

雷帕霉素对高糖诱导的足细胞增殖、迁移及上皮-间质转化的作用机制研究

赵学慧^{1*} 王淮淮¹ 李维维² 李迎婕¹ 贾军利¹

(¹河北北方学院附属第二医院肾内科, 张家口 075000; ²张家口市第二医院肾内科, 张家口 075000)

摘要 为探讨雷帕霉素对D-葡萄糖诱导的人肾小球足细胞增殖、迁移和上皮-间质转化(EMT)的影响及磷脂酰肌醇-3-激酶/丝氨酸-苏氨酸激酶(PI3K/AKT)信号通路的调控作用, 该研究体外培养人肾小球足细胞HGPC细胞系, 并将其分为对照组(5 mmol/L的D-葡萄糖)、高糖组(30 mmol/L的D-葡萄糖)、低/中/高浓度组(在30 mmol/L的D-葡萄糖的基础上加入2.5、5.0、10.0 μmol/L雷帕霉素), 用酶联免疫吸附实验(ELISA)、细胞计数试剂盒8(CCK-8)测定炎症因子白细胞介素-8(IL-8)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的表达水平及细胞活力, 筛选出最适雷帕霉素后, 又将细胞分为对照组、高糖组、雷帕霉素组、LY294002组(30 mmol/L的D-葡萄糖+10 μmol/L PI3K/AKT通路抑制剂 LY294002)、雷帕霉素+LY294002组(30 mmol/L的D-葡萄糖+10.0 μmol/L雷帕霉素+10 μmol/L PI3K/AKT通路抑制剂 LY294002)和雷帕霉素+SC79组(30 mmol/L的D-葡萄糖+10.0 μmol/L雷帕霉素+10 μmol/L PI3K/AKT通路激动剂 SC79), 干预24 h。5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(EdU)检测细胞增殖情况; 划痕法测定细胞的迁移能力; 蛋白免疫印迹(WB)法测定EMT及PI3K/AKT通路相关蛋白表达水平。结果表明, 与对照组相比, 高糖组细胞炎症因子IL-8和TNF-α表达水平显著升高, 细胞活力显著降低, 与高糖组相比, 高浓度组细胞炎症因子IL-8和TNF-α表达水平降低, 细胞活力升高($P<0.05$), 所以确定10.0 μmol/L雷帕霉素是最佳作用浓度, 进行进一步的实验。与对照组相比, 高糖组细胞增殖率和E-钙粘蛋白(cadherin)蛋白表达水平显著降低, 细胞迁移率和N-cadherin、波形蛋白(Vimentin)、纤连蛋白(FN)、p-PI3K/PI3K及p-AKT/AKT比值显著升高($P<0.05$); 与高糖组相比, 雷帕霉素组和LY294002组逆转了上述指标的变化趋势($P<0.05$); 与雷帕霉素组相比, 雷帕霉素+LY294002组中LY294002增强了上述指标变化趋势, 雷帕霉素+SC79组SC79削弱了这些指标变化趋势($P<0.05$)。总之, 雷帕霉素可促进D-葡萄糖诱导的人肾小球足细胞HGPC细胞的增殖, 抑制其迁移和EMT进程, 作用机制可能与阻断PI3K/AKT通路的信号转导相关。

关键词 糖尿病肾病; 足细胞; 雷帕霉素; 磷脂酰肌醇-3-激酶/丝氨酸-苏氨酸激酶信号通路; D-葡萄糖; 增殖; 迁移; 上皮-间质转化

Mechanism of Rapamycin on the Proliferation, Migration and Epithelial Mesenchymal Transformation of Podocytes Induced by High Glucose

ZHAO Xuehui^{1*}, WANG Huaihuai¹, LI Weiwei², LI Yingjie¹, JIA Junli¹

(¹Department of Nephrology, the Second Affiliated Hospital, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China;

²Department of Nephrology, the Second Hospital of Zhangjiakou 075000, China)

收稿日期: 2023-02-21 接受日期: 2023-04-03

河北省卫健委2021年度医学科学研究课题计划(批准号: 20210125)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15133314200, E-mail: zhaoxuehui8612@163.com

Received: February 21, 2023 Accepted: April 3, 2023

This work was supported by the 2021 Medical Science Research Project of the Hebei Provincial Health Commission (Grant No.20210125)

