

高糖诱导人肾近曲小管上皮细胞凋亡及其调控机制

袁育珺¹, 段惠芳², 胡志坚¹, 汪 渊³

摘要 目的 研究高糖诱导人肾近曲小管上皮细胞凋亡及其调控机制。方法 以人肾近曲小管上皮细胞株 HK-2 为研究对象,随机分为对照组、高糖组、甘露醇组。MTT、流式细胞术观察细胞的增殖和凋亡状况;ELISA 法检测细胞内 Caspase 的活性;Western blot 法分析 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)及 Caspase 家族蛋白的表达变化。结果 与对照组比较,高糖组能抑制 HK-2 细胞的体外增殖,下调抑制凋亡作用的蛋白 Bcl-2 表达,上调促凋亡作用的蛋白 Bax、Bak 表达($P < 0.05$);流式细胞术显示 HK-2 细胞周期有明显的变化,且随葡萄糖浓度的升高中期凋亡和末期凋亡所占的比例明显上升($P < 0.01$),并且 Caspase 酶原降解及活性表达也呈上升趋势($P < 0.01$)。结论 高糖能抑制 HK-2 细胞体外增殖,并诱导其凋亡,其机制可能是通过 Bcl-2 及 Caspase 家族调控 HK-2 细胞的凋亡。

关键词 高糖;HK-2;凋亡;表达

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)04-0497-05

细胞凋亡是生理性过程,不同于细胞坏死;凋亡细胞能产生吞噬和清除碎片的凋亡小体,避免周围环境中细胞损害,维持内环境稳定^[1]。糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)发病机制复杂, DN 早期,肾脏通过细胞凋亡等应急反应来清除过度增殖的内皮细胞,维持内环境稳定;DN 晚期,随着肾功能障碍,内环境稳态破坏,细胞凋亡过度,致使肾损害也加剧^[2-3]。了解和干预肾小管内皮细胞凋亡有助于延缓 DN 进展。该研究采用体外培养人肾近曲小管上皮细胞株 HK-2 细胞,分析高糖环境下 HK-2 细胞的增殖和凋亡状况、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)及 Caspase 家族蛋白表达的变化,并进一步探讨这些作用可能的分子调控机制。

2016-01-08 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81272399)

作者单位:九江学院附属医院¹ 检验科、² 医保办,九江 332000

³安徽省/省部共建教育部重要遗传病基因资源利用重点实验室,合肥 230032

作者简介:袁育珺,男,硕士;

汪 渊,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: wanyuan@ahmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料 低糖(5.5 mmol/L)DMEM(美国 Gibco 公司);D-glucose、医用甘露醇(北京国药集团公司);Gibco 原装小牛血清(北京索莱宝科技有限公司);HK-2 由中国科学技术大学生命科学院赠送,液氮保存;Annexin V-FITC(安徽碧云天生物试剂公司);一抗 actin、Caspase-3、Caspase-9、Bcl-2、Bax、Bak、Caspase-7(美国 Santa Cruz 公司);MTT(美国 Sigma 公司);二抗(美国 Pierce 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和分组 液氮取出 HK-2 细胞,37℃水浴解冻,迅速接种于含 10% 小牛血清低糖 DMEM(葡萄糖浓度 5.5 mmol/L),37℃、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中。胰酶消化传代,备用。分组:对照组(葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L)、高糖组(葡萄糖浓度分别为 25、40 mmol/L)和甘露醇组(葡萄糖浓度 5.5 mmol/L + 甘露醇浓度分别为 19.5、34.5 mmol/L)。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖 取生长旺盛的 HK-2 细胞,胰酶消化,按 1.2.1 分组,MTT 实验严格按照前期报道^[4]操作,实验重复 3 次。

