

高糖对小鼠足细胞(原)肾素受体表达的影响

杜 然 丁国华 任志龙 梁 伟 陈星华 刘以鹏

摘 要 **目的** 体外观察高糖刺激肾小球足细胞后(原)肾素受体(prorenin receptor, PRR)的表达变化,及 PRR 对足细胞凋亡的影响。**方法** 条件永生性小鼠足细胞用 35mmol/L 高糖刺激不同时间(0、1、3、6、12h),用不同浓度葡萄糖[35mmol/L 甘露醇对照组、正常对照组(含 5mmol/L 葡萄糖)、10、20、35mmol/L 组]刺激 3h, Western blot 及 real-time PCR 技术检测 PRR 的蛋白和 mRNA 表达;再将细胞分为 35mmol/L 高糖组、PRR 的多肽阻断剂柄区肽(handle region peptide, HRP)(10^{-6} mol/L)预处理组、氯沙坦(10^{-6} mol/L)预处理组、HRP + 氯沙坦预处理组,流式细胞仪法检测足细胞凋亡率。**结果** (1)35mmol/L 高糖刺激 3、6、12h 细胞 PRR 蛋白及 mRNA 表达较正常对照细胞显著上调($P < 0.05$)。(2)20mmol/L 与 35mmol/L 浓度葡萄糖刺激足细胞 PRR 蛋白及 mRNA 表达较正常对照和甘露醇刺激细胞显著升高($P < 0.05$)。(3)氯沙坦、HRP 及 HRP + 氯沙坦预处理细胞凋亡率较 35mmol/L 高糖刺激细胞显著降低($P < 0.05$),HRP + 氯沙坦预处理细胞凋亡率较氯沙坦预处理细胞降低($P < 0.05$)。**结论** 高糖刺激足细胞可通过上调 PRR 导致足细胞凋亡。

关键词 高糖 足细胞 (原)肾素受体 柄区肽 凋亡

Expression of Prorenin Receptor in High Glucose-stimulated Podocytes Du Ran, Ding Guohua, Ren Zhilong, et al. Division of Nephrology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract **Objective** To study the expression of prorenin receptor (PRR) in high glucose-stimulated podocytes, and the influence of PRR on podocytes apoptosis. **Methods** Immortalized mouse podocytes were stimulated with 35mmol/L high glucose at different time lengths (0, 1, 3, 6 and 12h) and in various conditions as 35mmol/L mannitol group, control group and 10, 20, 35mmol/L glucose group for 3 h. Expression of PRR was detected by Western blot and real-time PCR. Then divided podocytes into 35mmol/L high glucose group, HRP (10^{-6} mol/L) group, Losartan (10^{-6} mol/L) group, HRP + Losartan group to detect apoptosis rate. **Results** (1) The level of PRR protein and mRNA in 3, 6, 12h group were significantly increased compare with the control group ($P < 0.05$). (2) The level of PRR protein and mRNA in 20, 35mmol/L glucose group were significantly increased compare with the control and 35mmol/L mannitol group ($P < 0.05$). (3) Compare with the 35mmol/L high glucose group, the apoptosis rate in HRP, Losartan and HRP + Losartan group were significantly decreased ($P < 0.05$). The apoptosis rate in HRP, HRP + Losartan group were significantly decreased when compared to Losartan group ($P < 0.05$). **Conclusion** High glucose stimulate podocytes can induce the podocyte apoptosis through overexpression of PRR.

Key words High glucose; Podocytes; Prorenin receptor; HRP; Apoptosis

肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)异常激活在糖尿病肾病发生发展过程中发挥重要作用,阻断 RAS 系统的有效成分是治疗糖尿病肾病的重要措施之一^[1,2]。2002 年(原)肾素受体(prorenin receptor, PRR)被发现,人们对 RAS 有了进一步的认识^[3]。传统观念认为肾素和(或)原肾素与 PRR 结合后可诱导其自身活化,并促使血管紧张素原向 Ang I、II 转化,即 Ang II 依赖性信号途径,而 PRR 本身不发挥生物学效应。但随着研究的深入,

人们发现 PRR 还能激活细胞内非 Ang II 依赖性信号途径,其本身在介导肾脏病理损伤中也发挥重要作用^[4]。为探讨 PRR 变化与糖尿病肾病之间的联系,本文模拟体外高糖环境,研究足细胞中 PRR 的表达变化,及其对足细胞凋亡的影响。

