

褐藻多糖硫酸酯对脂多糖诱导大鼠肾小球系膜细胞 NO 产生量的影响

王雪妹^{1,2}, 王 晶¹, 张全斌¹

(1. 中国科学院 海洋研究所 海洋生物技术工程研究发展中心, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 慢性肾衰的进程中伴随着肾脏炎症的发生, 研究表明褐藻多糖硫酸酯具有抗炎作用, 且对于慢性肾衰的早期治疗具有一定的作用。本文通过脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导, 建立大鼠肾小球系膜细胞的炎症模型, 用来源于海带的高分子质量褐藻多糖硫酸酯 F1 和低分子质量褐藻多糖硫酸酯 F2 对细胞进行处理, 24 h 后 MTT 法检测各组细胞活力, Griess 法检测 24 h 及 48 h 后细胞培养液中 NO 的含量。结果表明, 各组间细胞活力无明显差异; 脂多糖可以诱导大鼠肾小球系膜细胞 NO 产量增加, F1 和 F2 均可在一定程度上抑制脂多糖诱导的 NO 产量的增加, 从而减轻细胞炎症反应。剂量为 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 F1 和 F2 处理细胞 48 h 后, 与模型组相比, F1 和 F2 组细胞培养液中 NO 含量分别下降 22.52% 和 38.65%, 低分子质量褐藻多糖硫酸酯抗炎效果明显高于高分子质量褐藻多糖硫酸酯。

关键词: 褐藻多糖硫酸酯; 肾小球系膜细胞; 脂多糖; 一氧化氮; 一氧化氮合酶

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)10-0001-05

doi: 10.11759/hyxx20131218002

褐藻多糖硫酸酯是来源于褐藻细胞壁的一种主要由硫酸化的岩藻糖组成的结构复杂多变的杂多糖。褐藻多糖硫酸酯具有多种生物活性, 主要有抗病毒、抗肿瘤、抗凝血和抗血栓、抗炎症和增强机体免疫功能等, 且随着他们的化学组分不尽相同, 其生物活性也有很大差异^[1]。研究发现^[2], 褐藻多糖硫酸酯在动物肾脏损伤模型中具有很好的肾脏保护作用, 可缓解慢性肾衰, 且已在临床得到了应用。褐藻多糖硫酸酯在慢性肾衰中对肾脏的保护作用表现在可降低尿蛋白、血清肌酐和尿素氮水平, 改善肾脏功能^[3]。对于褐藻多糖硫酸酯抗肾衰的机制已有一些研究, 褐藻多糖硫酸酯对肾脏的保护作用与其抗氧化能力相关^[3], 褐藻多糖硫酸酯可抑制阿霉素肾病肾硬化大鼠肾脏中 TGF- β 1 表达, 并减少细胞外基质中型胶原蛋白和纤连蛋白的合成^[4], 褐藻多糖硫酸酯可抑制肾小管上皮细胞间充质细胞转化^[5]。但是褐藻多糖硫酸酯抗肾衰的机制尚不明确, 有待进一步的研究。

NO 是哺乳动物体内一种重要的信号分子, 与机体的炎症反应密切相关。LPS 是革兰氏阴性细菌细胞壁中的一种成分, 对宿主是有毒性的, 是一种细菌内毒素。LPS 可诱导人肾小球系膜细胞的炎症反

应, 包括 NO 含量的增加^[6]。研究证明, 分子质量对多糖活性有重要影响, 本研究制备了两种不同分子质量褐藻多糖硫酸酯, 选取大鼠肾小球系膜细胞作为实验材料, 以 LPS 诱导炎症反应作为模型, 探讨不同分子质量褐藻多糖硫酸酯是否能够抑制 LPS 诱导的细胞培养液中 NO 含量的增加, 从而抑制细胞的炎症反应。通过实验结果探究褐藻多糖硫酸酯抗炎效果与其分子质量之间的关系, 从而对不同分子质量的褐藻多糖硫酸酯抗肾衰效果的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞

大鼠肾小球系膜细胞(HBZY-1)购于中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Colle-

收稿日期: 2013-12-18; 修回日期: 2014-02-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(41376166); 江苏省科技支撑计划项目(BE2012687)