1.2.3 Annexin V-FITC 分析细胞凋亡 取对数期生长的 HK-2 细胞,胰酶消化传代,制成细胞悬液,取合适的量平均接种于 6 孔板,次日按 1.2.1 分组,37℃刺激 48 h,各组胰酶消化制成约 1×10^6 个/ml 细胞悬液。400 μl Annexin V 结合液重悬,加入 5 μl Annexin V-FITC 染色液,2~8℃避光孵育 15 min。4℃冷冻离心 5 min(10 000 r/min),去除上清液,再用 400 μl Annexin V 结合液重悬,10 μl/孔 PI 染色液,震荡器轻轻混匀;锡箔纸包裹置冰上孵育 5 min,然后上机检测。

1.2.4 Caspase 蛋白酶原活性检测 原理:依据 ELISA 抗原抗体结合的原理,细胞内活性的 Caspase-7、Caspase-3、Caspase-9 能在体外与相应的酶结合,催化底物显色反应,通过吸光度(optical density, OD)值 OD₄₀₅ 来间接反应 Caspase-7、Caspase-3、Caspase-9 的活性。取对数期生长的 HK-2 细胞,

按 1.2.3 步骤操作,分组后置于培养箱连续刺激 2 d,胰酶消化,冷冻离心 5 min (10 000 r/min),按照 ELISA 法操作,依次加入酶、底物、酶标仪检测,实验重复 3 次。

1.2.5 Western blot 法检测 提取总蛋白:按 1.2.1 分组批量培养,刺激 48 h 后,弃去原液并用 PBS 洗去残留液体,置冰上,每瓶加裂解液 150 μl 充分裂解,细胞刮子收集细胞,低温冷冻离心 5 min (10 000 r/min),上清液置于 -80 ℃ 备用,BCA 测定蛋白浓度,每组加入浓缩蛋白上样缓冲液,水浴煮沸,分装备用,置于 -20 ℃ 保存。配制 12.5% SDS-PAGE,微量加样针上样,先用 40~50 V 电泳浓缩胶,100 V 电泳分离胶,100 mA 冰浴转膜,伊利脱脂牛奶封闭,PBS 洗膜,置于一抗为 Bcl-2 (1 : 400),Caspase-7 (1 : 1 000),Bak (1 : 1 000),Bax (1 : 300),Caspase-3 (1 : 2 000),Caspase-9 (1 : 800),actin (1 : 1 000),4 ℃ 过夜。相应二抗分别为山羊抗小鼠 (1 : 1 500),山羊抗鼠 (1 : 1 500),山羊抗兔 (1 : 1 000),山羊抗鼠 (1 : 1 000),山羊抗鼠 (1 : 1 000),山羊抗兔 (1 : 1 000),山羊抗小鼠 (1 : 4 000),37 ℃ 孵育 2 h,PBS 洗膜 3 次,暗室内胶片显影、定影,重复实验 3 次。结果进行统计学分析。Western blot 条带的灰度值用 Image Pro 4.5 分析软件测定。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学单因素方差分析,数据用 $x \pm s$ 表示。组间计量资料用方差分析。

2 结果

2.1 高糖对 HK-2 细胞的体外增殖的影响 MTT 结果采用单因素方差分析进行主体间效应检测,显示差异有统计学意义 ($F = 112.04, P < 0.01$)。组间两两比较显示,与对照组比较,高糖组 (25、40 mmol/L) 的 OD 值依次降低,且糖浓度为 40 mmol/L 抑制

率达 26.6% ($P < 0.05, P < 0.01$);而甘露醇组与对照组比较,差异无统计学意义,表明体外高糖能抑制 HK-2 细胞的体外增殖,与高晶体渗透压无关。见表 1。

表 1 不同浓度葡萄糖对 HK-2 细胞的增殖的影响 (n = 5)

组别	OD 值 ($x \pm s$)	抑制率 (%)
对照	1.84 ± 0.09	-
高糖		
25 mmol/L	1.61 ± 0.08	12.5 *
40 mmol/L	1.35 ± 0.11	26.6 **
甘露醇		
25 mmol/L	1.82 ± 0.10	1.1
40 mmol/L	1.80 ± 0.11	2.2

