

网络出版时间: 2025-06-30 12:53:27 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250630.0856.002>

氨氯地平通过抑制足细胞的 Ca^{2+} 内流促进细胞自噬

赵 韦¹, 徐德苹¹, 廖开楠¹, 蔡春林², 臧丹丹³, 周海胜^{1,3}(安徽医科大学¹ 生物化学教研室、² 病理生理学教研室、³ 科研实验中心, 合肥 230032)

摘要 目的 探究降血压药物氨氯地平对足细胞内 Ca^{2+} 内流及其自噬的影响。方法 体外常规培养永生化的人足细胞 (HPC), 使用血管紧张素 II (Ang II) 以及 L 型 Ca^{2+} 阻断剂氨氯地平单独或者联合处理 HPC 细胞, Ca^{2+} 成像系统实时检测药物处理后 HPC 细胞内 Ca^{2+} 通量的瞬时变化; Western blot 法检测自噬标志蛋白 LC3B-II / LC3B-I 比值变化、Beclin-1、P62 和凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达水平; 流式细胞术检测 488 nm 处 Fluo-4AM 的阳性细胞数以分析 HPC 细胞内 Ca^{2+} 内流水平; Lyso-Tracker Green 活细胞染色分析溶酶体荧光强度; 流式细胞术检测 HPC 细胞凋亡率。结果 与对照组比较, Ang II 组 Ca^{2+} 瞬时通量和 Fluo-4AM 阳性细胞数显著增加 ($P < 0.001$)、自噬标志蛋白 LC3B-II / LC3B-I 比值 ($P < 0.001$) 和 Beclin-1 的蛋白表达 ($P < 0.01$) 均降低、P62 的表达升高 ($P < 0.01$)、溶酶体荧光强度减弱 ($P < 0.05$)、细胞凋亡率升高 ($P < 0.0001$)、凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达降低 ($P < 0.01$)、Bax 蛋白升高 ($P < 0.001$)。与对照组比较, 氨氯地平组 Fluo-4AM 阳性细胞数显著降低 ($P < 0.001$)、LC3B-II / LC3B-I 比值 ($P < 0.001$) 和 Beclin-1 的蛋白表达 ($P < 0.001$) 均升高、P62 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)、溶酶体荧光强度增强 ($P < 0.01$)、细胞凋亡率降低 ($P < 0.01$)、Bcl-2 蛋白表达升高 ($P < 0.001$)、Bax 蛋白降低 ($P < 0.001$)。与 Ang II 组比较, Ang II + 氨氯地平组 Fluo-4AM 阳性细胞数显著降低 ($P < 0.001$)、LC3B-II / LC3B-I 比值 ($P < 0.01$) 以及 Beclin-1 的蛋白表达升高 ($P < 0.05$)、P62 蛋白降低 ($P < 0.01$)、溶酶体荧光强度增加 ($P < 0.05$)、细胞凋亡率降低 ($P < 0.001$)、Bcl-2 蛋白表达升高 ($P < 0.001$)、Bax 蛋白表达降低 ($P < 0.001$)。结论 氨氯地平抑制足细胞内 Ca^{2+} 内流, 促进足细胞自噬、抑制凋亡, 对于预防高血压肾病发生具有一定的作用。

关键词 足细胞; 氨氯地平; 血管紧张素 II; 自噬; Ca^{2+} ; 细胞凋亡

中图分类号 R 34

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)07-1179-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.07.003

2025-03-30 接收

基金项目: 安徽省高校学科(专业)拔尖人才学术资助项目(编号: gxbjZD2021046)

作者简介: 赵 韦, 女, 硕士研究生;

周海胜, 男, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: haishengs@ahmu.edu.cn

足细胞是位于肾小球基底膜的终末分化上皮细胞, 其正常的形态和结构对维持肾小球滤过及屏障功能至关重要^[1]。由于其再生能力很低, 足细胞非常敏感, 容易受到外界压力变化的影响^[2]。 Ca^{2+} 作为细胞内重要的第二信使, 参与并调节细胞内各种活动。在肾小球相关疾病等慢性肾病发展过程中,

group, the low-dose and high-dose AME groups showed reduced tissue damage in rats, the arthritis index, lung tissue wet-dry weight ratio, levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α , the expression levels of MyD88 and TLR4 proteins, and p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 ratio showed a dose-dependent decrease ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the expression of Beclin 1 and LC3 II / I proteins showed a dose-dependent increase ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with high-dose AME group, the tissue damage of rats in the high-dose AME + LPS group was worsened, the arthritis index, lung tissue wet-dry weight ratio, levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α , the expression levels of MyD88 and TLR4 proteins, and p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 ratio were higher ($P < 0.01$), the expression of Beclin 1 and LC3 II / I proteins was lower ($P < 0.01$). **Conclusion** AME inhibits the MyD88/TLR4/NF- κ B p65 pathway and alleviates lung injury in RA-ILD rats.

Key words astragalus mongholicus extract; rheumatoid arthritis; interstitial lung disease; lung injury; MyD88/TLR4/NF- κ B p65 pathway; inflammation; autophagy

Fund program Medical Science Research Project of Hebei Provincial Health Commission (No. 20231416)

