

# 高糖和LY294002干预影响足细胞内IV型胶原表达

邢玲玲<sup>1,2</sup> 刘青娟<sup>1</sup> 傅淑霞<sup>2</sup> 曹延萍<sup>3</sup> 刘巍<sup>1</sup> 段惠军<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>河北医科大学病理教研室, 石家庄 050017; <sup>2</sup>河北医科大学第二医院肾内科, 石家庄 050000;

<sup>3</sup>河北省邯郸市第一医院肾内科, 邯郸 056002)

**摘要** 探讨高糖和PI3K/Akt通路对足细胞内IV型胶原(Col IV)表达的影响。体外培养小鼠足细胞, 给予高糖(30 mmol/L)处理后, 分别于0, 12, 24, 48 h收集细胞, 采用免疫细胞化学染色法和Western blot技术检测Col IV的表达; Western blot技术检测Akt的活化及LY294002对Col IV表达的抑制效应。结果表明, 高糖诱导足细胞内Col IV蛋白表达增多, 24 h明显, 各时间点与高糖刺激前相比均有统计学差异( $P < 0.05$ ); 高糖激活Akt蛋白磷酸化, p-Akt随刺激时间延长表达增多。PI3K/Akt通路抑制剂LY294002孵育细胞24 h后, 可减弱高糖诱导的足细胞内Col IV的表达( $P < 0.05$ )。因此, 高糖可能通过激活PI3K/Akt通路上调足细胞内IV型胶原表达。

**关键词** PI<sub>3</sub>K/Akt通路; 足细胞; IV型胶原

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)基本病理改变包括肾小球肥大、足细胞损伤、肾小球基底膜(glomerular basement membrane, GBM)增厚、系膜基质增多以及结节性肾小球硬化。最近研究认为, 足细胞损伤是导致肾小球硬化的关键因素<sup>[1]</sup>。足细胞合成分泌细胞外基质IV型胶原(collogen IV, Col IV)、层粘连蛋白、集聚蛋白等, 参与GBM病理生理过程。研究表明, 高糖环境、血管紧张素II、转化生长因子- $\beta_1$  (transforming growth factor- $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ )等均可导致足细胞分泌IV型胶原增多, 促进GBM增厚<sup>[2]</sup>。对于高糖通过何种途径引起足细胞内Col IV表达增多, 目前尚不清楚。

磷酸酰肌醇3激酶/蛋白激酶B (phosphoinositide 3 kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)信号通路调节细胞分化、增殖、凋亡以及迁徙等, 其特异性阻断剂LY294002可以抑制Akt的磷酸化, 从而影响细胞生物学功能。新近研究表明, PI3K/Akt信号通路参与高糖诱导的肾小管上皮细胞脂代谢和细胞外基质沉积<sup>[3]</sup>, 提示该通路在肾小管上皮细胞损伤中的作用。然而, 该途径及其特异性阻断剂在足细胞损伤方面的研究未见报道。本文拟通过体外培养小鼠足细胞, 观察高糖刺激足细胞内p-Akt和Col IV的表达, 以及LY294002对Col IV表达的影响, 探讨PI3K/Akt通路在高糖诱导足细胞内Col IV表达的可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

小鼠足细胞株从中国协和医科大学细胞中心购买。LY294002试剂购自美国Promega公司, 兔抗p-Akt多克隆抗体购自美国Cell Signaling Technology公司, 兔抗Col IV多克隆抗体购自北京博奥森公司, SP法免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 足细胞培养** 小鼠足细胞按Mundel等<sup>[4]</sup>的方法进行培养: 将冻存的足细胞复苏后置于含10 U/mL  $\gamma$ -干扰素和10%胎牛血清的DMEM-F12培养液中, 在33 °C细胞培养孵箱中培养传代, 然后转入不含 $\gamma$ -干扰素和10%胎牛血清的DMEM-F12培养液中, 37 °C培养孵箱中使足细胞分化10~14 d后使用。