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 高糖对 HK-2 细胞凋亡的影响 结果采用单因素方差分析进行主体间效应检测,差异有统计学意义 ($F = 82.54, P < 0.01$)。组间两两比较显示:与对照组 (9.9%) 比较,高糖组 (图 1B、1C) 中期凋亡与末期凋亡所占的比例明显升高,并且末期凋亡所占的比例随着葡萄糖浓度的升高而升高;从图 1D、1E 中可以观察到甘露醇对细胞的凋亡影响不明显。提示高糖能诱导 HK-2 细胞凋亡,与高晶体渗透压无关。见图 1、表 2。

2.3 高糖对 Caspase 蛋白酶原活性的影响 单因素方差分析显示高糖能够增强 Caspase-7、Caspase-3、Caspase-9 活性 ($F = 71.43, 55.81, 74.32, P < 0.01$)。组间两两比较显示:与对照组比较,高糖组 Caspase-7、Caspase-3、Caspase-9 活性呈上升趋势,但甘露醇组活性没有明显变化。见图 2。

2.4 高糖对 Bcl-2 及 Caspase 蛋白酶原家族蛋白表达的影响 单因素方差分析显示高糖上调 Bak、bax、cleaved-Caspase-9、cleaved-Caspase-3、cleaved-Caspase-7 蛋白表达 ($F = 27.41, 47.54, 37.22, 41.77,$

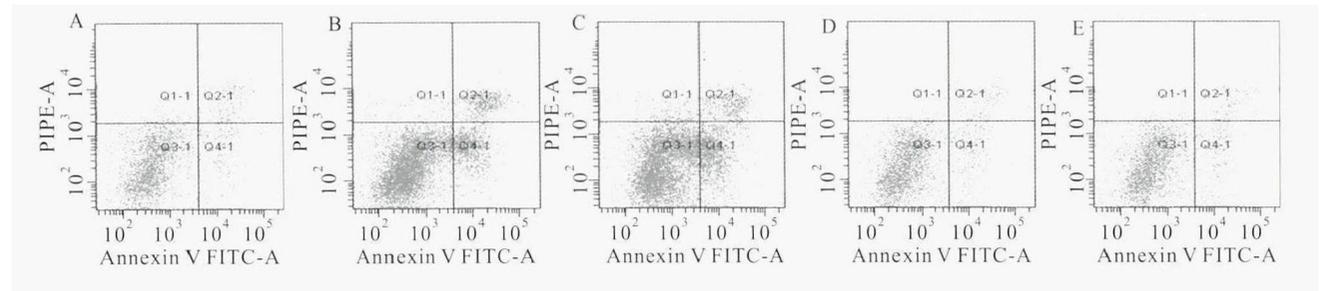


图 1 Annexin V-FITC 检测高浓度葡萄糖对 HK-2 细胞凋亡的影响

A: 对照组; B: 25 mmol/L 葡萄糖; C: 40 mmol/L 葡萄糖; D: 5.5 mmol/L 葡萄糖 + 19.5 mmol/L 甘露醇; E: 5.5 mmol/L 葡萄糖 + 34.5 mmol/L 甘露醇

25.47, $P < 0.01$); 下调 Bcl-2 蛋白表达 ($F = 33.14$)。组间两两比较显示:与对照组比较,Bcl-2 家族 Bcl-2 蛋白表达量有所下降,Bak、Bax 蛋白表达量显著上升,且 Bax/Bcl-2 的比值也呈上升趋势。另外剪切后的 Caspase 蛋白酶原家族 cleaved-Caspase-9、cleaved-Caspase-3、cleaved-Caspase-7 蛋白