Corresponding author Zhao Yue, E-mail: zy18732367252@126.com

可观察到足细胞内 Ca^{2+} 水平的增加^[3-4]。高血压被认为是引起慢性肾病的第二大原因^[5],主要受肾素-血管紧张素-醛固酮系统调节,其中血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 是该系统的主要调节介质^[6]。足细胞膜上的瞬时受体电位(transient receptor potential canonical, TRPC) 5 和 TRPC6 在参与调节足细胞 Ca^{2+} 内流、维持足细胞结构和功能方面具有重要作用^[7]。氨氯地平靶向电压依赖性的 L 型钙通道,通过阻断 Ca^{2+} 内流来扩张血管,降低外周血管阻力,从而起到降低血压的作用,是临床常用降血压药物。自噬是一种健康的生物“管家”过程,可以维持细胞蛋白质和细胞器的合成、降解和再循环之间的平衡。足细胞具有很高的基础自噬水平,当足细胞无法进行自噬时,易导致细胞损伤^[8]。该研究旨在探讨氨氯地平治疗高血压时是否影响足细胞内 Ca^{2+} 内流变化、细胞自噬及足细胞的功能,为预防高血压肾病提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 永生化人足细胞(human podocyte, HPC)为山东省省立医院风湿免疫科杨清锐教授惠赠。

1.1.2 主要试剂 RPMI-1640 培养基(货号: 11875500Bt, 美国 Gibco 公司);胎牛血清(货号: FSP500, 苏州依科赛生物科技股份有限公司);青链霉素混合液、胰蛋白酶和蛋白酶抑制剂(货号: P1400、T8150-25G0、P8304, 北京索莱宝科技有限公司);RIPA 裂解液(货号: BL504A, 北京白鲨生物技术有限公司); Ca^{2+} 荧光探针(Fluo-4AM)、Lyso-Tracker Green 溶酶体绿色荧光探针、Hoechst 33342 活细胞染色液(货号: S1060、C1047S、C1028, 上海碧云天生物技术有限公司);Ang II、氨氯地平(货号: HY-13948、HY-B0317, 美国 MCE 公司);兔源 GAP-DH 抗体(货号: AB010301, 稀释比 1:1 000, 安徽朵能生物技术有限公司);兔源 Beclin-1 抗体(货号: 11306-1-AP, 稀释比 1:1 000, 武汉三鹰生物技术有限公司);兔源 Bax 抗体(货号: WL01637, 稀释比 1:1 000, 湖南万类生物技术有限公司);兔源 LC3B 抗体、兔源 P62 抗体、鼠源 Bcl-2 抗体和抗兔的过氧化氢酶标记二抗(货号: 2775、5114、15071S、7074S, 稀释比分别为 1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:2 000, 美国 Cell Signaling Technology 公司);双染细胞凋亡检测试剂盒[货号: KTA0002, 亚科因(武汉)

生物技术有限公司]。

1.1.3 主要仪器 CO_2 培养箱(型号: CellXpert C170, 美国 Thermo Fisher 公司);流式分析仪(型号: CytoFlex, 美国 Beckman Coulter 公司); Ca^{2+} 成像系统(型号: BT100-2J, 美国 OLYMPUS 公司);倒置荧光显微镜(型号: Axio Observer 3, 德国 Zeiss 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HPC 细胞培养在含有 10% 胎牛血清、1% 青链霉素双抗的 RPMI-1640 培养基中,置于 37 °C、含有 5% CO_2 培养箱中传代培养。将细胞接种在孔板中并分为对照组、Ang II 组、氨氯地平组、Ang II + 氨氯地平组进行后续实验。

1.2.2 Western blot 实验 HPC 细胞接种在 12 孔板中,加入细胞裂解缓冲液,于冰上裂解 30 min,离心 10 min 后收取上清液以提取细胞总蛋白。通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白样品,然后转移到 PVDF 膜上并使用 5% 的脱脂奶粉在室温下封闭 2 h。TBST 洗涤 3 次后,孵育一抗 4 °C 摇床过夜。次日, TBST 洗涤 2 次,室温下孵育过氧化氢酶标记的二抗,经 TBST 洗涤 3 次后使用 ECL 发光液对蛋白进行可视化。

1.2.3 细胞内 Ca^{2+} 成像实验 HPC 细胞接种在 35 mm 细胞培养皿中。培养至细胞汇合度达 70% 左右,弃去细胞培养基, PBS 洗涤 3 次。使用 PBS 将 Fluo-4AM 稀释为浓度 5 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液。每皿细胞中加入 5 $\mu\text{mol/L}$ Fluo-4AM 工作液, 37 °C 孵育 30 min 进行探针加载。经 PBS 洗涤 3 次,再次加入 PBS 孵育 20 min 以确保 Fluo-4AM 在细胞内完全转变成 Fluo-4。孵育结束后将细胞培养皿放置在 Ca^{2+} 成像系统荧光显微镜下,记录正常状态下细胞内 Ca^{2+} 水平,待采集信号趋于稳定后,加入 100 $\mu\text{mol/L}$ Ang II,实时检测并记录细胞内 Ca^{2+} 通量的变化,收集数据并分析。

1.2.4 细胞内 Ca^{2+} 浓度检测 HPC 细胞接种在 12 孔板中,经指定时间及浓度的药物处理后弃去培养基(Ang II 和氨氯地平的使用浓度均为 10 $\mu\text{mol/L}$,处理时间为 6 h),使用胰蛋白酶消化贴壁细胞, PBS 终止消化,离心去除上清液后经 PBS 洗涤 3 次,每管加入 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fluo-4AM 工作液并重悬细胞, 37 °C 孵育 30 min 进行探针加载。PBS 洗涤 3 次后,加入 PBS 再次孵育 20 min 确保 Fluo-4AM 在细胞内完全转变成 Fluo-4。孵育结束后采用流式细胞术检测细胞内 FLuo-4 的荧光,以确定细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化。

1.2.5 Lyso-Tracker Green 活细胞染色 HPC 细胞接种在 12 孔板中,经指定时间及浓度的药物处理后弃去培养基(Ang II 和氨氯地平的使用浓度均为 $10 \mu\text{mol/L}$,处理时间为 24 h),PBS 洗涤 3 次后将细胞与 $5 \mu\text{mol/L}$ Lyso-Tracker Green 工作液在 37°C 下一起孵育 30 min,然后与 $1 \times$ Hoechst 33342 活细胞染料在 37°C 下共孵育 10 min 对细胞核染色,PBS 洗涤 3 次,使用倒置荧光显微镜进行检测以及图像获取。