作者简介: 王雪妹(1988-), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事海藻化学与海洋药物的研究, 电话: 0532-82898708, E-mail: wangxuemei-5221@163.com; 张全斌, 通信作者, 研究员, 博士生导师, E-mail: qbzhang@qdio.ac.cn

ction, CCTCC)。

1.1.2 实验药物

从海带(*Laminaria japonica*)中提取褐藻多糖硫酸酯^[7], 标记为 F1。由 F1 降解得到低分子质量褐藻多糖硫酸酯^[8], 标记为 F2。

1.1.3 实验试剂

DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)高糖(4500 mg/L Glucose)培养基(Hyclone 公司); 胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS, Hyclone 公司); 脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS, 美国 Sigma 公司); 胰蛋白酶(含 EDTA, Solarbio 公司); MTT(美国 Sigma 公司); 一氧化氮检测试剂盒(碧云天生物技术研究所有)。

1.2 实验方法

1.2.1 褐藻多糖硫酸酯化学组成的测定

褐藻多糖硫酸酯分子质量用高效凝胶色谱法以葡聚糖作为分子质量标准进行测定。岩藻糖含量用半胱氨酸盐酸盐法(Gibbons 法)以岩藻糖为标准进行测定^[9]。硫酸根含量用明胶氯化钡法以硫酸钾为标准进行测定^[10]。糖醛酸含量用吡啶比色法以葡萄糖醛酸为标准进行测定^[11]。单糖含量组成用 PMP 柱前衍生-HPLC 法进行测定^[12]。

1.2.2 大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 的培养

大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 的培养条件为: 90%DMEM 高糖培养基, 10%胎牛血清, 青链霉素混合液(青霉素的工作浓度为 100 U/mL, 链霉素的工作浓度为 0.1 g/L), 37℃, 5%CO₂ 培养箱中培养。传代时间为 2 d, 消化液为含 0.25%EDTA 的胰蛋白酶溶液。

1.2.3 MTT 法测定细胞活力

待细胞生长至对数期时, 消化收集细胞, 调整细胞悬液的浓度, 使细胞浓度为 5×10^4 个/mL。铺 96 孔板, 每孔加入 100 μ L 细胞悬液, 细胞数目为 5×10^3 个/孔。过夜培养至细胞贴壁, 换 0.5%FBS 的 DMEM 培养基, 培养 24 h, 使细胞处于 G0 期。换 10%FBS 的 DMEM 完全培养基, 正常组和模型组不加任何药物, 药物组加入药物 F1 或 F2 使其终浓度为 12.5、25、50、100 mg/L, 处理 1 h 后, 模型组和药物组加入 LPS

使其终浓度为 0.5 mg/L, 继续培养 24 h。每孔加入 20 μ L 5g/L MTT(避光), 培养 4 h。吸去培养液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 低速摇床振荡 10 min, 酶标仪 490 nm 测各孔吸光值。

1.2.4 细胞培养液中 NO 含量的测定

待细胞生长至对数期时, 消化收集细胞, 调整细胞悬液的浓度, 使细胞浓度为 3×10^4 个/mL。铺 24 孔板, 每孔加入 1 mL 细胞悬液, 细胞数目为 3×10^4 个/孔。过夜培养至细胞贴壁, 换 0.5%FBS 的 DMEM 培养基, 培养 24 h。换 10%FBS 的 DMEM 完全培养基, 正常组和模型组不加任何药物, 药物组加入药物 F1 或 F2 使其终浓度为 12.5、25、50、100 mg/L, 处理 1 h 后, 模型组和药物组加入 LPS 使其终浓度为 0.5 mg/L。培养 24 h, 取培养液 200 μ L, 继续培养 24 h, 取培养液 200 μ L, Griess 法测培养液中 NO 含量。

用完全培养基稀释标准品 NaNO₂, 使标准品的浓度依次为 0、1、2、5、10、20、40、60、100 μ mol/L。按 50 μ L/孔, 在 96 孔板中加入样品(设 3 个平行)及标准品, 在各孔中加入室温 Griess Reagent I 和 Griess Reagent II 各 50 μ L。10 min 后, 540 nm 测定吸光度。

