

- 2009,15(16):2005-2008
- 3 Cehling M, Arndt C, Eberhart LH, *et al.* Postoperative analgesia with parecoxib acetaminophen randomized double-blind placebo-controlled trial in patients undergoing thyroid surgery [J]. *Br J Anaesth*, 2010, (104)6:761-767
 - 4 Meiniche S, Kehlet H, Dahl JB. A qualitative and quantitative systematic review of preemptive analgesia for postoperative pain relief: the role of timing of analgesia [J]. *Anesthesiology*, 2002, 104(6):725-741
 - 5 Pogatzki-Zahn EM, Zahn PK. From preemptive to preventive analgesia [J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2006, 19(5):551-555
 - 6 Chen LC, Elliott RA. Systemic review of the analgesic efficacy and tol-

- erability of COX-2 inhibitors in post-operative pain control [J]. *Clin Pharm Ther*, 2004, 29(3):215-229
- 7 Power I, Barratt S. Analgesic agents for the postoperative period Non-opioids [J]. *Surg Clin North Am*, 1999, 79(2):275-295
 - 8 Grape S, Tramer MR. Do we need preemptive analgesia for the treatment of postoperative pain? [J]. *Best Pract Res Clin Anaesthesiology*, 2007, 21(1):51-63
 - 9 Riest G, Peters J, Weiss M, *et al.* Preventive effects of perioperative parecoxib on post-discectomy pain [J]. *Br J Anaesth*, 2008, 100(2):256-262
- (收稿日期:2013-08-28)
(修回日期:2013-09-02)

地塞米松改善脂多糖诱导的足细胞上皮间质转分化

邹敏书 余 健 聂国明 罗莉漫 徐洪涛 毛娇娇

摘 要 **目的** 观察地塞米松(DEX)对足细胞 nephrin、Akt 磷酸化及成纤维细胞特异性蛋白-1(fibroblast-specific protein 1, FSP1)、结蛋白(desmin)表达的影响,探讨 DEX 在足细胞上皮间质转分化的可能作用。**方法** 体外培养小鼠永生化足细胞,分别给予 LPS 或 DEX 干预,Annexin V-FITC/PI 标记流式细胞测定足细胞的凋亡百分率,噻唑蓝(MTT)法测定足细胞活力,Western blot 分别检测足细胞 nephrin、Akt 磷酸化水平, FSP1 和 desmin 蛋白的表达。**结果** LPS 诱导足细胞凋亡,降低足细胞活力,减少 nephrin、Akt 的磷酸化,上调 FSP1、desmin 的表达;而 DEX 明显减少足细胞的凋亡,增加足细胞的活力,上调 nephrin、Akt 的磷酸化水平,降低 FSP1、desmin 的表达。**结论** 地塞米松拮抗 LPS 引起的足细胞凋亡和失活,增加 nephrin、Akt 磷酸化水平,抑制足细胞上皮间质转分化而对足细胞有保护作用。

关键词 地塞米松 脂多糖 足细胞 上皮间质转分化

Dexamethasone Ameliorates Epithelial-mesenchymal Transdifferentiation of Podocytes Induced by Lipopolysaccharide. Zou Minshu, Yu Jian, Nie Guoming, Luo Liman, Xu Hongtao, Mao Jiaojiao. Department of Pediatrics, Wuhan General Hospital of GuangZhou Command of PLA, Hubei 430070, China

Abstract Objective To investigate the effect of dexamethasone (DEX) on the phosphorylation of nephrin and Akt, the expression of fibroblast-specific protein 1 (FSP-1) and desmin, and the possible role of DEX on podocyte epithelial-to-mesenchymal transdifferentiation (EMT). **Methods** Immortalized mouse podocytes were treated with lipopolysaccharide (LPS) or DEX. The percentage of podocyte apoptosis was detected by flow cytometry with annexin V-FITC/PI double staining. Podocyte viability was measured by using an MTT assay. The phosphorylation of nephrin and Akt and the expression of FSP-1 and desmin proteins were detected by western blotting. **Results** LPS administration induced podocyte apoptosis, reduced podocyte viability, downregulated the expression of the phosphorylation of nephrin and Akt, upregulated the expression of FSP1 and desmin. DEX significantly reduced podocyte apoptosis, increased podocyte viability, enhanced phosphorylation of nephrin and Akt, decreased the expression of FSP1 and desmin. **Conclusion** DEX reverses LPS-induced podocyte apoptosis and inactivation, and prevents the decline in phosphorylated nephrin and Akt in podocytes exposed to LPS, and inhibits podocyte EMT and has a protective effect on podocytes.