表达明显增加,见图 3。

3 讨论

DN 是糖尿病重要并发症之一,其基本病理特征主要表现为肾小球细胞外基质聚集与降解紊乱,导致肾小球病态增生、基底膜增厚和动脉硬化等,这

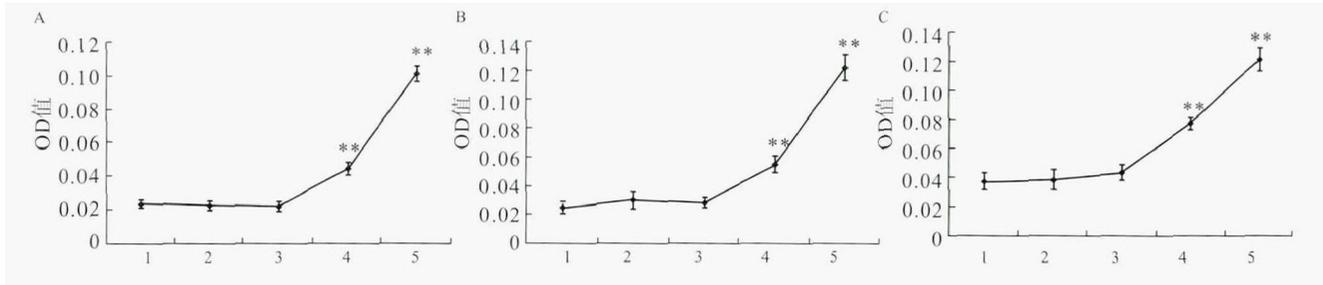


图 2 Caspase-3、Caspase-7、Caspase-9 活性检测 ($n = 4, x \pm s$)

A: Caspase-7; B: Caspase-3; C: Caspase-9; 1: 对照组; 2: 5.5 mmol/L 葡萄糖 + 19.5 mmol/L 甘露醇; 3: 5.5 mmol/L 葡萄糖 + 34.5 mmol/L 甘露醇; 4: 25 mmol/L 葡萄糖; 5: 40 mmol/L 葡萄糖; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