**1.2.2 高糖对足细胞p-Akt的时效测定** 分别以高糖(浓度为30 mmol/L)培养0, 12, 24, 48 h收集细胞, 同时以正常糖浓度(5 mmol/L)培养相同时间作为对照。

**1.2.3 LY294002阻断实验** 根据以上实验p-Akt的高峰确定孵育时间后进行实验分组。I组: 正常糖对照组; II组: 高糖组; III组: LY294002干预组, 该组细胞培养液中含葡萄糖(浓度为30 mmol/L)和LY294002

收稿日期: 2011-05-21 接受日期: 2011-08-08

河北省卫生厅医学科学研究重点课题(No.20090055)资助项目

\*通讯作者。Tel: 0311-86265734, E-mail: xingll99@sina.com

(20  $\mu\text{mol/L}$ )。

**1.2.4 免疫细胞化学检测足细胞Col IV的表达** 采用6孔板, 置无菌盖玻片爬片, 每组6孔细胞, 70%乙醇固定细胞30 min; 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 甲醇室温孵育10 min; 羊血清封闭, 37  $^\circ\text{C}$ 孵育30 min; 甩掉多余血清, 勿清洗, 滴加兔抗Col IV抗体(1:50稀释), 4  $^\circ\text{C}$ 过夜, 以PBS缓冲液代替一抗作为对照; 二抗37  $^\circ\text{C}$ 孵育30 min; 三抗37  $^\circ\text{C}$ 孵育25 min; 以上每步之间应用PBS缓冲液冲洗5 min, 3次。DAB显色, 光镜观察足细胞Col IV的表达。

**1.2.5 Western blot分析** 收集细胞用冰盐水冲洗3次, 吸走残余的液体, 加入300  $\mu\text{L}$ 蛋白裂解液裂解细胞, 低温离心机离心, 12 000 r/min, 20 min后提取蛋白上清液, 用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。每个样品取50  $\mu\text{g}$ 总蛋白, 10% SDS-PAGE凝胶电泳后电转移至PVDF膜, 5%脱脂奶粉37  $^\circ\text{C}$ 封闭2 h, 再分别加入抗p-Akt抗体(1:1 000稀释)和抗Col IV抗体(1:500稀释), 4  $^\circ\text{C}$ 过夜。ECL化学发光法显色。以 $\beta$ -actin (1:1 000稀释)作为内参照。Western blot条带信号强度应用LabWork 45图像分析软件进行定量分析, 测定各条带的吸光度值( $D$ )。以上实验过程独立重复4次以上。

**1.2.6 统计学方法** 采用SPSS 13.0统计软件包分析, 实验数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组之间比较采用方差分析进行显著性检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 足细胞内Col IV的表达

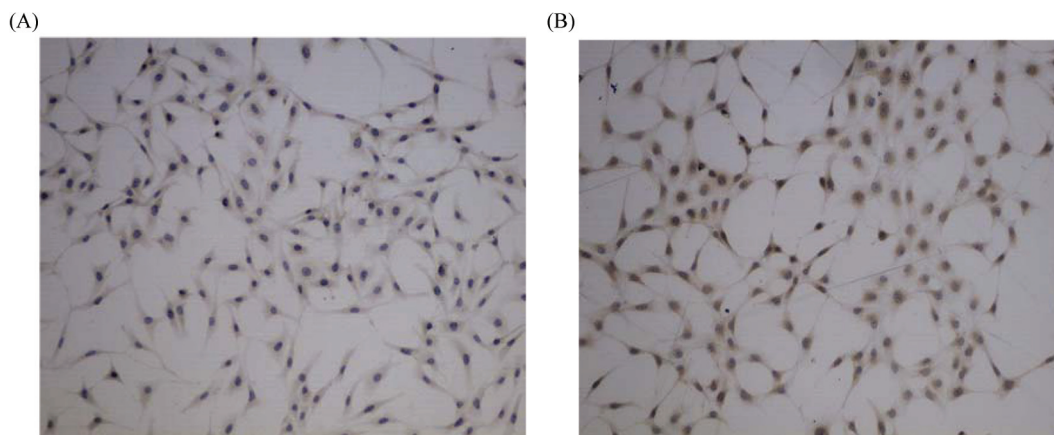
免疫细胞化学染色显示高糖刺激后Col IV表达增多, 主要表达在足细胞胞浆中, 与刺激前相比24 h表达明显(图1A和图1B)。Western blot检测Col IV的蛋白水平与免疫细胞化学检测结果基本一致, 随高糖刺激时间延长表达增多, 24 h达高峰, 各刺激时间点与未刺激前相比均有统计学差异( $P < 0.05$ , 图2)。

