基础研究 文章编号：0253-3626（2011）04-0412-04

PFT-α 对高糖诱导的肾小球足细胞泛素化通路和细胞凋亡的影响

沈赵楠，甘 华，杜晓刚，王晓林
（重庆医科大学附属第一医院肾内科，重庆 400016）

【摘 要】目的：观察 p53 抑制剂(Pifithrin-alpha，PFT-α)对高糖刺激后肾小球足细胞泛素化通路和细胞凋亡的影响。方法：体外培养小鼠肾小球足细胞，分为对照组、高糖组（30 mmol/L 葡萄糖）、甘露醇组（30 mmol/L 葡萄糖 +25 mmol/L 甘露醇）、PFT-α 组（30 mmol/L 葡萄糖 +10 μmol/L PFT-α）、0.2% 二甲基亚砜（Dimethyl sulfoxide，DMSO）溶剂对照组（30 mmol/L 葡萄糖 +0.2% DMSO）。用 Western blot 法检测各组足细胞 p53 和 COP1 蛋白的表达，TUNEL 方法检测各组足细胞凋亡情况。结果：高糖刺激 48 h 后足细胞 p53 蛋白表达水平（1.210 8 ± 0.035）较对照组（0.072 9 ± 0.007 13）明显增加，COP1 蛋白表达水平（0.579 6 ± 0.041 9）则较对照组（1.067 ± 0.053 4）下调；PFT-α 在高糖刺激 48 h 后作用足细胞 6 h，p53 蛋白表达水平（0.166 4 ± 0.038 7）较高糖组（1.210 8 ± 0.035）下调，COP1 蛋白表达水平（0.308 1 ± 0.014 5）与高糖组（0.579 6 ± 0.041 9）则差异无统计学意义；高糖刺激足细胞后凋亡率（35.41 ± 3.31）%分别是对照组（2.23 ± 0.17）%和 PFT-α 组（4.27 ± 0.21）%的 15.87 倍和 8.29 倍，甘露醇组（42.44 ± 6.11）%和 0.2% DMSO 组（32.80 ± 5.02）%与高糖组差异无统计学意义。结论：高糖损伤肾小球足细胞时可能抑制小鼠肾小球足细胞泛素蛋白酶体活化，进而增加肾小球足细胞的凋亡，PFT-α 可通过下调 p53 蛋白致小鼠肾小球足细胞凋亡减少。

【关键词】肾小球足细胞；高糖；p53；COP1；泛素化
【中国图书分类法分类号】R692.6；R34 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-11-03

Effect of PFT-α on ubiquitin and apoptosis of podocyte injured by high glucose

SHEN Zhao-nan, et al
(*Department of Nepgopathy, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of pifithrin-α(PFT-α)on the ubiquitin and the apoptosis of podocytes by high glucose. *Methods*: Cultured mouse podocytes were divided into normal group, high glucose group(30 mmol/L D-glucose), mannital group(30 mmol/L D-glucose+25 mmol/L mannital), PFT-α group(30 mmol/L D-glucose+10 μmol/L PFT-α) and 0.2% DMSO group(30 mmol/L glucose+0.2% DMSO). The expressions of p53 and COP1 protein of each group were measured by Western blot. The apoptosis of podocytes was measured by TUNEL. *Results*: The expression of p53 in mouse podocytes by high glucose in 48 hours (1.2108 ± 0.035) was higher than that in the normal group (0.072 9 ± 0.007 13), but the expression of COP1 (0.579 6 ± 0.041 9) was lower than that of normal group (1.067 ± 0.053 4). After PFT-α affected podocytes for 6 hours after high glucose, the expression of p53 in mouse podocytes(0.166 4 ± 0.038 7)was lower than that in the high glucose group(1.210 8 ± 0.035), the expression of COP1(0.308 1 ± 0.014 5)was the same as high glucose group (0.579 6 ± 0.041 9). The apoptosis of podocytes in high glucose group was(35.41 ± 3.31)%, which was 15.87 times higher than that of normal group(2.23 ± 0.17)% and 8.29 times higher than that of PFT-α group(4.27 ± 0.21)% respevtively, mannital group (42.44 ± 6.11)% and 0.2% DMSO group(32.80 ± 5.02)% were the same as high glucose group. *Conclusion*: High glucose injured podocytes may inhibit the activity of ubiquitin proteasome and increase the apoptosis of mouse podocytes. PFT-α can decrease the apoptosis through decreasing the expression of p53.

