

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.08.002
网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190130.1611.031.html(2019-01-31)

线粒体分裂/融合在高糖诱导足细胞损伤中的作用*

廖奕娇¹,陈奕君¹,何日明²,刘新辉²,杨曙东^{2△}

(1.广州中医药大学第四临床医学院肾病科,广东深圳 518033;2.广东省深圳市中医院肾病科 518033)

[摘要] **目的** 基于线粒体分裂/融合探讨高糖刺激对足细胞的损伤作用及可能机制。**方法** 分别采用30、45、60 mmol/L的葡萄糖刺激永生化的人足细胞 AB8/13 48 h。光镜下观察细胞形态变化。采用 Western blot 法检测足细胞标志蛋白足突蛋白(podocin),线粒体分裂因子(Mff)、线粒体动力蛋白(MiD49)及线粒体融合蛋白1(Mfn1)、Mfn2、视神经萎缩症蛋白1(OPA1)表达。**结果** 将足细胞置于 37 ℃培养箱 10 d 后可以分化为成熟的足细胞,表现为足突的出现,而 60 mmol/L 高糖刺激 48 h 后足细胞足突明显减少。高糖刺激呈浓度依赖性下调 podocin 表达,其中以 60 mmol/L 刺激组差异有统计学意义($P<0.05$)。此外高糖刺激可以上调线粒体分裂相关蛋白 MiD49、Mff 表达,而下调 Mfn1、Mfn2、OPA1 表达。**结论** 高糖刺激可诱导足细胞形态异常、下调 podocin 表达,其机制可能与线粒体分裂增加、融合减少有关。

[关键词] 足细胞;高糖;线粒体分裂;线粒体融合
[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)08-1267-03

Role of mitochondrial division/fusion in high glucose-induced podocyte injury*

LIAO Yijiao¹,CHEN Yujun¹,HE Riming²,LIU Xinhui²,YANG Shudong^{2△}

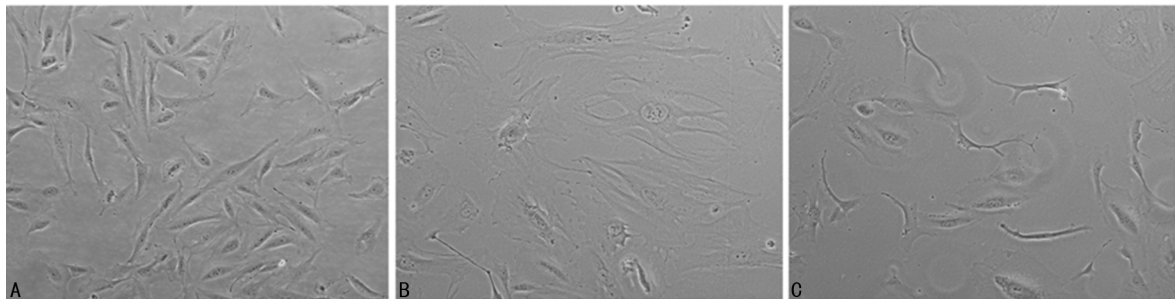
(1. The Fourth Clinical Medical College,Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen,Guangdong 518033,China;2. Department of Nephropathy,Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital,Shenzhen,Guangdong 518033,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the damage and possible mechanism of high glucose stimulation on podocytes based on mitochondrial division/fusion. **Methods** 30 mmol/L,45 mmol/L and 60 mmol/L glucose were used to stimulate AB8/13,immortalized human podocyte,for 48 hours. The morphology of podocytes was observed under light microscope. The podocyte marker protein podocin,mitochondrial fission factor (Mff),mitochondrial dynamics proteins of 49×10^3 (MiD49) and mitofusion (Mfn1),Mfn2,optic atrophy 1 (OPA1) were detected by Western blot. **Results** The podocytes were differentiated into mature podocytes after being placed in a 37 ℃ incubator for 10 d,which showed the appearance of foot processes,and the foot processes were significantly reduced after 48 h of 60 mmol/L high glucose stimulation. High glucose stimulation down-regulated the expression of podocin in a concentration-dependent manner,and the difference was statistically significant in the 60 mmol/L stimulation group ($P<0.05$). In addition,high glucose stimulation could up-regulate the expression of mitochondrial division-related proteins Mff and MiD49,and down-regulate the expression of mitochondrial fusion-related proteins Mfn1,Mfn2 and OPA1. **Conclusion** The high glucose can induce morphologic abnormality of podocyte and decrease the expression of podocin,which may be related to the increase of mitochondrial division and the decrease of mitochondrial fusion.