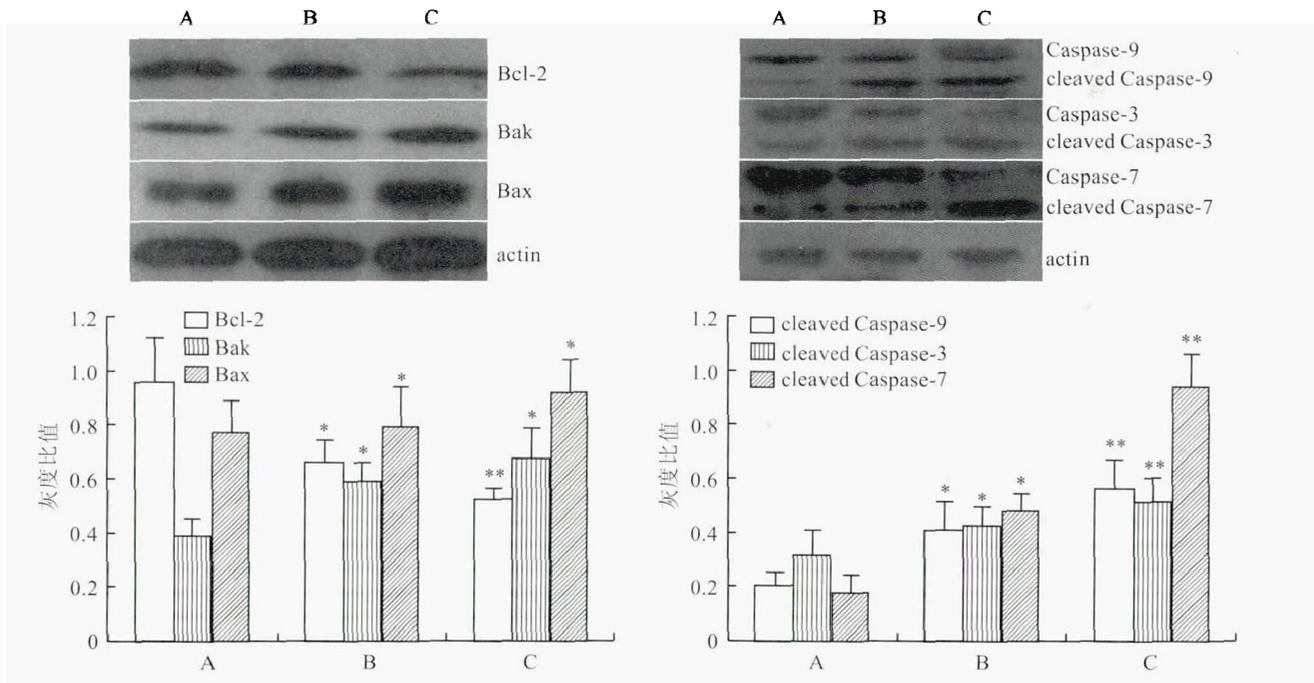


图 3 高浓度葡萄糖对 HK-2 细胞相关凋亡蛋白表达的变化

A: 对照组; B: 25 mmol/L 葡萄糖; C: 40 mmol/L 葡萄糖; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 2 不同浓度葡萄糖对 HK-2 细胞周期的影响 (%)

组别	Q3 - 1	Q1 - 1	Q2 - 1	Q4 - 1
对照	80	7.2	5.2	7.6
高糖				
25 mmol/L	69.5	7.4	6.6	16.5**
40 mmol/L	62.6	7	7	22.4**
甘露醇				
25 mmol/L	83.4	5.2	4.5	6.9
40 mmol/L	81.9	5	4.9	8.2

与对照组比较: ** $P < 0.01$

些改变严重影响肾小管的营养供应,诱发上皮细胞程序性凋亡,从而导致肾间质纤维化^[5]。国外相关报道^[6]证实终末期肾病肾小球损伤多数从肾小球上皮细胞(足细胞)损伤开始;在糖尿病的早期,长期处于高糖环境下的细胞微环境发生改变,导致肾小球超滤、诱发氧化应激、糖化终产物堆积、蛋白激酶 C 的激活、多元醇化、转化生长因子的过表达和炎症等,这些因素致使肾小管基底膜增厚,养分供应受阻,引起肾小管上皮细胞萎缩,导致肾衰竭。因此干预肾小管上皮细胞凋亡,维持上皮细胞活性,能有有效的减缓肾脏的衰竭^[5]。

体内长期高血糖容易导致上皮、内皮细胞损伤和功能障碍,从而诱发多种疾病,如 2 型糖尿病等;因此,控制血糖,并通过调节细胞增殖和凋亡修复损伤的细胞有重要的临床意义^[7-8]。本研究模拟体内高糖环境,选取稳定性较好的人肾近曲小管上皮细胞株 HK-2 进行体外培养。作为维持近曲小管功能的上皮细胞,HK-2 细胞的功能障碍在 DN 的发生发展中扮演着重要角色。实验表明高糖刺激 48 h 后 HK-2 细胞的增殖抑制,且出现细胞凋亡现象。