材料与方法

1. 材料:条件永生性的小鼠足细胞(美国纽约 Mount Sinai 医学院 Peter Mundel 教授惠赠),小鼠重组 γ 干扰素 (Sigma 公司),D-葡萄糖(国药集团化学试剂有限公司),兔抗小鼠 PRR 多克隆抗体、鼠抗 β -action 单克隆抗体、氯沙坦(美国 Santa Cruz),BCA 蛋白质定量试剂盒(上海申能博彩生物科技有限公司),实时定量 PCR 试剂盒(日本 Toyobo),HRP(上海吉尔生化有限公司)。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81270762)

作者单位:430060 武汉大学人民医院肾内科

通讯作者:丁国华,电子信箱:ghxding@gmail.com

2. 细胞培养与分组:未分化足细胞用含 10U/ml γ 干扰素的培养基在 5% CO_2 、33℃ 培养孵育箱传代培养,待达 70% 融合时,换用 37℃ 培养基(不含 γ 干扰素),转入 37℃、5% CO_2 培养孵育箱分化培养 10~14 天,刺激前改用无血清培养基同步化 12h。实验分组:①35mmol/L 高糖刺激不同时间(0、1、3、6、12h);②不同浓度葡萄糖糖[35mmol/L 甘露醇对照组、正常对照组(含 5mmol/L 葡萄糖)、10、20、35mmol/L 组]刺激 3h;③35mmol/L 高糖组、HRP(10^{-6} mol/L)预处理组、氯沙坦(10^{-6} mol/L)预处理组、HRP + 氯沙坦预处理组刺激 3h。收集细胞用于提取蛋白、mRNA 及检测凋亡率。

3. Western blot:收集各组细胞提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。每孔 40 μg 蛋白行聚丙烯酰胺凝胶电泳,恒流转膜,5% 脱脂奶粉 TBST 溶液室温封闭 2h,分别用一抗(兔抗 PRR 多克隆抗体 1:200、鼠抗 β -actin 单克隆抗体 1:1000)4℃ 孵育过夜。TBST 洗膜,辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1h, TBST 溶液洗膜。用 ECL 试剂显色,感光胶片曝光、显影、定影,凝胶成像分析系统测量行吸光度扫描,目的蛋白/ β -actin 比值表示相对含量。

4. real-time PCR:细胞总 RNA 提取按 Trizol 试剂说明书方法进行。每个样本取 4 μg 总 RNA 行反转录。实时定量 PCR 反应条件:95℃ 预变性 5min, 94℃ 15s, 58℃ 15s, 45℃ 30s, 35 个循环, 72℃ 延伸 10min。PRR 引物:上游引物:5'-GGG AAGCGT TAT GGAG-3';下游引物:5'-CGC AAG GTT GTA GGGA-3'。 β -actin 引物:上游引物:5'-GTC CACCG-CAAATGCTTCTA-3';下游引物:5'-TGCTGTACCTTCAC-CGTTC-3'。然后以 β -actin 为管家基因,计算目的基因的相对表达水平。

5. Annexin-PI 流式细胞仪法:胰酶消化收集细胞悬液, PBS 洗涤离心后重悬与 250 μL 预冷结合缓冲液,调整细胞数后移至离心管,分别加入 5ml FITC-Annexin V 和 10 μL PI,室温避光孵育后加入 400 μL 结合缓冲液中中止反应,流式细胞仪检测凋亡率。

6. 统计学方法:采用 SPSS 13.0 统计软件分析。数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。参数资料采用 One-way ANOVA 分析,组间比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 高糖对足细胞 PRR 蛋白表达的影响:35mmol/L 高糖刺激 3、6、12h 细胞 PRR 蛋白表达较正常对照组显著上调 ($P < 0.05$) (图 1)。20mmol/L 与 35mmol/L 浓度葡萄糖刺激足细胞 PRR 蛋白表达较正常对照和甘露醇刺激细胞显著升高 ($P < 0.05$) (图 2)。

2. 高糖对 PRR mRNA 表达的影响:35mmol/L 高糖刺激 3、6、12h 细胞 PRR mRNA 表达较正常对照组显著上调 ($P < 0.05$) (图 3)。20mmol/L 与

