induced peripheral sensory neuropathy--a role for elevated glyoxalase I [J]. *Exp Neurol*,2012,234(1):62-69.
- [18] BROUWERS O,NIESSEN P M,MIYATA T,et al. Glyoxalase-1 overexpression reduces endothelial dysfunction and attenuates early renal impairment in a rat model of diabetes[J]. *Diabetologia*,2014,57(1):224-235.
- [19] GIACCO F,DU X L,D'AGATI V D,et al. Knockdown of glyoxalase 1 mimics diabetic nephropathy in nondiabetic mice[J]. *Diabetes*,2014,63(1):291-299.

(收稿日期:2019-02-02 修回日期:2019-06-29)