

不同波形低强度电磁场对高糖培养的肾小球系膜细胞(HBZY-1细胞株)细胞外基质合成的影响

刘娟, 申广浩, 谢康宁, 景达, 雷涛, 李飞江, 罗二平
第四军医大学生物医学工程系, 陕西 西安 710032

【摘要】目的:研究低强度电磁场对糖尿病肾病模型细胞外基质(ECM)代谢产物的表达以及参与调节ECM的主要信号通路是否有积极的影响,并找到3种波形中的最优参数。**方法:**实验采用1.6 mT和15 Hz的正弦、方波、脉冲群分别对高糖培养的HBZY-1细胞株进行干预,每天作用8 h,连续3 d。完成后采用MTT法检测细胞活性,ELISA法检测上清液中转化生长因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)、纤维连接蛋白(FN)、基质金属蛋白酶(MMP-2)蛋白含量,Western blot法检测p38MAPK、ERK、Smad3总蛋白及磷酸化蛋白的表达。**结果:**(1)所有高糖组在1 d后都表现出较强的细胞活性,与正常组比较具有显著差异;与高糖对照组进行比较,方波和脉冲群组在干预2 d开始抑制HBZY-1细胞株的增殖,正弦组始终没有显著差异;脉冲群组细胞活性显著低于方波组。(2)所有高糖组的TGF $\beta 1$ 、FN蛋白表达显著高于正常组,MMP-2则相反;方波和脉冲群组TGF $\beta 1$ 、FN蛋白表达显著低于高糖对照组,而MMP-2蛋白的表达显著高于高糖对照组,正弦组在这些蛋白表达上与高糖对照组无显著差异;脉冲群组在TGF $\beta 1$ 蛋白表达显著低于方波组,而MMP-2蛋白表达则相反,FN蛋白表达则无显著差异。(3)所有高糖组的p-Smad3蛋白表达显著高于正常组;方波和脉冲群组p-Smad3蛋白表达显著低于高糖对照组,而正弦组无显著差异;与方波组相比,脉冲群组的抑制效果更显著。**结论:**方波和脉冲群能有效地抑制高糖诱导的HBZY-1细胞增殖,一方面通过抑制系膜细胞TGF $\beta 1$ 、FN的合成减少ECM的沉积,另一方面通过促进MMP-2的合成加速ECM降解。此外,方波和脉冲群还通过抑制TGF $\beta 1$ /Smad3信号通路减少系膜细胞的损伤。脉冲群对系膜细胞的作用效果显著好于方波。

【关键词】糖尿病肾病;肾小球系膜细胞;细胞外基质;低强度电磁场;高糖

【中图分类号】TN911.7

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2016)07-0747-04

Effect of low-intensity electromagnetic fields on ECM metabolism of glomerular mesangial cell (HBZY-1) cultured in high glucose condition

LIU Juan, SHEN Guang-hao, XIE Kang-ning, JING Da, LEI Tao, LI Fei-jiang, LUO Er-ping
Faculty of Biomedical Engineering, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Abstract: Objective To study on the effects of low-intensity electromagnetic fields on the expression of extracellular matrix (ECM) metabolites of diabetic nephropathy model and the main signal pathways participating in the regulation of ECM, and to find the optimal parameters of three waveforms. **Methods** The glomerular mesangial cell (HBZY-1) cultured in high glucose condition was intervened with the sine wave, square wave, and pulsed electromagnetic fields (PEMFs) of 1.6 mT and 15 Hz, with the intervention of 8 h/d for 3 consecutive days. After the stimulation, methyl thiazolyl tetrazolium assay was used to detect cell activity; enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the protein content of transforming growth factor (TGF) beta 1, fibronectin (FN), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in the supernatant; Western blot was used to detect the expression of p38MAPK, ERK, Smad3 total protein and phosphorylated protein. **Results** After 1 d of intervention, the high glucose groups showed stronger cell activity than the normal group, with significant differences. Compared with the high glucose control groups, the square wave group and PEMFs group began to inhibit the proliferation of HBZY-1 from the second day of intervention, and the sine wave group did not showed any significant differences. The cell activity in PEMFs group was significantly lower than that in square wave group. The TGF beta 1 and FN protein

