

论著·基础研究

# 果糖通过尿酸和活性氧簇诱导人肾小管上皮细胞单核细胞趋化蛋白-1的表达

王巧玲<sup>1\*</sup>, 陈晓欢<sup>2\*</sup>, 倪兆慧<sup>1</sup>, 顾乐怡<sup>1</sup>, 徐辰祺<sup>1#</sup>, 戴慧莉<sup>1#</sup>

1. 上海交通大学 医学院附属仁济医院肾脏科, 分子细胞(肾病)实验室, 上海 200127; 2. 新疆维吾尔自治区喀什地区第二人民医院肾病科, 喀什 844000

**[摘要]** 目的· 探讨果糖诱导肾小管上皮细胞表达单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 的机制。**方法·** 将 HK-2 细胞分为对照组, 果糖孵育 (1、5 和 10 mmol/L) 组, 果糖、己酮糖激酶抑制剂 (KHK-IN) 共孵育 (果糖 5 mmol/L, KHK-IN 分别为 12、100 和 1 000 nmol/L) 组, 尿酸孵育 (5、15 和 50 mg/dL) 组, 果糖、别嘌醇共孵育 (果糖 5 mmol/L, 别嘌醇分别为 0.01、0.1 和 0.5 mmol/L) 组, 尿酸、别嘌醇共孵育 (尿酸 50 mg/dL, 别嘌醇分别为 0.01、0.1 和 0.5 mmol/L) 组, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 (0.1 和 0.3 mmol/L) 组, 果糖、N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 共孵育 (果糖 5 mmol/L, NAC 分别为 5、10 和 50 mmol/L) 组, 尿酸、NAC 共孵育 (尿酸 50 mg/dL, NAC 分别为 5、10 和 50 mmol/L) 组。采用实时荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹实验检测 MCP-1 mRNA 和蛋白的表达; 利用活性氧 (ROS) 荧光探针观察果糖和尿酸对 HK-2 细胞 ROS 产生的影响。**结果·** 果糖剂量及时间依赖性诱导 HK-2 细胞 MCP-1 mRNA 转录和蛋白表达, 此过程可被 KHK-IN 阻断。外源性尿酸诱导 HK-2 细胞产生 MCP-1, 别嘌醇抑制果糖引起的 MCP-1 表达, 但不能阻断外源性尿酸的作用。果糖和尿酸均诱导 HK-2 细胞产生 ROS, 别嘌醇抑制了果糖而非外源性尿酸诱导的 ROS 产生。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HK-2 细胞生成 MCP-1, NAC 则抑制这种作用。**结论·** 果糖在己酮糖激酶催化下, 通过引起细胞内尿酸升高和产生 ROS, 导致人肾小管上皮细胞产生 MCP-1。

**[关键词]** 果糖; 尿酸; 活性氧簇; HK-2 细胞

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.04.006 **[中图分类号]** R692.6 **[文献标志码]** A

## Fructose induces HK-2 cells to express monocyte chemoattractant protein-1 through uric acid and reactive oxygen species

WANG Qiao-ling<sup>1\*</sup>, CHEN Xiao-huan<sup>2\*</sup>, NI Zhao-hui<sup>1</sup>, GU Le-yi<sup>1</sup>, XU Chen-qi<sup>1#</sup>, DAI Hui-li<sup>1#</sup>

1. Renal Division, Molecular Cell Laboratory for Kidney Diseases, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China; 2. Renal Section, Kashgar Prefecture Second People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Kashgar 844000, China

**[Abstract]** Objective · To investigate the mechanism of fructose-induced monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) production in HK-2 cells.  
**Methods** · The HK-2 cells were divided into fructose incubated (1, 5 and 10 mmol/L) group, fructose and ketohexo-kinase inhibitor (KHK-IN) co-incubation (fructose 5 mmol/L, KHK-IN was 12, 100 and 1 000 nmol/L, respectively) group, uric acid incubation (5, 15 and 50 mg/dL) group, fructose and allopurinol co-incubation (fructose 5 mmol/L, allopurinol were 0.01, 0.1 and 0.5 mmol/L) group, uric acid and allopurinol co-incubation (uric acid 50 mg/dL, allopurinol respectively 0.01, 0.1 and 0.5 mmol/L) group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incubation (0.1 and 0.3 mmol/L) group, fructose and N-acetylcysteine (NAC) co-incubation (fructose 5 mmol/L, NAC respectively 5, 10 and 50 mmol/L) group, and uric acid and NAC co-incubation (uric acid 50 mg/dL, NAC was 5, 10 and 50 mmol/L, respectively) group. The quantitative PCR method and Western blotting method were used to observe the expression of MCP-1 mRNA and protein. The effects of fructose and uric acid on the production of ROS in HK-2 cells were observed by using a fluorescent probe. **Results** · Fructose dose- and time-dependently induced MCP-1 gene transcription and protein production in HK-2 cells, which could be blocked by the ketohexo-kinase blockers. Exogenous uric acid induced MCP-1 production in HK-2 cells. Allopurinol inhibited fructose, but not exogenous uric acid-induced MCP-1 expression. Both fructose and uric acid induced ROS generation. Incubation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promoted MCP-1 production in HK-2 cells. NAC completely inhibited MCP-1 production induced by fructose and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Conclusion** · Catalyzed by the ketohexo-kinase, fructose results the production of MCP-1 through uric acid and reactive oxygen species.

**[Key words]** fructose; uric acid; reactive oxygen species; HK-2 cells

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (2015211C228) (Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, 2015211C228)。

[作者简介] 王巧玲 (1991—), 女, 硕士生; 电子信箱: ling\_37032@sjtu.edu.cn。陈晓欢 (1980—), 女, 主任医师, 硕士; 电子信箱: 1165625697@qq.com。  
\* 为共同第一作者。

[通信作者] 徐辰祺, 电子信箱: chenqi\_xu\_nephro@hotmail.com。戴慧莉, 电子信箱: dhl\_sh@163.com。<sup>#</sup> 为共同通信作者。



慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 在我国的患病率已高达 10.8%<sup>[1]</sup>。多种因素造成的早期损伤和持续炎症反应是 CKD 进展的因素。研究<sup>[2]</sup>发现, 低果糖饮食可以降低 CKD 患者的血压水平以及超敏 C 反应蛋白 (hypersensitive C reactive protein, hsCRP) 及可溶性细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecular-1, ICAM-1) 的水平, 认为减少果糖摄入可以延缓 CKD 进展。西方国家青年妇女大量饮用含果糖的饮料, 血尿酸水平显著升高, 炎症和高血压的发生率升高, 均被认为是加速 CKD 进展的危险因素<sup>[3]</sup>。果糖饮食与炎症、高血压和肾脏疾病的发生密切相关, 在果糖代谢过程中伴随产生的尿酸则同样与炎症反应有关, 这是果糖区别于其他单糖之处。然而, 果糖、尿酸与炎症之间的作用机制目前尚未明确阐释。