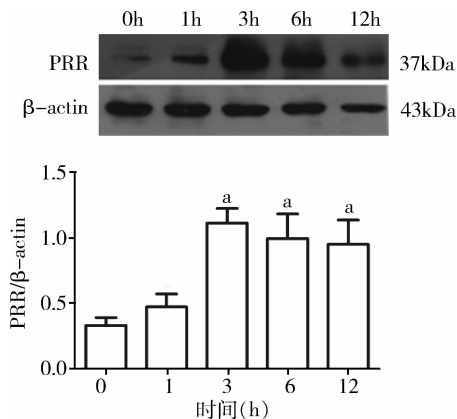


图 1 35mmol/L 葡萄糖刺激不同时间后各组细胞 PRR 表达的变化
与 0h 组比较, $^a P < 0.05$

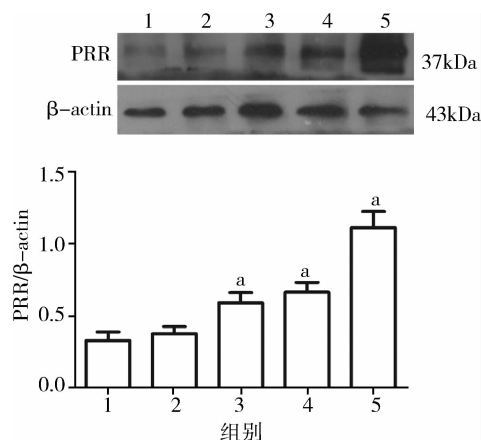


图 2 不同浓度葡萄糖刺激足细胞后各组 PRR 表达的变化

1. 35mmol/L 甘露醇对照组; 2. 正常对照组; 3. 10mmol/L 葡萄糖组; 4. 20mmol/L 高糖组; 5. 35mmol/L 高糖组。与正常对照组比较, $^a P < 0.05$

35mmol/L 浓度葡萄糖刺激足细胞 PRR mRNA 表达较正常对照和甘露醇刺激细胞显著升高 ($P < 0.05$) (图 4)。

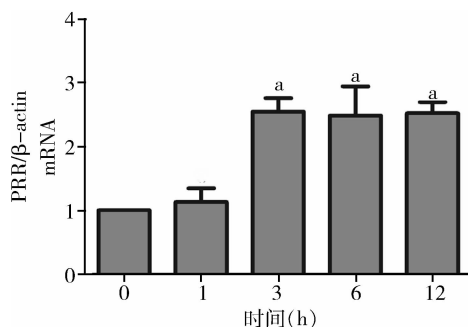


图 3 35mmol/L 葡萄糖刺激不同时间后各组细胞 PRRmRNA 表达的变化
与 0h 组比较, $^a P < 0.05$

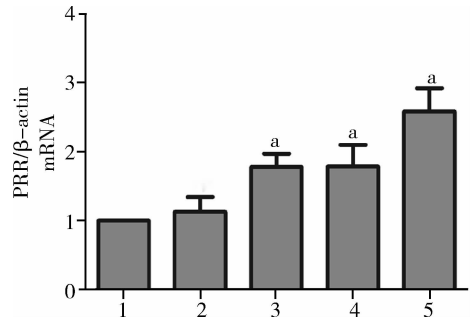


图 4 不同浓度葡萄糖刺激 3h 后
各组 PRR 的 mRNA 的变化

1. 正常对照组; 2. 35mol/L 甘露醇对照组; 3. 10mmol/L 组;
4. 20mmol/L 组; 5. 35mmol/L 组。与正常对照组比较, ^a*P* < 0. 05

3. 足细胞的凋亡率: 氯沙坦及 HRP + 氯沙坦预处理细胞凋亡率较 35mmol/L 高糖刺激细胞显著降低 (*P* < 0. 05), HRP + 氯沙坦预处理细胞凋亡率较氯沙坦预处理细胞降低 (*P* < 0. 05) (图 5、表 1)。

讨 论

既往人们对 RAS 的研究主要集中在调节水盐平衡的循环 RAS 上, 近年研究发现, 局部组织细胞内亦存在 RAS。局部 RAS 各成分, 如 PRR、血管紧张素 II 等的浓度都远较循环高^[5]。研究发现, 高糖刺激足细胞后局部 RAS 系统的活化可导致糖尿病肾病足细胞损伤及丢失^[6]。

