

## 论 著

必需脂肪酸经 MCP-1/TGF- $\beta_1$ /COL-I 通路  
对糖损伤人肾小管上皮细胞的作用姜明霞<sup>1</sup>, 王 宇<sup>1</sup>, 吕桂兰<sup>2</sup>, 周轶南<sup>1</sup>,董杏媛<sup>1</sup>, 许 琦<sup>1</sup>, 郑锦锋<sup>1</sup>(中国人民解放军东部战区总医院, 1. 营养科,  
2. 国家肾脏疾病临床医学研究中心, 江苏 南京, 210002)

**摘要:** 目的 探讨必需脂肪酸经单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)/转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )/I 型胶原蛋白 (COL-I) 信号通路对高浓度葡萄糖诱导的人肾小管上皮细胞 (HK-2) 的作用和机制。方法 通过四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法建立糖损伤 HK-2 细胞模型, 采用不同浓度  $\alpha$ -亚麻酸 (ALA)/亚油酸 (LA) 干预后, 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定糖损伤 HK-2 细胞上清液 MCP-1、TGF- $\beta_1$  和 COL-I 的蛋白表达量, 采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 测定糖损伤 HK-2 细胞 MCP-1、TGF- $\beta_1$  和 COL-I mRNA 的表达。结果 给予糖损伤 HK-2 细胞 50  $\mu\text{mol/L}$  ALA、LA 以及终浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$ 、比例 1:4 的 ALA/LA 混合液干预 48 h 后, MCP-1 mRNA 和 MCP-1 蛋白表达量降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 给予糖损伤细胞 100  $\mu\text{mol/L}$  ALA 和 LA 作用 48 h 后, TGF- $\beta_1$  mRNA 和 TGF- $\beta_1$  蛋白表达量降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 给予糖损伤 HK-2 细胞 100  $\mu\text{mol/L}$  ALA、50  $\mu\text{mol/L}$  LA 以及终浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$ 、比例为 1:4 的 ALA/LA 混合液干预 48 h 后, COL-I mRNA 和 COL-I 蛋白表达量降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 高糖对 HK-2 细胞产生损伤作用, 可表现为细胞因子 MCP-1、TGF- $\beta_1$  表达水平升高以及纤维化产物 COL-I 表达增加。ALA/LA 可通过下调 MCP-1 和 TGF- $\beta_1$  的表达, 降低 COL-I 水平, 起到保护糖损伤 HK-2 细胞的作用。

**关键词:**  $\alpha$ -亚麻酸/亚油酸; 人肾小管上皮细胞; 糖尿病肾病; 单核细胞趋化蛋白-1; 转化生长因子  $\beta_1$ ; I 型胶原蛋白  
中图分类号: R 151.4; Q 813 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2022)13-001-06 DOI: 10.7619/jcmp.20220397

Effect of essential fatty acids by MCP-1/TGF- $\beta_1$ /COL-I  
pathways for human kidney 2 cells with sugar damageJIANG Mingxia<sup>1</sup>, WANG Yu<sup>1</sup>, LYU Guilan<sup>2</sup>, ZHOU Yinan<sup>1</sup>,  
DONG Xingyuan<sup>1</sup>, XU Qi<sup>1</sup>, ZHENG Jinfeng<sup>1</sup>(1. Department of Nutrition, 2. National Clinical Research Center for Kidney Disease, General Hospital  
of East Theatre Command of Chinese People's Liberation Army, Nanjing, Jiangsu, 210002)

**Abstract: Objective** To study the effect and mechanism of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)/transforming growth factor beta1 (TGF- $\beta_1$ )/collagen-I (COL-I) pathways for human kidney 2 (HK-2) cells induced by high glucose. **Methods** Methyl Thiazolyl Tetrazolium (MTT) method was used to establish HK-2 cell model damaged by sugar. The protein expression levels of MCP-1, TGF- $\beta_1$  and COL-I in supernatant of HK-2 cells were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the expressions of MCP-1, TGF- $\beta_1$  and COL-I mRNA in HK-2 cells were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) after treatment with different concentrations of alpha linolenic acid (ALA)/linoleic acid (LA). **Results** After 48 h intervention in HK-2 cells induced by glucose were treated with 50  $\mu\text{mol/L}$  ALA and LA and 50  $\mu\text{mol/L}$  mixture of ALA/LA with the ratio of 1 to 4, the expression levels of MCP-1 mRNA and MCP-1 protein were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). After HK-2 cells induced by glucose and treated with 100  $\mu\text{mol/L}$  ALA and LA for 48 h, TGF- $\beta_1$  mRNA and TGF- $\beta_1$  protein expression were significantly decreased

( $P < 0.05$ )。After HK-2 cells induced by glucose and treated with 100  $\mu\text{mol/L}$  ALA, 50  $\mu\text{mol/L}$  LA and 50  $\mu\text{mol/L}$  mixture of ALA/LA with the ratio of 1 : 4 for 48 h, the expression of COL-1 mRNA and COL-1 protein were significantly decreased ( $P < 0.05$ )。 **Conclusion** HK-2 cells are damaged by high glucose, manifesting as increased expression of cytokines MCP-1 and TGF- $\beta_1$ , and increased expression of fibrosis product COL-1. ALA/LA can down-regulate the expression of MCP-1 and TGF- $\beta_1$ , reduce the level of COL-1, and protect HK-2 cells damaged by glucose.