Key words Dexamethasone; Lipopolysaccharide; Podocyte; Epithelial-mesenchymal transdifferentiation

足细胞又称肾小球上皮细胞,具有上皮细胞的特征。上皮间质转分化(epithelial-mesenchymal transdifferentiation, EMT)是指成熟的上皮细胞在特定的生理和病理情况下失去上皮细胞表型和获得间充质

细胞表型如成纤维细胞特异性蛋白-1(FSP-1)等^[1]。EMT 是足细胞损伤的早期事件,可导致足细胞及肾小球滤过屏障功能障碍,产生蛋白尿^[2]。Nephrin 是足细胞防止白蛋白滤出的最关键结构,也是足细胞之间的最重要黏附分子蛋白,而且是足细胞重要的信号分子,其胞内段酪氨酸位点磷酸化水平改

变可介导足细胞内信号转导,与足细胞骨架蛋白重排及存活状态密切相关^[3]。因此,nephrin 磷酸化在维持 SD 的完整性上起重要作用。

糖皮质激素是治疗原发性肾小球性蛋白尿的首选药物,有抗炎、抗过敏、抗休克及免疫调节作用。脂多糖是革兰阴性细菌细胞壁中的一种成分,可产生炎症反应及内毒素休克,是临床上引起感染性休克最常见的原因,可诱导足细胞损伤^[4]。有研究显示,足细胞是糖皮质激素主要肾保护作用的靶点之一^[5]。本文探讨地塞米松(dexamethasone, DEX)对足细胞 nephrin 及其信号通路磷酸化的影响,说明其对足细胞 EMT 的可能作用。

材料与方法

1. 足细胞体外培养:小鼠永生性足细胞株(MPC5)由美国 Peter Mundel 教授惠赠,液氮冻存备用。永生化小鼠足细胞株常规复苏后,在含 10% 胎牛血清、10U/ml 干扰素 1640 培养基,33℃、5% CO₂ 培养箱中培养 2 周。在 10% 胎牛血清而无干扰素的 1640 培养基培养,置于 33℃、5% CO₂ 培养箱中分化 2 周。分化成熟态足细胞分组处理如下:①正常对照组,不加干预因素;②LPS 组,50mg/L 脂多糖与足细胞共同孵育 24h^[6];③LPS + DEX 组,在 DEX 与足细胞孵育 1h 后,加浓度为 50mg/L 的 LPS, LPS + DEX 与足细胞共同孵育 24h。终止反应,收集细胞,分析蛋白质的表达及磷酸化水平。LPS 及 DEX 均购自美国 Sigma 公司。

2. 流式细胞仪测定足细胞凋亡百分率:采用(Annexin V - FITC/PI)双染色标记流式细胞仪检测足细胞的凋亡,简要步骤如下:轻轻加胰蛋白酶处理足细胞,2000r/min,离心 5min,用 PBS 洗涤细胞两次;400μl 缓冲液悬浮细胞,浓度大约为 1 × 10⁵/ml;在细胞悬浮液中加入 5μl Annexin V - FITC,轻轻混匀,2 ~ 8℃避光条件下孵育 15min。加入 10μl 碘化丙啶(PI)后轻轻混匀,2 ~ 8℃避光条件下孵育 5min;后细胞在缓冲液中悬浮培养,与 Annexin V - FITC 和 PI 染色液一起避光保存,冰上孵育染色 5min,同济医学院 BD Biosciences FAC-SCalibur LSR II 流式细胞仪分析测定,Annexin V FITC 阳性和 PI 阴性细胞为凋亡足细胞。对数据进行 Cell Quest Pro 软件分析。Annexin V - FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自美国罗氏公司。