【收稿日期】2016-05-19

【基金项目】国家自然科学基金(51577188)

【作者简介】刘娟, 硕士, 讲师, 研究方向: 生物医学工程, E-mail: liujuan@fmmu.edu.cn

【通信作者】罗二平, 博士, 教授, 研究方向: 生物医学工程, E-mail: luorping@fmmu.edu.cn

expressions in high glucose groups were significantly higher than those in normal group, while the MMP-2 in high glucose groups was lower than that in normal group. The TGF beta 1 and FN protein expressions in square wave group and PEMFs group were significantly lower than those in high glucose control group, but the MMP-2 protein expression in square wave group and PEMFs group was significantly higher than that in high glucose control group. No significant differences were found in the protein expressions between sine wave group and high glucose control group. Compared with square wave group, TGF beta 1 protein expression in PEMFs group was significantly lower, but the MMP-2 protein expression in PEMFs group was higher. No significant differences were found in FN protein expression between PEMFs group and square wave group. The phosphorylated Smad3 (p-Smad3) protein expression in high glucose groups was significantly higher than that in normal group. The p-Smad3 protein expressions in square wave group and PEMFs group were significantly lower than those in high glucose control groups, having no significant differences with sine wave group. Compared with the square wave group, the inhibitory effect of PEMFs group was more significant. **Conclusion** Square wave and PEMFs can effectively inhibit the proliferation of high glucose induced HBZY-1, decreasing ECM deposition by inhibiting the synthesis of mesangial cell TGF beta 1 and FN, and accelerating the ECM degradation by promoting the MMP-2 synthesis. Besides, the square wave and PEMFs can reduce the damage of mesangial cells by inhibiting the TGF beta1/Smad3 signal pathway. The effect of PEMFs on mesangial cells was significantly better than square wave.

Key words: diabetic nephropathy; glomerular mesangial cell; extracellular matrix; low-intensity electromagnetic field; high glucose

前言

糖尿病肾病(DN)是糖尿病微血管并发症之一,其主要病理特点为肾小球系膜细胞(GMC)增生、大量细胞外基质(ECM)堆积。DN发生发展过程中,GMC异常增殖、肥大以及ECM过度聚积的同时,也伴随着多种细胞因子和炎症介质分泌的异常增多,从而引起局部炎症反应加剧,也就加剧了肾小球硬化的发展。糖尿病本质上是慢性炎症的累积,而电磁场的非热生物效应已经被证实对生物机体有消炎、止痛、改善微循环等作用,特别是低频低强度电磁场(LEMFs)的效果更为显著^[1-2]。本实验以大鼠GMC细胞株HBZY-1为研究对象,观察最具代表性的3种波形LEMFs对高糖环境下HBZY-1细胞株TGFβ1/Smad3信号通路的影响,横向对比其作用效果,初步探讨电磁场改善高糖诱导的HBZY-1细胞株ECM代谢失衡作用的可能机制^[3-4]。

1 材料与方法

1.1 实验细胞与主要试剂

大鼠GMC(HBZY-1,美国ATCC),胎牛血清(杭州四季青生物有限公司),DMEM培养基(GIBCO公司),大鼠TGFβ1、FN、MMP-2的ELISA试剂盒(上海纪宁生物科研有限公司),兔抗p38MAPK单克隆抗体(美国Abcam公司),兔抗p38MAPKPhospho(pT180/pY182)单克隆抗体(美国Abcam公司),山羊抗兔IgG(H&L)-HRP二抗(美国Bioworld公司),兔抗β-Actin多克隆抗体(美国Bioworld公司)。

1.2 实验分组

按照LEMFs的不同波形,将GMC实验分为5组:正常对照组,DMEM低糖培养(5.6 mmol/L);模型组DN,DMEM高糖培养(25.0 mmol/L);正弦组DN+SIN,DMEM高糖培养+15 Hz正弦波;方波组DN+REC,DMEM高糖培养+15 Hz方波;脉冲群组DN+PEMFs,DMEM高糖培养+15 Hz脉冲群。3种波形的磁场强度统一调整为1.6 mT,其中脉冲群的具体波形参数:低频部分为5.00 ms脉冲群和60.00 ms的间隔,高频部分为0.20 ms的脉冲和0.02 ms的间隔。

1.3 电磁干预方法

将传代后的细胞,置于37℃、5% CO₂的孵箱过夜,第2天放入线圈内进行电磁干预(图1)。模型组置于相同的线圈内,但不施加电磁场干预,每天作用8 h,连续3 d,然后按照不同检测方法处理细胞。



The Helmholtz coils was placed in the cell culture incubator.