**Key words:** alpha linolenic acid/linoleic acid; human renal tubular epithelial cell; diabetic kidney disease; monocyte chemoattractant protein-1; transforming growth factor  $\beta_1$ ; collagen type I

糖尿病肾病(DKD)的发病机制复杂,至今尚未完全阐明,可能与遗传易感性、糖代谢紊乱、细胞因子、炎症机制等多种因素有关。单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)是DKD重要的生物学标志物,其引起的炎症反应可引起肾血管损伤、肾基质纤维化以及肾组织结构重建<sup>[1]</sup>。转化生长因子 $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )是一种调节细胞生长和分化的蛋白,可在多种细胞中表达,参与细胞外基质沉淀及纤维化的发生,包括I型胶原蛋白(COL-I)和纤维连接蛋白。MCP-1能够活化糖尿病高糖状态下的肾脏巨噬细胞,增加TGF- $\beta_1$ 分泌,并组成MCP-1/TGF- $\beta_1$ 通路参与DKD的发生<sup>[2-3]</sup>。除了肾小球的结构和功能变化之外,肾小管和肾小管间质的损伤和炎症也参与DKD的发展<sup>[4-5]</sup>。肾小管上皮细胞被认为是促进炎症、肾小管变性和纤维化的介质<sup>[6]</sup>。因此,本研究选用HK-2细胞作为实验对象,通过高糖作用建立糖损伤肾小管的体外模型,观察必需脂肪酸 $\alpha$ -亚麻酸(ALA)/亚油酸(LA)对肾小管损伤的作用和效果。

ALA和LA是人体必需脂肪酸,具有多种多样的生理功能。本课题组前期研究<sup>[7-8]</sup>结果证明,ALA/LA可改善HK-2细胞的糖毒性和氧化应激作用,但对于MCP-1/TGF- $\beta_1$ 介导的肾纤维化损伤尚无研究。本研究旨在观察ALA/LA对高糖损伤HK-2细胞MCP-1、TGF- $\beta_1$ 和COL-1表达的影响,探讨ALA/LA通过该信号通路保护DKD患者肾脏的功能和结构,减缓肾脏炎症状态及纤维化的发生发展的相关作用机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

ALA、LA和二十碳五烯酸(EPA)购自美国Nuchek公司;成人肾脏近曲小管上皮细胞(HK-2)购自美国标准菌种收藏中心(ATCC);胎牛血清、DMEM/F12液体培养基、胰蛋白酶购自Gibco

公司;二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑盐(MTT)购自Sigma公司;牛血清白蛋白(BSA)购自Amersco公司;葡萄糖和NaOH均为国产分析纯试剂。Trizol试剂盒购自Invitrogen公司,逆转录试剂盒购自Thermo公司,RNA酶抑制剂购自Fermentas公司,聚合酶链反应(PCR)引物由上海生工生物有限公司合成,人MCP-1、TGF- $\beta_1$ 和COL-1酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒均购自凯基生物科技发展有限公司。仪器:CO<sub>2</sub>细胞培养箱(美国Thermo公司),酶标仪(美国Bio-Rad公司),THZ-C恒温震荡器(北京佳源兴业科技有限公司),倒置荧光显微镜(日本OLYMPUS公司),温控水浴箱(金坛科兴仪器厂),722型分光光度计(上海第三分析仪器厂),低温高速离心机、台式高速离心机(Eppendorf),制冰机(AF-100, Scotsman); -80℃冰箱(美国Revco)。

### 1.2 方 法

1.2.1 ALA/LA/BSA溶液制备:参照COUSIN S P等<sup>[9]</sup>方法,将ALA、LA制成5 mmol/L ALA/LA/BSA储存液,冷却至室温,无菌过滤(0.45  $\mu\text{m}$ ),分装储存, -20℃保存。每次实验前取出ALA/LA/BSA储存液,于55℃水浴中加热15 min后,冷却至室温备用。

1.2.2 HK-2细胞培养:HK-2细胞接种于含100 U/mL青霉素、100  $\mu\text{g/mL}$ 链霉素、10%胎牛血清的DMEM/F12(1:1)完全培养基中,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养。

1.2.3 葡萄糖毒性测定:取对数生长期细胞接种于96孔培养板,每孔100  $\mu\text{L}$ (含 $5 \times 10^3$ 个细胞)。待细胞贴壁后,吸去原培养液,加入不同浓度葡萄糖溶液(17.5、30.1、35.1、40.2、48.7、56.5、64.3 mmol/L),培养48 h后,吸去培养液,加入MTT溶液,37℃孵育4 h,弃上清,加入DMSO,室温避光置摇床低速震荡10 min,用酶标仪测定490 nm处光密度(OD)值,计算细胞存活率<sup>[5]</sup>。

