文章编号:1000-5404(2013)20-2199-04

论著

晚期糖基化终产物对足细胞 synaptopodin 和迁移性的影响

成彩联,郑振达,汤 颖,叶增纯,李灿明,娄探奇 (510630 广州,中山大学附属第三医院肾内科)

[摘要] **目的** 观察晚期糖基化终产物(advanced glycation end-products, AGEs)对足细胞 synaptopodin 的影响和在足细胞迁移性中的作用,探讨其作用机制。**方法** 不同浓度 AGEs(0、20、40、80 μg/mL)干预足细胞 24 h,免疫印迹检测足细胞 synaptopodin 的表达,激光共聚焦显微镜观察足细胞肌动蛋白 F-actin 和 synaptopodin 的分布,Transwell 细胞迁移实验检测足细胞的迁移性,氯沙坦(100 μmol/L)预处理足细胞后,观察 synaptopodin 和 F-actin 的改变。**结果** AGEs 80 μg/mL 可降低足细胞 synaptopodin 的表达[(50±11)% *vs* 100%, $P<0.05$],并使肌动蛋白骨架 F-actin 发生重构,足细胞的迁移性增高[(47±6) *vs* (13±3), $P<0.05$],氯沙坦可减轻 AGEs 介导的 synaptopodin 的下调[(80±12)% *vs* (50±11)%, $P<0.05$]和 F-actin 的重构,降低足细胞的迁移性[(25±4) *vs* (47±6), $P<0.05$]。**结论** AGEs 可能通过激活足细胞内的肾素-血管紧张素系统的机制,下调 synaptopodin 表达,介导骨架蛋白的重构,增加迁移性。

[关键词] 晚期糖基化终产物;足细胞;synaptopodin;迁移性
[中图法分类号] R322.61;R329.28;R587.102 [文献标志码] A

Effects of advanced glycation end-products on expression of synaptopodin and podocyte migration

Cheng Cailian, Zheng Zhenda, Tang Ying, Ye Zengchun, Li canming, Lou Tanqi (Department of Nephrology, Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangdong Province, Guangzhou, 510630, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of advanced glycation end-products (AGEs) on the expression of synaptopodin and podocyte migration, and to explore their mechanisms. **Methods** Podocytes were incubated with different concentrations of AGEs (0, 20, 40 and 80 μg/mL) for 24 h, the expression levels of synaptopodin were measured by Western blotting, and cytoskeleton reorganization were observed by laser scanning confocal microscopy. Podocyte migration were assayed by Transwell assay. Then podocytes were pretreated with losartan for 60 min, and the changes of synaptopodin and cytoskeleton were observed. **Results** Incubation with AGEs resulted in a significant decrease in the expression of synaptopodin [(50±11)% *vs* 100%, $P<0.05$], AGEs also induced F-actin reorganization and increased podocyte migration (47±6 *vs* 13±3, $P<0.05$). However, pretreatment with losartan (100 μmol/L) alleviated the effects induced by AGEs in podocytes. **Conclusions** AGEs downregulate the expression of synaptopodin, induce cytoskeleton reorganization, and increase podocyte migration *via* activation the local renin-angiotensin system in podocytes.

[**Key words**] advanced glycation end-products; podocyte; synaptopodin; migration

Supported by the "Twelfth Five-year plan" of National Key Technology R&D Program (2011BA110B05), the National Natural Science Foundation of China (81070581) and the Foundation of Departmont of Science and Technology of Guangdong Province (2010B031600202, 2011B080701005). Corresponding author: Lou Tanqi, E-mail: lou.tq@163.com

晚期糖基化终产物(advanced glycation end-products, AGEs)是体内的蛋白质、脂肪等发生非酶糖基化的产物,在糖尿病患者体内明显升高,并且随着血糖的升高和肾功能的下降,AGEs 的升高更加明显,参与糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)的发生、发

[基金项目] "十二五"国家科技支撑计划(2011BA110B05);国家自然科学基金(81070581);广东省科技厅基金(2011B080701005,2010B031600202)
[通信作者] 娄探奇,E-mail: Lou.tq@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130619.1600.027.html(2013-06-19)