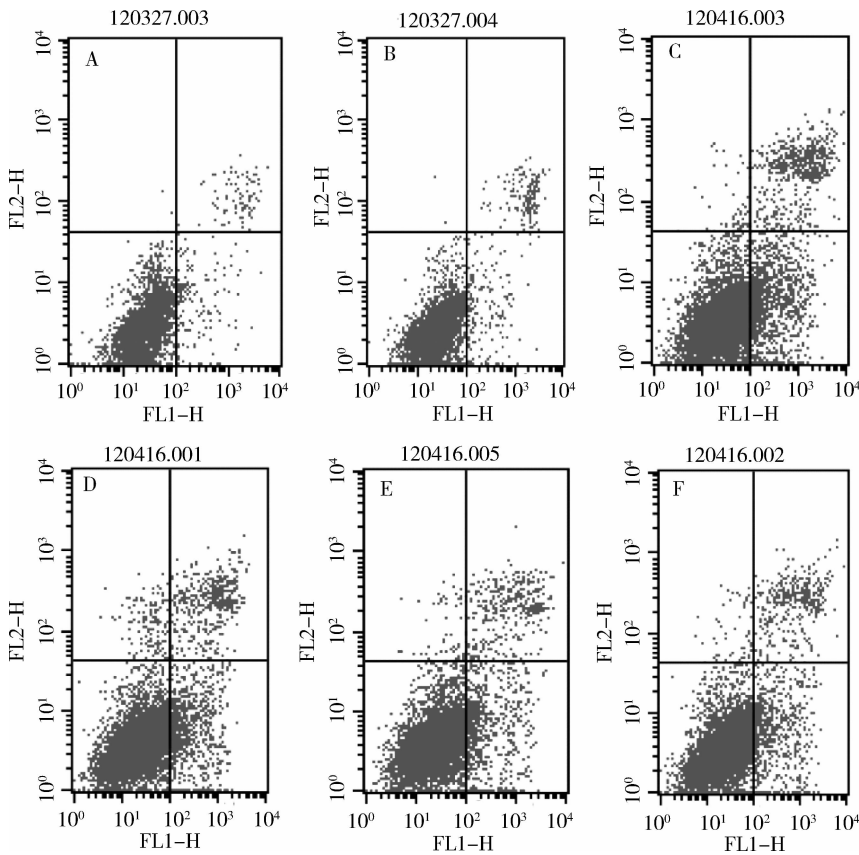


图 5 各组足细胞凋亡率散点图

A. 35mol/L 甘露醇对照组; B. 正常对照组; C. 35mmol/L 高糖组; D. HRP 组; E. 氯沙坦组; F. 氯沙坦 + HRP 组

PRR 是由 ATP6AP2 (ATPase 6 accessory protein2)/PRR 基因编码的一种 350 个氨基酸组成的跨膜蛋白, 在心脏、大脑、胰脏、肝脏以及肾脏等重要脏器均有表达^[7,8]。既往研究表明, PRR 在糖尿病患者及大鼠的肾脏中表达上调^[9]。Takahashi 等^[10]运用免疫组织化学技术, 证实在糖尿病引起终末期肾脏病患者的肾脏中, PRR 表达上调, 但主要在肾小管细胞

中。Cheng 等^[11]研究发现高糖刺激过表达环氧化酶 2 的足细胞可上调(原)肾素受体表达。本实验采用 Western blot 及 real-time PCR 技术证明足细胞中存在 PRR 表达, 高糖作用下, 足细胞中 PRR 表达显著上调, 与既往研究不同的是, 本实验发现足细胞 PRR 表达上调呈时间浓度依赖性, 蛋白表达在 3h 达高峰, mRNA 表达时间上虽无明显峰值, 但仍呈上升趋势。

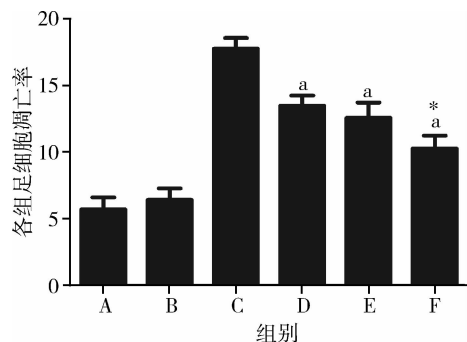


图6 各组足细胞凋亡率

A. 35mol/L 甘露醇对照组; B. 正常对照组; C. 35mmol/L 高糖组; D. HRP 组; E. 氯沙坦组; F. 氯沙坦 + HRP 组。与 35mmol/L 高糖组相比, ^a $P < 0.05$; 与氯沙坦组相比, ^{*} $P < 0.05$

研究表明, PRR 的表达上调可能与 Ang II 1 型受体亚型、还原型辅酶 II (NADPH) 的氧化活性增高及高糖激活 MAPK 途径相关, 上调的具体机制尚待进一步研究^[12]。