存活率 = (实验组 OD - 对照组 OD) × 100%。

1.2.4 实验分组: 本实验中将细胞分为 6 组。

① 正常对照组(N组): HK-2 细胞正常生长于 DMEM/F12 培养液; ② 高糖模型组(G组): HK-2 细胞在 DMEM/F12 培养液基础上加入高浓度葡萄糖共同培养; ③ 阳性对照组(E组): EPA 作为阳性对照物, 该组 HK-2 细胞在高糖环境下, 给予 10、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$  共 4 种浓度 EPA 分别进行干预; ④ ALA 组(A组): 该组 HK-2 细胞在高糖环境下, 给予 10、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$  共 4 种浓度 ALA 分别进行干预; ⑤ LA 组(L组): 该组 HK-2 细胞在高糖环境下, 给予 10、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$  共 4 种浓度 LA 分别进行干预; ⑥ ALA/LA 组(M组): 该组 HK-2 细胞在高糖环境下, 给予 ALA/LA 混合液分别干预, ALA/LA 浓度为 50、100  $\mu\text{mol/L}$ , 比例分别是 1:1、1:4、1:8。

1.2.5 ELISA 测定 HK-2 细胞上清中 TGF- $\beta_1$ 、MCP-1 和 COL-I 含量: HK-2 细胞经高糖培养以及 ALA/LA 干预后, 分离获得细胞上清液, 按照相应指标 ELISA 试剂盒的说明书进行操作, 采用酶标仪测定 OD 值, 计算 TGF- $\beta_1$ 、MCP-1 和 COL-I 表达量。

1.2.6 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)测定 HK-2 细胞 TGF- $\beta_1$ 、MCP-1 和 COL-I mRNA 的表达: 收集各组细胞, 采用 Trizol 试剂盒提取细胞 TGF- $\beta_1$ 、MCP-1 和 COL-I 总 RNA, 方法按照试剂盒说明书进行。PCR 扩增引物根据 GenBank 中相应基因序列设计, 引物序列: MCP-1-F 为 5'-TATTGTCCACTGACCCC-3', MCP-1-R 为 5'-CTTCACCCAACCTCTA-3'; TGF- $\beta_1$ -F 为 5'-AGCTGTACATTGACTTCCGCAAGG-3', TGF- $\beta_1$ -R 为 5'-CAGGCAGAAGTTGGCCTGCTAG-3'; COL-I-F 为 5'-TAGGTAGGCCATTGTGTATGCAGC-3', COL-I-R 为 5'-ACATGTTTCAGCTTTGTGGCC-3';  $\beta$ -actin-F 为 CC TAAAAGCCACCCCACTTC,  $\beta$ -actin-R 为 AGGGAGACCAAAAAGCCTTCA。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据分析, 计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 高浓度葡萄糖对 HK-2 细胞的作用

根据 MTT 实验结果, 与 17.5 mmol/L 浓度相比, 葡萄糖浓度从 40.2 mmol/L 开始, 细胞的存活

率受到抑制, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 在 40.2 ~ 60.4 mmol/L 范围内, 葡萄糖浓度与 HK-2 细胞存活率呈负相关( $r = -0.91$ ,  $P < 0.05$ )。60.4 mmol/L 浓度时, HK-2 细胞的存活率最低(图 1)。结合文献和课题组前期实验<sup>[5,7]</sup>结果, 本研究采用葡萄糖浓度 40.2 mmol/L、培养 48 h 作为 HK-2 细胞的高糖损伤条件。

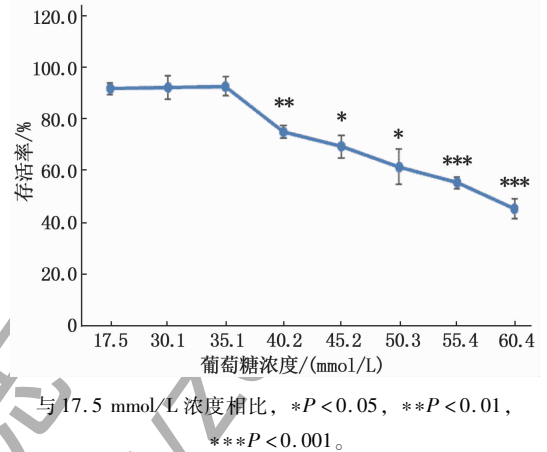


图 1 不同浓度葡萄糖对 HK-2 细胞活力的影响(48 h)