3. MTT 测定足细胞活力:收集对数生长期细胞,接种于 96 孔板中,每孔接种约 1 × 10⁴ 个细胞,在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养,体积 200μl,将细胞放入 CO₂ 孵育箱,37℃、50ml/L CO₂ 及 100% 饱和湿度条件下培养 24h。每孔加入 MTT 液 20μl,孵育后吸弃上清液,每孔分别加入二甲基亚砜 100μl,振荡裂解 15min 后,用 560nm 波长、空白调零,酶标仪测各孔吸光度值。MTT 试剂盒购自上海中天生物。

4. Western blot 检测 nephrin、Akt 磷酸化水平及 FSP - 1、desmin 蛋白的表达:用含蛋白酶及磷酸酶抑制剂的裂解液裂

解足细胞,12000 × g 离心 20min,取上清,BCA 法测定蛋白浓度。根据分子质量大小配制 SDS 聚丙烯酰胺凝胶浓度,配制浓缩胶、电泳缓冲液、转膜缓冲液、SDS 上样缓冲液、染膜液、封闭液及洗涤液。将蛋白样品与 SDS 上样缓冲液按 4:1 体积比混匀,放入 100℃ 热水中变性 15min。取 50μg 蛋白上样,5% ~ 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至硝酸纤维素膜,5% 脱脂奶粉封闭液封闭 1h,分别加适当比例稀释的兔抗 pY1228 nephrin、nephrin、P - Akt、Akt、FSP - 1、desmin 一抗,4℃孵育过夜,FITC 标记的 IgG 37℃孵育 1h,加化学发光试剂液显影、暗室中胶片曝光、显影、定影,用凝胶成像及分析系统对特异性条带进行灰度扫描,目的条带数值与对应的内参 β - actin 数值比表示蛋白的相对表达量。兔抗 pY1228 nephrin、nephrin、P - Akt、Akt、FSP - 1、desmin 一抗购自 Sigma 公司。

5. 统计学方法:所有数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 17.0 统计软件完成,多组比较用 one - way ANOVA LSD 方差分析,两组比较用 LSD - t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 足细胞凋亡百分率测定:在体外培养的足细胞中,LPS 诱导足细胞百分率(21.6% ± 4.5%)较对照组(2.5% ± 1.0%)明显增加($P < 0.01$),而 DEX 干预可明显改善 LPS 引起的足细胞凋亡 11.7% ± 3.7% vs 21.6% ± 4.5% ($P < 0.01$,图 1)。

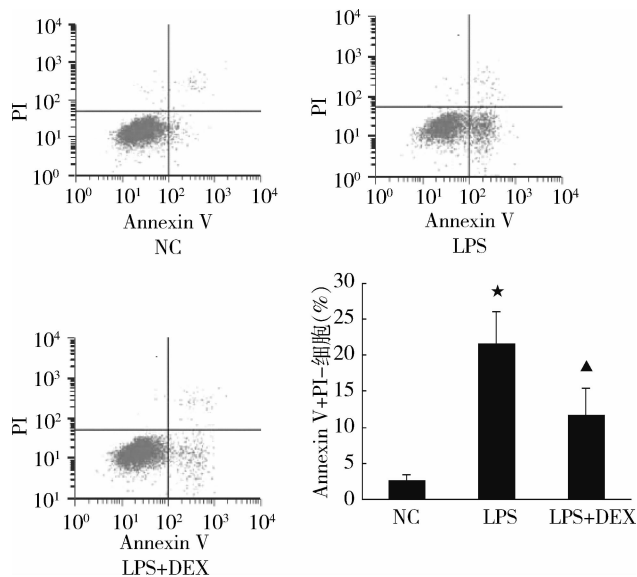


图 1 3 组足细胞凋亡百分率比较

与 NC 组相比较,* $P < 0.01$;与 LPS 组相比较,▲ $P < 0.01$;流式分析散点图第 4 象限示 Annexin V + PI - 细胞即凋亡的足细胞, $n = 6$