### 2.2 足细胞内p-Akt的水平

Western blot检测显示, 高糖刺激足细胞12 h后, p-Akt表达增多, 24 h达高峰, 48 h后逐渐下降, 各时间段与刺激前相比均有统计学差异( $P < 0.01$ , 图2)。

### 2.3 LY294002对足细胞内p-Akt、Col IV表达水平的影响

与高糖组(II组)相比, LY294002干预组(III组)足细胞孵育24 h后, p-Akt明显降低, Col IV蛋白水平也明显下降( $P < 0.05$ ), LY294002可以减弱高糖引起的足细胞内Col IV的表达(图3)。

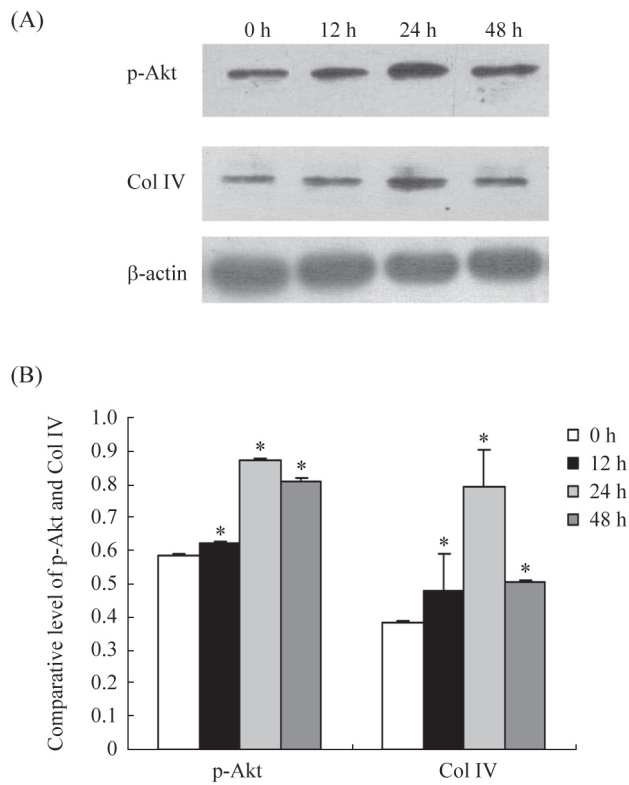


A: 高糖刺激0 h; B: 高糖刺激24 h。

A: podocytes treated by high glucose for 0 h; B: podocytes treated by high glucose for 24 h.

图1 Col IV免疫细胞化学染色(200 $\times$ )

Fig.1 Immunocytochemistry staining for Col IV in podocytes (200 $\times$ )



\* $P < 0.05$ , 与0 h相比。

\* $P < 0.05$ , vs 0 h.