有研究<sup>[4]</sup>显示, 高果糖饮食的小鼠出现肾小球纤维化、小管上皮凋亡、间质炎症、胶原沉积及小管周单核巨噬细胞聚集。葡萄糖被摄入后, 经山梨醇代谢生成果糖, 果糖通过小肠吸收进入血。超过 50% 的果糖进入肝脏代谢, 其余进入肾脏或脂肪组织代谢。肾小管上皮细胞含有大量葡萄糖转运蛋白 5 和葡萄糖转运蛋白 1, 这些转运体可以将果糖运至胞质。胞质中的己酮糖激酶, 又称果糖激酶 (ketohexokinase, KHK), 是果糖代谢的关键激酶。KHK 具有 KHK-C 和 KHK-A 亚型, 前者仅在肝脏表达, 后者在全身均有表达<sup>[5]</sup>。进入胞质的果糖在 KHK 催化下消耗腺苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP), 生成果糖-1-磷酸 (fructose-1-phosphate, F-1-P) 和腺苷二磷酸 (adenosine diphosphate, ADP), ADP 最终通过黄嘌呤氧化酶代谢为尿酸。研究<sup>[6-7]</sup>显示, KHK 基因敲除小鼠避免了糖尿病诱导的肾损伤, 激活 KHK 则介导了缺血导致的肾损伤。

单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 是趋化因子家族的细胞因子。在机体发生炎症时, 巨噬细胞、单核细胞、成纤维细胞等均可分泌 MCP-1, 故其表达可反映机体炎症水平。有研究<sup>[4]</sup>给予 14 只 SD 雌性大鼠不同饮食 11 周, 比较标准饮食组、高葡萄糖饮食组、高果糖饮食组大鼠 MCP-1 表达量, 结果提示果糖而非葡萄糖导致大鼠 MCP-1 升高, 进一步加速 CKD 进展。

KHK 和黄嘌呤氧化酶分别是果糖代谢与尿酸代谢的关键酶, 本研究应用其抑制剂和别嘌醇探讨果糖诱导炎症因子 MCP-1 表达的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

DMEM/F12 和 DMEM 低糖 (含 5 mmol/L 葡萄糖) 培

养基购自 Gibco 公司, D-(-)-果糖、尿酸、别嘌醇、N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC) 和尿酸检测试剂盒购自 Sigma Aldrich 公司, 果糖-1-磷酸二钾盐 (fructose-1-phosphate dipotassium salt) 于 Santa Cruz Biotechnology 公司合成, KHK 抑制剂 KHK-IN-1 购自 MedChem Express 公司, 抗人 MCP-1 抗体购自 Abcam 公司, 抗人 GAPDH 抗体购自 ProteinTech 公司, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 荧光探针购自碧云天公司, Takara 反转录试剂盒和 qPCR 试剂盒购自 Takara 公司。

### 1.2 细胞培养与分组

将人肾近端小管上皮细胞株 (HK-2) (由中国科学院上海细胞库提供) 接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养和维持细胞, 无血清 DMEM 低糖培养基用于药物刺激细胞实验; 细胞长至 90% 融合时传代, 70% ~ 75% 时进行各项分组细胞实验。

对照组为 DMEM 低糖培养基孵育; 果糖孵育组分别用 1、5 和 10 mmol/L 果糖孵育; 果糖 KHK-IN-1 共孵育组用 12、100 和 1 000 nmol/L KHK-IN-1 与 5 mmol/L 果糖共孵育; 尿酸孵育组分别用 5、15 和 50 mg/dL 尿酸孵育; 果糖别嘌醇共孵育组用 5 mmol/L 果糖与 0.01、0.1 和 0.5 mmol/L 别嘌醇孵育; 尿酸别嘌醇共孵育组用 50 mg/dL 尿酸与 0.01、0.1 和 0.5 mmol/L 别嘌醇孵育; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育组分别用 0.1 和 0.3 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育; 果糖 NAC 共孵育组用 5、10 和 50 mmol/L NAC 预孵育, 再用 5 mmol/L 果糖孵育; 尿酸 NAC 共孵育组用 5、10 和 50 mmol/L NAC 预孵育, 再用 50 mg/dL 尿酸孵育。

### 1.3 实时荧光定量 PCR

TRIzol 提取总 RNA, 测定 RNA 浓度。每个样本取 1 000 ng RNA 以 10 μL 体系于 T100™Thermal Cycler 反应 (37 °C 15 min → 85 °C 5 s → 4 °C ∞)。将反转录得到的 cDNA 稀释 5 倍, 以 20 μL 体系进行 PCR。*MCP-1* 上游引物序列为 5'-TCTCAAACTGAAGCTCGCACT-3', 下游引物序列为 5'-GGGCATTGATTGCATCTGGC-3'; *GAPDH* 上游引物序列为 5'-GAAAGCCTGCCGGTGACTAA-3', 下游引物序列为 5'-GCCAATACGACCAAATCAGAG-3'。

### 1.4 蛋白免疫印迹实验

用含苯甲基磺酰氟 (PMSF) 和蛋白酶抑制剂 Cocktail 的细胞裂解液提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。取 30 μg 蛋白样品加样于 15% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺

凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离蛋白, 转印至 PVDF 膜后, 5% 牛血清白蛋白溶液室温封闭 3 h; 兔抗人 MCP-1 抗体 (0.2 μg/mL) 和小鼠抗人 GAPDH 抗体 (1:5 000) 4 ℃ 过夜, 山羊抗兔和山羊抗小鼠 IgG 抗体 (均 1:5 000) 室温孵育 1 h; 采用 TANON 成像仪系统显影, Image J 软件分析条带灰度。

### 1.5 细胞内 ROS 检测

细胞长至 85% ~ 90% 时, 用无菌 37 ℃ 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤细胞; 在无血清 DMEM 低糖培养基中, 以 1:1 000 浓度加入 DCHFDA 探针, 37 ℃ 避光孵育 15 min; 孵育结束后, 用无血清 DMEM 低糖培养基洗去未进入细胞的探针; 于荧光显微镜 ( $\lambda_{\text{Ex}}=488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}}=525 \text{ nm}$ ) 下观察并采集图像。