【Key words】podocyte; high glucose; p53; COP1; ubiquitin

作者介绍：沈赵楠(1983-)，女，硕士，
研究方向：肾小球疾病的诊断与治疗。
通信作者：甘 华，女，教授，Email：shen789@sina.com。
基金项目：高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(编号：20070631008)。

糖尿病肾病（Diabetic nephropathy，DN）是糖尿病常见而特有的微血管并发症，其发病机制尚未完全清楚[1]。研究表明泛素-蛋白酶体通路（Ubiquitin-proteasome pathway，UPP）在细胞凋亡中发挥重要作用[2]。目前的基础研究显示泛素-蛋白酶体途径参与了肾脏纤维化多条信号通路，冯兵等[3]研究发现应用蛋白酶抑制剂可降低慢性肾衰竭大鼠主动脉中核因子-κB 的 mRNA 和蛋白的表达，延缓肾脏纤维化的进程。但是有关糖尿病肾病中对肾小球足细胞 UPP 调节的研究报道甚少。p53 特异性抑制剂 PFT-α，可阻断阿霉素、γ 射线等诱导的 p53 激活，降低正常组织的凋亡[4,5]，但在 DN 中的作用少有报道。为此，本研究通过 PFT-α 对高糖刺激后小鼠肾小球足细胞 COP1 介导的泛素化通路的变化及细胞凋亡情况进行研究，旨在探讨 UPP 在高糖诱导的小鼠肾小球足细胞中是否活化，以及抑制 p53 表达后高糖环境中肾小球足细胞凋亡的改变情况，为阐明糖尿病肾小球硬化发生机制提供新的理论依据和试验基础。

1 材料和方法

1.1 细胞与试剂

小鼠肾小球足细胞株由英国皇家公立医院阮雄中教授惠赠，RPMI1640 培养液、胎牛血清和青链霉素溶液购自美国 Hyclone 公司，IFN-γ 和Ⅰ型鼠尾胶原购自美国 Sigma 公司，总蛋白提取试剂盒购自南京凯基公司，SDS-PAGE 配胶试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒和 ECL 化学发光试剂盒购自北京碧云天公司，p53 小鼠单克隆抗体、COP1（泛素修饰因子）小鼠单克隆抗体、β-Actin 小鼠单克隆抗体和辣根过氧化物酶山羊抗小鼠 IgG 购自美国 Santa Cruze 公司，PFT-α 购自美国 Calbioche 公司，TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒购自德国 Roche 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 足细胞培养方法参照文献[6]。未分化的足细胞用含 10%胎牛血清、10 U/ml IFN-γ 和 100 U/ml 青链霉素的 RPMI1640 培养液，在 33℃ 0.5% CO_2 细胞培养箱中传代培养。诱导分化时，将细胞转入不含 IFN-γ 的 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液，37℃分化 10~14 d，根据不同的要求分组。

1.2.2 实验分组 参照文献[7,8]建立 DN 肾小球足细胞凋亡模型，随机分为对照组、高糖组：30 mmol/L 葡萄糖、甘露醇组：30 mmol/L 葡萄糖 +25 mmol/L 甘露醇、PFT-α 组：30 mmol/L 葡萄糖 +10 μmol/L PFT-α、0.2%二甲基亚砜（Dimethyl sulfoxide，DMSO）溶剂对照组：30 mmol/L 葡萄糖 +0.2% DMSO。PFT-α 在高糖刺激 48 h 后作用 6 h，收获细胞用于 Western blot 和 TUNEL 试验。

