

· 基础医学 ·

文章编号: 1002-0217(2019) 01-0001-04

高糖环境对肾小球足细胞及 TNFR1 的影响

吴雪¹ 章尧² 孟祥健¹ 张斌华¹ 王李卓² 高家林¹

(1.皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 内分泌科,安徽 芜湖 241001; 2.皖南医学院 生物化学与分子生物学教研室,安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 探究高糖环境下小鼠肾小球足细胞及炎症因子 TNFR1 的改变, 期望为糖尿病肾病(DN) 的防治提供新的思路。方法: 将离体培养的小鼠肾小球足细胞分别设为正常对照组(D-葡萄糖 5.5 mmol/L)、高渗组(D-葡萄糖 5.5 mmol/L+甘露醇 39.5 mmol/L)、高糖组(D-葡萄糖 45 mmol/L)。刺激 48 h 后, 用 western blotting 检测高渗组、高糖组足细胞胰岛素信号通路的关键蛋白、纤维化标志蛋白、炎症水平的变化, 以及炎症因子 TNFR1 的表达情况; 刺激 72 h 后, 观察高糖组足细胞形态及细胞核的变化。结果: 刺激 48 h 后, pIRS-1^{Ser307} 在高渗组和高糖组表达均高于正常组, pAKT^{Ser473} 在高糖组表达低于正常组, 足细胞胰岛素抵抗水平上升; Collagen I、Fibronectin 及 IL1 β 在高渗组和高糖组表达均高于正常组, 足细胞纤维化水平及炎症水平上升; 此外, 炎症因子 TNFR1 在高渗组和高糖组表达也高于正常组。刺激延长至 72 h, 与正常对照组比较, 高糖组足细胞形态发生改变并开始出现凋亡。结论: 高糖可影响足细胞的形态及生存, 提高足细胞炎症水平。甘露醇和高糖均促进炎症因子 TNFR1 的表达, 推测 DN 伴随的高渗、高糖均可影响 TNFR1 在足细胞的表达。TNFR1 可能成为 DN 防治的新靶点。

【关键词】糖尿病肾病; 肿瘤坏死因子受体 1; 炎症; 足细胞**【中图分类号】**R-332; R 587.2 **【文献标志码】**A**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2019.01.001

Effects of high glucose environment on glomerular podocytes and TNFR1

WU Xue, ZHANG Yao, MENG Xiangjian, ZHANG Binhua, WANG Lizhuo, GAO Jialin

Department of Endocrinology and Genetic Metabolism, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

【Abstract】Objective: To investigate the changes of podocytes and TNFR1 in mice under high glucose environment for new direction to the prevention and treatment of diabetic nephropathy(DN). **Methods:** MPC5 podocytes were incubated with *in vitro* technique and allocated to control group(D-glucose dose in 5.5 mmol/L), hyperosmotic group(D-glucose in dose of 5.5 mmol/L+mannitol in dose of 39.5 mmol/L) and high glucose group(D-glucose dose in 45 mmol/L). Western blot was performed to detect the changes of insulin signaling pathway, fibrosis and inflammation levels, TNFR1 expression in the podocytes 48 h following stimulation. Morphology and nucleus changes of podocytes were observed at 72 h after glucose stimulation. **Results:** After stimulating podocytes for 48 hours, pIRS-1^{Ser307} expression was higher, yet pAKT^{Ser473} expression was lower in hyperosmotic and high glucose groups than in the control group and insulin resistance level was increased in the podocytes. Collagen I, Fibronectin and IL1 β expression was higher in hyperosmotic and high glucose group than in the control group, with increased fibrosis and inflammation levels in the podocytes. Higher expression of inflammatory factor TNFR1 was also observed in hyperosmotic and high glucose groups. After stimulating the podocytes for 72 hours, podocyte morphology changed and apoptosis occurred in the high glucose group. **Conclusion:** High glucose affects the morphology and survival and increases inflammation level in the podocytes. Both mannitol and high glucose may promote the expression of inflammatory factor TNFR1. DN associated with hyperosmolar and high glucose level can be speculated to regulate the expression of TNFR1 in podocytes, suggesting that TNFR1 may be a new target for the prevention and treatment of DN.