1.2.6 细胞凋亡实验 HPC 细胞接种在 12 孔板中,经指定时间及浓度的药物处理后弃去培养基(Ang II 和氨氯地平的使用浓度均为 $10 \mu\text{mol/L}$,处理时间为 6 h),使用胰蛋白酶消化贴壁细胞并用 PBS 终止消化,离心去除上清液后经 PBS 洗涤 2 次,每管加入 $100 \mu\text{L}$ $1 \times$ Annexin V Binding Buffer 重悬细胞,并向细胞悬液中加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin V-AbFluor 488、 $2 \mu\text{L}$ PI 染料,室温下避光孵育 15 min,孵育结束后每管加入 $400 \mu\text{L}$ $1 \times$ Annexin V Binding Buffer 重悬细胞。最后使用流式细胞仪检测 488 nm 处阳性细胞比例,记录数据并分析。

1.3 统计学处理 所有实验独立重复 3 次后,使用 Prism 8.4.0 软件统计分析,统计结果使用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间均数比较采用单因素方差分析(ANOVA),方差分析后,组间两两比较采用 Bonferroni 多重比较进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氨氯地平对 HPC 细胞 Ca^{2+} 内流及自噬的影响 为探讨 L 型 Ca^{2+} 阻断剂氨氯地平对 HPC 细胞自噬功能的影响,采用氨氯地平处理 HPC 细胞,Western blot 检测细胞自噬标记分子 LC3B-II/LC3B-I 比值变化、Beclin-1 蛋白表达水平以及 P62 的降解情况。结果如图 1 显示,HPC 细胞基础下具有较高水平的 LC3B-I 表达,同时可检测到 LC3B-II,提示 HPC 细胞在无刺激时,自噬水平较低。氨氯地平分别处理 HPC 15、30、60 和 120 min 后,LC3B-I 的表达水平降低,但 LC3B-II 随着氨氯地平处理时间的延长,逐步升高。与对照组比较,氨氯地平组 LC3B-II/LC3B-I 的比值增高($F = 572.60$, $P < 0.001$)、Beclin-1 蛋白表达水平升高($F = 28.43$, $P < 0.001$),而 P62 表达降低($F = 7.92$, $P < 0.01$),差异有统计学意义。这些结果提示氨氯地平作用于足细胞能增加细胞自噬水平。

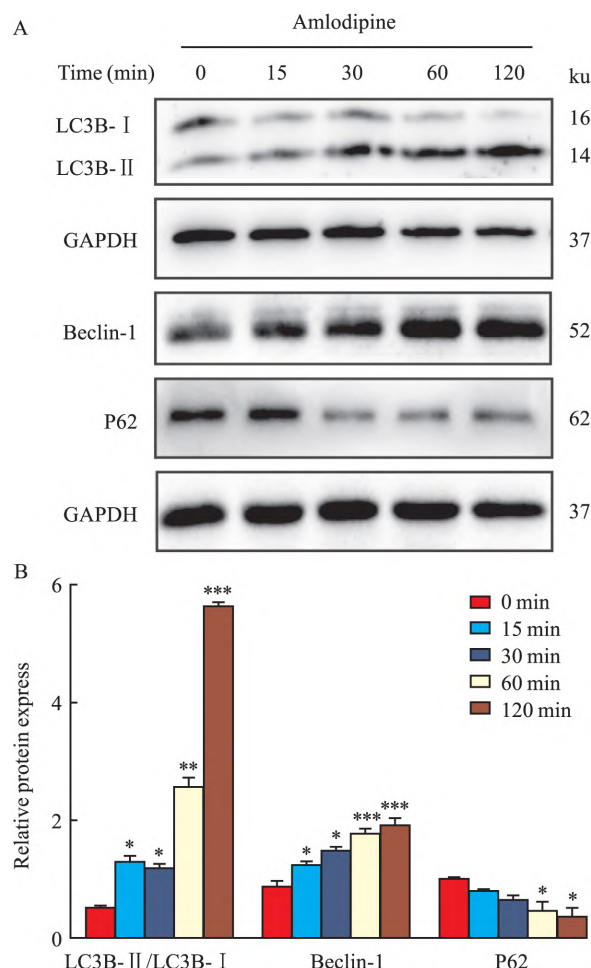


图1 氨氯地平对 HPC 细胞自噬的影响

Fig.1 Amlodipine increased autophagy in HPC cells

A: The protein expression levels of LC3B, Beclin-1, and P62 detected by Western blot in HPC cells; B: Quantitative analysis of relative protein expression; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 0 min group.

2.2 HPC 细胞内 Ca^{2+} 浓度变化对其自噬的影响

为探究氨氯地平是否通过调节细胞 Ca^{2+} 内流影响细胞自噬,使用 Ang II 处理 HPC 细胞,观察细胞内 Ca^{2+} 内流变化及其与自噬的关系。首先使用 Ang II 作用于 HPC 细胞后,加载 Ca^{2+} 荧光探针 (Fluo-4AM),使用 Ca^{2+} 成像系统实时检测 HPC 细胞内 Ca^{2+} 内流变化。结果如图 2A 所示,受到 Ang II 刺激后,细胞内 Ca^{2+} 水平在短时间内迅速升高。进一步运用流式细胞术检测细胞内 Fluo-4 的阳性细胞比例,结果显示,见图 2B、2C,在 Ang II 刺激后, FITC⁺ 细胞比例由静息状态的 (31.90 ± 1.77) % 增加到 (48.41 ± 6.42) %,较静息状态增加 (Bonferroni 检验 $P < 0.001$);当使用 L 型 Ca^{2+} 抑制剂氨氯地平处理细胞后, FITC⁺ 细胞比例由静息状态的