[Key words] podocyte;high glucose;mitochondrial fission;mitochondrial fusion

糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DN)是我国终末期肾脏病(ESRD)的第二位原发病,并且其患病率和发病率均呈现快速增长趋势^[1]。DN 患者因高糖血症而引起肾小球基底膜增厚、系膜扩张及细胞外基质增生,使肾小球高滤过、产生蛋白尿,最终由慢性肾功能不全进展为 ESRD^[2]。足细胞是肾小球脏层上皮细胞,其结构的损伤及功能的改变都会影响肾小球滤过膜的通透性,是评估肾小球滤过膜通透性的重要生

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81603437);广东省深圳市卫生计生系统科研项目(SZJX2017067、SZLY2018005);广东省中医药局(20181227)。 作者简介:廖奕娇(1990—),在读硕士,主要从事中医药治疗肾脏病的研究。 △ 通信作者,E-mail:y. s. d@163. com。



A: 未分化细胞; B: 对照组; C: 60 mmol/L 组

图 1 足细胞形态变化 (×100)

物标志物^[3]。高糖对足细胞的损伤所导致的滤过膜屏障破坏是 DN 产生蛋白尿的主要原因^[4]。podocin 作为足细胞裂孔隔膜的主要蛋白分子,是足细胞损伤的重要标志,在维持足细胞的正常形态和功能及蛋白尿发生中起重要作用^[5]。

近年来的研究表明,线粒体在 DN 发生、发展中起重要作用。线粒体是一个动态细胞器,其形态的维持依靠线粒体分裂和融合机制。线粒体分裂和融合可增加细胞应激抵抗力,分裂/融合的异常与疾病的发生密切相关^[6]。然而,目前有关高糖刺激对足细胞线粒体分裂/融合影响的文献报道甚少。本研究拟通过观察不同浓度葡萄糖对体外培养的人足细胞线粒体分裂/融合相关蛋白的调控,以探讨高糖诱导足细胞损伤的可能机制。

1 材料和方法

1.1 细胞与材料

1.1.1 永生化人足细胞 AB8/13(英国布里斯托大学 Moin A. SALEEM 教授馈赠)。RPMI-1640 培养基、胎牛血清(FBS)、胰岛素-转铁蛋白-硒溶液(ITS)、双抗及胰酶(美国 Gibco 公司)。抗体:足突蛋白(podocin)、线粒体融合蛋白 1(mitofusion 1,Mfn1)及 Mfn2(英国 Abcam 公司);线粒体分裂因子(mitochondrial fission factor,Mff)、线粒体动力蛋白(MiD49,美国 Proteintech 公司);视神经萎缩症蛋白 1(optic atrophy 1,OPA1,美国 BD Biosciences 公司);二抗(CST 公司)。仪器:超净工作台(新加坡 ESCO 公司);CO₂ 培养箱(美国 Thermo Scientific 公司);全自动凝胶成像和化学发光图像分析系统(美国 ChemiDoc™ MP Imaging System 公司)、垂直电泳仪、转膜仪(美国 Bio-Rad Laboratories 公司);酶标仪(美国 BioTek 公司)。

1.2 方法

1.2.1 足细胞培养 足细胞快速复苏后用含 10% FBS、1% ITS 及 1% 双抗的 RPMI-1640 培养基于 33℃ 培养箱中进行增殖。每 1~2 天换液 1 次。细胞生长融合至 80%~90% 时用 0.25% 胰蛋白酶[含

0.02% 乙二胺四乙酸(EDTA)]溶液消化、传代。将一部分细胞转移至 37℃ 培养箱用含 5% FBS 及 1% 双抗的 RPMI-1640 培养基诱导分化 10 d 后用于后续实验。

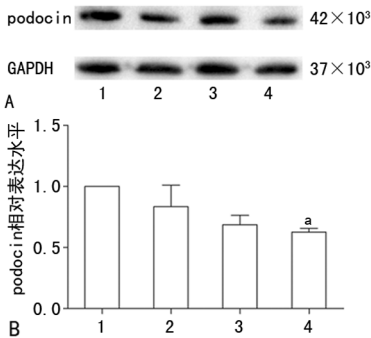
1.2.2 实验分组 对照组:普通 RPMI-1640 培养基;高糖刺激组的葡萄糖浓度分别为 30(30 mmol/L 组)、45(45 mmol/L 组)、60 mmol/L(60 mmol/L 组)。刺激时间为 48 h。