### 1.6 尿酸检测

将  $2 \times 10^6$  HK-2 细胞重悬于 4 倍细胞体积的预冷 uric acid assay buffer 中冰上快速彻底匀浆, 4 ℃ 下  $1300 \times g$  离心 10 min, 收集上清; 96 孔板每孔加入 50 μL 上清和 50 μL 配置好的 Master Reaction Mix 混合均匀, 37 ℃ 避光孵育 30 min; 于酶标仪以  $\lambda_{\text{Ex}}=535 \text{ nm}$ 、 $\lambda_{\text{Em}}=587 \text{ nm}$  参

数下读取荧光光密度值, 并根据标准曲线计算尿酸浓度。

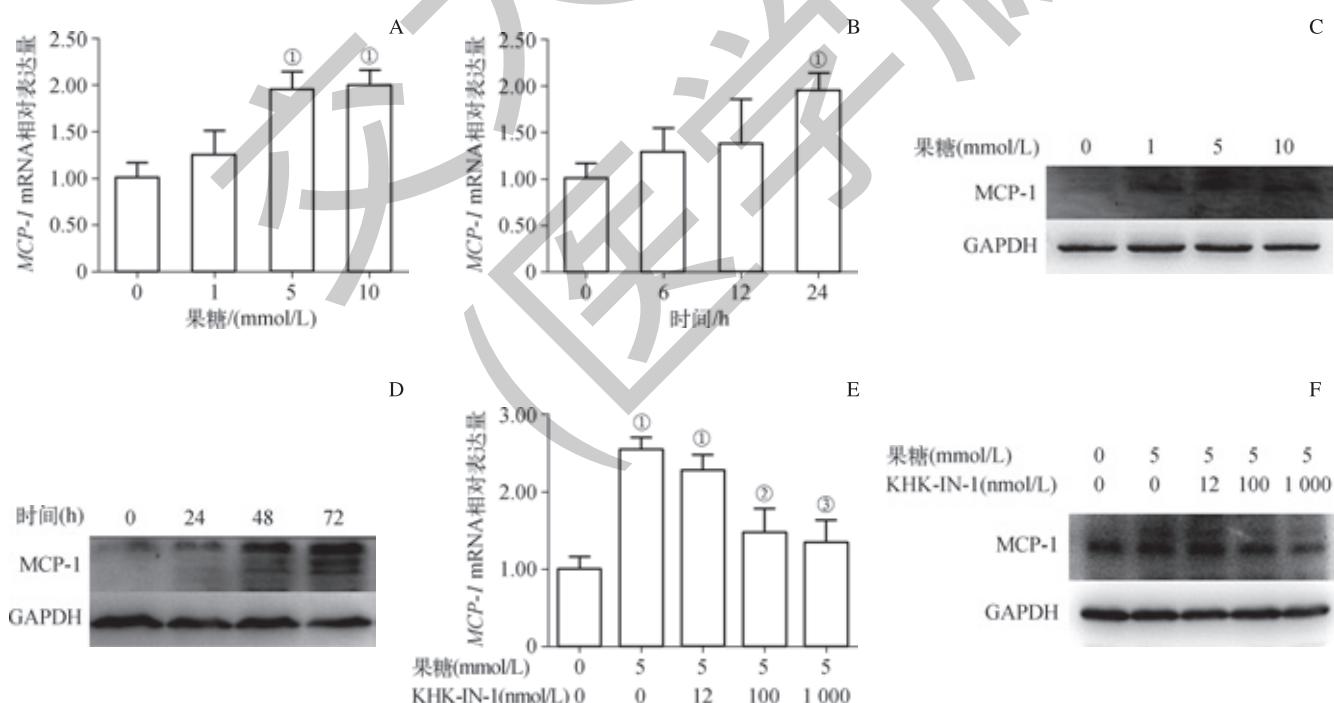
### 1.7 统计学方法

采用 GraphPad 6.0 软件进行统计学分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。3 组及以上独立样本均数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 果糖依赖 KHK 诱导 HK-2 细胞产生 MCP-1

果糖孵育组中, 5 和 10 mmol/L 果糖孵育 24 h, *MCP-1* mRNA 表达量分别是对照组的  $(1.95 \pm 0.19)$  倍和  $(1.99 \pm 0.17)$  倍 (均  $P=0.000$ ); 5 和 10 mmol/L 果糖孵育 48 h, *MCP-1* 蛋白表达量分别为对照组的  $(2.77 \pm 0.53)$  倍和  $(3.11 \pm 0.41)$  倍 ( $P=0.003$ ,  $P=0.001$ )。果糖 KHK-IN-1 共孵育组中, 在 100 nmol/L 和 1 000 nmol/L KHK-IN-1 作用下, *MCP-1* mRNA 表达量分别较果糖 (5 mmol/L) 孵育组 *MCP-1* mRNA 表达量下降  $(42.13 \pm 20.48)\%$  和  $(46.85 \pm 25.87)\%$  ( $P=0.002$ ,  $P=0.000$ ), *MCP-1* 蛋白表达量分别下降  $(56.70 \pm 13.38)\%$  和  $(65.01 \pm 18.33)\%$  ( $P=0.014$ ,  $P=0.006$ ) (图 1)。



注: A. 不同浓度果糖孵育 24 h 对 HK-2 细胞 *MCP-1* mRNA 表达的影响 ( ${}^{\circ}P=0.000$ , 与 0 mmol/L 组比较); B. 5 mmol/L 果糖作用不同时间对 HK-2 细胞 *MCP-1* mRNA 表达的影响 ( ${}^{\circ}P=0.000$ , 与 0 h 比较); C. 不同浓度果糖孵育 48 h 对 HK-2 细胞 *MCP-1* 蛋白表达的影响; D. 5 mmol/L 果糖作用不同时间对 HK-2 细胞 *MCP-1* 蛋白表达的影响; E. 抑制 KHK 活性对果糖孵育产生的 *MCP-1* mRNA 表达的影响 ( ${}^{\circ}P=0.000$ , 与果糖 0 mmol/L+KHK-IN-1 0 nmol/L 组比较;  ${}^{\circ}P=0.002$ ,  ${}^{\circ}P=0.000$ , 与果糖 5 mmol/L+KHK-IN-1 0 nmol/L 组比较); F. 抑制 KHK 活性对果糖孵育产生的 *MCP-1* 蛋白表达的影响。