(31.90 ± 1.77) % 减少到 (19.63 ± 1.86) % ,较静息状态减少 (Bonferroni 检验 $P < 0.001$) ;而 Ang II + 氨氯地平组中 FITC⁺ 细胞比例 (32.92 ± 1.13) % 恢复到静息状态 (31.90 ± 1.77) % 的水平 ,与静息状态比较 联合处理后 FITC⁺ 细胞比例变化差异无统计学意义 ($P > 0.05$) ;并且与 Ang II 组 (48.41 ± 6.42) % 比较 ,FITC⁺ 细胞比例减少 (Bonferroni 检验

$P < 0.001$) 。因此 ,使用 Ang II 和氨氯地平处理 HPC 细胞 ,可以有效改变 HPC 细胞内的 Ca^{2+} 内流变化 ,差异有统计学意义 ($F = 96.17$, $P < 0.001$) 。

根据上述处理 HPC 细胞引起的细胞内 Ca^{2+} 内流变化 ,观察足细胞自噬的变化。Western blot 分析 LC3B-II /LC3B-I 比值、Beclin-1 以及 P62 的蛋白表达变化 ,结果如图 2D、2E 所示 ,LC3B-II /LC3B-I 比

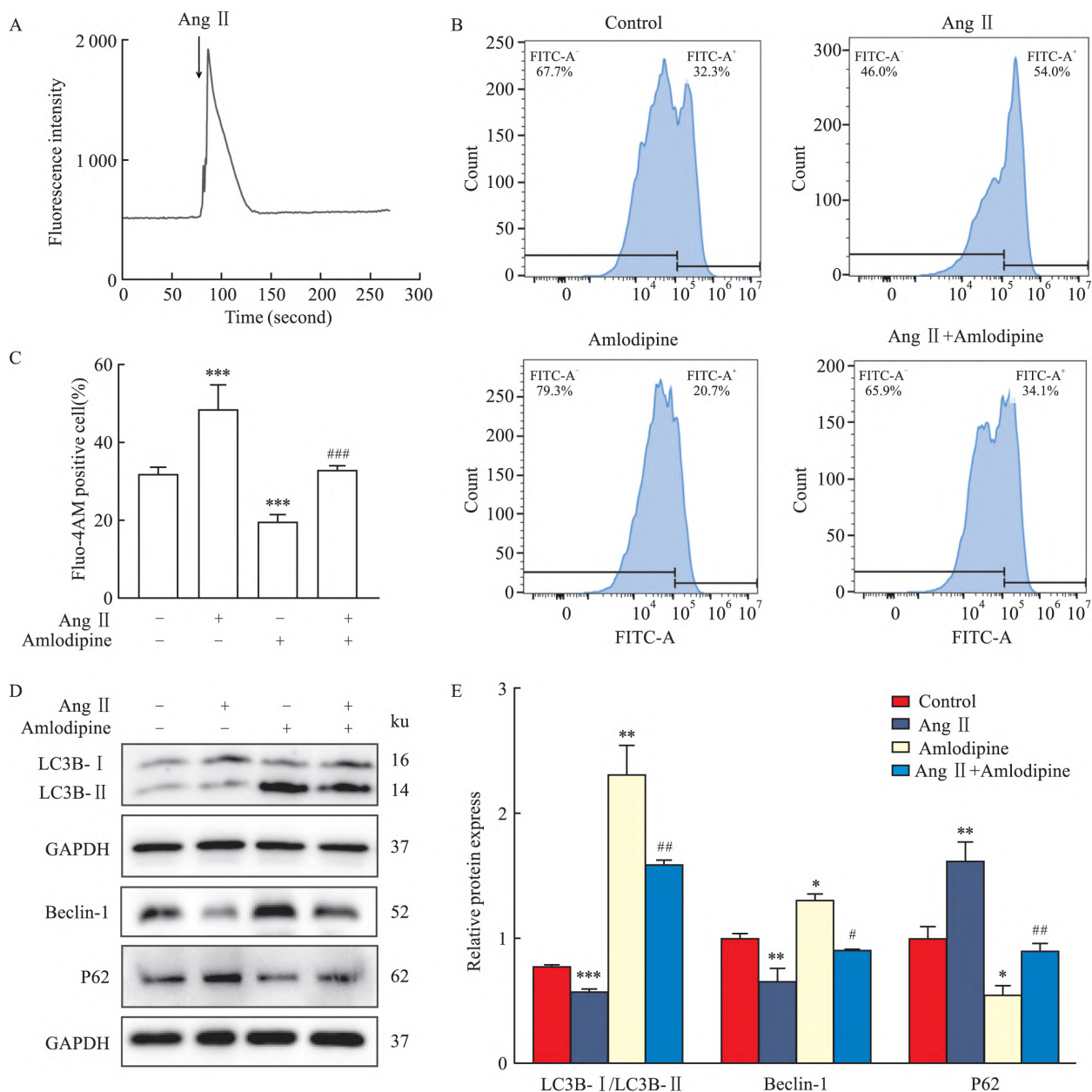


图2 HPC 细胞内 Ca^{2+} 浓度变化对其自噬的影响

Fig.2 Amlodipine affected autophagy by altering calcium concentration in HPC cells

A: Representative images of calcium fluxes in HPC induced by Ang II; B: Intracellular Ca^{2+} concentration in HPC cells detected by flow cytometry; C: Quantification of Fluo-4AM positive cells; D: The protein expression levels of LC3B, Beclin-1, and P62 detected by Western blot in HPC cells; E: Quantitative analysis of relative protein expression; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs Ang II group.