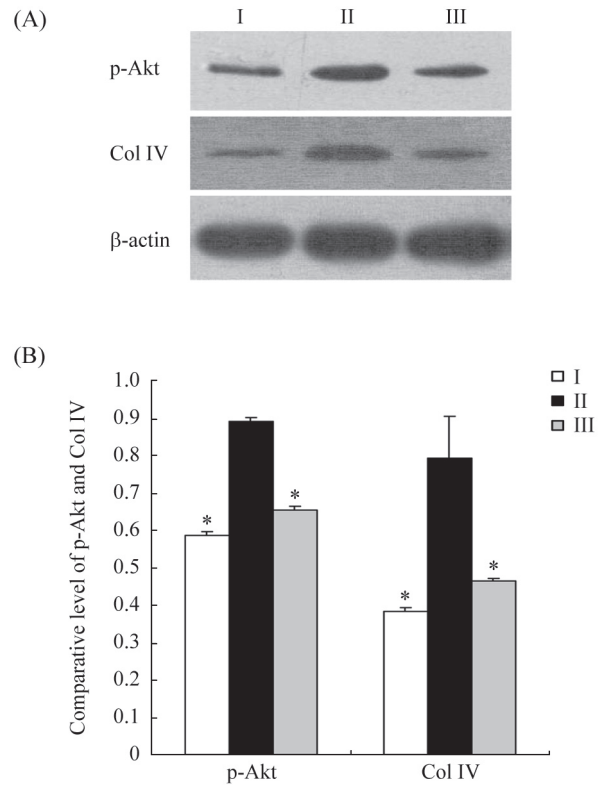
图2 Western blot检测高糖刺激足细胞不同时间p-Akt、Col IV蛋白的表达

Fig.2 Western blot analysis of the expression of p-Akt, Col IV in podocytes cultured with high glucose for different time

### 3 讨论

GBM增厚是糖尿病肾病的典型病理改变, Col IV作为GBM的主要成分之一, 其异常堆积是引起GBM增厚的重要原因。足细胞合成分泌Col IV, 参与GBM病理生理过程。高糖和糖基化终末产物均可以引起糖尿病组织和足细胞内IV型胶原表达增强<sup>[5-6]</sup>。本研究结果显示, 高糖刺激足细胞分泌Col IV, 与国内外报道一致; 随刺激时间延长, 足细胞内Col IV表达增多, 高峰在24 h, 48 h后表达开始减弱, 这种表达的时间规律性与Akt的激活具有一定的一致性。

PI3K/Akt通路的激活是一个多步骤的过程: 受体酪氨酸激酶与其配体结合发生磷酸化后激活PI3K, PI3K活化后磷酸化磷脂酰肌醇二磷酸(PIP<sub>2</sub>)生成磷脂酰肌醇三磷酸(phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate, PIP<sub>3</sub>), PIP<sub>3</sub>和Akt N端的PH结构域结合, 使Akt进一步被磷酸化, 并作用于一系列底物, 发挥其生物学作用。该通路特异性阻断剂LY294002通过抑制



\* $P < 0.05$ , 与II组相比。

\* $P < 0.05$ , vs II group.

图3 Western blot检测各处理组足细胞p-Akt、Col IV蛋白的表达

Fig.3 Western blot analysis of the expression of p-Akt, Col IV in podocytes of each group

PI3K的活化, 影响Akt的磷酸化, 从而阻断Akt发挥生物学效应<sup>[7]</sup>。

我们在前期预实验中发现, 高糖短时间(1 h内)刺激足细胞, p-Akt表达迅速升高(文章待发表), 本实验中维持长时间高糖刺激(>12 h) p-Akt表达逐渐升高, 24 h达高峰, 这可能与不同时间影响PI3K/Akt通路激活的因素有关。Sandhya等<sup>[8]</sup>通过删除Smad和CD2AP基因培养足细胞发现, TGF- $\beta$ <sub>1</sub>激活PI3K/Akt通路在1 h内依赖于CD2AP表达, 8 h以后则依赖于Smad途径。另外本研究中也发现, 高糖诱导足细胞内p-Akt和Col IV的表达高峰均在24 h。应用PI3K/Akt通路特异性阻断剂LY294002干预后, Col IV的表达下降, 提示高糖可能通过激活PI3K/Akt信号通路, 上调足细胞内Col IV的表达, 导致GBM增厚, 这也进一步提示PI3K/Akt信号通路可能介导了足细胞损伤, 参与了糖尿病肾病的发展。