2. 足细胞活力测定:LPS 诱导足细胞活力在 560nm 吸光度值为 0.32 ± 0.04,较对照组 0.48 ± 0.06 明显减少($P < 0.01$),而 DEX 干预可明显拮抗 LPS 引起的足细胞活力降低(0.43 ± 0.07 vs 0.32 ±

0.04, $P < 0.01$, 图 2)。

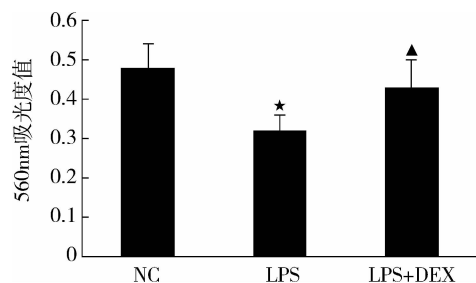


图 2 3 组足细胞活力比较(在 560nm 吸光度值)

与 NC 组相比较, * $P < 0.01$; 与 LPS 组相比较, ^ $P < 0.01$, $n = 6$

3.3 组 P - nephrin/nephrin、P - Akt/Akt 水平比较:与 NC 组相比,LPS 处理分别使足细胞 P - nephrin/nephrin、P - Akt/Akt 水平明显降低($P < 0.01$),而 LPS + DEX 组两者水平与对 NC 组相比无统计学意义(P 均 > 0.05)。与 LPS 相比较,DEX 处理组 P - nephrin/nephrin、P - Akt/Akt 明显升高,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)(图 3、图 4)。

4. DEX 对上皮间质转化蛋白表达的影响:本文实验结果显示,足细胞间质标志蛋白 FSP - 1、desmin 表达相类似。在 NC 组两者均有少量表达,LPS 诱导两者表达明显增加,均较 NC 组升高,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),DEX 处理足细胞致两者表达较 LPS 组减少,差异有统计学意义(P 均 < 0.05 ,图 5)。

