

高糖对体外培养的足细胞自噬的影响

郑海宁¹, 苏东明², 董成龙¹, 鲁一兵^{1*}, 丁大法^{1*}

(¹南京医科大学第二附属医院内分泌科, 江苏 南京 210011; ²南京医科大学代谢病研究中心, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究不同葡萄糖浓度、不同作用时间对体外培养的足细胞自噬的影响。方法:体外培养小鼠永生性足细胞系,给予不同浓度的葡萄糖(5.6、11.0、20.0、30.0 mmol/L)刺激,作用时间分别为6、12、24、36 h。Western blot 检测足细胞自噬标记蛋白微管相关蛋白1轻链3(LC3) II的表达;透射电镜观察足细胞自噬小体的形成;荧光显微镜观察足细胞转染 GFP-LC3 荧光蛋白后绿色荧光蛋白颗粒的变化。结果:①与0 h相比,30 mmol/L 葡萄糖刺激后足细胞 LC3- II 蛋白的表达随着作用时间的延长逐渐增加,到24 h时增加最明显,差异有显著性($P < 0.05$)。24 h时,透射电镜下足细胞自噬小体形成最多;荧光显微镜下足细胞转染 GFP-LC3 绿色荧光蛋白颗粒最多。②与对照组5.6 mmol/L相比,随着葡萄糖刺激浓度的增加足细胞 LC3- II 蛋白的表达明显增加,30 mmol/L 浓度时最明显,差异有显著性($P < 0.05$)。结论:高糖呈浓度和时间依赖性增加体外培养的足细胞 LC3- II 蛋白的表达、诱导足细胞自噬体的形成。

[关键词] 足细胞;自噬;葡萄糖;糖尿病肾病

[中图分类号] R587.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)04-433-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20140406

Effects of high glucose on autophagy of cultured podocytes *in vitro*

Zheng Haining¹, Su Dongming², Dong Chenglong¹, Lu Yibing^{1*}, Ding Dafa^{1*}

(¹Department of Endocrinology, the Second Affiliated Hospital to NJMU, Nanjing 210011; ²Institute of Metabolic Diseases, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of different concentrations of D-glucose and different periods of time on autophagy in *in vitro* cultured podocytes. **Methods:** *In vitro*, cultured mouse podocyte clones (MPC5) were incubated with D-glucose at concentrations of 5.6, 11, 20 and 30 mmol/L for 6, 12, 24 and 36 h, respectively. The protein expressions of LC3 in podocytes were examined by Western blot and autophagosomes in podocytes were observed by transmission electron microscope. The changes of green fluorescent protein particles were observed after GFP-LC3 transfected podocytes by fluorescence microscopy. **Results:** ① Compared with the 0 h group, the protein expression of LC3-II increased in a time-dependent manner and reach the highest at 24 h in podocytes exposed to 30 mmol/L D-glucose ($P < 0.05$). At the time of 24 h, the autophagosomes in podocytes and the green fluorescent protein particles in GFP-LC3 transfected podocytes were increased most prominent. ② Compared with the 5.6 mmol/L group, the protein expression of LC3-II was increased in a dose-dependent manner in podocytes exposed to D-glucose with increasing concentrations. In the concentration of 30 mmol/L, the expression of LC3-II was most prominent ($P < 0.05$). **Conclusion:** High glucose upregulates the protein expression of LC3-II in time- and dose-dependent manners and induces autophagy in cultured podocytes.

[Key words] podocyte; autophagy; glucose; diabetic nephropathy

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(04):433-436]

高糖对足细胞的损伤是糖尿病肾病蛋白尿的主要机制。自噬是一种溶酶体参与降解细胞内老化及

受损细胞器和蛋白质的细胞代谢过程,是应激状态下细胞自我保护的适应性表现^[1]。而有关高糖刺激对足细胞自噬的影响目前文献报道甚少。本研究拟通过观察不同浓度的葡萄糖、不同作用时间下体外培养的足细胞自噬的变化了解高糖对足细胞自噬的影响。