图 1 果糖通过 KHK 诱导 HK-2 细胞产生 MCP-1

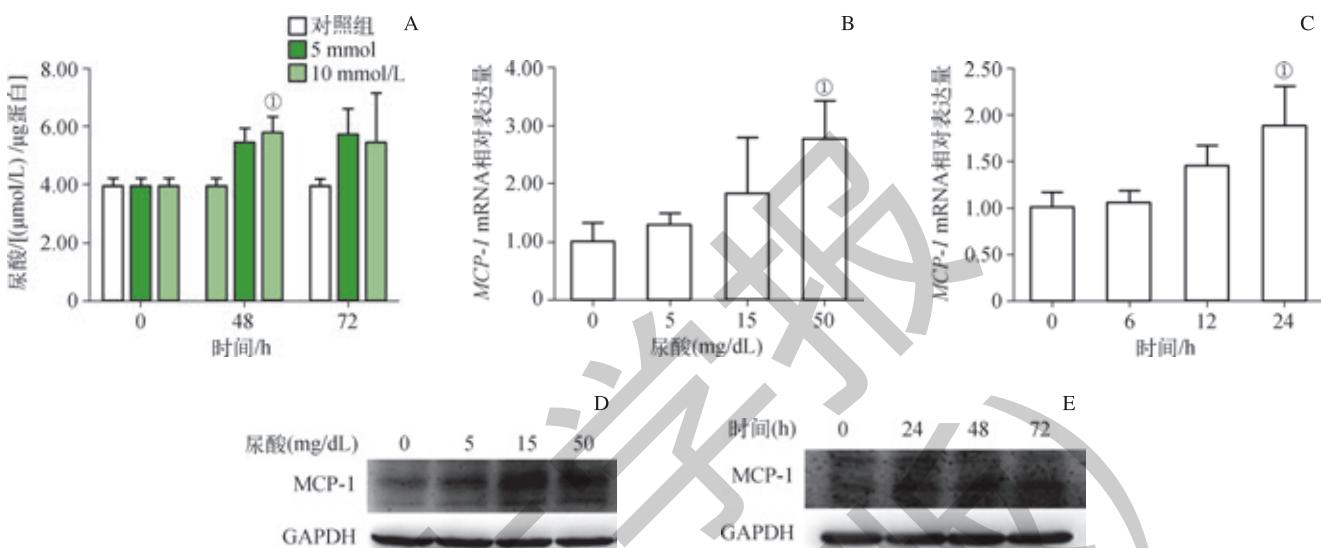
Fig 1 Fructose stimulates HK-2 cells producing MCP-1 through KHK



## 2.2 尿酸介导果糖诱导的 MCP-1 产生

果糖孵育组中, 5 和 10 mmol/L 果糖孵育 48 h, 细胞内尿酸浓度分别较对照组增加 ( $1.51 \pm 1.40$ )  $\mu\text{mol/L}$  和 ( $1.86 \pm 1.70$ )  $\mu\text{mol/L}$  ( $P=0.086$ ,  $P=0.037$ ); 孵育 72 h, 细胞内尿酸浓度分别较对照组增加 ( $1.72 \pm 2.26$ )  $\mu\text{mol/L}$  和 ( $1.51 \pm 3.05$ )  $\mu\text{mol/L}$  ( $P=0.469$ ,  $P=0.566$ )。尿酸孵育

组中, 尿酸浓度梯度和时间梯度实验均显示, 50 mg/dL 尿酸孵育 24 h, *MCP-1* mRNA 表达量显著升高, 分别为对照组的 ( $2.78 \pm 0.869$ ) 倍和 ( $1.88 \pm 0.52$ ) 倍 ( $P=0.030$ ,  $P=0.013$ ); 孵育 48 h, *MCP-1* 蛋白表达量分别为对照组的 ( $3.52 \pm 1.57$ ) 倍和 ( $3.38 \pm 0.98$ ) 倍 ( $P=0.027$ ,  $P=0.020$ ) (图 2)。



注: A. 果糖对 HK-2 细胞尿酸产生的影响 (①  $P=0.037$ , 与 0 mmol/L 48 h 组比较); B. 不同浓度尿酸作用 24 h 对 HK-2 细胞 *MCP-1* mRNA 表达的影响 (①  $P=0.037$ , 与 0 mg/dL 组比较); C. 50 mg/dL 尿酸作用不同时间对 *MCP-1* mRNA 表达的影响 (①  $P=0.013$ , 与 0 h 组比较)。

图 2 内源性尿酸介导果糖诱导 HK-2 细胞产生 MCP-1

Fig 2 Endogenous uric acid mediates production of MCP-1 stimulated by fructose in HK-2 cells

果糖别嘌醇共孵育组中, 0.001、0.1 和 0.5 mmol/L 别嘌醇可抑制 5 mmol/L 果糖预处理后 *MCP-1* mRNA 表达, 其表达量较果糖 (5 mmol/L) 孵育组分别下降 ( $25.85 \pm 12.43$ ) %、( $25.66 \pm 17.90$ ) %、( $55.55 \pm 18.61$ ) % ( $P=0.004$ ,  $P=0.005$ ,  $P=0.000$ ) (图 3A)。0.1 和 0.5 mmol/L 别嘌醇可抑制 5 mmol/L 果糖预处理后 *MCP-1* 蛋白表达, 其表达量较果糖 (5 mmol/L) 孵育组分别下降 ( $34.48 \pm 8.25$ ) % 和 ( $49.91 \pm 10.34$ ) % (均  $P=0.000$ ) (图 3B)。尿酸别嘌醇共孵育组中, 别嘌醇未显著减少 *MCP-1* mRNA 和蛋白的表达, 与尿酸孵育组比较, 差异均无统计学意义 (均  $P>0.05$ ) (图 3C、D)。