1.2.3 Western blot 检测小鼠肾小球足细胞 p53 和 COP1 蛋白的变化 收集各组细胞，用预冷的磷酸盐缓冲液（Phosphate buffered solution，PBS）洗 3 次，加入裂解液裂解细胞，超声粉碎 3、4 次，每次 3~4 s，4℃、14 000 r/min 离心 15 min，取上清为样品，BCA 蛋白定量试剂盒测定总蛋白浓度，加上样缓冲液，于沸水中煮5 min。以每泳道60 μg总蛋白进行10%SDS-PAGE凝胶电泳分离，电泳完毕后胶上的蛋白电转移到聚偏二氟乙烯（Polyvinylidene fluoride，PVDF）膜上，5%脱脂奶粉封闭 90 min。一抗分别为 1:1 000 稀释的小鼠 p53 单克隆抗体，小鼠 COP1 单克隆抗体和小鼠 β-Actin 单克隆抗体（作为内参），4℃孵育 PVDF 膜过夜。用相应的 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶山羊抗小鼠 IgG 的二抗 37℃孵育 2 h，ECL 化学发光显影显示结果。应用 Quantity One 图像分析软件对特异性条带进行灰度扫描，以目的蛋白/β-actin 灰度值之比表示相关含量。

1.2.4 TUNEL 法检测小鼠肾小球足细胞凋亡 将上述各组足细胞以 5×10^4 个细胞的密度种于 24 孔板的玻片上，待达到 70%~90%融合时收获细胞用于 TUNEL。把含有细胞的载玻片经 PBS 清洗，4%多聚甲醛溶液室温固定 30 min；0.3% H_2O_2-甲醇室温孵育 30 min；0.1% Triton-X 100 4℃ 2 min；每张玻片用 1 μl TDT 和 50 μl 荧光素标记的 dUTP 液配成的 TUNEL 反应混合液在 37℃孵育 60 min，50 μl 转化剂过氧化物酶（Peroxidase，POD）在 37℃孵育 30 min；二氨基联苯胺（3,3'-diaminobenzidine，DAB）显色，苏木素复染后封片。于光镜下观察并照相。每个样品随机计数 5 个视野，按公式计算凋亡指数（Apoptosis index，AI）：AI = 凋亡细胞数/（凋亡细胞数 + 正常细胞数）。

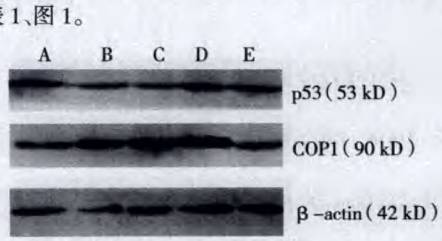
1.3 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计软件处理数据，实验数据均以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。各组均数经方差齐性检验后，多个样本均数间的两两比较采用方差分析，组间比较采用 *Dunnett-t* 检验；2 组间比较采用配对 *t* 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PFT-α 对 p53 和 COP1 蛋白在小鼠肾小球足细胞中的表达影响

Western blot 结果显示与对照组相比，高糖组细胞 p53 蛋白表达水平上调（$P<0.05$），COP1 蛋白表达水平下调（$P<0.05$）；与高糖组相比，PFT-α 作用 6 h 后 p53 蛋白表达水平下调（$P<0.05$），与对照组差异无统计学意义（$P>0.05$），COP1 表达无明显改变（$P>0.05$）；高糖组、甘露醇组与 0.2%DMSO 组细胞之间 p53 和 COP1 蛋白表达差异无统计学意义（$P>0.05$）。见表 1、图 1。



A. 对照组；B. 高糖组；C. 甘露醇组；
D. 0.2% DMSO 溶剂对照组；E. PFT-α 组

图 1 小鼠足细胞中 p53 和 COP1 的表达

表 1　各组小鼠肾小球足细胞中 p53 和 COP1 的蛋白表达

平均灰度值	p53	COP1
对照组	0.072 9 ± 0.007 13	1.067 ± 0.053 4
高糖组	1.210 8 ± 0.035	0.579 6 ± 0.041 9
甘露醇组	0.927 3 ± 0.141 8	0.223 7 ± 0.067 3
0.2% DMSO 组	1.094 1 ± 0.175 4	0.157 7 ± 0.068 3
PFT-α 组	0.166 4 ± 0.038 7	0.308 1 ± 0.014 5