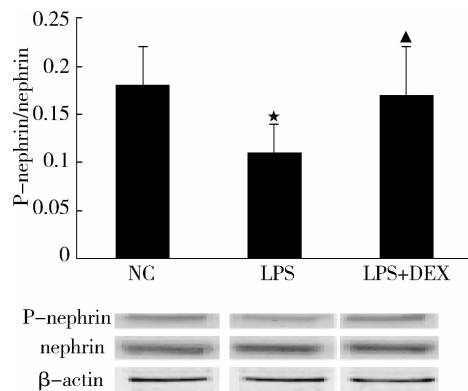


图 3 3 组足细胞 P - nephrin/nephrin 的比较

与 NC 组相比较, * $P < 0.01$; 与 LPS 组相比较, ^ $P < 0.05$, $n = 6$

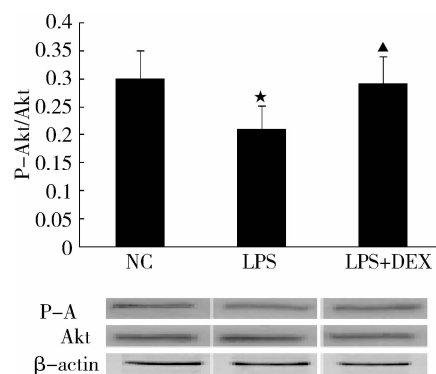


图 4 3 组足细胞 P - Akt/Akt 的比较

与 NC 组相比较, * $P < 0.01$; 与 LPS 组相比较, ^ $P < 0.05$, $n = 6$

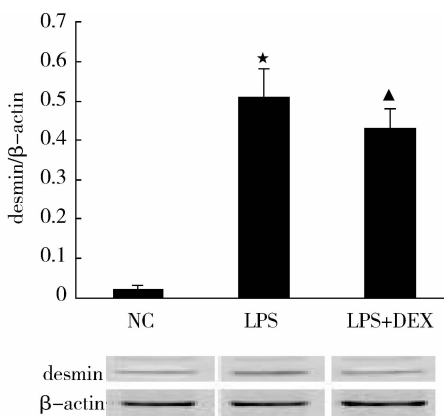
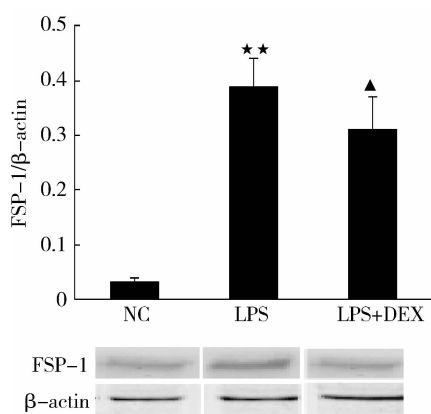


图 5 3 组足细胞上皮间质转化蛋白 FSP - 1、desmin 表达比较

与 NC 组相比较, * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$; 与 LPS 组相比较, ^ $P < 0.05$, $n = 6$

讨 论

蛋白尿是肾损伤的标志,降低蛋白尿是肾保护治疗的主要靶点。足细胞位于滤过屏障的最外层,在防止蛋白滤出上起关键作用。糖皮质激素是治疗肾小球性蛋白尿的一线药物,足细胞表达糖皮质激素受体,DEX 对足细胞有直接保护作用,可防止嘌呤霉素

诱导的足细胞凋亡,这种作用不依赖于其免疫抑制效应^[7]。足细胞凋亡是肾小球足细胞密度降低及数目减少的原因之一。近来研究发现足细胞凋亡还与细胞骨架的紊乱相关。本研究结果显示,LPS 内毒素可诱导足细胞凋亡,降低其活力,而 DEX 则抑制 LPS 诱导足细胞凋亡,增加其活力,提示 DEX 可能对细菌感

染引起的足细胞损伤、凋亡有拮抗作用。与 Yu 等^[8,9]报道的 DEX 可通过降低 Bad mRNA 和蛋白质的表达,并稳定 PI₃K/Akt 信号通路从而抑制足细胞的凋亡相一致。

人类对足细胞的认识是一逐渐深入的过程,由足细胞、裂孔隔膜(SD)、nephrin, PI₃K/Akt 是 nephrin 下游通路,nephrin 能通过 PI₃K/Akt 途径部分稳定足细胞细胞骨架改变,减轻蛋白尿^[10]。既往研究显示,DEX 减轻全身炎症反应,恢复肾小球 nephrin mRNA 和蛋白质的表达,减轻蛋白尿^[11]。有研究显示,DEX 通过阻断 TRPC6 信号通路可维持 SD 结构和功能的完整性,在抗蛋白尿机制上发挥重要作用^[12]。近年来,人们不仅关注 nephrin 的表达,而且认识到其磷酸化水平在维持足细胞功能中的重要作用^[13,14]。有研究显示,在正常情况下,nephrin 在 Y1204 和 Y1228 位点发生磷酸化改变,维持足细胞正常生理功能;在嘌呤霉素肾病和人类微小病变肾病时这种磷酸化减少^[15]。本研究结果显示,LPS 诱导磷酸化的 nephrin、Akt 分别占总的 nephrin、Akt 比率降低,而 DEX 可拮抗两者的磷酸化比率下降,提示 DEX 对足细胞保护作用的更精确机制可能是增加磷酸化的 nephrin、Akt 所占的比率而不是单纯增加 nephrin、Akt 的表达,更进一步说明 nephrin 磷酸化的重要性。