展[1-2]。足细胞和足突间的裂孔隔膜是构成肾小球滤过膜的最后一道屏障,足突细胞骨架改变,导致裂孔隔膜结构消失,滤过膜的完整性破坏,出现蛋白尿[3]。而蛋白尿是DN最早和最常见的临床表现,不但可加速肾脏疾病的进展,而且是心脑血管疾病的独立危险因素。本研究旨在观察AGEs对足细胞骨架蛋白synaptopodin的影响并进一步探讨其在足细胞迁移性中的作用及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠原代培养足细胞株MPC5由中山大学余学清教授惠赠。AGEs(德国Merck),细胞培养级牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA,美国MP Biomedicals),兔抗GAPDH多克隆抗体(美国Proteintech Group),兔抗synaptopodin多克隆抗体(美国Santa Cruz),小鼠γ-干扰素、氯沙坦和结晶紫(美国Sigma-aldrich),罗丹明鬼笔环肽(美国Invitrogen),DyLight 488山羊抗小鼠IgG(美国Jackson ImmunoResearch),Transwell培养板(8 μm,美国Corning),激光共聚焦显微镜LSM510(德国META ZEISS)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 足细胞在33 ℃培养箱含10%胎牛血清10 U/mL γ-干扰素的RPMI1640培养基中分裂增殖,然后转至10%胎牛血清不含γ-干扰素的RPMI1640培养液在37 ℃分化10~14 d,取分化成熟的足细胞进行实验。实验分为不同浓度AGEs组(0、20、40、80 μg/mL)、BSA组,检测synaptopodin的表达和F-actin的分布,然后氯沙坦预处理后观察上述指标的改变,并观察足细胞迁移性。

1.2.2 免疫印迹 蛋白的提取按说明书进行,采用BCA法测定蛋白浓度,8%聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,封闭,兔抗鼠synaptopodin(1∶200),辣根过氧化物酶标记二抗(1∶60 000)室温孵育1 h,TBST洗3次,显影、定影。用BIORAD扫描仪扫描胶片,Quantity one图像分析软件分析目标条带和内参光密度值,目标条带/内参值为该目的蛋白相对含量。

1.2.3 免疫荧光实验步骤 将0.1%明胶溶液包被盖玻片放入6孔板中,加入等量消化好的细胞悬液,待其贴壁生长至70%左右,同步化过夜,加处理因素培养24 h,依次经4%多聚甲醛固定,0.25% Triton X-100打孔,封闭,孵育一抗synaptopodin(1∶100)和罗丹明鬼笔环肽(5 μL/片),孵育DyLight 488山羊抗小鼠IgG(1∶1 000),Hoechst 33342染色液染核,滴少量抗荧光淬灭剂,指甲油封边,激光共聚焦显微镜下观察并照相取图。

1.2.4 Transwell细胞迁移实验 胰酶消化经不同因素处理的足细胞,用含0.1% FBS的RPMI1640培养基重悬,调整细胞数至$(1\sim10)\times10^5$,取细胞悬液200 μL(1×10^5)加入Transwell培养板上室,下室加入500 μL含10% FBS的培养基,放置37 ℃培养箱培养24 h,甲醇固定,结晶紫染色,用棉签小心擦去基质胶和上室内的细胞,倒置显微镜下观察、计数、拍照。每个样本随机选取10个视野,计算每个视野的细胞数。

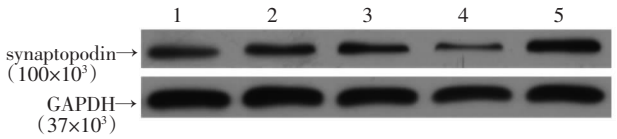
1.3 统计学方法

数据均代表3次以上重复实验结果,以$\bar{x}\pm s$表示。采用SPSS 16.0统计软件,多个样本均数的比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD方法。

2 结果

2.1 不同浓度AGEs对足细胞synaptopodin的影响

不同浓度的AGEs(0、20、40、80 μg/mL)干预小鼠足细胞24 h,免疫印迹检测synaptopodin的蛋白表达,结果显示,与对照组比较,80 μg/mL AGEs能明显下调足细胞synaptopodin的表达($P<0.05$),0、20、40、80 μg/mL AGEs依次为100%、(91±13)%、(80±13)%、(50±11)%,而BSA对synaptopodin的蛋白表达没有明显影响[(98±10)% *vs* 100%, $P>0.05$],见图1。