【Key words】diabetic nephropathy; TNFR1; inflammation; podocytes

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN) 作为糖尿病(diabetes mellitus, DM) 的微血管并发症, 常导

致终末期肾衰。持续的蛋白尿、高血压、肾小球滤过率下降是 DN 的主要临床表现。不仅如此, DN 还与

基金项目: 国家自然科学基金项目(81471002, 81800766); 安徽省自然科学基金项目(1708085MH188); 皖南医学院中青年基金项目(WK2016F01)

收稿日期: 2018-04-10

作者简介: 吴雪(1991-), 女, 2015 级硕士研究生, (电话) 18895380986, (电子信箱) 824919224@qq.com;

高家林, 男, 主任医师, 教授, 硕士生导师, (电子信箱) jialing.gao@yahoo.com, 通信作者;

王李卓, 女, 讲师, (电子信箱) 19277984@qq.com, 通信作者。

DM 病人心血管事件的发生率、病死率密切相关^[1]。足细胞是终末分化的肾小球内皮细胞,参与肾小球滤过屏障的组成。持续的高糖状态可以损伤足细胞功能, DN 蛋白尿的产生也与其有关^[2]。

DN 具有发病时难察觉,发生时难治愈的特点,其发病机理尚不明确,目前缺乏有效治疗。晚期糖基化终末产物的沉积,肾素-血管紧张素-醛固酮系统及蛋白激酶 C 的激活,多元醇通路的活化,机体氧化应激水平增加及遗传因素一直被认为是 DN 的主要发病机制。越来越多的研究证实炎症机制在 DN 的进展中发挥重要作用,并且成为学术界研究的新热点^[3]。本文旨在通过高糖诱导足细胞炎症,寻找 DN 治疗的新靶点,完善 DN 的发病机制,为 DN 的防治提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 材料 小鼠肾小球足细胞(MPC5 细胞)购自北京北纳创联生物技术研究院,于 90%DMEM 低糖培养基,10% 优质胎牛血清培养。DMEM 低糖培养基(GE Healthcare Life Science),葡萄糖(西陇化工),甘露醇(合肥睿捷),胎牛血清(上海双洙),胰酶细胞消化液(碧云天),pIRS-1^{Ser307} 抗体(碧云天),pAKT^{Ser473}(Abcam),Collagen I (Proteintech),Fibronectin (Proteintech),IL1β (Proteintech),TNFR1 (Proteintech),β-actin(Sigma),辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)(碧云天),辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)(碧云天),DAPI 染色液(碧云天),化学发光底物(Thermo Fisher Scientific),彩色预染蛋白质分子量标准(Sigma),RIPA 裂解液(碧云天),PMSF(碧云天),SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(碧云天),PVDF 蛋白转印膜(碧云天),超纯水(Millipore)。

1.2 细胞处理 细胞设为正常对照组(D-葡萄糖 5.5 mmol/L)、高渗组(D-葡萄糖 5.5 mmol/L+甘露醇 39.5 mmol/L)、高糖组(D-葡萄糖 45 mmol/L),葡萄糖及甘露醇干预细胞 48 h 后提取细胞蛋白。同样的方法再处理细胞两次,共提取 3 批蛋白样本。

1.3 western blotting 检测 细胞干预 48 h 后,弃培养液,PBS 漂洗 3 次,加入蛋白裂解液(1 mL RIPA 裂解液+10 μL PMSF)冰上裂解 10 min,细胞刮刀刮下。裂解的细胞转移至 1.5 mL EP 管,在超声波细胞破碎仪上进行充分匀浆,匀浆完成后,继续冰上裂解 30 min。测定蛋白浓度,用 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液进行蛋白变性。配胶完成后开始上样、电泳,上样顺序为正常对照组,高渗组,高糖组。电泳浓缩

胶时,电压设为 80 V,电泳分离胶时,电压设为 120 V。电泳完成后进行转膜,转膜条件 110V/90 min,冰浴。转膜完成后室温封闭 90 min,4℃ 过夜孵育一抗。次日,洗一抗,每次 10 min,洗 3 次。后室温孵育二抗 2 h,洗二抗,每次 10 min,洗 3 次。曝光,Image J 分析灰度值。按上述方法在提取的 3 批蛋白样本上进行 3 次独立实验。

1.4 DAPI 染色 细胞干预 72 h,弃培养液,加入 PBS 漂洗 1 次。细胞固定,加入 DAPI 染色液,避光染色 10 min。弃去 DAPI 染色液,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,即可在荧光倒置显微镜下观察。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析。数值变量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数之间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 *q* 检验。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 足细胞胰岛素信号通路的变化 western blotting 结果显示,细胞刺激 48 h 以后,pIRS-1^{Ser307} 在高渗组和高糖组表达均高于正常组,差异有统计学意义(*P*<0.05),而高渗组和高糖组表达差异无统计学意义(*P*>0.05);pAKT^{Ser473} 在高渗组表达升高(*P*<0.05),但在高糖组表达下降(*P*<0.05),差异均有统计学意义(*P*<0.05)(图 1 表 1)。