足细胞 EMT 是足细胞失去上皮的标志蛋白如 nephrin、P - cadherin,而间充质标志物如 FSP1 及 desmin 表达增加的过程^[16]。在这一过程中,足细胞形态发生变化,导致细胞间接触消失,细胞极性改变,在蛋白尿的发生中发挥作用。FSP1 在组织纤维母细胞及 EMT 细胞中表达。FSP1 阳性的细胞选择性表达 Snail1 及 ILK,两者均是诱导 EMT 的重要信号分子。结蛋白(desmin)是一种细胞骨架中间丝蛋白,属于肌源性细胞标志,正常情况下仅在系膜细胞少量表达,足细胞不表达,当足细胞受损发生表型改变时,可大量表达,因此也可作为反映足细胞损伤的标志。FSP1、desmin 均是间充质标记蛋白,EMT 可导致足细胞功能障碍,导致蛋白尿。本研究结果显示,LPS 减少足细胞标志蛋白 nephrin 的磷酸化水平,增加间充质标志物 FSP1 及 desmin 的表达,DEX 则可抑制这种效应,提示 DEX 可抑制足细胞的 EMT 效应。有研究报道,DEX 以剂量依赖性方式阻断 HK - 2 细胞的上皮间质表型,阻止单核细胞浸润,增加 E - cadherin 的表达,减少 desmin 和纤维连接蛋白的表达。与本文结论有一定的相似之处。

总之,DEX 对维持 nephrin 磷酸化水平起调节作用,并减少足细胞凋亡,促进其活力,减轻足细胞 EMT 的发生,从而对足细胞有保护作用。

参考文献

- 章俊,郭婷婷,杨蕾,等.牛蒡子苷对晚期氧化蛋白产物诱导小鼠足细胞转分化的影响[J].南方医科大学学报,2012,32(3):378 - 382
- Lee HS. Mechanisms and consequences of TGF - α overexpression by podocytes in progressive podocyte disease [J]. Cell Tissue Res, 2012, 347(1):129 - 140
- 任志龙,梁伟,丁国华,等.血管紧张素 II 对足细胞 nephrin 磷酸化水平的影响[J].中华肾脏病杂志,2012,28(8):622 - 627
- Leeuwis JW, Nguyen TQ, Dendooven A, *et al.* Targeting podocyte - associated diseases[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2010, 62(14):1325 - 1336
- Agrawal S, Guess AJ, Benndorf R, *et al.* Comparison of direct action of thiazolidinediones and glucocorticoids on renal podocytes: protection from injury and molecular effects[J]. Mol Pharmacol, 2011, 80(3):389 - 399
- Ma J, Zhang B, Liu S, *et al.* 1,25 - Dihydroxyvitamin D(3) inhibits podocyte uPAR expression and reduces proteinuria[J]. PLoS One, 2013, 8(5):e64912
- Wada T, Pippin JW, Marshall CB, *et al.* Dexamethasone prevents podocyte apoptosis induced by puromycin aminonucleoside: role of p53 and Bcl - 2 - related family proteins[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(9):2615 - 2625
- Yu SY, Qi R. Role of bad in podocyte apoptosis induced by puromycin aminonucleoside[J]. Transplant Proc, 2013, 45(2):569 - 573
- Yu S, Li Y. Dexamethasone Inhibits Podocyte Apoptosis by Stabilizing the PI₃K/Akt Signal Pathway[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013:326986
- Greka A, Mundel P. Cell biology and pathology of podocytes[J]. Annu Rev Physiol, 2012, 74:299 - 323
- 邹敏书,周建华,余健,等.地塞米松对脓毒症新生大鼠 nephrin 的影响[J].临床儿科杂志,2012,30(4):367 - 371
- Yu S, Yu L. Dexamethasone resisted podocyte injury via stabilizing TRPC6 expression and distribution[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 2012:652059
- New LA, Keyvani CA, Jones N. Direct regulation of nephrin tyrosine phosphorylation by Nck adaptor proteins[J]. J Biol Chem, 2013, 288(3):1500 - 1510
- Mathieson PW. The podocyte as a target for therapies - new and old [J]. Nat Rev Nephrol, 2011, 8(1):52 - 56
- Ohashi T, Uchida K, Uchida S, *et al.* Dexamethasone increases the phosphorylation of nephrin in cultured podocytes[J]. Clin Exp Nephrol, 2011, 15(5):688 - 693
- Wang C, Liu X, Ke Z, *et al.* Mesangial medium from IgA nephropathy patients induces podocyte epithelial - to - mesenchymal transition through activation of the phosphatidylinositol - 3 - kinase/Akt signaling pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2012, 29(5 - 6):743 - 752

(收稿日期:2013 - 06 - 12)

(修回日期:2013 - 06 - 25)