*Corresponding author. Tel: +86-15133314200, E-mail: zhaoxuehui8612@163.com

Abstract The aim of this study was to investigate the effects of rapamycin on *D*-glucose-induced proliferation, migration, EMT (epithelial-mesenchymal transition) and PI3K/AKT (phosphatidylinositol-3-kinase/serine-threonine kinase) signaling pathway of human glomerular podocytes. The human glomerular podocyte HGPC cell lines were cultured *in vitro* and divided into control group (5 mmol/L *D*-glucose), high glucose group (30 mmol/L *D*-glucose), and low/medium/high concentration group (30 mmol/L *D*-glucose+2.5, 5, 10 μ mol/L rapamycin). The optimum concentration of rapamycin was selected by the expression levels of inflammatory factor IL-8 (interleukin-8), TNF- α (tumor necrosis factor- α) detected by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) and cell viability measured by CCK-8 (cell counting kit-8). The supplementation groups were further divided into LY294002 group (30 mmol/L *D*-glucose+10 μ mol/L PI3K/AKT pathway inhibitor LY294002), rapamycin+LY294002 group (30 mmol/L *D*-glucose+10.0 μ mol/L rapamycin+10 μ mol/L PI3K/AKT pathway inhibitor LY294002) and rapamycin+SC79 group (30 mmol/L *D*-glucose+10.0 μ mol/L rapamycin+10 μ mol/L PI3K/AKT pathway agonist SC79), intervened for 24 h. Cell proliferation was detected by EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine); the migration ability of cells was determined by wound healing; the expression levels of EMT and PI3K/AKT pathway-related proteins were determined by WB (Western blot). The results showed that compared with the control group, the expression levels of the inflammatory factor IL-8 and TNF- α in the high glucose group were significantly increased, and the cell viability was significantly decreased. Compared with the high glucose group, the expression level of inflammatory factor IL-8 and TNF- α in high concentration group were decreased, while the cell viability was increased ($P<0.05$). Therefore, 10.0 μ mol/L rapamycin was determined to the optimal concentration for further experiments. Compared with the control group, the cell proliferation rate and E-cadherin protein expression level in the high glucose group were significantly decreased, while the cell migration rate and the proteins expression levels of N-cadherin, Vimentin, FN, p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT were significantly increased in the high glucose group ($P<0.05$). Compared with the high glucose group, the change trend of above indexes was reversed by rapamycin group and inhibitor group ($P<0.05$). Compared with the rapamycin group, LY294002 in the rapamycin+LY294002 group enhanced the trend of these indexes, while SC79 in the rapamycin+SC79 group weakened the trend of these indexes ($P<0.05$). In conclusion, rapamycin could promote the proliferation and inhibit the migration and EMT process of human glomerular podocyte HGPC cells induced by *D*-glucose, and the mechanism may be related to blocking PI3K/AKT pathway signal transduction.

Keywords diabetes nephropathy; podocytes; rapamycin; phosphatidylinositol-3-kinase/serine-threonine kinase signaling pathway; *D*-glucose; proliferation; migration; epithelial-mesenchymal transformation

糖尿病肾病是糖尿病患者常见的三大并发症之一,是糖尿病患者致残或死亡的重要原因。随着糖尿病发病率的迅猛增长,以及糖尿病患者存活时间的延长,由糖尿病导致的慢性肾脏疾病患者的数量也在逐年增加,糖尿病肾病已成为终末期肾脏病的主要病因^[1]。我国糖尿病肾病防治原则就是注意患者饮食及习惯、控糖、控血压、控蛋白尿,现有治疗糖尿病肾病方法效果不理想,亟待寻求新的治疗方法或药物。雷帕霉素是一种新型大环内酯类免疫抑制剂,对许多疾病都具有免疫抑制效应,能够抑制恶性细胞的增殖和迁移^[2]。GAO等^[3]报道,雷帕霉素能够抑制内皮细胞增殖和迁移以及血管生

成。WANG等^[4]研究发现,雷帕霉素可以降低糖尿病大鼠模型的蛋白尿水平,减轻早期糖尿病肾病足细胞损伤。但雷帕霉素在糖尿病肾病中的作用机制尚不完全明确。磷脂酰肌醇-3-激酶/丝氨酸-苏氨酸激酶(PI3K/AKT)信号通路在细胞增殖、存活、迁移和上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)等细胞过程中可以介导生长因子信号在细胞生理学中发挥核心作用,PI3K/AKT信号通路是正常代谢所必需的,因此与糖尿病的发展密切相关^[5]。研究显示,香豆素苷可通过调控PI3K/AKT信号通路减轻糖尿病肾病模型大鼠足细胞损伤^[6]。雷帕霉素可以抑制肾小管上皮细胞发生的EMT作用^[7],雷帕霉

素通过阻断PI3K/AKT信号通路可抑制食管癌细胞活力和迁移^[8]。然而,目前尚不清楚雷帕霉素是否可以通过调控PI3K/AKT信号通路影响D-葡萄糖诱导的HGPC细胞的生物学行为。本研究通过D-葡萄糖诱导HGPC细胞构建体外高糖细胞模型,探讨雷帕霉素干预对D-葡萄糖诱导的HGPC细胞增殖、迁移和EMT的影响以及对PI3K/AKT信号通路的调控机制,以期为肾小球足细胞高糖模型的相关治疗研究提供新的理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