### 2.2 ALA/LA 降低糖损伤 HK-2 细胞的 MCP-1 水平

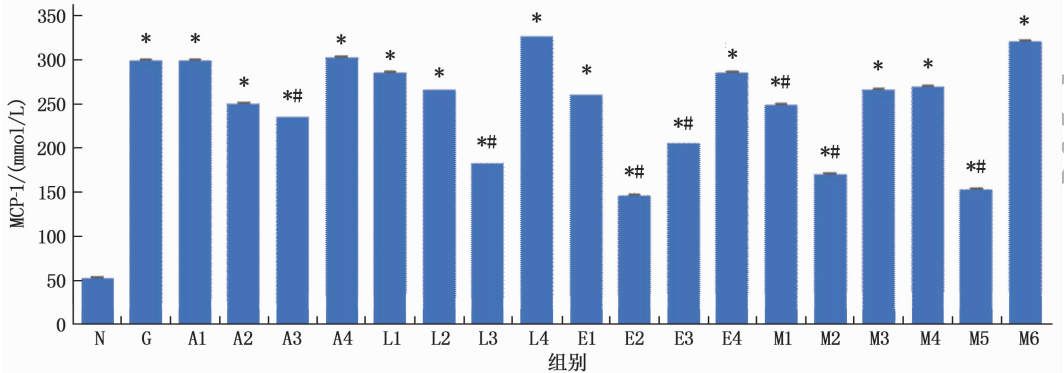
经高糖培养后, 与正常对照组相比, HK-2 细胞上清液 MCP-1 水平升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。给予糖损伤 HK-2 细胞 100  $\mu\text{mol/L}$  ALA 和 LA (A3 组、L3 组), 50、100  $\mu\text{mol/L}$  EPA (E2 组、E3 组) 干预 48 h 后, 细胞上清液 MCP-1 含量较高糖模型组降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 给予 HK-2 细胞终浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$  和 100  $\mu\text{mol/L}$ , 且比例为 1:4 的 ALA/LA 混合液 (M2 组、M5 组) 作用 48 h 后, 干预组 HK-2 细胞上清液 MCP-1 含量低于高糖模型组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。其中, 干预浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$ , 比例为 1:4 的 ALA/LA 混合液 (M5 组) 的干预效果最佳。见图 2。

### 2.3 ALA/LA 降低糖损伤 HK-2 细胞的 TGF- $\beta_1$ 水平

高糖培养后, 与正常对照组细胞相比, HK-2 细胞上清液 TGF- $\beta_1$  水平升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。给予 HK-2 细胞 100、200  $\mu\text{mol/L}$  ALA (A3 组、A4 组), 100  $\mu\text{mol/L}$  LA (L3 组), 10、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$  EPA (E1 组、E2 组、E3 组、E4 组) 干预 48 h 后, 与高糖模型组相比, 细胞上清液 TGF- $\beta_1$  含量降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 另外给予 HK-2 细胞终浓度分别为

50  $\mu\text{mol/L}$  和 100  $\mu\text{mol/L}$ 、比例为 1:4 的 ALA/LA 混合液(M2 组、M5 组)干预 48 h 后,细胞上清液 TGF- $\beta_1$  含量均低于高糖模型组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。其中,100  $\mu\text{mol/L}$  ALA(A3 组)

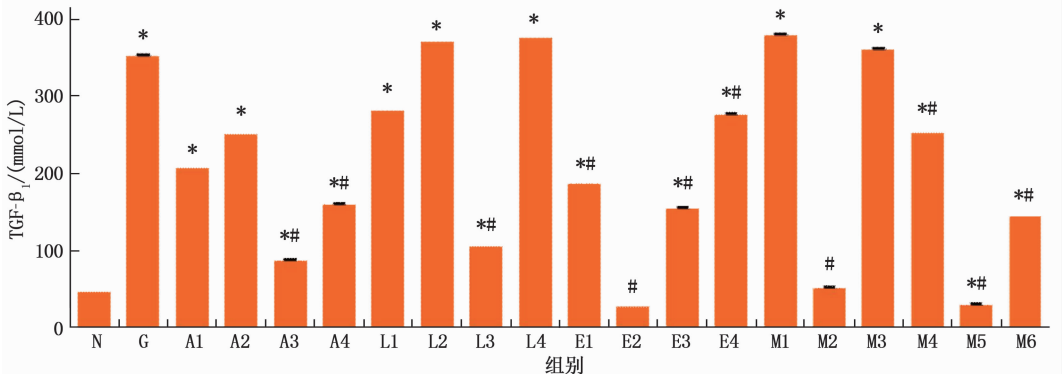
和 100  $\mu\text{mol/L}$ 、比例为 1:4 的 ALA/LA 混合液(M5 组)对高糖损伤 HK-2 细胞的作用效果较好。见图 3。



N: 正常对照组; G: 高糖模型组; A1 ~ A4: ALA 干预组, 干预物浓度分别为 10、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$ ; L1 ~ L4: LA 干预组, 干预物浓度分别为 10、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$ ; E1 ~ E4: EPA 干预组, 干预物浓度分别为 10、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$ ; M1 ~ M3: ALA/LA 混合干预组, 干预物浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$ , 混合比例分别为 1:1、1:4、1:8; M4 ~ M6: ALA/LA 混合干预组, 干预物浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$ , 混合比例分别为 1:1、1:4、1:8。

与正常对照组相比, \* $P < 0.05$ ; 与高糖模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 2 ALA/LA 对糖损伤 HK-2 细胞 MCP-1 表达的影响