图1 电磁干预实物图

Fig.1 Picture of electromagnetic intervention

1.4 MTT法测细胞增殖

将HBZY-1按上述电磁干预方法传代培养于10%胎牛血清及双抗的低糖DMEM培养液中。用含0.25%胰蛋白酶消化后,通过细胞计数,按照 1×10^3 cell/孔接种到96孔培养板中,每个组默认预留6个复孔。等细胞充分贴壁,换用0.5%胎牛血清培养24 h,常规培养,按照图1的干预方法,分别在1 d、2 d、3 d时间点进行检测,每孔配置20 μ L 噻唑蓝(MTT)溶液,37 $^{\circ}$ C孵育4 h。缓慢离心去除上清液,然后配置150 μ L/孔的二甲基亚砜(DMSO),振荡直至结晶充分消融,接着使用酶标仪检测490 nm波长处的光密度(OD)值。在可控制的细胞数目里,MTT最终结晶的数量与活细胞数是正相关的关系。最终的OD值能够代表活细胞数目,如果OD值越大,则表明活细胞数量越多,也就表示细胞增殖能力越旺盛。连续重复3次,得出的数据进行统计学分析。

1.5 ELISA法测定细胞培养上清液中TGF β 1、FN、MMP-2蛋白质含量

采用正常条件培养HBZY-1细胞株细胞,DMEM采用低糖(5.6 mmol/L),加入适量0.25% Trypsin。然后 2.5×10^4 cell/孔的数量接种到24孔培养板内,显微镜下观察,等到细胞充分贴壁,换用0.5%胎牛血清培养24 h。贴壁后,按照图1的干预方法进行实验干预,小心收集细胞上清液,离心后分装,置于-80 $^{\circ}$ C冰箱保存。检测时进行解冻,冻存期间杜绝取出,避免造成多次融化,ELISA要根据试剂盒的使用方法规定流程完成,该试剂盒敏感区间非常宽且敏感度高,与其他转化生长因子的交叉反应不到1%。详细的实验方法参照试剂盒说明书。

1.6 Western blot检测Smad3总蛋白及磷酸化蛋白的表达

收集各组HBZY-1,经蛋白裂解液冰上裂解30 min后,12 000 r/min离心15 min,收集上清,用考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒进行蛋白浓度定量。取25 μ g总蛋白进行15% SDS-PAGE凝胶电泳,电泳完毕后凝胶上的蛋白以电转移至硝酸纤维素膜,5%脱脂奶粉封闭,一抗37 $^{\circ}$ C孵育1.5 h,二抗37 $^{\circ}$ C孵育1.0 h, ECL检测,同时以 β 肌动蛋白作为内参照。并定量分析X光片条带的OD,实验重复3次。

1.7 统计学方法

实验数据均采用SPSS 20.0软件进行统计学分析,各组计量数据均采用均值 \pm 标准差表示。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行多组数据比较, $P \leq 0.05$ 认为具有统计学差异。