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81270896);国家自然科学基金青年项目(81100577)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: luyibing2004@126.com; dingdafa2004@yahoo.com.cn

1 材料和方法

1.1 材料

条件永生性小鼠足细胞系 MPC5 由美国爱因斯坦大学 Mundel P 教授惠赠,南京医科大学第二附属医院肾脏科杨俊伟教授转赠。RPMI-1640 培养基、HEPES、opti-MEM 培养基(Gibco 公司,美国),胎牛血清(FBS,HyClone 公司,美国), γ 干扰素(PT 公司,美国),I 型胶原(BD 公司,美国),胰蛋白酶、葡萄糖、兔抗鼠 LC3B 抗体(Sigma 公司,美国),羊抗兔二抗(南京凯基), β -actin(巴奥德公司,美国),GFP-LC3 质粒(上海诺百),脂质体 2000(英杰公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 足细胞培养

小鼠 MPC5 培养方法参照文献[2]。足细胞快速复苏后用含 10%FBS 及 γ 干扰素的 RPMI-1640 培养液于 33°C 传代增殖,继而接种到 25 cm² 培养瓶(3.0×10^5 个/瓶)或 6 孔板内(1.0×10^5 个/L),于 37°C 诱导分化后进行实验。实验分组:正常对照组(5.6 mmol/L 葡萄糖)、低、中、高浓度(11、20、30 mmol/L)葡萄糖处理组,分别培养 6、12、24、36 h。独立重复 3 次上述步骤。

1.2.2 Western blot 观察足细胞 LC3-II 蛋白的表达

PBS 洗涤细胞 2 次,按 100:1 加入细胞裂解液和蛋白酶抑制剂,刮下细胞,于冰上裂解 30 min,然后 4°C,12 000 r/min 离心 10 min 取上清,按 1/5 体积加入 6 \times 上样缓冲液,100°C 变性 10 min。应用考马斯亮蓝法测浓度,等量样品(30 μ g 蛋白)以 SDS-PAGE 分离蛋白质,电泳后将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,室温下 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h,加一抗孵育慢摇 0.5 h 后 4°C 过夜。0.5 h 室温下复温后 1 \times TBST 洗一抗,加 HRP 标记二抗室温孵育 1 h。1 \times TBST 洗二抗,加发光液后用天能凝胶成像系统进行图像扫描记录。

1.2.3 透射电镜观察足细胞自噬体形成

正常对照组和 30 mmol/L 高糖刺激 24 h 后,PBS 洗涤,离心收集细胞,5% 戊二醛固定,常规脱水、包埋、切片及染色,透射电镜观察、拍照、记录。

1.2.4 荧光显微镜观察转染 GFP-LC3 质粒足细胞绿色荧光颗粒

将足细胞传代种植于 6 孔板上,细胞贴壁融合达 60% 后,予以 opti-MEM 培养基孵育,以脂质体 2000 转染 GFP-LC3 质粒,按照说明书每孔加入 4

μ g/ml 浓度的 GFP-LC3 质粒转染 6 h 后,更换正常培养基培养 24 h。之后分别予以 5.6、30.0 mmol/L 葡萄糖培养 24 h 后,在荧光显微镜下观察。

1.3 统计学方法

应用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析,两组间比较用 Tukey's 检验进行统计, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖作用不同时间后足细胞 LC3-II 蛋白表达的变化

与对照组 0 h 相比,高浓度葡萄糖(30 mmol/L)处理足细胞 6、12 h,LC3-II 蛋白的表达有所增加,但是差异无显著性($P > 0.05$);到 24 h 时,LC3-II 蛋白的表达明显增加,差异有显著性($P < 0.05$);到 36 h 时,LC3-II 蛋白的表达明显下降,差异无显著性($P > 0.05$,图 1)。