Bcl-2 家族和 Caspase 共同参与调控细胞凋亡^[9-10]。Bcl-2 家族通过调控 Bcl-2 与 Bax、Bak 之间的比例,改变线粒体膜的通透性释放细胞色素 C 等促凋亡蛋白^[11-12],诱导细胞凋亡。而 Caspase 家族分工协作,Caspase-9 感受线粒体发出的死亡信号;Caspase-3 属于凋亡效应子,能直接引起细胞凋亡;Caspase-7 能促使 ROS 表达,诱导内质网应激,参与细胞凋亡^[13-15]。本实验 Western blot 结果表明 HK-2 细胞内 Bcl-2 家族和 Caspase 家族均被激活,表现为 Bcl-2 蛋白表达量下降,Bak、Bax 蛋白表达量上升,且 Bax/Bcl-2 的比值也呈上升趋势。另外 Caspase 蛋白酶原家族 Caspase-9、Caspase-3、Caspase-7 酶原降解及活性表达也呈上升趋势。推测高糖可能是通过某种途径激活 Bcl-2 家族,释放细胞色素 C,引起 Caspase 酶原降解,活化 Caspase 家族启动级连反应,诱导 HK-2 细胞发生凋亡。详细机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Krysko D Y, Vanden Bergh T, D'Herde K, et al. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis [J]. *Methods*, 2008, 44(3):205-21.
- [2] Verzola D, Gandolfo M T, Ferrario F, et al. Apoptosis in the kidneys of patients with type II diabetic nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2007, 72(10):1262-72.
- [3] Kolati S R, Kasala E R, Bodduluru L N, et al. BAY 11-7082 ameliorates diabetic nephropathy by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammation via NF- κ B pathway [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2015, 39(2):690-9.
- [4] 袁育珺,朱华庆,周青,等.高浓度葡萄糖诱导 HepG-2 细胞凋亡及其调控的相关机制 [J]. *安徽医科大学学报*, 2011, 46(12):1223-6.
- [5] Zhao X, Liu G, Shen H, et al. Liraglutide inhibits autophagy and apoptosis induced by high glucose through GLP-1R in renal tubular epithelial cells [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(3):684-92.
- [6] Asanuma K. The role of podocyte injury in chronic kidney disease [J]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, 2015, 38(1):26-36.
- [7] Song H, Wu F, Zhong Y, et al. Irisin promotes human umbilical vein endothelial cell proliferation through the ERK signaling pathway and partly suppresses high glucose-induced apoptosis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10):e110273.
- [8] Triqle C R, Samuel S M, Ravishabkar S, et al. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many way [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2012, 90(6):713-8.
- [9] Liu J, Yao Y, Qing H, Chen R. Oxymatrine triggers apoptosis by regulating Bcl-2 family proteins and activating caspase-3/caspase-9 pathway in human leukemia HL-60 cells [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(6):5409-15.
- [10] Galluzzi I, Vitale I, Abrams J M, et al. Molecular definitions of cell death subroutines; recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 [J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(1):107-20.
- [11] Han C R, Jun do Y, Lee J Y, et al. Prometaphase arrest-dependent phosphorylation of Bcl-2 and Bim reduces the association of Bcl-2 with Bak or Bim, provoking Bak activation and mitochondrial apoptosis in nocodazole-treated Jurkat T cells [J]. *Apoptosis*, 2014, 19(1):224-40.
- [12] 曹军军,杨茂伟,郭宝磊,等.高糖通过线粒体途径诱导成骨细胞凋亡 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2012, 28(12):1109-14.
- [13] Chen X, Wang J, Qin Q, et al. Mono-2-ethylhexyl phthalate induced loss of mitochondrial membrane potential and activation of Caspase3 in HepG2 cells [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2012, 33(3):421-30.
- [14] Wu C Y, Tang Z H, Jiang L, et al. PCSK9 siRNA inhibits HUVEC apoptosis induced by ox-LDL via Bcl/Bax-caspase9-caspase3 pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 359(1-2):347-58.
- [15] Liu J, Yao Y, Dinq H, et al. Oxymatrine triggers apoptosis by regulating Bcl-2 family proteins and activating caspase-3/caspase-9 pathway in human leukemia HL-60 cells [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(6):5409-15.