N: 正常对照组; G: 高糖模型组; A1 ~ A4: ALA 干预组, 干预物浓度分别为 10、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$ ; L1 ~ L4: LA 干预组, 干预物浓度分别为 10、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$ ; E1 ~ E4: EPA 干预组, 干预物浓度分别为 10、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$ ; M1 ~ M3: ALA/LA 混合干预组, 干预物浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$ , 混合比例分别为 1:1、1:4、1:8; M4 ~ M6: ALA/LA 混合干预组, 干预物浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$ , 混合比例分别为 1:1、1:4、1:8。与正常对照组相比, \* $P < 0.05$ ; 与高糖模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 3 ALA/LA 对糖损伤 HK-2 细胞 TGF- $\beta_1$  表达的影响

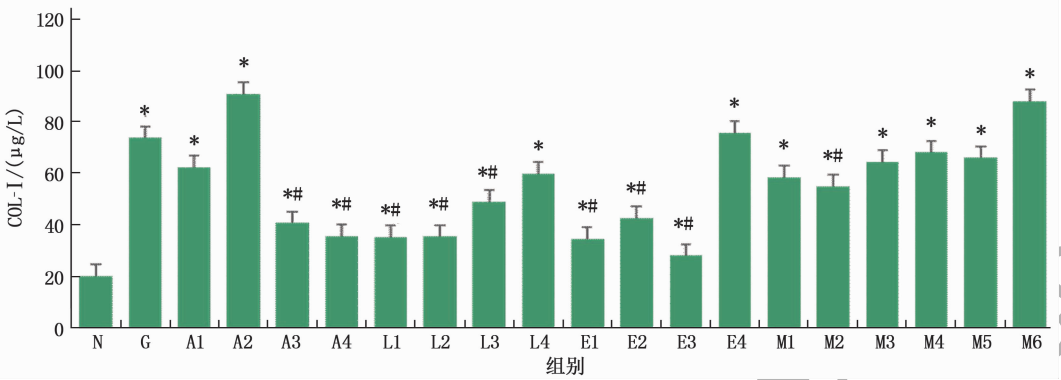
#### 2.4 ALA/LA 降低糖损伤 HK-2 细胞的 COL- I 水平

高糖培养后,与正常对照组相比,高糖模型组 HK-2 细胞上清液 COL-I 水平升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。给予 HK-2 细胞 100、200  $\mu\text{mol/L}$  ALA(A3 组、A4 组), 10、50、100  $\mu\text{mol/L}$  LA(L1 组、L2 组、L3 组), 10、50、100  $\mu\text{mol/L}$  EPA(E1 组、E2 组、E3 组)以及终浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$ 、比例为 1:4 的 ALA/LA 混合液(M2 组)干预 48 h 后,细胞上清液 COL- I 含量均低于高糖模型组,差异有统

计学意义( $P < 0.05$ )。见图 4。

#### 2.5 ALA/LA 降低糖损伤 HK-2 细胞的 MCP-1 mRNA 水平

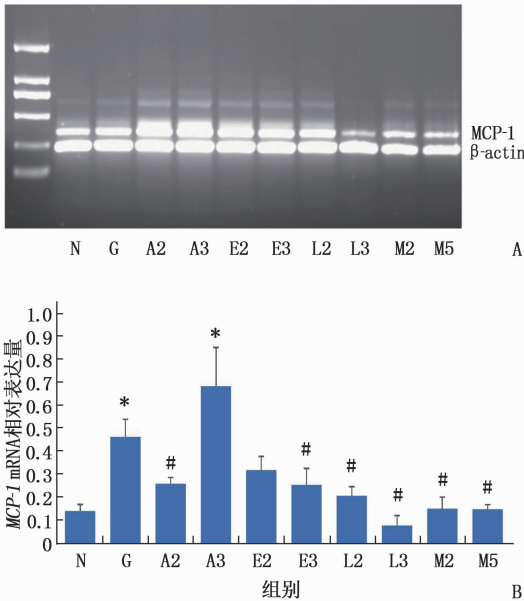
与正常对照组相比,高糖模型组 HK-2 细胞 MCP-1 mRNA 水平升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。给予 HK-2 细胞 50  $\mu\text{mol/L}$  ALA(A2 组), 50、100  $\mu\text{mol/L}$  LA(L2 组、L3 组)和 100  $\mu\text{mol/L}$  EPA(E3 组),以及 50、100  $\mu\text{mol/L}$  比例为 1:4 的 ALA/LA(M2 组、M5 组)干预 48 h 后,与高糖模型组相比,细胞 MCP-1 mRNA 水平下降,差异有统计



N: 正常对照组; G: 高糖模型组; A1 ~ A4: ALA 干预组, 干预物浓度分别为 10、50、100、200 μmol/L; L1 ~ L4: LA 干预组, 干预物浓度分别为 10、50、100、200 μmol/L; E1 ~ E4: EPA 干预组, 干预物浓度分别为 10、50、100、200 μmol/L; M1 ~ M3: ALA/LA 混合干预组, 干预物浓度为 50 μmol/L, 混合比例分别为 1:1、1:4、1:8; M4 ~ M6: ALA/LA 混合干预组, 干预物浓度为 100 μmol/L, 混合比例分别为 1:1、1:4、1:8。与正常对照组相比, \* $P < 0.05$ ; 与高糖模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 4 ALA/LA 对糖损伤 HK-2 细胞 COL-1 表达的影响