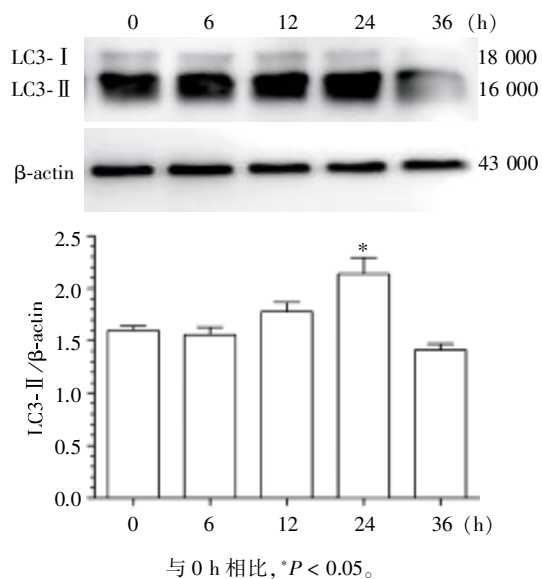
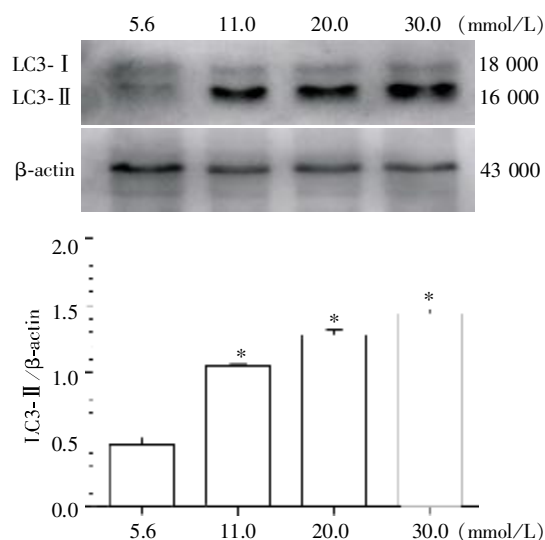


图 1 高糖(30 mmol/L)培养足细胞不同作用时间 LC3-II 蛋白表达的变化

Figure 1 The protein expressions of LC3-II in podocytes exposed to 30 mmol/L D-glucose for different periods of time observed by Western blot

2.2 不同浓度的高糖作用 24 h 后足细胞 LC3-II 蛋白表达的变化

与正常葡萄糖浓度(5.6 mmol/L)的对照组相比,随着葡萄糖刺激浓度的增高,足细胞 LC3-II 的表达逐渐增加,在 30 mmol/L 葡萄糖浓度下,LC3-II 表达量增加最为明显,差异均具有显著性($P < 0.05$,图 2)。



与 5.6 mmol/L 相比, * $P < 0.05$ 。

图 2 不同葡萄糖浓度培养足细胞 24 h LC3-II 蛋白表达的变化

Figure 2 The protein expressions of LC3-II in podocytes exposed to different concentrations of D-glucose for 24 h observed by Western blot

2.3 高糖作用 24 h 透射电镜下足细胞自噬体形成的改变

高浓度葡萄糖 (30 mmol/L) 处理足细胞 24 h 后,透射电镜下可见典型的自噬体形成,表现为胞质内游离的单层或双层膜结构包裹细胞质或损伤的细胞器形成泡状结构。与对照组相比,高糖处理 24 h 后的足细胞胞质内的自噬体数目明显增多,自噬体的体积增大(图 3)。

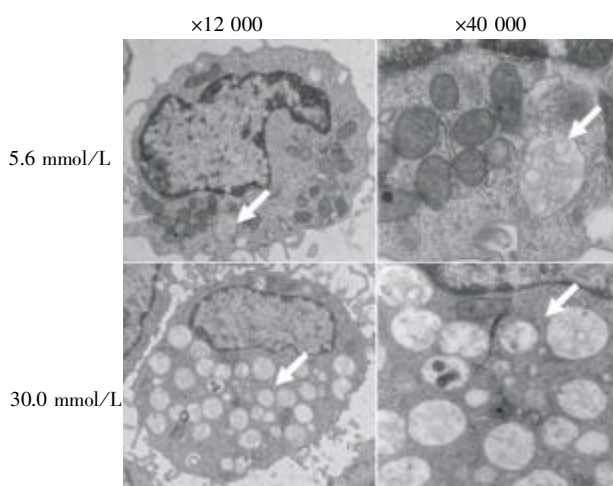
2.4 高糖作用 24 h 荧光显微镜下足细胞 GFP-LC3 蛋白荧光的变化

与对照组(5.6 mmol/L 浓度葡萄糖)相比,高浓度葡萄糖(30 mmol/L)处理足细胞 24 h 后,荧光显微镜下观察 GFP-LC3 转染后的足细胞,胞质内出现的 GFP-LC3 绿色荧光颗粒的数目明显增多(图 4)。