值($F = 41.51$, $P < 0.001$)、Beclin-1($F = 21.88$, $P < 0.01$)和 P62($F = 20.22$, $P < 0.001$)的蛋白表达在不同处理组的均存在显著性差异。与对照组比较, Ang II 组中 LC3B-II /LC3B-I 比值(Bonferroni 检验 $P < 0.001$)以及 Beclin-1 蛋白表达(Bonferroni 检验 $P < 0.01$)降低, P62 蛋白表达(Bonferroni 检验 $P < 0.01$)升高; 与对照组比较, 氨氯地平组中 LC3B-II /LC3B-I 比值(Bonferroni 检验 $P < 0.001$)和 Beclin-1 蛋白表达(Bonferroni 检验 $P < 0.001$)增加, 而 P62 蛋白表达(Bonferroni 检验 $P < 0.05$)降低; 与 Ang II 组比较, Ang II + 氨氯地平组中 LC3B-II /LC3B-I 比值(Bonferroni 检验 $P < 0.01$)和 Beclin-1 蛋白表达(Bonferroni 检验 $P < 0.05$)增加, P62 蛋白表达(Bonferroni 检验 $P < 0.01$)降低。由此提示 HPC 的自噬受其细胞内 Ca^{2+} 内流的影响。

2.3 抑制 HPC 细胞 Ca^{2+} 内流对溶酶体功能的影响 细胞自噬依赖于自噬溶酶体的完整性。为进一步探讨氨氯地平 and Ang II 对足细胞自噬溶酶体功能的影响, 在 HPC 细胞中转染 Lyso-Tracker Green 探针标记溶酶体, 以评估溶酶体的功能变化。活细胞对溶酶体的标记染色结果如图 3 所示: 与对照组比较, Ang II 刺激时, HPC 细胞内绿色标记的溶酶体的荧光强度较对照组减少(Bonferroni 检验 $P < 0.05$); 而使用氨氯地平抑制 Ca^{2+} 内流后, 溶酶体的荧光强度增强(Bonferroni 检验 $P < 0.01$); 与 Ang II

组比较, Ang II + 氨氯地平组增加溶酶体的荧光强度(Bonferroni 检验 $P < 0.05$), 差异均有统计学意义($F = 30.34$, $P < 0.001$)。因此氨氯地平通过抑制细胞内 Ca^{2+} 内流, 有利于增强足细胞的溶酶体的功能, 这可能与促进细胞自噬密切相关。

2.4 HPC 细胞 Ca^{2+} 内流对细胞凋亡的影响 为了观察对足细胞凋亡的影响, 使用氨氯地平及 Ang II 处理足细胞, 运用流式细胞术检测凋亡细胞。结果如图 4A、4B 所示, 与对照组比较, Ang II 组细胞凋亡率增加(Bonferroni 检验 $P < 0.0001$); 氨氯地平组抑制 L 型 Ca^{2+} 钙通道后 HPC 细胞的凋亡率下降(Bonferroni 检验 $P < 0.01$); 进一步, 与 Ang II 组比较, Ang II + 氨氯地平组的细胞凋亡水平下降(Bonferroni 检验 $P < 0.001$), 差异均有统计学意义($F = 387.30$, $P < 0.0001$)。

通过 Western blot 来检测凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达变化。结果如图 4C、4D 所示, Bcl-2 表达($F = 52.86$, $P < 0.001$)和 Bax 表达($F = 189.60$, $P < 0.001$)在不同处理组间均存在显著差异。与对照组比较, Ang II 组 Bcl-2 蛋白表达(Bonferroni 检验 $P < 0.01$)下降, Bax 蛋白表达(Bonferroni 检验 $P < 0.001$)升高; 与对照组比较, 氨氯地平组的 Bcl-2 蛋白表达(Bonferroni 检验 $P < 0.001$)升高, Bax 蛋白表达(Bonferroni 检验 $P < 0.001$)下降。此外, 与 Ang II 组比较, Ang II + 氨氯地平组 Bcl-2 蛋

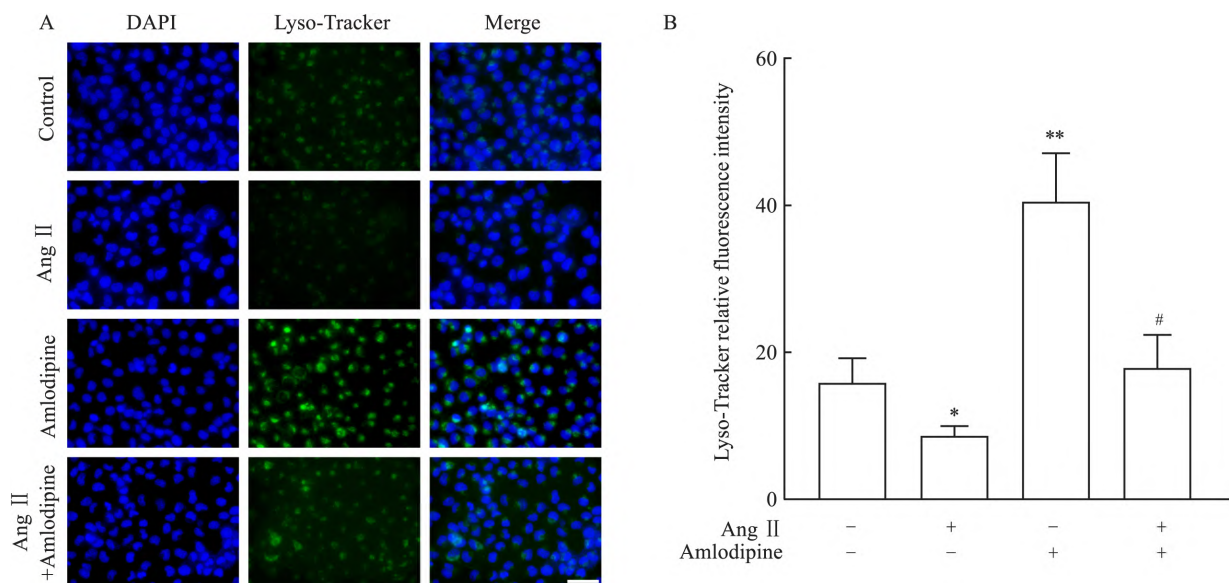


图3 Ca^{2+} 内流对 HPC 细胞溶酶体功能的影响

Fig. 3 The effect of calcium influx on lysosomal function in HPC cells

A: Representative images of Lyso-Tracker Green live cell staining $\times 400$, Scale bar: 100 μm ; B: Relative quantitative analysis of fluorescence intensity; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs Ang II group.