1.2.3 蛋白免疫印迹(Western blot) 细胞分组刺激后吸除培养液,以预冷的 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次。加入 1× 细胞裂解液 80~100 μL/皿并均匀覆盖,置于冰上裂解 10~15 min。用细胞刮仔细刮下细胞蛋白并吸入 EP 管内,离心(4℃,12 000×g,10 min)后将上清液转入另一 EP 管;电泳、转膜、5% 脱脂奶粉室温封闭 60 min;孵育一抗、二抗,曝光显影,图像分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS15.0 软件进行统计学分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

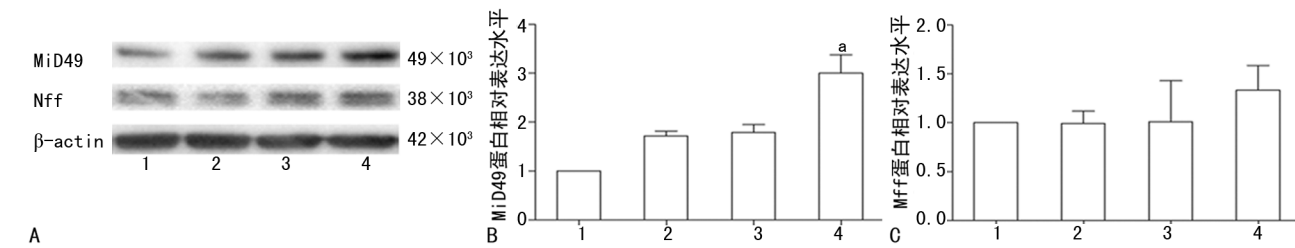
2 结 果

2.1 足细胞形态变化 与未分化细胞相比,经过 10 d 分化的对照组足细胞可见足突生成(箭头所示)。而经 60 mmol/L 高糖刺激 48 h 后足突广泛减少甚至消失,见图 1。



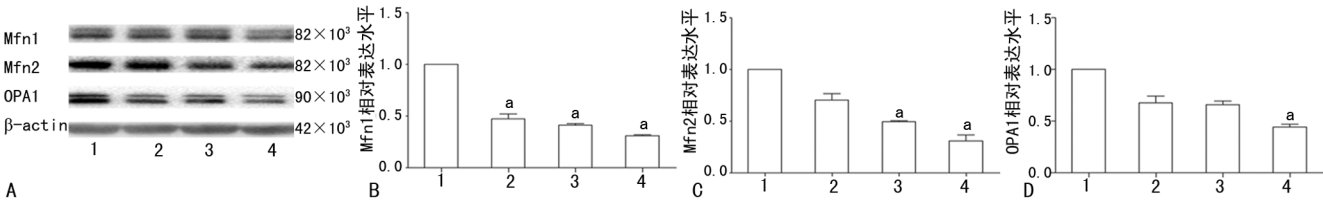
A: Western blot 图; B: Western blot 分析图; 1: 对照组; 2: 30 mmol/L 组; 3: 45 mmol/L 组; 4: 60 mmol/L 组; ^a: $P < 0.05$, 与对照组比较

图 2 各组细胞 podocin 表达



A: Western blot 图; B、C: Western blot 分析图; 1: 对照组; 2: 30 mmol/L 组; 3: 45 mmol/L 组; 4: 60 mmol/L 组; ^a: $P < 0.05$, 与对照组比较

图 3 各组细胞线粒体分裂相关蛋白表达



A: Western blot 图; B、C、D: Western blot 分析图; 1: 对照组; 2: 30 mmol/L 组; 3: 45 mmol/L 组; 4: 60 mmol/L 组; ^a: $P < 0.05$, 与对照组比较

图 4 各组细胞线粒体融合相关蛋白表达

2.2 足细胞标志蛋白 podocin 表达的变化 Western blot 结果显示, 高糖刺激可呈浓度依赖性下调 podocin 表达, 其中 60 mmol/L 组足细胞 podocin 蛋白表达显著下调, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 为正常对照组 0.63 倍, 见图 2。

2.3 线粒体分裂相关蛋白表达 高糖刺激可呈浓度依赖性增加线粒体分裂相关蛋白 MiD49 及 Mff 的表达。其中, 60 mmol/L 组与对照组比较, MiD49 表达显著上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。同时, 60 mmol/L 组 Mff 表达较对照组上调, 表达水平为对照组的 1.33 倍, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3。