2 结果

2.1 不同波形LEMFs对HBZY-1细胞增殖活性的影响

方差分析显示,照射1 d后,DN、DN+SIN、DN+REC、DN+PEMFs组显著性高于CON组($P < 0.05$),说明高糖作用能显著促进HBZY-1细胞的增殖。照射2 d后,DN、DN+SIN、DN+REC、DN+PEMFs组显著性高于CON组($P < 0.05$);DN+REC、DN+PEMFs组与DN组相比显著性低于DN组($P < 0.05$);DN+PEMFs组显著性低于DN+REC组($P < 0.05$)。与CON组相比,高糖能显著促进HBZY-1细胞的增殖;与DN组相比,DN+REC组和DN+PEMFs组显著抑制HBZY-1细胞的增殖;与DN+REC组相比,DN+PEMFs组的抑制效果更显著。照射3 d后,DN、DN+SIN、DN+REC、DN+PEMFs组显著性高于CON组($P < 0.05$);DN+REC、DN+PEMFs组与DN组相比显著性低于DN组($P < 0.05$);DN+PEMFs组显著性低于DN+REC组($P < 0.05$)。高糖能显著促进HBZY-1细胞的增殖;与DN组相比,DN+REC组和DN+PEMFs组能显著性抑制HBZY-1细胞的增殖;与DN+REC组相比,DN+PEMFs组的抑制效果更显著。

2.2 不同波形LEMFs对HBZY-1细胞TGF β 1、FN与MMP-2蛋白表达的影响

2.2.1 不同波形LEMFs对HBZY-1细胞TGF β 1蛋白表达的影响 方差分析显示,DN、DN+SIN、DN+REC、DN+PEMFs组显著性高于CON组($P < 0.05$);DN+REC、DN+PEMFs组与DN组相比显著性低于DN组($P < 0.05$);DN+PEMFs组显著性低于DN+REC组($P < 0.05$)。与CON组相比,高糖能显著促进HBZY-1细胞TGF β 1蛋白的表达;与DN组相比,DN+REC组和DN+PEMFs组能显著性抑制HBZY-1细胞TGF β 1蛋白的表达;与DN+REC组相比,DN+PEMFs组的抑制效果更显著。

2.2.2 不同波形LEMFs对HBZY-1细胞FN蛋白表达的影响 方差分析显示,DN、DN+SIN、DN+REC、DN+PEMFs组显著性高于CON组($P < 0.05$);DN+REC、DN+PEMFs组与DN组相比显著性低于DN组($P < 0.05$);DN+PEMFs组与DN+REC组无统计学差异($P > 0.05$)。与CON组相比,高糖能显著促进HBZY-1细胞FN蛋白的表达;与DN组相比,DN+REC组和DN+PEMFs组能显著性抑制HBZY-1细胞FN蛋白的表达;DN+REC与DN+PEMFs组对FN蛋白表达的抑制效果无显著性差异。

2.2.3 不同波形LEMFs对HBZY-1细胞MMP-2蛋白表达量的影响 方差分析显示,DN、DN+SIN、DN+

REC、DN+PEMFs组显著性低于CON组($P<0.05$); DN+REC、DN+PEMFs组与DN组相比显著性高于DN组($P<0.05$); DN+PEMFs组显著性高于DN+REC组($P<0.05$)。与CON组相比,高糖能显著抑制HBZY-1细胞MMP-2蛋白的表达;与DN组相比, DN+REC组和DN+PEMFs组能显著性促进HBZY-1细胞MMP-2蛋白的表达;与DN+REC组相比, DN+PEMFs组的促进效果更显著。

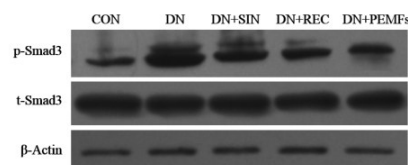
2.3 不同波形 LEMFs 对 HBZY-1 细胞 Smad3 信号通路的影响

如图2所示, DN、DN+SIN、DN+REC、DN+PEMFs组,高糖培养显著促进HBZY-1细胞磷酸化p-Smad3蛋白的表达。DN+REC、DN+PEMFs组与DN组相比, HBZY-1细胞磷酸化p-Smad3蛋白表达降低。DN+PEMFs组磷酸化p-Smad3蛋白的表达低于DN+REC组。统计学分析显示, DN、DN+SIN、DN+REC、DN+PEMFs组HBZY-1细胞磷酸化Smad3蛋白相对表达量显著性高于CON组($P<0.05$)。DN+REC、DN+PEMFs组HBZY-1细胞磷酸化Smad3蛋白相对表达量显著性低于DN组($P<0.05$)。DN+PEMFs组HBZY-1细胞磷酸化Smad3蛋白相对表达量显著性低于DN+REC组($P<0.05$)。结果表明,与CON组相比,高糖能显著促进HBZY-1细胞磷酸化p-Smad3蛋白表达;与DN组相比, DN+REC组和DN+PEMFs组能显著性抑制HBZY-1细胞磷酸化p-Smad3蛋白表达;与DN+REC组相比, DN+PEMFs组的抑制效果更显著。