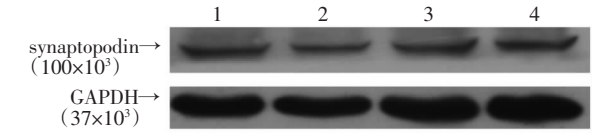


1: 对照组;2: 20 μg/mL;3: 40 μg/mL;4: 80 μg/mL;5: BSA

图1 免疫印迹检测不同浓度AGEs对足细胞synaptopodin的影响

2.2 氯沙坦对AGEs介导synaptopodin的影响

100 μmol/L氯沙坦预孵育小鼠足细胞60 min后,加入80 μg/mL AGEs作用24 h,结果显示,AGEs能明显下调synaptopodin的表达[(50±11)% *vs* 100%, $P<0.05$],氯沙坦预处理能明显减轻AGEs介导的synaptopodin的下调程度[(80±12)% *vs*. (50±11)%, $P<0.05$],见图2。



1:对照组;2: 80 μg/mL AGEs;3: 80 μg/mL AGEs + 100 μmol/L Losartan; 4: BSA

图2 免疫印迹检测不同处理因素对足细胞synaptopodin的影响

2.3 氯沙坦对AGEs介导的足细胞骨架蛋白重构的影响

小鼠足细胞与100 μmol/L氯沙坦预孵育60 min后,加入80 μg/mL AGEs作用24 h,激光共聚焦显微镜结果显示:AGEs引起synaptopodin的荧光强度减弱,F-actin从有序的平行状纤维束重构为杂乱无序的网状物。氯沙坦预处理能减轻AGEs介导的synaptopodin的荧光强度减弱的程度,减少F-actin的重构,见图3。