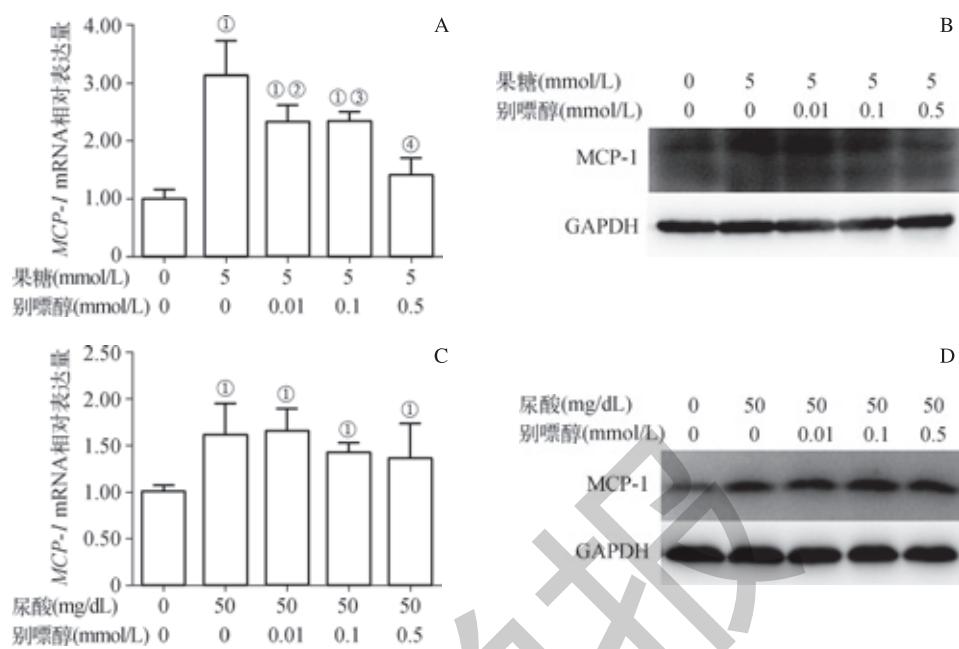
## 2.3 ROS 参与果糖和尿酸诱导 HK-2 细胞生成 MCP-1

5 mmol/L 果糖与 50 mg/dL 尿酸分别孵育 HK-2 细胞 4 h, 可见荧光强度与对照组相比显著增强 (图 4A); 而 0.1 mmol/L 浓度的别嘌醇可以显著抑制果糖诱导的 ROS

产生, 而不能抑制尿酸诱导的 ROS 产生 (图 4B)。

HK-2 细胞  $\text{H}_2\text{O}_2$  孵育的浓度和时间梯度实验中, 均观察到 0.3 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  孵育 24 h 时 *MCP-1* mRNA 较对照组显著增加, 分别为对照组的 ( $5.30 \pm 0.59$ ) 倍和 ( $3.30 \pm 0.28$ ) 倍 (均  $P=0.000$ ); *MCP-1* 蛋白表达亦均较对照组显著升高, 分别为对照组的 ( $1.82 \pm 0.21$ ) 倍和 ( $3.96 \pm 1.80$ ) 倍 ( $P=0.002$ ,  $P=0.029$ ) (图 5)。

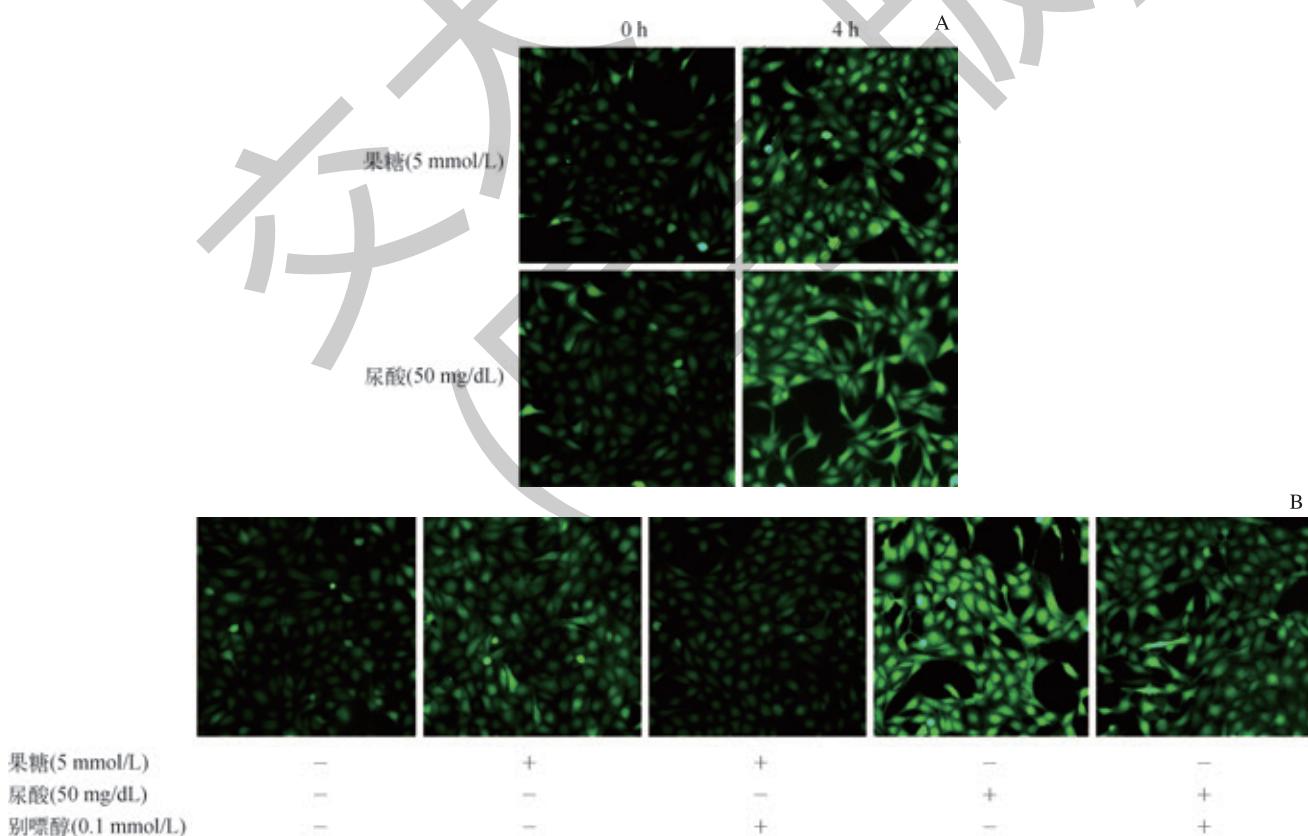
果糖和 NAC 共孵育组中, 5、10 和 50 mmol/L NAC 孵育 HK-2 细胞后, *MCP-1* mRNA 较果糖孵育组分别下降 ( $47.88 \pm 34.39$ ) %、( $65.40 \pm 28.79$ ) % 和 ( $67.78 \pm 38.36$ ) % ( $P=0.023$ ,  $P=0.003$ ,  $P=0.002$ )。尿酸 NAC 共孵育组中, 5、10 和 50 mmol/L NAC 孵育 HK-2 细胞后, *MCP-1* mRNA 较尿酸孵育组分别下降 ( $58.87 \pm 17.42$ ) %、( $57.49 \pm 22.49$ ) % 和 ( $84.02 \pm 18.72$ ) % (均  $P=0.000$ )。与果糖孵育组比较, 果糖 NAC 共孵育组 ROS 荧光减弱; 与尿酸孵育组比较, 尿酸 NAC 共孵育组 ROS 荧光减弱 (图 5)。