2.2　PFT-α 对高糖刺激下足细胞凋亡的影响

在光学显微镜下观察，正常细胞核为卵圆形或椭圆形，呈淡蓝色；凋亡细胞的细胞核呈现棕黄色，染色质聚集，核出现边缘化、分叶状或碎片状。结果显示高糖刺激足细胞后凋亡率（35.41 ± 3.31）%分别是对照组（2.23 ± 0.17）%和 PFT-α 组（4.27 ± 0.21）%的 15.87 倍和 8.29 倍，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；甘露醇组（42.44 ± 6.11）%和 0.2% DMSO 组（32.80 ± 5.02）%与高糖组差异无统计学意义（$P>0.05$）。见图 2。

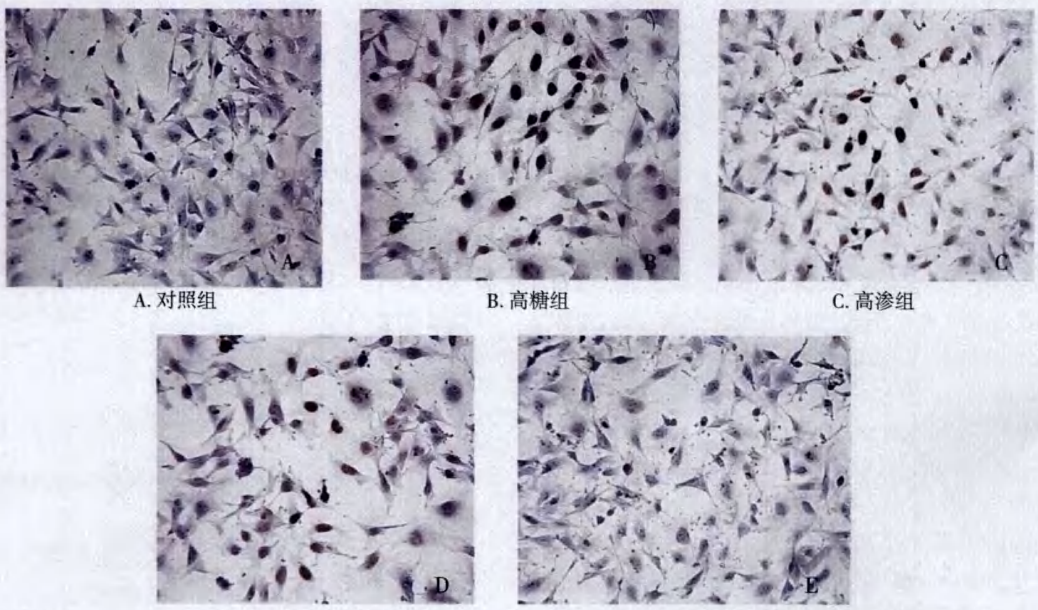
3　讨　论

肾小球足细胞位于肾小球基底膜的外侧，其表面的阴离子层对肾小球滤过膜电荷屏障有重要意义。DN 时肾小球足细胞逐渐发生凋亡、脱落，导致足细胞的密度和数量减少，致使肾小球滤过屏障的选择性通透功能进行性损害。当足细胞不能完全覆盖肾小球基底膜时，基底膜在毛细血管静水压的作用下，受压突向肾小囊，进而与肾小球壁层上皮细胞粘连和细胞外基质成分的沉积，最终形成肾小球硬化[9]。

细胞凋亡是由基因调控的细胞主动死亡过程，是机体细胞分化、生长发育、生理性及病理性死亡的重要机制[10]。近年发现细胞凋亡参与了 DN 的发生发展过程，有研究[11]发现用链脲佐菌素和高能量饮食建立 2 型糖尿病大鼠模型，与对照组相比，19 周后糖尿病大鼠肾脏细胞凋亡明显增加，并且主要发生于肾小管、肾间质和肾皮质，系膜细胞未检测到凋亡细胞。还有研究发现高糖环境中凋亡调节基因的表达发生了一定的改变，诱导凋亡的发生，促进了 DN 的发生。p53 是重要的细胞凋亡调控基因，20 世纪 90 年代以来的研究发现[12]细胞凋亡机制中野生型 p53 基因编码的 p53 蛋白是一种 DNA 结合蛋白，在 G_1 期发挥细胞周期检查点的功能：当DNA 损伤时，通过刺激细胞周期素依赖的蛋白激酶抑制物的表达阻滞细胞周期并启动 DNA 修复；如修复失败则启动细胞凋亡。