1.2.5 统计学方法

所有数据均采用($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS13.0 进行成组间方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 褐藻多糖硫酸酯化学组成测定结果

来源于海带的褐藻多糖硫酸酯及其低分子质量产物(F1 和 F2)的化学组成测定结果见表 1。结果表明, F1 的分子质量为 87 305 Da, F2 的分子质量为 6 500 Da, F1 分子质量明显高于 F2。F1 和 F2 的主要化学成分均为岩藻糖和硫酸根, 另外均含有较多的半乳糖。F2 与 F1 相比, F2 岩藻糖和硫酸根含量略低于 F1, 且 F2 含有较多的半乳糖。

2.2 MTT 法测定细胞活力

MTT 法测定各组细胞活力结果如图 1(以 F2 为例)所示。结果表明, 各组间细胞活力无显著性差异。

表 1 来源于海带的褐藻多糖硫酸酯(F1 和 F2)的化学组成

Tab. 1 Chemical composition of fucoidan (F1 and F2) from *Laminaria japonica*

样品	分子质量 (Da)	岩藻糖 (%)	糖醛酸 (%)	硫酸根 (%)	中性单糖组成(%, W/W)					
					Fuc	Gal	Man	Glc	Rha	Xyl
F1	87305	29.12	1.93	33.01	62.08	24.33	6.06	1.93	3.80	1.80
F2	6500	28.71	3.65	30.14	51.53	32.71	2.13	9.01	3.07	1.54

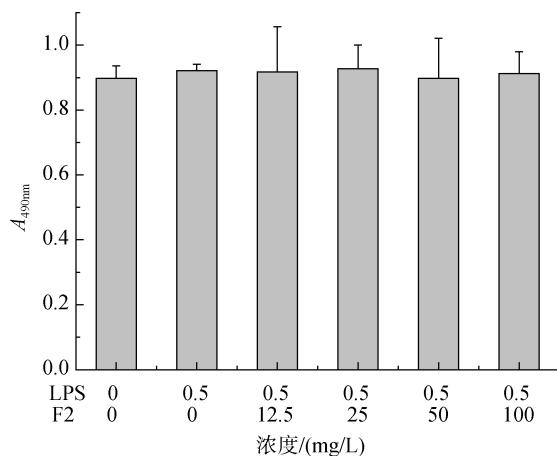


图1 MTT 法测定各组细胞活力(以 F2 为例)

Fig.1 The cell viability of each group detected by MTT method (taking F2 as the example)

因此,在此基础上测定其他指标是可行的,可排除因各组间细胞活力差异导致的其他指标的变化。

2.3 细胞培养液中 NO 含量的测定

细胞培养液中 NO 含量测定结果见图 2 及图 3。由图 2 可知, F1 可以抑制 LPS 引起的大鼠肾小球系膜细胞 NO 产生量的增加, 24 h 时, 25、50、100 mg/L 三个药物组与模型组相比 NO 含量有显著性差异, 48 h 时, 12.5、25、50、100 mg/L 四个药物组与模型组相比 NO 含量均有显著性差异。由图 3 可知, F2 可以抑制 LPS 引起的大鼠肾小球系膜细胞 NO 产生量的增加, 24 h 时, 50、100 mg/L 两个药物组与模型组

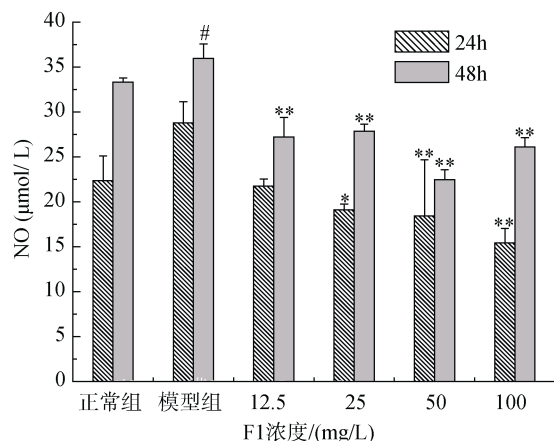


图2 F1 对 LPS 诱导 HBZY-1 NO 产生量的影响(24 h 和 48 h)
Fig.2 The effect of F2 on NO production by HBZY-1 cells induced by LPS (24 h and 48 h)