PRR 多肽阻断剂柄区肽 (handle region peptide, HRP) 是 1 个包含肾素原柄区氨基酸序列的 10 肽, 其能阻断肾素 (原) 与 PRR 相结合, Takahashi 等研究发现, 长期使用 HRP 治疗糖尿病大鼠, 能减少大鼠的蛋白尿并完全阻断肾小球硬化^[13,14]。且同时使用 Ang II 1 型受体亚型阻断剂和 HPR 治疗糖尿病大鼠, 与单用其中一种药物治疗相比, 疗效更为显著^[15]。本实验模拟体外高糖环境, 发现 HRP 能显著降低足细胞的凋亡率, 联合使用 HPR 及氯沙坦比单用氯沙坦能更显著降低足细胞凋亡率, 我们认为, 高糖刺激足细胞上调 PRR 表达, PRR 与肾素 (原) 结合后, PRR 胞内段的酪氨酸、丝氨酸残基磷酸化, 从而引发 MAPK (mitogenactivated protein kinases) 途径包括细胞外信号调节激酶 1 和 2 (extracellular signal regulated kinases 1 and 2, ERK1/2)、P38、JNK 和热休克蛋白 27 的磷酸化和活化, 通过激活细胞内 Ang II 依赖性 & 非 Ang II 依赖性两种信号途径导致足细胞凋亡, 具体机制尚待进一步研究。

综上所述, 小鼠足细胞中存在 PRR 的表达, 高糖刺激后足细胞内 PRR 异常增高, 其可能在糖尿病肾病时高糖致足细胞损伤、丢失的病理过程中发挥重要作用, 为临床糖尿病肾病足细胞病变的防治提供新的思路和借鉴。

参考文献

- Shah IM, Mackay SP, Mckay GA. Therapeutic strategies in the treatment of diabetic nephropathy – a translational medicine approach[J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(8): 997 – 1016
- Sarafidis PA, Bakris GL. Renin – angiotensin blockade and kidney disease[J]. *Lancet*, 2008, 372(9638): 511 – 512
- Nguyen G, Delarue F, Burckle C, *et al.* Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(11): 1417 – 1427
- Ichihara A. The cutting – edge of medicine; (Pro) renin receptor and renal disease[J]. *Nihon Naika Gakkai Zasshi*, 2012, 101(8): 2310 – 2315
- Nguyen G, Muller DN. The biology of the (pro) renin receptor[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(1): 18 – 23
- Durvasula RV, Shankland SJ. Activation of a local renin angiotensin system in podocytes by glucose[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 294(4): F830 – F839
- Nabi AH, Biswas KB, Arai Y, *et al.* (Pro) renin receptor and prorenin: their plausible sites of interaction[J]. *Front Biosci*, 2012, 17: 389 – 395
- Nguyen G, Contrepas A. Physiology and pharmacology of the (pro) renin receptor[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2008, 8(2): 127 – 132
- Pereira LG, Arnoni CP, Maquigussa E, *et al.* (Pro) renin receptor: another member of the system controlled by angiotensin II? [J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2012, 13(1): 1 – 10
- Takahashi K, Yamamoto H, Hirose T, *et al.* Expression of (pro) renin receptor in human kidneys with end – stage kidney disease due to diabetic nephropathy[J]. *Peptides*, 2010, 31(7): 1405 – 1408
- Cheng H, Fan X, Moeckel GW, *et al.* Podocyte COX – 2 exacerbates diabetic nephropathy by increasing podocyte (pro) renin receptor expression[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(7): 1240 – 1251
- Siragy HM, Huang J. Renal (pro) renin receptor upregulation in diabetic rats through enhanced angiotensin AT1 receptor and NADPH oxidase activity[J]. *Exp Physiol*, 2008, 93(5): 709 – 714
- Ichihara A, Hayashi M, Kaneshiro Y, *et al.* Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for nonproteolytic activation of prorenin[J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(8): 1128 – 1135
- Takahashi H, Ichihara A, Kaneshiro Y, *et al.* Regression of nephropathy developed in diabetes by (Pro) renin receptor blockade[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(7): 2054 – 2061
- Seki Y, Ichihara A, Mizuguchi Y, *et al.* Add – on blockade of (pro) renin receptor in imidapril – treated diabetic SHRsp[J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2010, 2: 972 – 979

(收稿日期: 2012 – 11 – 07)

(修回日期: 2012 – 11 – 14)