注: A. 不同浓度别嘌醇对 5 mmol/L 果糖诱导的 HK-2 细胞 *MCP-1* mRNA 表达的影响 (①  $P=0.000$ , 与果糖 0 mmol/L+ 嘌醇 0 mmol/L 组比较; ②  $P=0.004$ , ③  $P=0.005$ , ④  $P=0.000$ , 与果糖 5 mmol/L+ 别嘌醇 0 mmol/L 组比较); B. 不同浓度别嘌醇对 5 mmol/L 果糖诱导 *MCP-1* 蛋白表达的影响; C. 不同浓度别嘌醇对 50 mg/dL 尿酸诱导的 *MCP-1* mRNA 表达的影响 (①  $P=0.000$ , 与尿酸 0 mg/dL+ 别嘌醇 0 mmol/L 组比较); D. 不同浓度别嘌醇对 50 mg/dL 尿酸诱导 *MCP-1* 蛋白表达的影响。

图 3 别嘌醇抑制果糖诱导 HK-2 细胞产生 MCP-1

Fig 3 Allopurinol inhibits production of MCP-1 induced by fructose

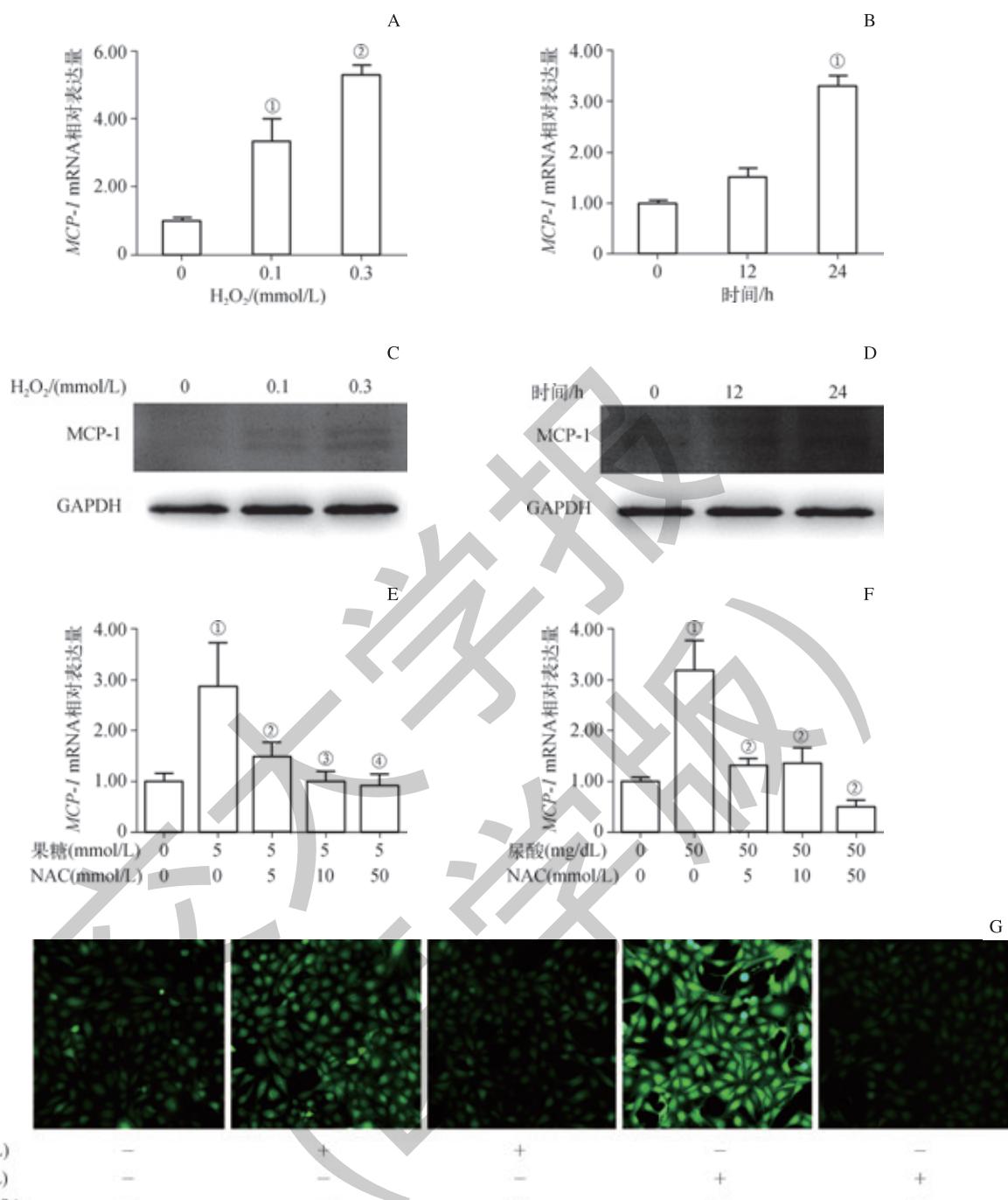


注: A. 5 mmol/L 果糖与 50 mg/dL 尿酸孵育 HK-2 细胞 4 h 的总 ROS 变化; B. 对照组、果糖孵育组、果糖别嘌醇共孵育组、尿酸组及尿酸别嘌醇共孵育组孵育 HK-2 细胞 4 h 总 ROS 变化。