表 1 足细胞胰岛素信号通路蛋白表达水平

蛋白	正常组 (n=3)	高渗组 (n=3)	高糖组 (n=3)	F	P
pIRS-1 ^{Ser307}	0.44±0.06	0.76±0.11*	0.91±0.14*	14.694	0.005
pAKT ^{Ser473}	0.62±0.04	0.78±0.05*	0.32±0.08* #	46.743	0.000

注:与正常对照组比较,**P*<0.05;与高渗组比较,#*P*<0.05。

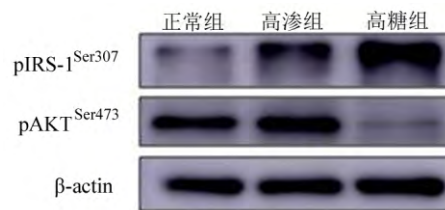


图 1 足细胞胰岛素信号通路的变化

2.2 足细胞纤维化及炎症水平的变化 western blotting 结果显示,细胞刺激 48 h 以后,Collagen I、Fibronectin 及 IL1β 在高渗组和高糖组表达均高于正常组,差异均有统计学意义(*P*<0.05);Collagen I 在高糖组表达高于高渗组,差异有统计学意义(*P*<0.05);其他两组间差异无统计学意义(*P*>0.05)(图 2 表 2)。

表 2 足细胞纤维化及炎症蛋白表达水平

蛋白	正常组 (n=3)	高渗组 (n=3)	高糖组 (n=3)	F	P
Collagen I	0.38±0.14	0.94±0.03*	1.14±0.04* #	63.204	0.000
Fibronectin	0.70±0.13	1.13±0.12*	1.20±0.13*	13.762	0.006
IL1β	0.83±0.04	1.12±0.15*	1.26±0.10*	12.322	0.008
TNFR1	0.15±0.01	0.25±0.03*	0.30±0.05*	15.474	0.004

注:与正常对照组比较,* P<0.05;与高渗组比较 #P<0.05。

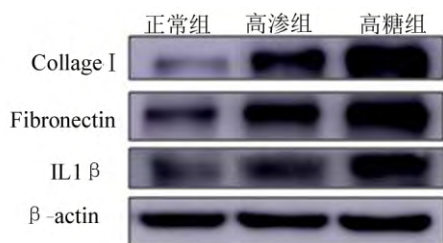


图 2 足细胞纤维化及炎症水平的变化

2.3 足细胞 TNFR1 表达的变化 western blotting 结果显示 细胞刺激 48 h 以后 炎症因子 TNFR1 在高渗组和高糖组表达均高于正常组 差异有统计学意义(P<0.05) 而高渗组和高糖组表达差异无统计学意义(P>0.05) (图 3 表 2)。

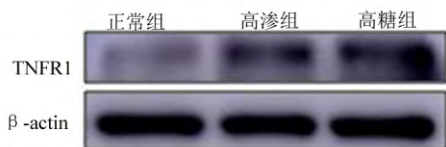
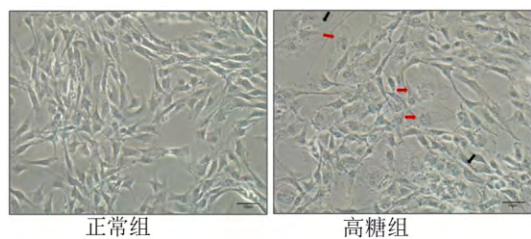


图 3 足细胞 TNFR1 表达的变化

2.4 高糖对足细胞形态的影响 高糖刺激 72 h 后 高糖组与正常对照组比较 细胞胞体明显变大 细胞间边缘不清 足细胞失去正常形态(图 4)。



红色箭头表示细胞体变大 黑色箭头表示细胞边缘不清。

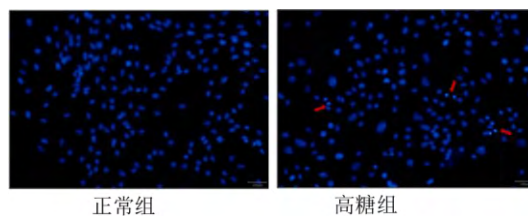
图 4 高糖对足细胞形态的影响(×200)