p53 是促进细胞凋亡的调控因子，也是 UPP 的底物。UPP 是细胞内腺嘌呤核苷三磷酸（Adenosine-triphosphate，ATP）依赖的蛋白质选择性降解的主要途径，也是真核细胞内重要的蛋白质质控系统，参与细胞凋亡、MHC Ⅰ类抗原的递呈、细胞周期和细胞内信号转导等多种生理过程，尤其是通过降解细胞内各信号通路的抑制因子或（和）激活因子发挥上调或下凋作用[13]，对维持细胞的稳态具有十分重要的意义[14]。目前发现 COP1、Pirh2 和 NIRF 等都具有泛素连接酶的活性，能通过非 Mdm2 途径使 p53 蛋白发生泛素化而降解，从而抑制依赖 p53 的细胞凋亡。

目前有关糖尿病并发症方面的基础研究显示[15]发现糖尿病肌肉萎缩是由于肌肉蛋白泛素降解增加，糖尿病时心肌蛋白的泛素化降解也增加。王晓[16]等发现高糖环境下血管内皮细胞内 Ub mRNA 表达增加，与细胞凋亡的发生相对应，且 Ub mRNA 的变化发生在细胞凋亡的形态学改变之前。但 DN 进展过程中泛素化过程有何变化鲜有报道，本研究对此进行了初步探究。本实验结果表明高糖状态下肾小球足细胞 p53 的表达明显增加，COP1 蛋白表达的下降，提示高糖可能抑制小鼠肾小球足细胞内泛素-蛋白酶体的活化，对 p53 的调控作用减弱，促使肾小球足细胞凋亡的增加；而 PFT-α 可通过依赖



A. 对照组　　B. 高糖组　　C. 高渗组

D. 0.2% DMSO 溶剂对照组　　E. PFT-α 组

图 2　肾小球足细胞的凋亡情况（TUNEL 法，×200 倍）

p53的凋亡通路减少肾小球足细胞凋亡，但对泛素修饰因子COP1的影响不大。高糖诱导肾小球足细胞损伤时COP1通过什么途径被抑制？依赖p53的细胞凋亡途径下游基因如bcl-2/bax如何变化，以及PFT-α对它们有何影响？需要进一步研究。

结合本研究结果，高糖可抑制小鼠肾小球足细胞的泛素蛋白酶体通路的活化从而使得足细胞凋亡增加，这可能是DN发病机制之一，为DN的基础研究和临床研究提供了一个新思路。

参 考 文 献

[1] Wendt T M, Tianji N, Guo J, et al.RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicated podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J].Am J Patbology, 2003, 162(4): 1123-1136.

[2] *Dimmeler S, Zeiher A M.Vascular repair by circulating endothelial* progenitor cells: the missing link in atherosclerosis[J].Mol Med, 2004, 82(10): 671-677.

[3] 冯 兵，杨 旭，叶自林，等.慢性肾衰竭大鼠主动脉NF-κB的表达变化[J].第三军医大学学报，2008，30(15)：1430-1433.

[4] Komarov P G, Komarova E A, Kondratov R V, et al.A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy[J]. Science, 1999, 285(5434): 1733-1737.

[5] Komarova E A, Gudkov A V.Chemoprotection from p53-dependent apoptosis: potential clinical applica-tions of the p53 inhibitors[J].Biochem Pharmacol, 2001, 62(6): 657-667.

[6] Mundel P, Reiser J, Zuniga Mejia Borja A, et al.Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines[J].Exp Cell Res, 1997, 236(1): 248-258.

[7] Baba M, Wada J, H ashimoto I, et al.Galectin-9 inhibits glomerular hypertrophy in db/db diabetic mice via cell-cycle-dependent mechanisms [J].J Am soc nephrol, 2005, 16(11): 3222-3224.