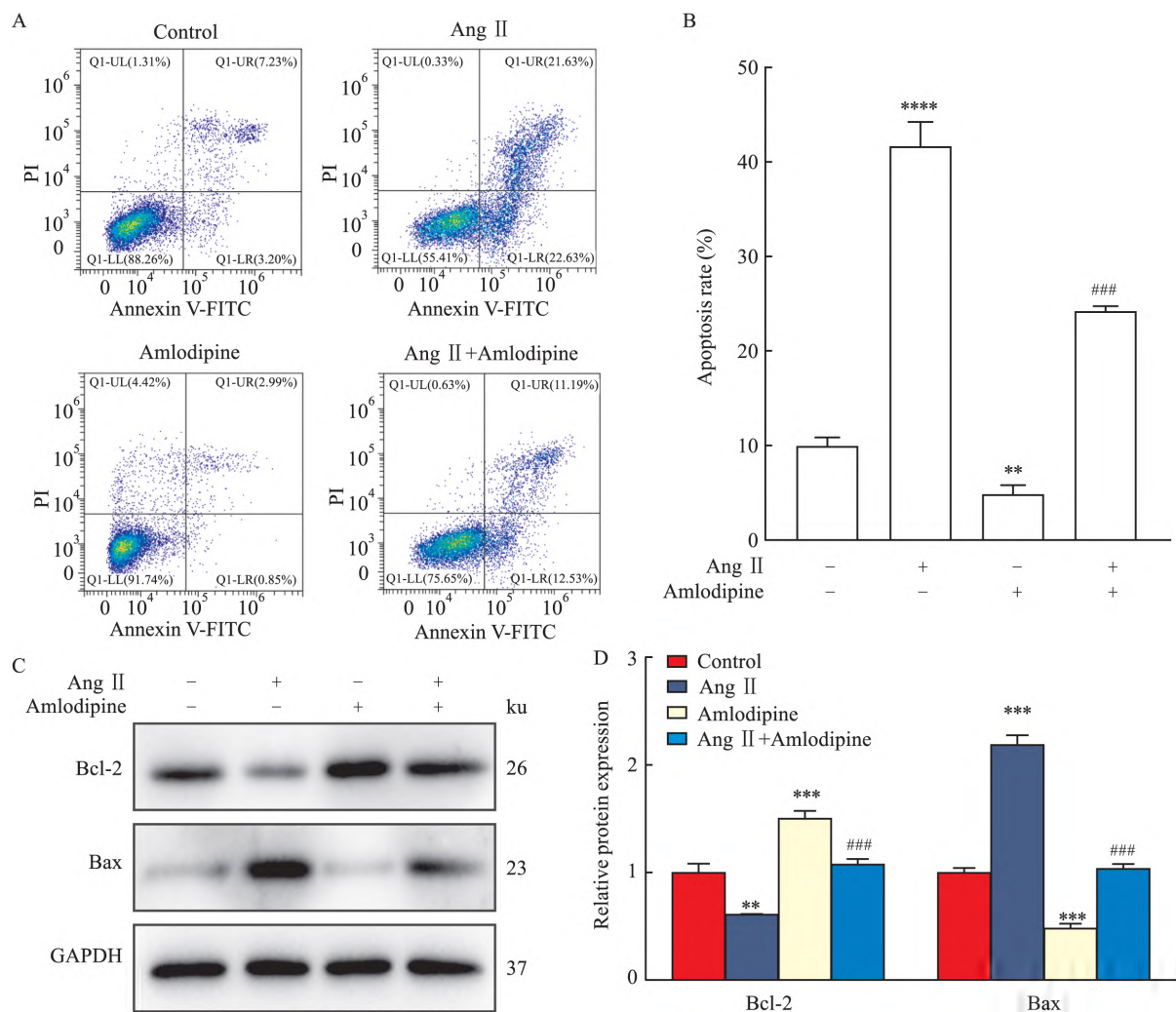
图4 Ca^{2+} 内流对 HPC 细胞凋亡的影响

Fig. 4 The effect of calcium influx on apoptosis in HPC cells

A: Detection of HPC apoptosis by flow cytometry; B: Quantification of apoptosis rate; C: The protein expression levels of Bcl-2 and Bax detected by Western blot in HPC cells; D: Quantitative analysis of relative protein expression; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs the Control group; ### $P < 0.001$ vs the Ang II group.