当然, Col IV的表达受多因素的影响, 足细胞损

伤也非单一途径发挥作用,而高糖诱导足细胞内PI3K/Akt通路的激活也受其它信号通路的调控,这些有待更深入更完善的研究加以证实。随着体外足细胞研究的发展,PI3K/Akt信号通路为了解足细胞损伤的机制及糖尿病肾病的防治提供了一条新的途径。

### 参考文献 (References)

- Petermann A, Floege J. Podocyte damage resulting in podocy-turia: A potential diagnostic marker to assess glomerular disease activity. *Nephron Clin Pract* 2007; 106(2): 61-6.
- Li JJ, Kwak SJ, Jung DS, Kim JJ, Yoo TH, Ryu DR, *et al.* Podocyte biology in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 2007; 106: S36-42.
- Hao J, Liu SX, Zhao S, Liu QJ, Lv X, Chen H, *et al.* PI3K/Akt pathway mediates high glucose-induced lipogenesis and extracel-lular matrix accumulation in HKC cells through regulation of SREBP-1 and TGF- $\beta$ 1. *Histochem Cell Biol* 2011; 135(2): 173-81.
- Mundel P, Reiser J, Zúñiga Mejía BA, Pavenstädt H, Davidson GR, Kriz W, *et al.* Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of con-ditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Ras* 1997; 236(1): 248-58.
- 梁馨月, 顾乐怡, 王丽华, 高嘉元, 钱家麒, 张敏芳, 等. 高糖环-境及雷帕霉素干预对肾小球足细胞IV型胶原和MMP-9表达的影响. *上海交通大学学报(医学版)* 2010; 30(5): 518-21.
- Phillips LM, Wang Y, Dai T, Feldman DL, Lapage J, Adler SG. The renin inhibitor aliskiren attenuates high-glucose induced extracellular matrix synthesis and prevents apoptosis in cultured podocytes. *Nephron Exp Nephrol* 2011; 118(3): e49-59.
- Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 1994; 269(7): 5241-8.
- Sandhya X, Thiruvur N, Stefanie K, Taoran Z, Wenjun J, Andrey SS, *et al.* T $\beta$ RI independently activates smad- and CD2AP-de-pendent pathways in podocytes. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(10): 2127-37.

## Effects of High Glucose and LY294002 on the Expression of Collagen IV in Mouse Podocyte

Xing Lingling<sup>1,2</sup>, Liu Qingjuan<sup>1</sup>, Fu Shuxia<sup>2</sup>, Cao Yanping<sup>3</sup>, Liu Wei<sup>1</sup>, Duan Huijun<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; <sup>2</sup>Department of Nephrology, the Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China;

<sup>3</sup>Department of Nephrology, the First Hospital of Handan, Handan 056002, China)

**Abstract** To investigate effects of high glucose and phosphoinositide 3 kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) pathway on the expression of collagen IV (Col IV) in mouse podocyte, we divided cultured mouse podocytes into high glucose (30 mmol/L, HG) group and normal glucose (5 mmol/L, NG) group. Cells were collected respectively at 0, 12, 24, 48 h after stimulation. The expression of collagen IV was detected by immunocytochemistry and Western blot analysis. The expression of phospho-Akt and the inhibition of LY294002 on collagen IV were analyzed by Western blot. Compared with control group, the level of Col IV in mouse podocytes treated by high glucose was significantly increased ( $P < 0.05$ ), with reaching the peak at 24 h. The phosphorylation of Akt was observed in mouse podocytes induced by high glucose. The level of phospho-Akt was increased in a time-dependent manner. However, inhibition of activation of Akt with LY294002, a specific PI3K/Akt pathway inhibitor, attenuated the high glucose-induced expression of Col IV at 24 h after intervention. We conclude that high glucose maybe up-regulate the expression of Col IV in mouse podocytes by activating PI3K/Akt pathway.

**Key words** PI<sub>3</sub>K/Akt pathway; podocyte; collagen IV

Received: May 21, 2011 Accepted: August 8, 2011

This work was supported by the Department of Health of Hebei Province of China (No.20090055)

\*Corresponding author. Tel: 86-311-86265734, E-mail: duanhj246@hotmail.com