[8] 王立柱，黄 蔷，黄海长，等.热休克蛋白27/转录激活因子5复合物在高糖诱导足细胞凋亡中的意义[J].中华医学杂志，2006，86(6)：394-398.

[9] Macconi D, Bonomelli M, Benigni A, et al.Pathophysiologic implications of reduced podocyte number in a rat model of progressive glomerular injury[J].Am J Pathol, 2006, 168(1): 42-54.

[10] Green D R.Apoptosis pathways: Paper wraps stone blunts scissors[J]. Cell, 2005, 102(4): 1-5.

[11] 苏君梅，董 峰，易 华，等.糖尿病大鼠肾脏细胞凋亡的研究[J].武汉大学学报·医学版，2003，24(1)：17-20.

[12] Li Y, Raffo A T, Drew L, et al.Fas-mediated apoptosis is dependent on wild-type p53 status in human cancer cells expressing a temperature-sensitive p53 mutant alanine-143[J].Cancer Res, 2003, 63(7): 1527-1533.

[13] Murata T, Shimotohno K.Ubiquitination and proteasome-dependent degradation of human eukaryotic translation initiation factor 4E[J].J Biol Chem, 2006, 281(29): 20788-20800.

[14] Picka C M, Eddins M J.Ubiquitin: structures, functions, mechanisms [J].Biochem Biophys Acta, 2004, 1695(1-3): 55-72.

[15] Mastrocola R, Reffo P, Penna F, et al.Muscle wasting in diabetic and in tumor-bearing rats: role of oxidative stress[J].Free Radic Biol Med, 2008, 44(4): 584-593.

[16] 王 晓，李 果.泛素在高糖诱导的血管内皮细胞凋亡中的表达[J].上海第二医科大学学报，2005，25(1)：36-38.

（责任编辑：张学颖）

医学论文中的统计学处理与基本要求

1. 统计设计应科学、规范

论文中应明确陈述统计设计的名称，如实验设计应描述设计类型：成组设计、配对设计、随机区组设计、析因设计、正交试验设计、拉丁方设计等；调查设计应描述前瞻性、回顾性、叙述性研究；临床试验设计应描述属于第几期临床试验及采用什么盲法，描述实施重复、对照、随机、均衡基本原则的情况，阐明如何控制非试验因素的干扰。

2. 统计方法选择应正确

根据研究目的、资料类型、设计方案、样本大小、数据结构、特定条件、综合分析等选择统计方法。如：两样本均数比较用 t、t' 检验，多个样本均数的两两比较用方差分析与 q 检验，多个试验组均数与一个对照组均数比较用 Dunnett 检验；无序分类资料样本率间比较用 χ^2 检验、二项分布、Poisson 分布、精确概率法等，有序列分类资料用秩和检验；多因素、多指标用多元分析，多指标医学参考值范围用确定医学参考值范围的多指标统计方法；两指标之间的关系（如浓度依赖效应）用直线相关、曲线相关、等级相关分析，对于双向分类资料用一般 χ^2 检验，遗传研究资料要用医学遗传数理统计方法，而不能随意采用普通统计方法。

3. 统计分析结果解释应合理

当 $P \leqslant \alpha$ 时，可以认为对比组间差异有统计学意义，并给出统计量、具体 P 值（如：配对 $\chi^2=49.59$，$P=0.000$）。当需要对总体作出估计时，可以给出总体均数或总体率的95%可信区间。既要给出统计结论，又要给出医学专业结论。

4. 资料陈述应适宜

近似正态分布的资料用 $\bar{x} \pm s$ 描述集中与离散趋势，近似对数正态分布的资料用 G 描述集中趋势，偏态分布的资料用 M 描述集中趋势；表、图、文字相互间不重复；法定计量单位均用正体，统计符号均用斜体。描述试验对象纳入标准、排出标准，给出其随机化的细节，报告处理中出现的各种情况，给出观察例数，报告观察中的丢失，材料（对象）与方法中应描述所用统计方法（借助统计方法，读者能通过原始资料核实报告结果），指明参考文献、所用计算软件。统计术语正确。

本刊编辑部