白表达 (Bonferroni 检验 $P < 0.001$) 升高, Bax 蛋白表达 (Bonferroni 检验 $P < 0.001$) 下降。这些结果表明, 氨氯地平抑制细胞内 Ca^{2+} 内流, 增加细胞自噬水平, 抑制细胞凋亡。

3 讨论

肾小球上皮细胞是覆盖于肾小球毛细血管的特殊细胞, 有利于维持肾小球滤过屏障。其中足细胞作为肾小球上皮细胞中的脏层上皮细胞, 具有独特的形态结构与功能, 长期受高血压刺激会导致微环境变化进而造成足细胞结构和功能损伤, 影响肾小球滤过功能, 最终导致蛋白尿等慢性肾脏疾病的发生与发展^[9]。自噬作为一种应激适应性模式, 可以

抑制细胞凋亡, 保护细胞免受损伤。在健康的肾小球上皮细胞中, 自噬在维持细胞内稳态等方面起着重要作用, 特别是在应对血管压力时, 这对肾小球上皮细胞的存活和功能尤为重要。

正常情况下, 维持细胞内 Ca^{2+} 稳态对细胞正常生理进程至关重要, Ca^{2+} 过载会导致细胞死亡^[10]。同时, 细胞内钙信号传导和钙超负荷是足细胞肌动蛋白动力学改变、引发足细胞损伤和导致蛋白尿的细胞死亡调节因子。已有研究^[11]显示, 足细胞内 Ca^{2+} 介导的信号通路是调节足细胞自噬平衡、参与细胞存活的重要机制。TRPC 属于足细胞中研究广泛的瞬时受体电位超家族, Salemkour et al^[12] 研究发现, TRPC6 介导的 Ca^{2+} 内流导致糖尿病肾病中钙蛋

白酶活性升高,进而导致足细胞自噬受损、足细胞损伤和蛋白尿的发展。此外,Ang II 是高血压状态下肾脏组织较为多见的、加剧高血压的危险因素。研究^[13]证明,Ang II 主要通过作用于 AGTR1 受体来促使 Ca^{2+} 的流入,导致 Ca^{2+} 内流的变化和足细胞的丢失。氨氯地平是一种二氢吡啶类钙通道阻滞剂,通过抑制细胞内 Ca^{2+} 内流来降低 Ca^{2+} 浓度,目前已经成为治疗高血压的首选药物之一^[14]。

足细胞内 Ca^{2+} 内流的异常会影响足细胞自噬和细胞凋亡。本研究显示,氨氯地平抑制足细胞内 Ca^{2+} 内流时,自噬相关蛋白 LC3B 和 Beclin-1 表达水平显著升高,P62 表达水平降低,说明自噬增加且自噬流完整。而 Ang II 作用足细胞时, Ca^{2+} 内流增加,自噬受到抑制。自噬发生时,细胞质中的蛋白或细胞器被囊泡包裹,并与溶酶体融合形成自噬溶酶体,从而进行消化和分解,形成完整自噬流。因此,维持溶酶体功能的稳定性是完成自噬的重要条件^[15]。Ang II 作用于足细胞时, Ca^{2+} 内流增加导致溶酶体功能减弱;而氨氯地平则通过抑制足细胞内 Ca^{2+} 内流,有利于增强溶酶体的功能,维持完整的自噬通量。

肾小球上皮细胞发生凋亡是高血压肾病的主要原因之一^[16]。自噬通过清除受损细胞器和蛋白质来抑制凋亡信号通路,从而作为一种保护机制来防止凋亡,有利于维持肾小球功能^[17]。本研究证实,在使用氨氯地平后,足细胞的凋亡率显著降低,凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达升高,Bax 表达下降。因此,特异性阻断 L 型 Ca^{2+} 通道、抑制足细胞中 Ca^{2+} 内流,可以有效提高足细胞中自噬水平,保护其免受凋亡的损伤。

综上所述,本研究表明,对于具有高水平基础自噬的足细胞,高血压会诱发肾脏组织分泌 Ang II,导致足细胞内 Ca^{2+} 内流增多,自噬标志蛋白 LC3B、Beclin-1 表达下调,P62 蛋白表达升高,破坏溶酶体功能。而氨氯地平可以通过阻断 Ca^{2+} 内流,有利于恢复和提高自噬水平,减少细胞凋亡,在降血压治疗过程中,对肾小球基底膜具有较好的保护作用,这为氨氯地平治疗高血压肾病提供了新的见解。

参考文献

- [1] Kopp J B, Anders H J, Susztak K, et al. Podocytopathies [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6: 68. doi: 10.1038/s41572-020-0196-7.
- [2] Tao Y, Yazdizadeh Shotorbani P, Inman D, et al. Store-operated Ca^{2+} entry inhibition ameliorates high glucose and Ang II-induced

podocyte apoptosis and mitochondrial damage [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2023, 324(5): F494-504. doi: 10.1152/ajprenal.00297.2022.

- [3] 石生,江肖,徐兴欣,等. 伴足突融合的原发性 IgA 肾病的临床病理特征及危险因素分析 [J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(12): 2119-23. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.020.
- [3] Shi S, Jiang X, Xu X X, et al. Clinicopathologic features and risk factors of primary IgA nephropathy with foot process effacement [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(12): 2119-23. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.020.
- [4] Tu Y C, Shu H P, Sun L L, et al. The physiopathologic roles of calcium signaling in podocytes [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2023, 28(10): 240. doi: 10.31083/j.fbl2810240.
- [5] Kohagura K. The public health impact of hypertension and diabetes: a powerful tag team for the development of chronic kidney disease [J]. *Hypertens Res*, 2023, 46(2): 339-40. doi: 10.1038/s41440-022-01114-9.
- [6] Thimm C, Erichsen L, Wruck W, et al. Unveiling angiotensin II and losartan-induced gene regulatory networks using human urine-derived podocytes [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(13): 10551. doi: 10.3390/ijms241310551.
- [7] Anderson M, Roshanravan H, Khine J, et al. Angiotensin II activation of TRPC6 channels in rat podocytes requires generation of reactive oxygen species [J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(4): 434-42. doi: 10.1002/jcp.24461.
- [8] Shankland S J, Wang Y, Shaw A S, et al. Podocyte aging: why and how getting old matters [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2021, 32(11): 2697-713. doi: 10.1681/ASN.2021050614.
- [9] Li X, Zhang Y, Xing X, et al. Podocyte injury of diabetic nephropathy: novel mechanism discovery and therapeutic prospects [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 168: 115670. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115670.
- [10] Yang J, Zhao Z, Gu M, et al. Release and uptake mechanisms of vesicular Ca^{2+} stores [J]. *Protein Cell*, 2019, 10(1): 8-19. doi: 10.1007/s13238-018-0523-x.
- [11] Ma S, Xu J, Zheng Y, et al. Qian Yang Yu Yin granule improves hypertensive renal damage: a potential role for TRPC6-CaMKK β -AMPK-mTOR-mediated autophagy [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 302: 115878. doi: 10.1016/j.jep.2022.115878.
- [12] Salemkour Y, Yildiz D, Dionet L, et al. Podocyte injury in diabetic kidney disease in mouse models involves TRPC6-mediated calpain activation impairing autophagy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2023, 34(11): 1823-42. doi: 10.1681/ASN.0000000000000212.
- [13] Binz-Lotter J, Jüngst C, Rinschen M M, et al. Injured podocytes are sensitized to angiotensin II-induced calcium signaling [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2020, 31(3): 532-42. doi: 10.1681/ASN.2019020109.
- [14] Williams B, Mancia G, Spiering W, et al. 2018 Practice guidelines for the management of arterial hypertension of the European society of hypertension and the European society of cardiology:

- ESH/ESC Task Force for the Management of Arterial Hypertension [J]. *J Hypertens*, 2018, 36(12): 2284–309. doi: 10.1097/HJH.0000000000001961.
- [15] Liu Y, Wei F Z, Zhan Y W, et al. TLR9 regulates the autophagy-lysosome pathway to promote dendritic cell maturation and activation by activating the TRAF6-cGAS-STING pathway [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2023, 39(12): 1200–12. doi: 10.1002/kjm2.12769.
- [16] Liu F, Wei C C, Wu S J, et al. Apocynin attenuates tubular apoptosis and tubulointerstitial fibrosis in transgenic mice independent of hypertension [J]. *Kidney Int*, 2009, 75(2): 156–66. doi: 10.1038/ki.2008.509.
- [17] Jin Q, Ma F, Liu T, et al. Sirtuins in kidney diseases: potential mechanism and therapeutic targets [J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22(1): 114. doi: 10.1186/s12964-023-01442-4.

Amlodipine promotes autophagy by inhibiting calcium influx in human podocytes

Zhao Wei¹, Xu Deping¹, Liao Kainan¹, Cai Chunlin², Zang Dandan³, Zhou Haisheng^{1,3}

(¹Dept of Biochemistry, ²Dept of Pathology and Pathophysiology,

³Center for Scientific Research, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the effects of the antihypertensive drug Amlodipine on calcium influx and autophagy in human podocytes (HPC). **Methods** HPC cells were routinely cultured *in vitro*. HPC cells were treated with angiotensin II (Ang II), the L-type Ca^{2+} blocker Amlodipine alone or in combination. The Ca^{2+} imaging system was used to detect the transient changes in the intracellular Ca^{2+} flux of HPC cells in real time after drug treatment. Western blot was employed to detect the changes in the ratio of autophagy marker proteins LC3B-II/LC3B-I, and the expression levels of Beclin-1, P62, as well as apoptosis-related proteins Bcl-2 and Bax. Flow cytometry was used to detect the number of Fluo-4AM positive cells at 488 nm to analyze the level of intracellular Ca^{2+} influx in HPC cells. Lyso-Tracker Green live cell staining was applied to analyze the fluorescence intensity of lysosomes. Flow cytometry was also used to detect the apoptosis rate of HPC cells. **Results** Compared with the control group, in the Ang II group, the transient Ca^{2+} flux and the number of Fluo-4AM positive cells increased significantly ($P < 0.001$). The ratio of autophagy marker proteins LC3B-II/LC3B-I ($P < 0.001$) and the protein expression of Beclin-1 ($P < 0.01$) decreased significantly, while the expression of P62 increased ($P < 0.01$). The fluorescence intensity of lysosomes weakened ($P < 0.05$), the apoptosis rate increased ($P < 0.0001$), the expression of apoptosis-related protein Bcl-2 decreased ($P < 0.01$), and the protein level of Bax increased ($P < 0.001$). Compared with the control group, in the Amlodipine group, the number of Fluo-4AM positive cells decreased significantly ($P < 0.001$), the ratio of LC3B-II/LC3B-I ($P < 0.001$) and the protein expression of Beclin-1 ($P < 0.001$) increased, the protein expression of P62 decreased ($P < 0.05$), the fluorescence intensity of lysosomes enhanced ($P < 0.01$), the apoptosis rate decreased ($P < 0.01$), the protein expression of Bcl-2 increased ($P < 0.001$), and the protein level of Bax decreased ($P < 0.001$). Compared with the Ang II group, in the Ang II + Amlodipine group, the number of Fluo-4AM positive cells decreased significantly ($P < 0.001$), the ratio of LC3B-II/LC3B-I ($P < 0.01$) and the protein expression of Beclin-1 increased ($P < 0.05$), the protein level of P62 decreased ($P < 0.01$), the fluorescence intensity of lysosomes increased ($P < 0.05$), the apoptosis rate decreased ($P < 0.001$), the protein expression of Bcl-2 increased ($P < 0.001$), and the protein level of Bax decreased ($P < 0.001$). **Conclusion** Amlodipine inhibits calcium influx, promotes autophagy and inhibits apoptosis in human podocytes, which is useful in preventing the development of hypertensive nephropathy.

Key words human podocytes; amlodipine; angiotensin II; autophagy; Ca^{2+} ; apoptosis

Fund program Academic Funding Program for Top Talents in Colleges and Universities in Anhui Province (No. gxbjZD2021046)

Corresponding author Zhou Haisheng, E-mail: haishengs@ahmu.edu.cn