学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 5。



A: MCP-1 电泳图; B: MCP-1 mRNA 相对表达量。

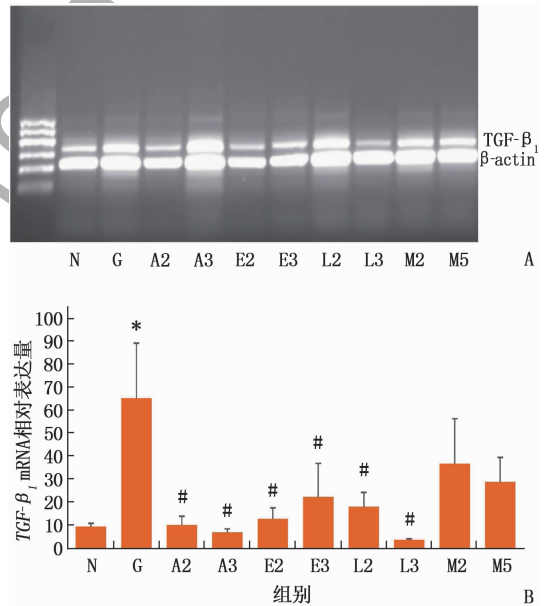
N: 正常对照组; G: 高糖模型组; A2、A3: ALA 干预组, 干预物浓度分别为 50、100 μmol/L; L2、L3: LA 干预组, 干预物浓度分别为 50、100 μmol/L; E2、E3: EPA 干预组, 干预物浓度分别为 50、100 μmol/L; M2、M5: ALA/LA 混合干预组, 干预物浓度为 50、100 μmol/L, 混合比例为 1:4。与正常对照组相比, \* $P < 0.05$ ; 与高糖模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 5 ALA/LA 对糖损伤 HK-2 细胞 MCP-1 mRNA 表达的影响

## 2.6 ALA/LA 降低糖损伤 HK-2 细胞的 $TGF-\beta_1$ mRNA 水平

与正常对照组相比, 高糖模型组 HK-2 细胞  $TGF-\beta_1$  mRNA 水平升高, 差异有统计学意义 ( $P <$

0.05)。在前期实验的基础上, 给予 50、100 μmol/L 的 ALA、LA 和 EPA (A2 组、A3 组、L2 组、L3 组、E2 组、E3 组) 干预 48 h 后, HK-2 细胞  $TGF-\beta_1$  mRNA 水平均低于高糖模型组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 6。



A:  $TGF-\beta_1$  电泳图; B:  $TGF-\beta_1$  mRNA 相对表达量。

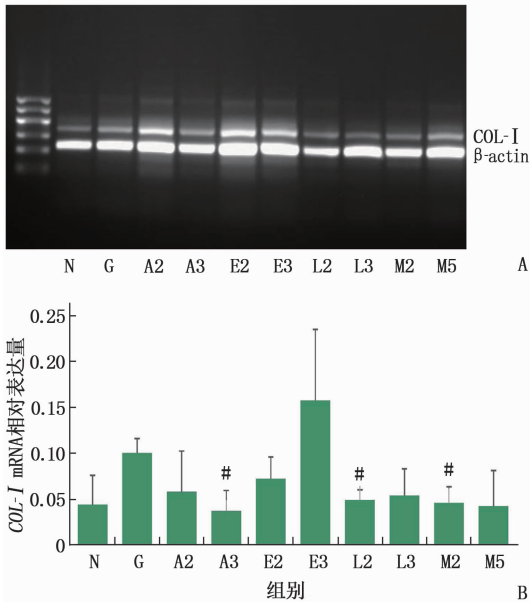
N: 正常对照组; G: 高糖模型组; A2、A3: ALA 干预组, 干预物浓度分别为 50、100 μmol/L; L2、L3: LA 干预组, 干预物浓度分别为 50、100 μmol/L; E2、E3: EPA 干预组, 干预物浓度分别为 50、100 μmol/L; M2、M5: ALA/LA 混合干预组, 干预物浓度为 50、100 μmol/L, 混合比例为 1:4。与正常对照组相比, \* $P < 0.05$ ; 与高糖模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 6 ALA/LA 对糖损伤 HK-2 细胞  $TGF-\beta_1$  mRNA 表达的影响

### 2.7 ALA/LA 降低糖损伤 HK-2 细胞的

#### COL- I mRNA 水平

高糖培养后, HK-2 细胞 COL- I mRNA 水平高于正常对照组, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。在前期实验的基础上, 给予糖损伤 HK-2 细胞 100  $\mu\text{mol/L}$  ALA (A3 组)、50  $\mu\text{mol/L}$  LA (L2 组), 以及终浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$ 、比例为 1: 4 的 ALA/LA (M2 组) 混合液干预 48 h 后, HK-2 细胞 COL- I mRNA 水平低于高糖模型组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 7。