PTP1B 及瘦素信号通路在奥曲肽抗大鼠肝纤维化中的作用

陈元淦, 张超, 李方跃, 牛森森

摘要 目的 研究蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B) 在奥曲肽 (OCT) 治疗大鼠肝纤维化过程中的作用机制, 及其对瘦素和 JAK2-STAT3 信号通路的影响。方法 将大鼠随机分为: 空白组、OCT 组、模型组。模型组和 OCT 组采用皮下注射四氯化碳 (CCl₄) 法建立肝纤维化模型。饲养 8 周后, 采集标本, 全自动生化分析仪测定血清肝脏生化指标: 总胆红素 (TBIL)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 及大鼠血清白蛋白 (ALB)。ELISA 法测定瘦素水平, HE 染色观察肝脏病理, 免疫组化法检测肝组织瘦素及瘦素受体 (Ob-Rb) 的表达, 碱水解法测定肝脏中羟脯氨酸 (Hyp) 含量。Western blot 法检测肝组织内 PTP1B、JAK2、STAT3、p-JAK2、p-STAT3 的表达。结果 与空白组比较, 模型组和 OCT 组大鼠血清中 TBIL、ALT、AST 水平上升 ($P < 0.05$), ALB 水平明显降低 ($P < 0.05$), 血清瘦素、肝组织内瘦素及瘦素受体表达增加 ($P < 0.001$)。肝组织中 Hyp 含量明显升

高 ($P < 0.05$)。模型组及 OCT 组 JAK2、STAT3 磷酸化水平较空白组升高 ($P < 0.001$)。OCT 组与模型组比较, 肝脏生化指标改善明显, 病理改变较轻, 血清瘦素含量减少 ($P < 0.05$), 肝组织内瘦素、Ob-Rb 及 Hyp 含量降低 ($P < 0.05$), JAK2、STAT3 磷酸化水平较模型组均有降低 ($P < 0.05$), 而 PTP1B 表达增加 ($P < 0.001$)。结论 应用 OCT 能一定程度上减轻大鼠肝纤维化程度, 减轻肝脏损伤。推测其机制是 OCT 通过上调 PTP1B, 抑制了瘦素及 JAK2/STAT3 信号通路的促肝纤维化效应, 最终达到抗肝纤维化的目的。

关键词 瘦素; 奥曲肽; 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B; JAK2/STAT3
中图分类号 R 575.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)04-0501-05

肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 被认为在肝纤维化的发展过程中有重要地位。各种因素导致肝脏的损伤, 使 HSC 被激活并产生细胞外机制^[1]。瘦素与瘦素受体 (obese receptor, Ob-Rb) 结合, 激活下游信号通路 JAK2/STAT3, 参与了 HSC 的增殖和活化^[2-3]。蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B) 是 JAK2/STAT3 的负性调控因子。生长抑素是一种能抑制细胞因子合

2016-01-18 接收

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金 (编号: KJ2014A117)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院肝胆胰外科一病区, 合肥 230022

作者简介: 陈元淦, 男, 硕士研究生;

张超, 男, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: smallcloud2@hotmail.com

Apoptosis of HK-2 cells induced by high glucose and its regulation mechanism

Yuan Yujun¹, Duan Huifang², Hu Zhijian¹, et al

(¹Clinical Laboratory, ²Medicare Office, The Affiliated Hospital of Jiujiang University, Jiujiang 332000)

Abstract Objective To investigate high glucose-induced apoptosis in HK-2 cells and its possible regulation mechanism. **Methods** HK-2 cells were divided into three groups and treated as follows: normal group, high glucose groups, mannitol groups. The cell proliferation and apoptosis of HK-2 cell was analyzed by MTT, flow cytometry. The expression of Bcl-2 and Caspase family proteins were studied by Western blot, and the activity of Caspase family was analyzed by ELISA. **Results** High glucose could inhibit growth of HK-2 cells. Moreover, high concentrations of glucose could also induce apoptosis with the concentration increased more obviously ($P < 0.01$). Western blot showed that high glucose down-regulated Bcl-2, increased Bak, Bax expression ($P < 0.05$). **Conclusion** High glucose can inhibit the proliferation of HK-2 cells *in vitro* and induce its apoptosis, and its mechanism may regulate the apoptosis of HK-2 cells through Bcl-2 and Caspase families.

Key words high glucose; HK-2; apoptosis; expression