2.5 高糖对足细胞核的影响 高糖刺激 72 h 后 进行 DAPI 染色。结果显示高糖组与正常对照组比较 部分细胞核缩小、变亮 细胞出现核固缩(图 5)。

3 讨论

足细胞是肾小球滤过屏障的主要成分 在 DN 的进展中具有重要地位 可通过参与肌动蛋白细胞骨架重排阻止尿蛋白的产生^[4]。DN 伴随的高糖环

境可以损伤足细胞的功能 本实验中高糖不仅影响了足细胞的形态 还促其出现了核固缩。提示足细胞发生凋亡 正常生存受到影响 这种现象与 Wang 等人的实验结果相符合^[5]。近来有研究证实 足细胞和骨骼肌细胞、肝细胞一样 也是胰岛素作用的靶细胞 并且在产生蛋白尿前就已发生胰岛素抵抗^[6]。在 DN 中 IRS1/PI3K/AKT 信号通路是足细胞发生胰岛素抵抗的主要机制^[7]。Ser307 是 IRS1 上一个重要的酪氨酸磷酸化位点 pIRS-1^{Ser307}对胰岛素信号通路具有负性调控作用。本实验中 甘露醇和高糖刺激下足细胞 pIRS-1^{Ser307}表达增高 提示 IRS1 酪氨酸位点磷酸化增强 IRS1 与胰岛素受体正常结合受到影响^[8]。AKT 是 IRS1/PI3K/AKT 信号通路下游主要部分 而 pAKT^{Ser473}是 AKT 的完全活化形式^[9]。本实验中 高糖刺激下 pAKT^{Ser473}表达下降 提示 AKT 的正常功能受到影响。高糖刺激下的足细胞 胰岛信号通路发生异常 胰岛素抵抗明显增加。



红色箭头表示核固缩。

图 5 高糖对足细胞核的影响(DAPI 染色×100)

虽然 DN 的发病机制不明 发展也受诸多因素影响 譬如病程、患者年龄、种族、肾脏疾病易感性 但当 DN 进展至终末期肾衰时常伴有明显的肾脏纤维化^[10]。肾脏许多病理改变与肾脏纤维化有关 比如肾小球硬化 肾小管间质纤维化 足细胞损伤等^[11]。细胞外基质在肾脏修复时的过度沉积是肾脏纤维化的一个主要原因 而 Collagen I 及 Fibronectin 是其主要成分^[12]。本实验中 Collagen I 及 Fibronectin 在甘露醇和高糖刺激下表达增高 提示足细胞纤维化水平上升。炎症在 DN 中展现出重要地位 有学者认为 DN 病人实质是长期处于一种区别于红肿热痛为主要表现的“微炎症”状态。DN 伴随的高糖环境可诱发机体内炎症的级联反应 通过巨噬细胞浸润 炎症信号通路激活 炎症因子高表达等方式促进 DN 的发展^[13]。此外 有研究证实胰岛素抵抗与 DM 病人免疫系统的激活及慢性低度炎症状态密切相关^[14]。本实验中 甘露醇和高糖刺激下炎症因子 IL1β 在足细胞的表达升高。Khurram Shahzad 等也已证实 DN 小鼠肾脏中 IL1β 的表达

增加。

本实验发现,在高糖刺激足细胞发生胰岛素抵抗、纤维化及炎症水平明显增高的情况下,炎症因子 TNFR1 在高渗组、高糖组表达均升高。TNFR1 也被称作为 p55、p60、CD120a 或 TNFRSF1A,主要通过 NFκB 和 MAPK 炎症通路发挥促炎作用^[15]。TNFR1 作为一种跨膜糖蛋白,是人体 TNF 受体超家族主要成员之一,其分子量为 60 ku,位于染色体 12p13^[16]。正常情况下,肾脏中 TNFR1 在肾小球表达相对较高,且在足细胞中 TNFR1 的表达受炎症因子 TNF α 的调控^[17-18]。本实验发现 TNFR1 在高渗组和高糖组表达均升高,且差异均具有统计学意义,因此认为 DN 伴随的高渗、高糖均可影响足细胞 TNFR1 的表达。已有临床实验证实, DN 病人血循环中 TNFR1 的水平较高,且血清中 TNFR1 的表达水平与炎症因子 CRP 及 IL6 的水平相关^[19-20]。虽然 TNFR1 在肾脏的机制研究较少,但已证实 TNF 在肾脏中强大的炎症效应主要是通过其受体 TNFR1 实现的。在肾小球肾炎中,敲除 TNFR1 基因可以减轻肾小球炎症水平,缓解疾病的发展^[17]。因此,结合本实验结果,推测 TNFR1 影响了 DN 的进展,炎症机制是其参与途径。

炎症与 DN 密切相关,本实验发现在甘露醇和高糖刺激下炎症因子 TNFR1 在足细胞中表达升高。虽然有相关临床实验,但是 TNFR1 在 DN 的机制研究仍然空白。深入研究 TNFR1 可能为 DN 发病机制的补充及防治带来新的方向。

【参考文献】

[1] LIN YC ,CHANG YH ,YANG SY ,et al.Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease [J].Journal of the Formosan Medical Association 2018 ,117(8) : 662-675.