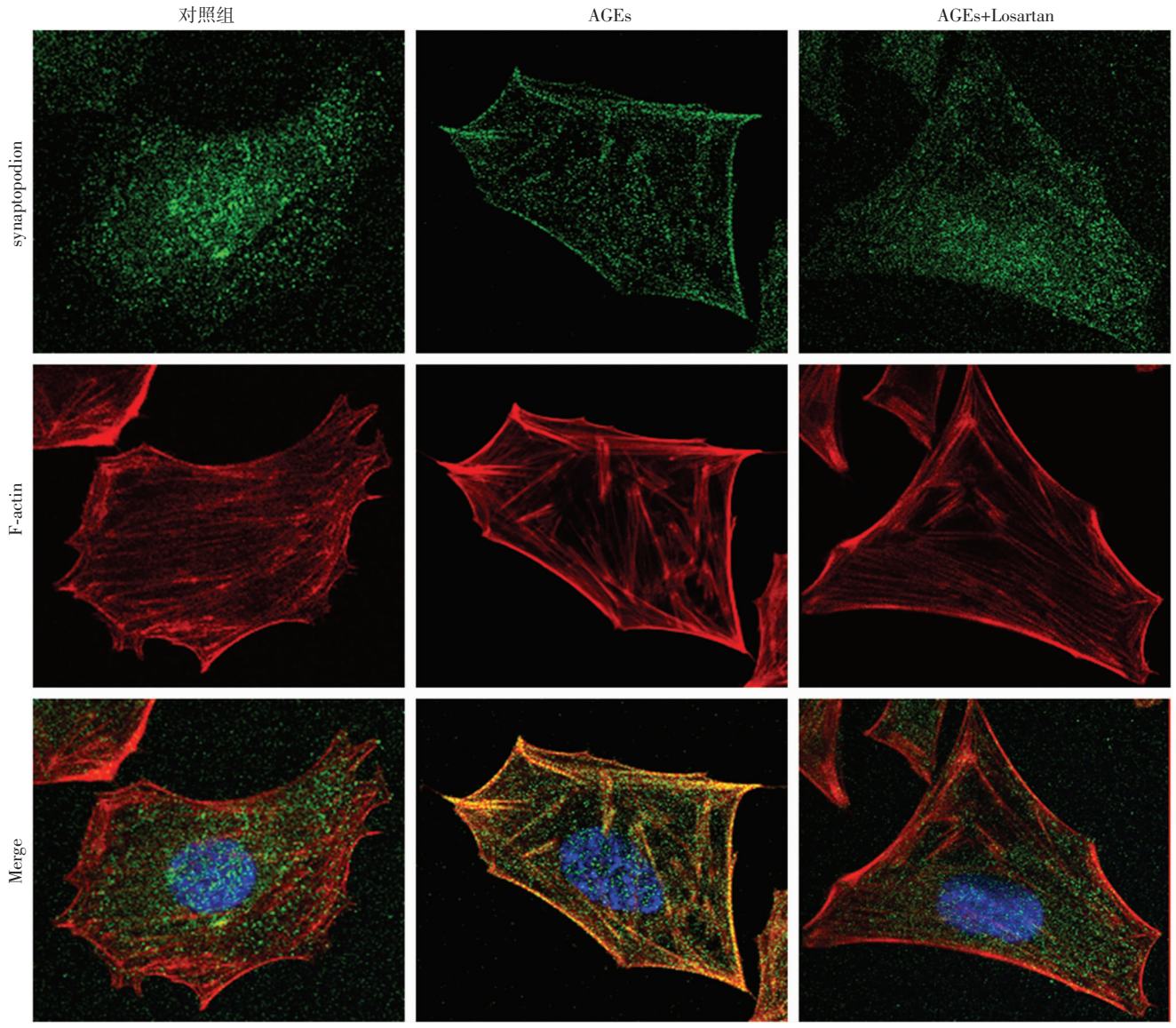


图3 80 μg/mL AGEs对足细胞synaptopodin和F-actin重构的影响 （免疫荧光激光共聚焦显微镜 ×630）

2.4 氯沙坦对AGEs介导足细胞迁移性的影响

与对照组相比，AGEs明显增加迁移至transwell下室的足细胞[(47±6) *vs* (13±3)，$P<0.05$]，100 μmol/L氯沙坦预孵足细胞60 min后，进行80 μg/mL AGEs干预24 h，结果发现，氯沙坦能明显减少迁移至transwell下室的足细胞[(25±4) *vs* (47±6)，$P<0.05$]，而BSA对足细胞的迁移性没有明显影响[(16±5) *vs*. (13±3)，$P>0.05$]。

3 讨论

2型DN早期就出现肾小球足细胞相对密度下降、足突增宽，并可见细胞体脱落、足突融合、微绒毛化等变化[4]。足突的任何一个结构域发生功能障碍，都将引起肌动蛋白从并联的收缩蛋白束变成致密的网状结构，并伴有足突融合和蛋白尿。足细胞骨架主要由F-actin组成，synaptopodin和α-actinin-4将F-actin连接在一起，其改变或重构均可使足细胞发生变形，移动性增加。足细胞骨架的改变不但可导致足突消失、细胞表型改变，而且还可诱导足细胞凋亡。研究发现用松胞菌素破坏肌动蛋白细胞骨架，能阻止鱼精蛋白所致的足突融合[5]，可见肌动蛋白重构在足突的动态变化中起关键作用。

synaptopodin是一种与肌动蛋白微丝偶联的蛋白，在机体内只表达于肾小球的足细胞和后脑的突触内。本研究通过以不同浓度的AGEs(0、20、40、80 μg/mL)干预小鼠足细胞24 h，发现80 μg/mL AGEs能明显下调synaptopodin的表达。激光共聚焦结果显示，足细胞内synaptopodin荧光强度明显减弱，足细胞F-actin肌动蛋白由平行排列的纤维束变为杂乱无序的网状物。synaptopodin通过阻断Smurf-1介导RhoA的泛素

化,促进张力纤维的形成,从而调控足细胞肌动蛋白动力学,阻断足细胞肌动蛋白细胞骨架重构为迁移的表型,抑制足细胞的运动性,从而稳定肾小球滤过膜[6-7]。研究发现随着肾脏纤维化的加重,synaptopodin 的表达逐渐减少[8-9]。synaptopodin 的突变或缺失[10]可以导致足细胞结构的改变,引起蛋白尿和肾小球硬化的发生。当用 RNA 干扰沉默 synaptopodin 后,足细胞损伤后张力纤维的再形成减少,F-actin 减少,足突消失后失去再恢复能力,且 synaptopodin 束与 α-actinin-4 形成肌动蛋白纤维丝,损伤足细胞肌动蛋白细胞骨架的可塑性,而重新转染细胞 synaptopodin 后,这些异常可被逆转[7]。这些研究提示,AGEs 介导的 synaptopodin 的下调不但可导致足细胞骨架蛋白的重构,而且还参与足细胞的损伤及损伤后的修复过程,从而导致蛋白尿和肾小球硬化。