人肾小球足细胞HGPC购自河南省工业微生物菌种工程技术研究中心。雷帕霉素、D-葡萄糖、PI3K/AKT通路抑制剂LY294002、PI3K/AKT通路激动剂SC79购自上海源叶生物科技有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、DMEM-F12培养基购自美国Gibco公司;酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒购自杭州主诺生物技术有限公司;活细胞计数试剂盒(CCK-8)购自上海翌圣生物科技有限公司;5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷(EdU)细胞增殖检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;RIPA裂解液购自美国Abw公司;二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白试剂盒购自英国Abcam公司;鼠抗人[PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、E-钙粘蛋白(E-cadherin)、N-钙粘蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、纤连蛋白(fibronectin, FN)及 β -actin一抗]、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG(二抗)购自美国CST公司。MF52-N型倒置荧光显微镜购自州市明美光电技术有限公司;HWO301型二氧化碳培养箱购自美国FORMA公司;Multiskan Ascent型酶标仪购自美国Thermo公司;Gel Doc2000型凝胶成像系统购自美国Backman公司。

1.2 实验方法

1.2.1 人肾小球足细胞HGPC细胞培养 将HGPC细胞培养于DMEM-F12培养基(含10%胎牛血清、1%青-链霉素)中,置于37℃、5% CO₂培养箱中进行培养。待细胞贴壁达80%以上时进行细胞传代,取第4代对数期生长HGPC细胞用于实验。

1.2.2 分组及给药 选取第4代对数期生长的人HGPC细胞,调整密度至 2×10^5 个/mL,将其接种到96孔

板中,每孔100 μ L。将人HGPC细胞分为对照组、高糖组、低/中/高浓度组并进行预实验,对照组细胞中加入5 mmol/L的D-葡萄糖,高糖组加入30 mmol/L的D-葡萄糖,低/中/高浓度组在30 mmol/L的D-葡萄糖的基础上分别加入2.5、5.0、10.0 μ mol/L雷帕霉素进行干预。根据预实验结果选择有显著作用的10 μ mol/L雷帕霉素进行后续实验,又将HGPC细胞分为对照组、高糖组、雷帕霉素组、LY294002组、雷帕霉素+LY294002组和雷帕霉素+SC79组,对照组细胞5 mmol/L的D-葡萄糖,高糖组加入30 mmol/L的D-葡萄糖,雷帕霉素组是在30 mmol/L的D-葡萄糖基础上加入10.0 μ mol/L雷帕霉素,LY294002组是在30 mmol/L的D-葡萄糖基础上加入10 μ mol/L PI3K/AKT通路抑制剂LY294002,雷帕霉素+LY294002组是在30 mmol/L的D-葡萄糖基础上加入10.0 μ mol/L雷帕霉素再加入10 μ mol/L PI3K/AKT通路抑制剂LY294002,雷帕霉素+SC79组是在30 mmol/L的D-葡萄糖基础上加入10.0 μ mol/L雷帕霉素再加入10 μ mol/L PI3K/AKT通路激动剂SC79,每组设置3个复孔,后置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。

1.2.3 ELISA试剂盒检测HGPC细胞培养液中炎症因子白细胞介素-8(IL-8)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达水平 收集各组干预24 h后的细胞上清液,按照IL-8和TNF- α ELISA试剂盒说明书的操作步骤,测定细胞炎症因子IL-8和TNF- α 的表达水平。将细胞培养液在4℃、1 500 \times g条件下离心10 min,收集上清液,将100 μ L标准品及待测上清液加入酶标板中,37℃孵育2 h,弃去上清液;加100 μ L生物素化抗体工作液和酶结合物工作液37℃孵育1 h;洗涤后用90 μ L底物溶液37℃孵育10 min;再加入50 μ L终止液,于5 min内测量各孔在波长为450 nm处的D值。根据标准曲线计算炎症因子IL-8和TNF- α 的表达水平。

1.2.4 CCK-8法测定HGPC细胞的活力 选取第4代对数期生长的细胞,调整密度至 2×10^5 个/mL,将其接种到96孔板中,每孔加100 μ L,实验重复3次。各组干预24 h后,加入CCK-8溶液10 μ L,在37℃、5% CO₂培养箱中继续孵育2 h,使用酶标仪测定各组D值(450 nm)。细胞活力(%)=[(高糖组或低/中/高浓度组D值-空白组D值)/(对照组D值-空白组D值)] \times 100%。