2.4 线粒体融合相关蛋白表达 各浓度的高糖刺激对足细胞线粒体融合相关蛋白 Mfn1、Mfn2、OPA1 的表达均有一定下调作用。其中, 30、45、60 mmol/L 组均可显著下调 Mfn1 表达, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4A、B。45 mmol/L 组与 60 mmol/L 组 Mfn2 表达较对照组显著下调 ($P < 0.05$), 见图 4A、C。60 mmol/L 组 OPA1 表达较对照组显著下调 ($P < 0.05$), 见图 4A、D。

3 讨论

DN 表现的持续蛋白尿与足细胞裂孔隔膜密切相关, 裂孔隔膜的完整性是肾小球滤过机械屏障的关键^[7]。podocin 是分布于裂孔膜的跨膜蛋白, 起到细胞骨架连接桥梁作用, 是防止清蛋白滤出的关键分子蛋白, 但裂孔膜分子易受损害, 一旦发生突变则会破坏肾小球滤过膜的完整性, 产生大量蛋白尿^[8]。国内外已有不少研究表明高糖环境下足细胞的增殖降低, 出现 podocin 蛋白表达明显下调的现象^[9-11]。

线粒体的分裂与融合对其正常功能的发挥具有非常重要的作用, 线粒体通过不断活跃的分裂/融合

可稳定线粒体的形态及分布^[12]。线粒体融合相关蛋白 Mfn1、Mfn2 及 OPA1 等, 其分裂蛋白则有 MiD49、Mff 等。Mfn1 和 Mfn2 是线粒体融合的关键介导蛋白, Mfn1 主要在融合的前期促进线粒体间的彼此结合, Mfn2 则主要在线粒体融合反应的后期起作用^[13]。OPA1 位于线粒体内膜上, 具有促进线粒体融合的功能, 可使嵴连接处于关闭状态, 以维持嵴的形态^[14-15]。MiD49、Mff 可以募集动力相关蛋白 1 促进线粒体裂变, 且 MiD49 在 Mff 缺失的情况下, 仍可推动裂变的进行^[16]。本研究用不同浓度葡萄糖对足细胞作用 48 h, 与对照组比较, 60 mmol/L 的高糖刺激可引起足细胞形态结构发生明显变化, 细胞数量显著减少, 且由实验数据可知 podocin 表达明显下调。同时, 由 Western blot 结果可知 60 mmol/L 高糖可上调线粒体分裂相关蛋白、下调线粒体融合相关蛋白, 表明线粒体形态调控在高糖的作用下发生了明显的变化。

综上所述, 高糖可能通过增加线粒体分裂、减少线粒体融合诱导足细胞损伤及形态异常。该研究从线粒体形态调控的角度阐明了高糖诱导足细胞损伤的机制及可能靶点, 为下一步治疗药物的筛选奠定了实验基础。

参考文献

[1] LI L S, LIU Z H. Epidemiologic data of renal diseases from a single unit in China: Analysis based on 13,519 renal biopsies[J]. Kidney Int, 2004, 66(3): 920-923.
[2] 胡寒, 沈龙海. 自噬对糖尿病肾病的作用及相关药物研究[J]. 世界临床药物, 2017, 38(8): 559-563.
[3] GLUHOVSCHI C, GLUHOVSCHI G, PETRICA L, et al. Urinary biomarkers in the assessment of early diabetic nephropathy[J]. J Diab Res, 2016, 2016: 4626125.
[4] ASANUMA K, MUNDEL P. The role (下转第 1274 页)