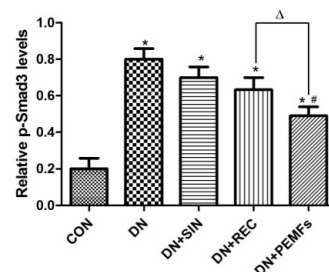
3 讨论

电磁生物效应是一种非常复杂的物理因子刺激生物体在宏观(组织、系统、器官等)或微观(细胞、分子、通道等)发生生理活动的反应,而LEMFs一直是电磁生物效应研究中的热点^[5]。LEMFs能促进成骨细胞合成从而加速骨折愈合,还能够减少水肿、增加血流、上调生长因子受体、增强嗜中性粒细胞和巨噬细胞的吞噬能力以及表皮细胞的迁移能力,增加纤维和肉芽组织的分化能力^[6-7]。有研究指出糖尿病患者或者实验动物模型的肾脏中巨噬细胞的渗透性升高以及白细胞吸附蛋白的合成增强,趋化因子诱导的炎性细胞在肾脏组织中的聚集是DN等不同类型的肾脏疾病的重要诱因^[8-9]。

从实验结果可以看出,高糖环境下GMC细胞株HBZY-1细胞的增殖活力明显增加, TGFβ1、FN合成增多, MMP-2合成减少;同时高糖能有效激活HBZY-1细胞Smad3蛋白的磷酸化,提示高糖激活的TGFβ1/



a: Expression of phosphorylated Smad3 (p-Smad3) in HBZY-1



b: Relative expression of p-Smad3 protein level

Compared with CON, * $P<0.05$; compared with DN, # $P<0.05$; compared with DN+PEMFs, $\Delta P<0.05$. CON: Control normal group; DN: Diabetic nephropathy; SIN: Rectangle; REC: Square wave; PEMFs: Pulsed electromagnetic fields

图2 不同分组HBZY-1细胞Smad3磷酸化蛋白的表达与磷酸化Smad3蛋白相对表达量($n=8, \bar{x} \pm s$)

Fig.2 Expression of p-Smad3 in HBZY-1 and the relative expression of p-Smad3 protein level ($n=8, \text{Mean} \pm \text{SD}$)

Smad3通路参与了GMC损伤和ECM代谢失衡的过程,这些已经被前人的研究所证实^[10-11]。在高糖诱导的HBZY-1中,3组LEMFs与DN组比较,可以发现方波组和脉冲群组能够显著抑制细胞增殖,二者还能显著促进MMP-2的合成。此外,二者在Smad3信号分子磷酸化方面起到明显抑制的作用,这些结果提示方波和脉冲群这两种波形的LEMFs能够通过降低GMC活性、减少ECM合成、增加ECM降解来缓解GMC损伤。另一方面,通过降低Smad3的磷酸化程度来抑制TGFβ1/Smad3信号通路,进而缓解GMC损伤。通过对方波组和脉冲群组进行比较,综合整体效果来看,是脉冲群组更加显著。本文研究也存在一些不足,由于是初步研究,只选用了3种常用波形的LEMFs参数,不能完全体现最优参数,在后续研究中可以探讨LEMFs在DN肾损伤保护方面的最优参数。

【参考文献】

- [1] HARDELL L, SAGE C. Biological effects from electromagnetic field exposure and public exposure standards[J]. Biomed Pharmacother, 2008, 62(2): 104-109.
- [2] BOKKON I, ERDOFI-SZABO A, TILL A, et al. EMOST: elimination of chronic constipation and diarrhea by low-frequency and intensity electromagnetic fields[J]. Electromagn Biol Med, 2014, 33(1): 68-74.

(下转756页)