图 4 别嘌醇抑制果糖诱导 HK-2 细胞产生 ROS

Fig 4 Allopurinol inhibits production of ROS induced by fructose





注: A. 不同浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用 24 h 对 HK-2 细胞  $MCP-1$  mRNA 表达的影响 ( $^{\circ}P=0.002$ ,  $^{\circ}P=0.000$ , 与 0 mmol/L 组比较); B. 0.3 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用不同时间对 HK-2 细胞  $MCP-1$  mRNA 表达的影响 ( $^{\circ}P=0.000$ , 与 0 h 组比较); C. 不同浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用 24 h 对 HK-2 细胞 MCP-1 蛋白表达的影响; D. 0.3 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用不同时间对 HK-2 细胞 MCP-1 蛋白表达的影响; E. NAC 抑制果糖诱导 HK-2 细胞  $MCP-1$  mRNA 表达 ( $^{\circ}P=0.003$ , 与果糖 0 mmol/L+NAC 0 mmol/L 组比较;  $^{\circ}P=0.023$ ,  $^{\circ}P=0.003$ ,  $^{\circ}P=0.002$ , 与果糖 5 mmol/L+NAC 0 mmol/L 组比较); F. NAC 抑制尿酸诱导 HK-2 细胞  $MCP-1$  mRNA 表达 ( $^{\circ}P=0.000$ , 与尿酸 0 mg/dL+NAC 0 mmol/L 组比较;  $^{\circ}P=0.000$ , 与尿酸 50 mg/dL+NAC 0 mmol/L 组比较); G. 对照组、果糖孵育组、果糖 NAC 共孵育组、尿酸组及尿酸 NAC 共孵育组 ROS 变化。

图 5 ROS 介导果糖诱导 HK-2 细胞产生 MCP-1

Fig 5 ROS mediates production of MCP-1 stimulated by fructose in HK-2 cells

### 3 讨论

本研究结果显示: 果糖通过 HK2 细胞的 KHK 催化代谢为尿酸, 并生成 ROS, 导致  $MCP-1$  mRNA 和蛋白表达

增加, 提示了果糖诱导肾脏炎症应答的可能机制。

增加糖的摄入, 可能诱导血糖升高从而加速 CKD 的进展。但研究<sup>[8]</sup>发现, 除了葡萄糖, 果糖摄入增加也增大高血压和代谢综合征的风险。Brymora 等<sup>[2]</sup>研究结果显示:

低果糖饮食降低了 CKD 患者的血压、血浆 ICAM-1 和 hsCRP 的表达。另有研究<sup>[4]</sup>发现，高果糖饮食的小鼠出现肾小球纤维化、小管上皮凋亡、间质炎症、胶原沉积及小管周单核巨噬细胞聚集，提示减少果糖的摄入可能有助于延缓 CKD 的进展。大量饮用含有果糖的饮料，可提高血尿酸水平和高血压的发生率，这均是加速 CKD 的可调节的危险因素<sup>[9]</sup>。

葡萄糖在醛糖还原酶催化下经山梨醇生成果糖<sup>[10]</sup>。果糖是一种水溶性较好的单糖，进入体内后被小肠吸收入血，50%以上的果糖转运至肝脏代谢，其余经肾脏及脂肪组织代谢<sup>[10-12]</sup>。果糖经肾小管上皮细胞膜上果糖转运体5和2转运至胞质内，进入胞质的果糖可以被己糖激酶和己酮糖激酶(KHK)磷酸化。果糖在KHK催化下消耗1分子ATP，磷酸化生成1磷酸果糖(F-1-P)，产生ADP。ADP经腺苷酸激酶生成一磷酸腺苷(AMP)，AMP在腺苷脱氨酶的作用下生成次黄嘌呤核苷酸(IMP)。在核苷磷酸化酶作用下，IMP生成次黄嘌呤，后经2次黄嘌呤氧化酶氧化，最终生成尿酸<sup>[13]</sup>。当前的研究再次证实了KHK和细胞内尿酸介导了果糖的作用，外源性尿酸及抑制果糖代谢均不能导致MCP-1的产生。高尿酸血症是痛风的危险因素，是慢性肾脏病发病和心血管疾病的独立危险因素，也是高果糖饮食诱导代谢综合征的主要原因。高尿酸血症还可以促进脂肪组织生成，增加胰岛素抵抗，引起肥胖、高血压、糖尿病等一系列代谢综合征<sup>[14]</sup>。研究<sup>[15]</sup>显示，给予小鼠高果糖(60%以上)饮食4周后，小鼠血浆尿酸水平升高，肾皮质血管收缩，入球小动脉增厚，并且诱发了一系列代谢综合征(如高血压、高脂血症、胰岛素抵抗)；而果糖的另一代谢产物F-1-P在醛缩酶B催化下生成磷酸二羟丙酮和甘油醛。目前，仍缺乏F-1-P在肾脏炎症及纤维化方面的研究。

尿酸一方面被认为是一种抗氧化剂，可以增强超氧自由基的清除，减少ROS<sup>[16]</sup>；另一方面，当尿酸在人体内生成过多时，则引起高胰岛素血症、高脂血症等一系列代谢综合征。有研究<sup>[17]</sup>表明，尿酸增强了脂肪细胞中NADPH氧化酶的活性，增加了ROS的产生；NADPH氧化酶依赖

的ROS产生，激活MAP激酶P38和ERK1/2通路，降低一氧化氮(NO)生物利用活性，导致蛋白硝基化和脂质过氧化的产生。黄嘌呤氧化酶是尿酸产生的关键酶，组织损伤和缺血时黄嘌呤脱氢酶转变成黄嘌呤氧化酶，此过程产生超氧阴离子和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>[18]</sup>。当黄嘌呤氧化酶与黄嘌呤反应时，电子沿着钼(Mo)、Fe-S和黄素腺嘌呤二核苷(FAD)传递。黄嘌呤氧化酶产生还原性黄素腺嘌呤二核苷(FADH<sub>2</sub>)，而黄嘌呤脱氢酶产生还原型核素二核苷酸(FADH<sub>2</sub>)，只有FADH<sub>2</sub>可以与O<sub>2</sub>反应<sup>[19]</sup>。在尿酸代谢过程中，黄嘌呤氧化酶将次黄嘌呤氧化成黄嘌呤，进一步氧化黄嘌呤产生尿酸。黄嘌呤氧化酶与NAPDH氧化酶和线粒体电子传递链共同使线粒体产生的ROS释放进入细胞质<sup>[20]</sup>。

细胞内升高的ROS使硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)与硫氧还蛋白分离，导致TXNIP与NLRP3炎症状结合；NLRP3炎症状小体的激活，进一步通过caspase1途径导致细胞产生白介素1β(IL-1β)或白介素18(IL-18)，引起炎症反应<sup>[19-21]</sup>。ROS作为信号分子，还可以活化ERK、p38MAPK通路，进而调节转录因子核因子κB(NF-κB)的活化，启动细胞因子、化学趋化因子和炎症因子，包括环氧合酶2、TNF-α、IL-1β和IL-18等基因的转录，使T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤细胞、Treg细胞、树突状细胞及巨噬细胞聚集，诱导炎症反应。细胞内聚集的ROS还可以通过酪氨酸硝基化修饰，抑制酪氨酸激酶受体的磷酸化，参与炎症反应<sup>[21-23]</sup>。本研究结果显示，别嘌醇可以抑制果糖诱导HK-2细胞ROS下降和MCP-1产生。可见，细胞内尿酸和ROS生成增加与高果糖的作用机制有关。