#.与正常组相比 $P<0.05$; *.与模型组相比 $P<0.05$; **.与模型组相比 $P<0.01$

#.compared with the normal group $P<0.05$; *.compared with the model group $P<0.05$; **.compared with the model group $P<0.01$

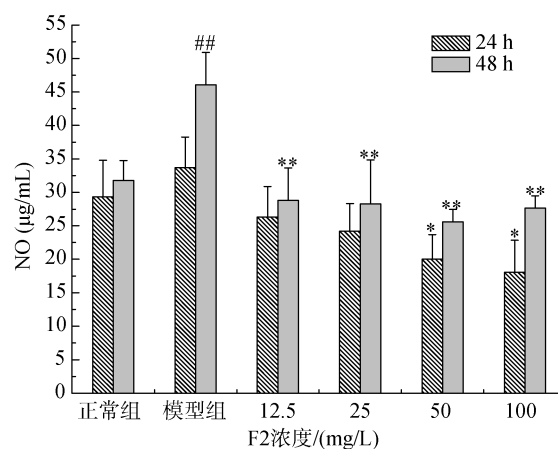


图3 F2 对 LPS 诱导 HBZY-1 NO 产生量的影响(24 h 和 48 h)

Fig.3 The effect of F2 on NO production by HBZY-1 cells induced by LPS (24 h and 48 h)

##.正常组相比 $P<0.01$; *.与模型组相比 $P<0.05$; **.与模型组相比 $P<0.01$

##.compared with the normal group $P<0.01$; *.compared with the model group $P<0.05$; **.compared with the model group $P<0.01$

相比 NO 含量有显著性差异, 48 h 时, 12.5、25、50、100 mg/L 四个药物组与模型组相比 NO 含量均有显著性差异。

为了比较 F1 和 F2 抑制 LPS 诱导大鼠肾小球系膜细胞 NO 产生的效果大小, 选取作用时间为 48h, 药物浓度为 25 mg/L 的组别与对应的模型组进行比较, 结果如表 2 所示。由表 2 可知, F1 和 F2 的作用剂量为 25 mg/L 时, 与模型组相比, 细胞培养液中 NO 含量下降比例分别为 22.52%和 38.65%, 药物抗炎效果为 F2>F1。

表 2 F1 和 F2 抑制 LPS 诱导大鼠肾小球系膜细胞 NO 产生的效果比较

Tab. 2 Comparison of inhibitory effect of F1 and F2 on NO production induced by LPS

NO 含量	模型组 (μmol/L)	25 mg/L 组 (μmol/L)	NO 含量降低比例(%)
F1	35.96±1.61	27.86±0.79**	22.52
F2	46.05±4.84	28.25±6.58**	38.65

注: **表示与模型组相比 $P<0.01$

3 讨论

褐藻多糖硫酸酯具有抗炎和抗肾衰的活性, 且其抗肾衰活性已在临床的得到了应用。虽然对于褐藻多糖硫酸酯肾脏保护作用的机制有一定的研究, 但是其肾脏保护机制尚不明确。在慢性肾衰的进程中伴随着炎症反应的发生, 研究褐藻多糖硫酸酯抗

炎作用对于褐藻多糖硫酸酯抗肾衰效果及机制的研究具有一定的意义。肾小球系膜细胞是肾脏中三种固有细胞之一,对于肾脏炎症、慢性肾衰的进程中起到重要的作用。本文研究结果表明, LPS 可引起大鼠肾小球系膜细胞 NO 产量的增加, F1 和 F2 均可在一定程度上抑制细胞的 NO 的产生,从而降低细胞的炎症反应。

由 F1 和 F2 化学组成及其抑制 LPS 诱导的大鼠肾小球系膜细胞 NO 产生的效果可知, F2 抗炎作用(NO 含量降低比例为 38.65%)显著高于 F1(22.52%),且 F2 分子质量(6 500 Da)明显低于 F1(87 305 Da),由此可推断分子量较低时抗炎效果更好,可能是由于分子量较低时更易被细胞吸收,从而更易起到抗炎的作用。在以后的研究工作中,可通过研究不同化学组成的褐藻多糖硫酸酯的抗肾衰效果,通过对褐藻多糖硫酸酯抗肾衰效果与抗炎效果进行比较,从而确定褐藻多糖硫酸酯抗肾衰是否与其具有抗炎作用有一定的关系。