A: COL- I 电泳图; B: COL- I mRNA 相对表达量。

N: 正常对照组; G: 高糖模型组; A2, A3: ALA 干预组, 干预物浓度分别为 50、100  $\mu\text{mol/L}$ ; L2, L3: LA 干预组, 干预物浓度分别为 50、100  $\mu\text{mol/L}$ ; E2、E3: EPA 干预组, 干预物浓度分别为 50、100  $\mu\text{mol/L}$ ; M2、M5: ALA/LA 混合干预组, 干预物浓度为 50、100  $\mu\text{mol/L}$ , 混合比例为 1: 4。与高糖模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 7 ALA/LA 对糖损伤 HK-2 细胞 COL- I mRNA 表达的影响

### 3 讨论

COL- I 可在 DKD 进展过程中沉积于肾小球基底膜、系膜基质和肾小管间质。肾小管上皮细胞可通过分泌丰富的细胞外基质、细胞因子和黏附分子填充肾小管间质空间, 并通过信号通路相互影响, 损害肾实质细胞和重塑肾脏结构<sup>[10-12]</sup>。TGF- $\beta$  信号系统可损害肾小管细胞完整性, 导致肾小管萎缩, 并通过诱导上皮细胞凋亡或自噬导致肾小管间质纤维化。本研究结果显示, 高糖模

型组 HK-2 细胞外液 TGF- $\beta_1$  和 COL- I 水平显著高于正常对照组 ( $P < 0.05$ ), 提示高糖可刺激 HK-2 细胞分泌 TGF- $\beta_1$ , 进而促进 COL- I 生成。这与陈继业等<sup>[13]</sup>提出的观点一致, 高糖可刺激 HK-2 细胞增强胶原和 TGF- $\beta_1$  基因转录, 导致肾小管基底膜增厚和肾小管间质组织学异常。

本研究结果进一步显示, 经 ALA、ALA/LA 干预 48 h 后, 高糖损伤 HK-2 细胞 TGF- $\beta_1$  和 COL- I 含量, 以及细胞 TGF- $\beta_1$  和 COL- I mRNA 水平都较高糖模型组显著降低 ( $P < 0.05$ ), 表明 ALA/LA 可延缓 HK-2 细胞的纤维化进程。ALA 和 LA 为人体必需脂肪酸, 具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等多种生理功能。本课题组前期实验结果表明, ALA/LA 可提高糖损伤 HK-2 细胞的抗氧化酶活力, 降低活性氧簇 (ROS) 的生成, 提高 HK-2 细胞的抗氧化能力。ROS 可激活 TGF- $\beta_1$  信号通路, 触发多种细胞分泌 TGF- $\beta_1$ , 产生纤维化的作用。但 ALA/LA 通过抑制 ROS 的生成, 下调 TGF- $\beta_1$  的表达, 延缓纤维化的作用机制还有待进一步研究。

肾脏的炎症因子和炎症状态对于促进 DKD 的发展和进展至关重要, 是 DKD 的主要病理生理学参与者<sup>[14]</sup>。MCP-1 是单核细胞的有效趋化因子, 可影响 DKD 进程中单核细胞相关炎症的整个级联反应, 包括从骨髓释放单核细胞, 建立黏附和浸润的趋化因子梯度<sup>[8]</sup>。MCP-1 和 TGF- $\beta_1$  是相互作用的细胞因子, TGF- $\beta_1$  能刺激 MCP-1 在肾近端小管中的表达, 引起巨噬细胞的浸润<sup>[15]</sup>。本研究结果显示, HK-2 细胞在高糖环境下, MCP-1 基因和 MCP-1 蛋白的表达量均显著增加 ( $P < 0.05$ )。且经 ALA、ALA/LA 干预 48 h 后, 与高糖模型组相比, HK-2 细胞 MCP-1 含量以及 MCP-1 mRNA 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 证明一定剂量 ALA、ALA/LA 可从基因和蛋白水平抑制 MCP-1 的产生。因此, 通过 ALA/LA 抑制 MCP-1/TGF- $\beta_1$  的表达, 下调 COL- I 的生成, 减缓 HK-2 细胞纤维化的进程, 有望成为治疗 DKD 的新策略、新方法。

#### 参考文献

[1] DRISS V, QUESNEL B, BRINSTER C. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1/CCL2) contributes to Thymus atrophy in acute myeloid leukemia[J]. Eur J Immunol, 2015, 45(2): 396-406.  
 [2] SULAIMAN W, NGUYEN D H. Transforming growth factor beta 1, a cytokine with regenerative functions[J]. Neural Regen Res, 2016, 11(10): 1549-1552.