3 讨论

高血糖引起足细胞损伤,导致足细胞脱落、丢失和数目下降是糖尿病肾病蛋白尿形成的主要原因,可能与糖代谢紊乱导致非酶糖化、多元醇通路激活、蛋白激酶 C(PKC)激活、氧化应激及内质网应激增加等因素有关,但目前机制还不完全清楚^[3-4]。

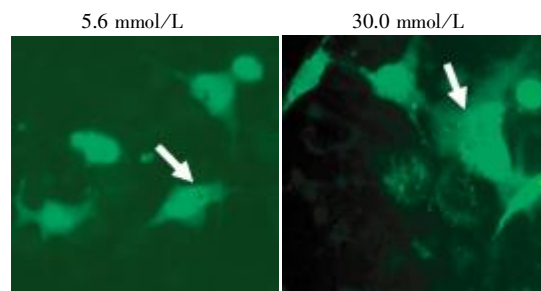
自噬是细胞通过单层或双层膜包裹内源性物质形成自噬体,并与溶酶体融合成自噬溶酶体进行多种酶的消化及降解,以实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新。自噬通过清除老化的蛋白质、



与 5.6 mmol/L 相比,30.0 mmol/L 组足细胞中自噬泡的数量明显增多,大小不一。

图 3 高糖刺激足细胞 24 h 透射电镜下胞质内自噬体形成的变化

Figure 3 Changes of the autophagosomes in podocytes exposed to high glucose for 24 h observed by electron microscopy



与 5.6 mmol/L 组相比,30.0 mmol/L 组足细胞浆中 GFP-LC3 融合蛋白形成的绿色荧光颗粒数量明显增多($\times 200$)。

图 4 高糖刺激足细胞 24 h 荧光显微镜下足细胞转染 GFP-LC3 绿色荧光蛋白的变化

Figure 4 Changes of punctate fluorescence patterns of GFP-LC3 in GFP-LC3 transfected podocytes exposed to high glucose for 24 h observed by fluorescence microscopy

过氧化物酶、线粒体等不需要的和损伤的分子和细胞器,来维持细胞内环境的稳定。因此,自噬是细胞在应激状态下自我保护的一种机制^[5]。目前已证实自噬对足细胞等终末分化细胞的生长和发育很重要,Mizushima 等^[6]研究也证实足细胞中存在较高的基础自噬。Hartleben 等^[7]研究发现足细胞特异性缺失自噬相关基因(Atg)5,明显抑制小鼠自噬的产生,导致内质网应激、蛋白尿增加及肾小球疾病恶化。与对照组相比,用嘌呤霉素氨基核苷(puromycin aminonucleoside, PAN)和阿霉素喂养 Atg5^{-/-}小鼠,更

容易导致足细胞数目降低和大量蛋白尿产生,表明自噬消失更容易导致肾小球疾病^[7]。足细胞是高度分化的特殊细胞,受损后不易再生,针对高血糖等损伤因素更需要通过足细胞的自噬清除损伤的细胞器,修复足细胞功能。但目前有关高糖对足细胞自噬的影响目前只有2篇文献报道。

LC3是自噬发生的一种标记性蛋白。在自噬泡形成过程中,LC3经剪切修饰变成胞浆蛋白LC3-I,之后LC3-I转变为LC3-II,可定位于前自噬泡和自噬泡膜表面,参与自噬体的伸展扩张。因此,LC3-II被认为自噬活动的特异性标志物^[1]。