[2] WANG Y ,LI H ,SONG S P.Beta-arrestin 1/2 aggravates podocyte apoptosis of diabetic nephropathy via wnt/beta-catenin pathway [J].Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research 2018 24: 1724-1732.

[3] WADA J ,MAKINO H.Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy [J].Clinical Science 2013 ,124(3) : 139-152.

[4] FAUL C ,ASANUMA K ,YANAGIDA-ASANUMA E ,et al.Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton [J].Trends in Cell Biology ,2007 ,17(9) : 428-437.

[5] WANG X B ,ZHU H ,SONG W ,et al.Gremlin regulates podocyte apoptosis via transforming growth factor-beta (tgf-beta) pathway in diabetic nephropathy [J].Medical Science Monitor: International

Medical Journal of Experimental and Clinical Research 2018 24: 183-189.

[6] GUZMAN J ,JAUREGUI AN ,MERSCHER-GÓMEZ S ,et al.Podocyte-specific GLUT4-deficient mice have fewer and larger podocytes and are protected from diabetic nephropathy [J].Diabetes , 2014 63(2) : 701-714.

[7] FORNONI A.Proteinuria ,the podocyte ,and insulin resistance [J].The New England Journal of Medicine ,2010 ,363(21) : 2068 - 2069.

[8] 杨风英 ,牛燕媚 ,刘彦辉 ,等.有氧运动对高脂膳食诱导的胰岛素抵抗小鼠骨骼肌细胞胰岛素受体底物 1 及其丝氨酸磷酸化活性的影响 [J].中国运动医学杂志 2011 30(1) : 36-41.

[9] 黄启晶 ,李璐 ,赵聪 ,等.花旗泽仁对胰岛素抵抗大鼠肌肉组织中 CaSR 基因、蛋白表达及 AKT 活性的影响 [J].中医学报 , 2017 45(5) : 31-35.

[10] TANG F ,HAO Y ,ZHANG X ,et al.Effect of echinacoside on kidney fibrosis by inhibition of TGF-beta1/Smads signaling pathway in the db/db mice model of diabetic nephropathy [J].Drug Design , Development and Therapy 2017 ,11: 2813-2826.

[11] KIM YI ,SHIN HW ,CHUN YS ,et al.CST3 and GDF15 ameliorate renal fibrosis by inhibiting fibroblast growth and activation [J].Biochemical and Biophysical Research Communications ,2018 ,500 (2) : 288-295.

[12] DUFFIELD JS.Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis [J].The Journal of Clinical Investigation 2014 ,124(6) : 2299 -2306.

[13] PAN Y ,WANG Y ,CAI L ,et al.Inhibition of high glucose-induced inflammatory response and macrophage infiltration by a novel curcumin derivative prevents renal injury in diabetic rats [J].British Journal of Pharmacology 2012 ,166(3) : 1169-1182.

[14] DU P ,FAN B ,HAN H ,et al.NOD2 promotes renal injury by exacerbating inflammation and podocyte insulin resistance in diabetic nephropathy [J].Kidney International 2013 84(2) : 265-276.

[15] XU Q ,CHOKSI S ,LIU Z.Switching from TNF-induced inflammation to death signaling [J].Molecular & Cellular Oncology 2018 5 (1) : e1392402.

[16] DESPLAT-JEGO S ,BURKLY L.Targeting TNF and its family members in autoimmune/inflammatory disease [J].Mediators of Inflammation 2014 2014: 628748.

[17] TAUBITZ A ,SCHWARZ M ,ELTRICH N ,et al.Distinct contributions of TNF receptor 1 and 2 to TNF-induced glomerular inflammation in mice [J].PloS One 2013 8(7) : e68167.

[18] MARTINEZ-REZA I ,DIAZ L ,GARCIA-BECERRA R.Preclinical and clinical aspects of TNF-alpha and its receptors TNFR1 and TNFR2 in breast cancer [J].Journal of Biomedical Science 2017 , 24(1) : 90.

[19] FERNANDEZ-JUAREZ G ,VILLACORTA PEREZ J ,LUNO FERNANDEZ JL ,et al.High levels of circulating TNFR1 increase the risk of all-cause mortality and progression of renal disease in type 2 diabetic nephropathy [J].Nephrology (Carlton ,Vic) ,2017 22 (5) : 354-360.

[20] 米桂平.TNFR1、TNFR2 在 2 型糖尿病早期肾病中的临床意义 [J].中国医师杂志 2016 2(18) : 208-211.