- [11] ADLER C, HELLER T, SCHREGEL F, *et al.* TIMP-2/IGFBP<sub>7</sub> predicts acute kidney injury in out-of-hospital cardiac arrest survivors[J]. *Crit Care*, 2018, 22(1): 126.
- [12] JOHNSON A C M, ZAGER R A. Mechanisms underlying increased TIMP2 and IGFBP<sub>7</sub> urinary excretion in experimental AKI[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2018, 29(8): 2157–2167.
- [13] WANG X Y, ROJAS-QUINTERO J, WILDER J, *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promotes polymorphonuclear neutrophil (PMN) pericellular proteolysis by anchoring matrix metalloproteinase-8 and-9 to PMN surfaces[J]. *J Immunol*, 2019, 202(11): 3267–3281.
- [14] LIU B C, TANG T T, LV L L. How tubular epithelial cell injury contributes to renal fibrosis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165: 233–252.
- [15] ROMAGNOLI S, RICCI Z, RONCO C. Perioperative acute kidney injury: prevention, early recognition, and supportive measures[J]. *Nephron*, 2018, 140(2): 105–110.
- [16] XIE Y, ANKAWI G, YANG B, *et al.* Tissue inhibitor metalloproteinase-2 (TIMP-2) · IGF-binding protein-7 (IGFBP<sub>7</sub>) levels are associated with adverse outcomes in patients in the intensive care unit with acute kidney injury[J]. *Kidney Int*, 2019, 95(6): 1486–1493.
- [17] JOLIAT G R, LABGAA I, DEMARTINES N, *et al.* Acute kidney injury after liver surgery: does postoperative urine output correlate with postoperative serum creatinine[J]. *HPB (Oxford)*, 2020, 22(1): 144–150.
- [18] FRIED L. When increase in serum creatinine doesn't imply kidney damage[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2020, 15(3): 304–305.
- [19] BULLEN A L, KATZ R, LEE A K, *et al.* The SPRINT trial suggests that markers of tubule cell function in the urine associate with risk of subsequent acute kidney injury while injury markers elevate after the injury[J]. *Kidney Int*, 2019, 96(2): 470–479.
- [20] ZHANG B, SHI Y Q, ZOU J J, *et al.* High glucose stimulates cell proliferation and Collagen IV production in rat mesangial cells through inhibiting AMPK-K ATP signaling[J]. *Int Urol Nephrol*, 2017, 49(11): 2079–2086.
- [21] CAI X J, WANG L, WANG X L, *et al.* Silence of IGFBP<sub>7</sub> suppresses apoptosis and epithelial mesenchymal transformation of high glucose induced-podocytes[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(2): 1095–1102.

(本文编辑: 梁琥)

(上接第 6 面)

- [3] DOCHERTY N G, MURPHY M, MARTIN F, *et al.* Targeting cellular drivers and counter-regulators of hyperglycaemia and transforming growth factor- $\beta$ 1-associated profibrotic responses in diabetic kidney disease[J]. *Exp Physiol*, 2014, 99(9): 1154–1162.
- [4] WU L, LI X Q, CHANG D Y, *et al.* Associations of urinary epidermal growth factor and monocyte chemoattractant protein-1 with kidney involvement in patients with diabetic kidney disease[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2020, 35(2): 291–297.
- [5] ZENI L, NORDEN A G W, CANCARINI G, *et al.* A more tubulocentric view of diabetic kidney disease[J]. *J Nephrol*, 2017, 30(6): 701–717.
- [6] SHUI H, GAO P, SI X Y, *et al.* Mycophenolic acid inhibits albumin-induced MCP-1 expression in renal tubular epithelial cells through the p38 MAPK pathway[J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(4): 1749–1754.
- [7] JIANG M X, ZHANG H F, ZHAI L J, *et al.* ALA/LA ameliorates glucose toxicity on HK-2 cells by attenuating oxidative stress and apoptosis through the ROS/p38/TGF- $\beta$ 1 pathway[J]. *Lipids Heal Dis*, 2017, 16(1): 216.
- [8] 姜明霞, 章海凤, 叶变良, 等. 葡萄糖对 HK-2 细胞的糖毒性及 ALA/LA 的干预作用[J]. *营养学报*, 2017, 39(1): 41–44, 49.
- [9] COUSIN S P, HÜGL S R, WREDE C E, *et al.* Free fatty acid-induced inhibition of glucose and insulin-like growth factor I-induced deoxyribonucleic acid synthesis in the pancreatic beta-cell line INS-1[J]. *Endocrinology*, 2001, 142(1): 229–240.
- [10] SURESH Y, DAS U N. Long-chain polyunsaturated fatty acids and chemically induced diabetes mellitus; effect of  $\omega$ -6 fatty acids[J]. *Nutrition*, 2003, 19(2): 93–114.
- [11] HALLER H, BERTRAM A, NADROWITZ F, *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 and the kidney[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2016, 25(1): 42–49.
- [12] MORIYA T, TANAKA K, MORIYA R. Glomerular structural changes and structural-functional relationships at early stage of diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients[J]. *Med Electron Microsc*, 2000, 33(3): 115–122.
- [13] 陈继业, 余雪松, 叶本兰. TGF- $\beta$ 1 与糖尿病肾病[J]. *中国糖尿病杂志*, 2002, 10(1): 56–58.
- [14] LEE S B, KALLURI R. Mechanistic connection between inflammation and fibrosis[J]. *Kidney Int Suppl*, 2010(119): S22–S26.
- [15] SATIRAPOJ B, DISPAN R, RADINAHAMED P, *et al.* Urinary epidermal growth factor, monocyte chemoattractant protein-1 or their ratio as predictors for rapid loss of renal function in type 2 diabetic patients with diabetic kidney disease[J]. *BMC Nephrol*, 2018, 19(1): 246.

(本文编辑: 周娟)