本研究发现,30 mmol/L葡萄糖处理体外培养的小鼠足细胞,随着高糖刺激时间的延长LC3-II蛋白的表达逐渐增加,到24 h时增加最明显,而到36 h时已经出现下降。说明高糖刺激的早期可以出现足细胞自噬的增加。以24 h为时间点,观察不同浓度(11、20、30 mmol/L)高糖刺激对足细胞LC3-II蛋白表达的影响,发现与对照组5.6 mmol/L的正常葡萄糖浓度相比,随着葡萄糖浓度的增加足细胞自噬的发生亦增加。尤其在30 mmol/L葡萄糖浓度诱导下自噬增加最为明显,说明随着葡萄糖刺激强度的增加足细胞自噬的发生也在增强。

为进一步验证本文的结果,首先用透射电镜观察30 mmol/L高糖处理足细胞24 h后足细胞胞质内,自噬体形成的数目。与对照组相比,高糖处理24 h后的足细胞胞质内的自噬体数目明显增多,自噬体的体积增大;其次,选择GFP-LC3单荧光指示体系来观察30 mmol/L高糖处理足细胞24 h后绿色荧光颗粒数量的变化。正常细胞自噬较少时,GFP-LC3融合蛋白弥散在胞浆中;自噬形成较多时,GFP-LC3融合蛋白转位至自噬体膜,在荧光显微镜下形成多个明亮的绿色荧光斑点。本研究结果发现与5.6 mmol/L葡萄糖浓度相比,高糖处理足细胞24 h后绿色荧光颗粒明显增加,证实在高糖刺激的早期足细胞自噬明显增加。

高血糖引起足细胞自噬的机制目前还不清楚。高血糖可引起足细胞氧化应激的发生,Gonzalez等^[8]研究发现氧化应激能促进糖尿病患者肾脏细胞自噬的增加。氧化应激时ROS可以抑制自噬相关基因Atg4的蛋白酶活性,促进Atg8/LC3的脂化来激活

自噬^[9]。Fang等^[10]研究发现高糖引起的足细胞自噬与内质网应激(ER)的增强有关。高糖可能通过激活AMPK、促进自噬启动激酶Ulk1蛋白317和777位点的磷酸化,进一步抑制mTORC1来诱导自噬的发生^[11]。但具体的机制尚待于进一步的研究来证实。

[参考文献]

- [1] Jing K, Lim K. Why is autophagy important in human diseases[J]. *Exp Mol Med*, 2012, 44(2): 69-72
- [2] Mundel P, Reiser J, Zúñiga Mejía Borja A, et al. Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines [J]. *Exp Cell Res*, 1997, 236(1): 248-258
- [3] Spurney RF, Coffman TM. Stressed-out podocytes in diabetes? [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(11): 2035-2037
- [4] Morse E, Schroth J, You YH, et al. TRB3 is stimulated in diabetic kidneys, regulated by the ER stress marker CHOP, and is a suppressor of podocyte MCP-1 [J]. *Am J Physiol-Renal Physiology*, 2010, 299(5): F965-F972
- [5] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion [J]. *Nature*, 2008, 451(7182): 1069-1075
- [6] Mizushima. Methods for monitoring autophagy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(12): 2491-2502
- [7] Hartleben B, Gödel M, Meyer-Schwesinger C, et al. Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(4): 1084-1096
- [8] Gonzalez CD, Lee MS, Marchetti P, et al. The emerging role of autophagy in the pathophysiology of diabetes mellitus [J]. *Autophagy*, 2011, 7(1): 2-11
- [9] Bartolomé A, López-Herradón A, Portal-Núñez S, et al. Autophagy impairment aggravates the inhibitory effects of high glucose on osteoblast viability and function [J]. *Biochem J*, 2013, 455(3): 329-337
- [10] Fang L, Zhou Y, Cao H, et al. Autophagy attenuates diabetic glomerular damage through protection of hyperglycemia-induced podocyte injury [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60546
- [11] Kim J, Kundu M, Viollet B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(2): 132-141

[收稿日期] 2013-10-28