本实验尚存在一些不足：因为无法采购到果糖另一代谢产物1磷酸果糖，未能进一步探究F-1-P的作用；未开展动物实验以进一步证实体外研究结论。实际上啮齿类动物体内状况与人类不同，存在大量可以快速分解尿酸的尿酸氧化酶，因此，动物实验检测果糖的作用可能极为困难。

综上所述，果糖经己酮糖激酶磷酸化后产生1磷酸果糖，消耗ATP产生ADP，最终代谢为尿酸，尿酸通过ROS介导了果糖诱导的肾小管上皮细胞炎症的发生。

## 参·考·文·献

- [1] Zhang L, Wang F, Wang L, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China: a cross-sectional survey[J]. *Lancet*, 2012, 380(9842): 650.
- [2] Brymora A, Flisinski M, Johnson RJ, et al. Low-fructose diet lowers blood pressure and inflammation in patient with chronic kidney disease[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 27(2): 608-612.
- [3] Choi HK, Willett W, Curhan G. Fructose-rich beverages and risk of gout in women[J]. *JAMA*, 2010, 304(20): 2270-2278.
- [4] Gersch MS, Mu W, Cirillo P, et al. Fructose, but not dextrose, accelerates the progression of chronic kidney injury[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 293(4): F1256-F1261.
- [5] Hayward BE, Bonhron DT. Structure and alternative splicing of ketohexokinase gene[J]. *Eur J Biochem*, 1998, 257(1): 85-91.
- [6] Lanasa MA, Ishimoto T, Cicerchi C, et al. Endogenous fructose production and fructokinase activation mediate renal injury in diabetic nephropathy[J]. *J*



- Am Soc Nephrol, 2014, 25(11): 2526-2538.
- [7] Ronal Jimenez CA, Ishimoto T, Lanarpa MA, et al. Fructokinase activity mediates dehydration-induced renal injury[J]. Kidney Int, 2014, 86(2): 294-302.
- [8] Khitan Z, Kim DH. Fructose: a key factor in the development of metabolic syndrome and hypertension[J]. J Nutr Meta, 2013(2013): ID682673.
- [9] Yang T, Chu CH, Bai CH, et al. Uric acid concentration as a risk marker for blood pressure progression and incident hypertension: a Chinese cohort study[J]. Metabolism, 2012, 61(12): 1747-1755.
- [10] Cirillo P, Gersch MS, Mu W, et al. Ketohexokinase-dependent metabolism of fructose induces proinflammatory mediators in proximal tubular cells[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(3): 545-553.
- [11] Froesch ER, Ginsberg JL. Fructose metabolism of adipose tissue.I.Comparison of fructose and glucose metabolism in epididymal adipose tissue of normal rats[J]. J Bio Chem, 1962, 237: 3317-3324.
- [12] Van den Berghe G. Fructose: metabolism and short-term effects on carbohydrate and purine metabolic pathways[J]. Prog Biochem Pharmacol, 1986, 21: 1-32.
- [13] Halfirsch J. Metabolic effects of dietary fructose[J]. FASEB J, 1990, 4(9): 2652-2660.
- [14] Caliceti C, Calabria D, Roda A, et al. Fructose intake, serum uric acid, and cardiometabolic disorders: a critical review[J]. Nutrients, 2017, 9(4): E395.
- [15] Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Bautista-Garcia P, et al. Effects of febuxostat on metabolic and renal alterations in rats with fructose-induced metabolic syndrome[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 294(4): F710-F718.
- [16] Tasaki E, Sakurai H, Nitao M, et al. Uric acid, an important antioxidant contributing to survival in termites[J]. PLoS One, 2017, 12(6): e0179426.
- [17] Sautin YY, Nakagawa T, Zharikov S, et al. Adverse effects of classic antioxidant uric acid in adipocytes: NADPH oxidase-mediated oxidative/nitrosative stress[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 293(2): c584-c596.
- [18] Asai R, Nishino T, Matsumura T, et al. Two mutations convert mammalian xanthine oxidoreductase to highly superoxide-prudent xanthine oxidase[J]. J Biochem, 2007, 141(4): 525-534.
- [19] Barber MJ, Bray RC, Cammack R, et al. Oxidation-reduction potentials of turkey liver xanthine dehydrogenase and the oxidase and dehydrogenase behavior in molybdenum-containing hydroxylases[J]. Biochem J, 1977, 163(2): 279-289.
- [20] Li H, Horke S, Forstermann U. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention[J]. Trends Pharmacol Sci, 2013, 34(6): 313-319.
- [21] Zhou R, Tardivel A, Thorens B, et al. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation[J]. Nat Immunol, 2010, 11(2): 136-140.
- [22] Schroder K, Zhou R, Tschoop J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger[J]. Science, 2010, 327(5963): 296-300.
- [23] Duan SB, Yang SK, Zhou QY, et al. Mitochondria-targeted peptides prevent contrast-induced acute kidney injury in the rats with hypercholesterolemia[J]. Ren Fail, 2013, 35(8): 1124-1129.

[收稿日期] 2017-12-26

[本文编辑] 吴 洋

## 学术快讯

### 上海交通大学医学院附属仁济医院国际门诊通过 DNV GL 国际认证

2018年4月12日, 上海交通大学医学院附属仁济医院国际门诊暨上海一渥太华国际家庭医生门诊(下称“国际门诊”)举行DNV GL国际认证揭牌仪式。挪威卫生大臣Bent Høie, 挪威驻沪总领事Kristin Iglum, 上海市卫计委副主任闻大翔, 仁济医院院长李卫平、副院长王育及牟姗, DNV GL管理服务集团大中国区总裁康文煜, 中国医疗总经理薄会杰, 中国首席临床总监Cathie Abrahamsen等, 与仁济医院合作的各商业保险公司及健康管理机构中外代表近百人出席。

仁济医院国际门诊DNV GL国际认证项目于2017年1月由仁济医院与全球知名的国际第三方认证、评估及风险管理机构DNV GL合作并启动, 历时1年顺利通过认证。这是中国第一个DNV GL独有的基于风险的评审方式, 也是拥有国际医疗质量协会认可的国际门诊认证证书, 在中国医院管理发展历史上具有里程碑式的意义。