参考文献

- [1] 董平,张生来,刘颖斌. 外科住院医师规范化培训中所面临的问题与思考[J]. 中国高等医学教育, 2012(10):92-93.
 - [2] 余情,郑玉英,王葆青,等. 住院医师规范化培训中出科考核的实践与思考[J]. 中国卫生资源, 2011, 14(6):370-371.
 - [3] 王劼,王勇,王心如. 德尔菲法在住院医师规范化培训出科考核指标量化中的应用[J]. 江苏卫生事业管理, 2018, 29(4):459-462.
 - [4] 刘颖,宋安齐,徐孝军,等. 住院医师规范化培训出科考核质量控制体系的构建与实践[J]. 西北医学教育, 2016, 24(4):655-657.
 - [5] MISHRA A, BROWNING D, HAVILAND M J, et al. Communication skills training in ophthalmology: results of a needs assessment and pilot training program[J]. J Surg Educ, 2018, 75(2):417-426.
 - [6] BUCKLEY E J, MARKWELL S, FARR D, et al. Improving resident performance on standardized assessments of medical knowledge: a retrospective analysis of interventions correlated to American board of surgery in-service training examination performance[J]. Am J Surg, 2015, 210(4):734-738.
 - [7] 赵真真,李重先. 住院医师规范化培训出科考核内容设置与实践[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(66):223-224.
 - [8] SYMER M M, ABELSON J S, GADE L, et al. Association between American Board of Surgery in-training examination score and attrition from general surgery residency[J]. Surgery, 2018, 164(2):206-211.
 - [9] WOOD T C, RAISON N, HALDAR S, et al. Training Tools for Nontechnical Skills for Surgeons-A Systematic Review[J]. J Surg Educ, 2017, 74(4):548-578.
 - [10] BAILEY E A, JOHNSON A P, LEEDS I L, et al. Quantification of resident work in colorectal surgery[J]. J Surg Educ, 2018, 75(3):564-572.
 - [11] KIMBROUGH M K, THRUSH C R, BARRETT E, et al. Are surgical milestone assessments predictive of in-training examination scores? [J] J Surg Educ, 2018, 75(1):29-32.
 - [12] 张博,汪卓赟. 以胜任力为导向的住院医师规范化培训考核体系构建[J]. 中国医院管理, 2015, 35(9):48-50.
 - [13] 董美丽. 美国住院医师规范化培训考核评价现状与借鉴[J]. 中国高等医学教育, 2015(12):25-26.
 - [14] 余宛达,季国忠. 以严格的考核制度保障住院医师规范化培训质量[J]. 江苏卫生事业管理, 2014, 25(6):91-93.
 - [15] 刘彦爽,胡金朋. 住院医师规范化培训考核体系改革的实践与探索[J]. 中国高等医学教育, 2014(2):36-37.
-
- (收稿日期:2018-12-18 修回日期:2019-01-27)
-
- (上接第 1269 页)
- of podocytes in glomerular pathobiology[J]. Clin Exp Nephrol, 2003, 7(4):255-259.
 - [5] 李志杰,张悦. 黄芪多糖对早期糖尿病肾病大鼠足细胞 nephrin 和 podocin 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(9):1772-1776.
 - [6] 蒋道芳,张晓丽. 线粒体损伤与急性肾损伤的研究进展[J]. 生理科学进展, 2017, 48(4):260-273.
 - [7] LORENZEN J, SHAH R, BISER A, et al. The role of osteopontin in the development of albuminuria[J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(5):884-892.
 - [8] CAMICI M. Urinary biomarkers of podocyte injury[J]. Biomark Med, 2008, 2(6):613-616.
 - [9] WANG R M, WANG Z B, WANG Y, et al. Swiprosin-1 promotes mitochondria-dependent apoptosis of glomerular podocytes via P38 MAPK pathway in early-stage diabetic nephropathy[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 45(3):899-916.
 - [10] 于梅,姜国华,迟继铭,等. 肾炎消白颗粒对糖尿病肾病大鼠足细胞 podocin、nephrin 表达的影响[J]. 中国中医药科技, 2018, 25(2):188-190, 204.
 - [11] 张雯,张伟,赵娜,等. 中药合剂对早期糖尿病肾病大鼠足细胞 nephrin 和 podocin 表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2014, 15(5):397-400.
 - [12] MEEUSEN S, MCCAFFERY J M, NUNNARI J. Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro[J]. Science, 2004, 305(5691):1747-1752.
 - [13] 付玉环,姜广建,夏庆安,等. 线粒体同和蛋白 Mfn1/2 的结构和功能[J]. 生命的化学, 2007, 27(65):511-513.
 - [14] CIPOLAT S, MARTINS DE BRITO O, DAL ZILIO B, et al. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(45):15927-15932.
 - [15] FREZZA C, CIPOLAT S, MARTINS DE BRITO O, et al. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion[J]. Cell, 2006, 126(1):177-189.
 - [16] LOSÓN OC, SONG Z, CHEN H, et al. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission[J]. Mol Biol Cell, 2013, 24(5):659-667.
- (收稿日期:2018-12-18 修回日期:2019-01-03)