我们前期研究发现 AGEs 可激活足细胞内的肾素-血管紧张素系统(renin angiotensin system, RAS),但关于 AGEs 对足细胞骨架蛋白的影响及 RAS 在其中的作用尚不清楚。我们通过血管紧张素Ⅱ的受体拮抗剂氯沙坦预处理足细胞,观察足细胞内的 RAS 激活是否参与 AGEs 对足细胞骨架蛋白和迁移性的影响。结果发现,AGEs 可明显增加足细胞的迁移性,而氯沙坦预处理可以减轻 AGEs 介导的 synaptopodin 的下调和 F-actin 的重构,并且 AGEs 介导的足细胞迁移性的增高也明显减轻。这些结果提示,足细胞内的 RAS 激活可能参与了 AGEs 介导的足细胞骨架蛋白的重构和迁移性。F-actin 的重构导致细胞从稳定表型转变为迁移表型,细胞的迁移性增加,导致骨架蛋白的高转运,消耗能量,终使足细胞脱落。而且细胞的迁移消耗 synaptopodin,而 synaptopodin 的减少又进一步使张力纤维的形成减少,导致细胞损伤后的修复能力下降,形成恶性循环。研究发现血管紧张素Ⅱ通过氧化应激激活 rac1 和细胞骨架调节蛋白(ezrin radixin moesin, ERM),促使肌动蛋白细胞骨架的重构[11]。肾病综合征的小鼠肾组织 synaptopodin 的表达下降,环孢素通过稳定 synaptopodin 的表达,维持足细胞的表型,减少足突融合,从而减少蛋白尿[12]。这些结果提示足细胞内的 RAS 激活可能参与了骨架蛋白的重构,减轻 AGEs 对足细胞骨架蛋白的影响可能是氯沙坦减少蛋白尿的另一作用机制。足细胞肌动蛋白骨架处于动态变化中,早期足细胞的形态改变,如足突融合、裂孔隔膜断裂是可逆的。持续性损伤将导致足细胞凋亡或从基底膜上脱落,最终进展为肾小球硬化和终末期肾衰竭。因此,研究其细胞骨架重构的调节机制对于足细胞的防护具有重大的意义。

综上所述,AGEs 下调 synaptopodin 的表达并介导骨架蛋白的重构,增加足细胞的迁移性,而氯沙坦预处理可以减轻 AGEs 介导的这些改变,为临床上使用肾素-血管紧张素系统抑制剂治疗糖尿病肾病,从细胞水平保护足细胞提供了理论依据。

参考文献:

[1] 成彩联, 郑振达, 碱钢, 等. 晚期糖基化终产物对足细胞内肾素-血管紧张素系统的影响[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(17): 1779-1782.

[2] Forbes J M, Cooper M E. Mechanisms of diabetic complications[J]. Physiol Rev, 2013, 93(1): 137-188.

[3] Fuchshofer R, Ullmann S, Zeilbeck L F, *et al*. Connective tissue growth factor modulates podocyte actin cytoskeleton and extracellular matrix synthesis and is induced in podocytes upon injury[J]. Histochem Cell Biol, 2011, 136(3): 301-319.

[4] 李琴, 龚伟. 足细胞骨架结构的调节机制与蛋白尿[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2011, 20(2): 149-153.

[5] Verma R, Kovari I, Soofi A, *et al*. Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization[J]. J Clin Invest, 2006, 116(5): 1346-1359.

[6] Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Faul C, *et al*. Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling[J]. Nat Cell Biol, 2006, 8(5): 485-491.

[7] Asanuma K, Kim K, Oh J, *et al*. Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner[J]. J Clin Invest, 2005, 115(5): 1188- 1198.

[8] Lu H, Kapur G, Mattoo T K, *et al*. Hypoxia decreases podocyte expression of slit diaphragm proteins[J]. Int J Nephrol Renovasc Dis, 2012, 5: 101-107.

[9] Kato T, Mizuno S, Nakamura T. Preservations of nephrin and synaptopodin by recombinant hepatocyte growth factor in podocytes for the attenuations of foot process injury and albuminuria in nephritic mice[J]. Nephrology (Carlton), 2011, 16(3): 310-318.

[10] Huber T B, Kwoh C, Wu H, *et al*. Bigenic mouse models of focal segmental glomerulosclerosis involving pairwise interaction of CD2AP, Fyn, and synaptopodin[J]. J Clin Invest, 2006, 116(5): 1337-1345.

[11] Hsu H H, Hoffmann S, Endlich N, *et al*. Mechanisms of angiotensin II signaling on cytoskeleton of podocytes[J]. J Mol Med (Berl), 2008, 86(12): 1379-1394.

[12] Zhang Q, Shi S F, Zhu L, *et al*. Tacrolimus improves the proteinuria remission in patients with refractory IgA nephropathy[J]. Am J Nephrol, 2012, 35(4): 312-320.

(**收稿**:2013-05-02;**修回**:2013--)

(编辑 龙 亮)