NO 是以精氨酸作为底物在 NO 合酶的作用下生成的,在部分炎症反应中,会有 NO 合酶含量的升高从而导致 NO 生成量的增加。因此,褐藻多糖硫酸酯可能通过某种方式影响 NO 合酶的含量或活性,从而对 NO 的产生过程产生一定的影响。为了探究褐藻多糖硫酸酯影响 NO 产生的原因和途径,在接下来的研究工作中,可通过研究 NO 合成酶含量的变化来探究褐藻多糖硫酸酯对于 NO 含量产生影响的途径。

参考文献:

- [1] Berteau O, Mulloy B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide [J]. *Glycobiology*, 2003, 13(6): 29R-40R.
- [2] Zhang Q, Li Z, Xu Z, et al. Effects of fucoidan on chronic renal failure in rats [J]. *Planta Medica*, 2003, 69(06): 537-541.
- [3] Wang J, Zhang Q, Jin W, et al. Effects and mechanism of low molecular weight fucoidan in mitigating the peroxidative and renal damage induced by adenine [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 84(1): 417-423.
- [4] 王兆华. 褐藻多糖硫酸酯对阿霉素肾病肾硬化大鼠肾脏的保护作用[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2005.
- [5] 刘建春. 褐藻多糖硫酸酯对腺嘌呤致大鼠肾间质纤维化的作用及其机制探讨[D]. 中国协和医科大学硕士学位论文, 2006.
- [6] Wu F, Zhang W, Li L, et al. Inhibitory effects of honokiol on lipopolysaccharide-induced cellular responses and signaling events in human renal mesangial cells [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2011, 654(1): 117-121.
- [7] Wang J, Zhang Q, Zhang Z, et al. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2008, 42(2): 127-132.
- [8] Wang J, Wang F, Zhang Q, et al. Synthesized different derivatives of low molecular fucoidan extracted from *Laminaria japonica* and their potential antioxidant activity in vitro [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009, 44(5): 379-384.
- [9] Gibbons M N. The determination of methylpentoses [J]. *Analyst*, 1955, 80(949): 268-276.
- [10] Kawai Y, Seno N, Anno K. A modified method for chondrosulfatase assay [J]. *Analytical Biochemistry*, 1969, 32(2): 314-321.
- [11] Bitter T, Muir H M. A modified uronic acid carbazole reaction [J]. *Analytical Biochemistry*, 1962, 4(4): 330-334.
- [12] Honda S, Akao E, Suzuki S, et al. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives [J]. *Analytical Biochemistry*, 1989, 180(2): 351-357.

Effect of fucoidan on NO production induced by LPS in rat glomerular mesangial cells

WANG Xue-mei^{1, 2}, WANG Jing¹, ZHANG Quan-bin¹

(1. Research and Development Center of Marine Biotechnology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Dec., 18, 2013

Key words: fucoidan; glomerular mesangial cells; Lipopolysaccharide; NO; NO synthase

Abstract: The process of chronic renal failure is accompanied by renal inflammation. Fucoidan has anti-inflammatory activity, and therefore has potential effect for early treatment of chronic renal failure. In this paper, A inflammation model of rat glomerular mesangial cells was induced by lipopolysaccharide (LPS), then the cells were treated with high molecular fucoidan F1 and low molecular fucoidan F2 obtained from *Laminaria japonica*. After 24 h, the cell viability was detected by MTT method. After 24h and 48h, the content of NO in cell culture medium was detected by Griess method. The results show that, there was no difference in the cell viability among different groups. LPS could induce NO production by rat glomerular mesangial cells, and F1 and F2 could inhibit the NO production induced by LPS, thereby reducing the inflammatory response. The NO content in culture medium decreased 22.52% and 38.65%, respectively after treatment with 25 mg/L F1 and F2 for 48 h as compared with the control group. The anti-inflammatory effect of F2 is stronger than that of F1, suggesting the anti-inflammatory effect of low molecular fucoidan is higher than that of high molecular fucoidan.

(本文编辑: 康亦兼)