1.2.5 EdU法测定HGPC细胞的增殖率 取各组干预24 h的细胞,进行EdU处理,去除培养液,用0.5 mL 4%多聚甲醛室温固定15 min,用0.5 mL 3% BSA洗涤3次;

用0.5 mL 0.3% TritonX-100去除BSA, 室温10 min, 再用BSA洗涤3次; 12孔板中每孔加200 μ L Click反应液(现配现用), 室温避光孵育30 min, 3% BSA洗涤3次去除Click反应液; 每孔加入0.5 mL Hoechst, 室温避光孵育10 min; 再用3% BSA洗涤3次去除Hoechst; 装片, 荧光显微镜拍照, 再用ImageJ软件处理图片。EdU阳性染色细胞(红色)占总细胞(蓝色)的百分比表示细胞增殖率。

1.2.6 划痕法测定HGPC细胞的迁移情况 将各组处于对数期的HGPC细胞, 调整密度至 2×10^5 个/mL, 接种到6孔板中, 每孔1 mL。细胞密度达90%后, 采用200 μ L移液器枪头进行划痕, 后置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养24 h。放置显微镜下拍照记录0和24 h划痕情况, 划痕面积分别记为 S_0 与 S_{24} 。细胞迁移率(%)= $(S_0 - S_{24})/S_0 \times 100\%$ 。

1.2.7 蛋白免疫印迹法(WB)检测HGPC细胞中EMT和PI3K/AKT通路相关蛋白的表达水平 干预24 h时, 收集各组细胞于RIPA液在冰上进行裂解, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心20 min, 取上清进行蛋白变性后, 制胶, 上样, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶电泳, 300 mA恒流转聚偏二氟乙烯(PVDF)膜, 5%脱脂牛奶室温封闭2 h, 然后参照抗体说明书加入一定稀释比例的一抗[PI3K(1:3 000)、AKT(1:10 000)、p-PI3K(1:1 000)、p-AKT(1:5 000)、E-cadherin(1:5 000)、N-cadherin(1:5 000)、Vimentin(1:20 000)、FN(1:5 000)及 β -actin(1:10 000)], 4 $^{\circ}$ C

孵育过夜, TBST洗涤3次后加入辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠IgG二抗(1:2 000), 室温孵育2 h, 弃去液体, TBST洗涤3次, 最后加显影液, 使用凝胶成像系统拍照记录。蛋白灰度值用G表示, 蛋白相对表达量= $G_{目的蛋白}/G_{内参蛋白(\beta\text{-actin})}$ 。

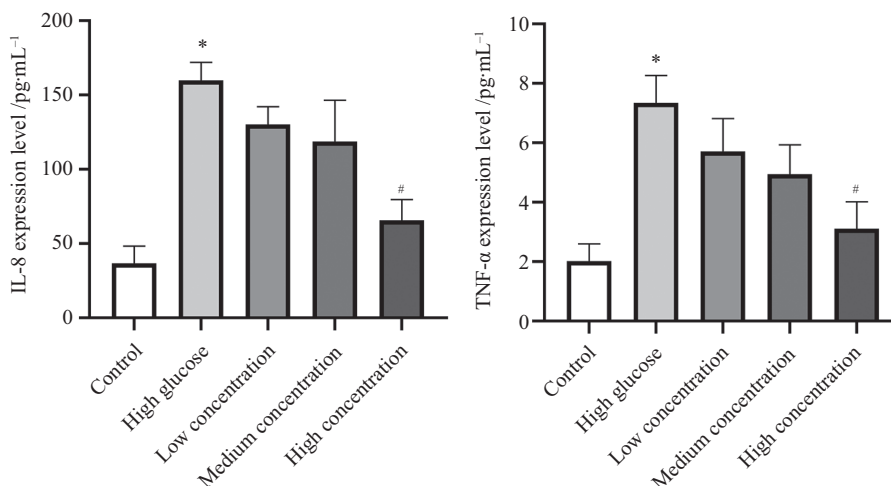
1.3 统计学分析

采用SPSS 23.0软件进行统计分析, 数据以($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析法, 符合正态分布且方差齐时, 两组间比较Dunnnett's *t*检验; 不符合正态分布时, 采用秩和检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。使用GraphPad Prism 8软件进行作图, ImageJ计算细胞增殖数、划痕面积和蛋白灰度值。

2 结果

2.1 雷帕霉素最佳作用浓度筛选

分别使用ELISA和CCK-8法检测雷帕霉素对D-葡萄糖诱导的HGPC细胞炎症因子(IL-8和TNF- α)的表达水平以及细胞活力的影响(图1和图2), 实验结果显示, 干预24 h时, 与对照组比较, 高糖组细胞炎症因子IL-8和TNF- α 表达水平显著升高, 细胞活力则显著降低($P < 0.05$); 与高糖组相比, 加入雷帕霉素处理后, 低/中/高浓度组细胞炎症因子IL-8和TNF- α 表达水平降低, 细胞活力升高, 其中低/中浓度组差异无统计学意义($P > 0.05$), 高浓度组差异有统计学意义($P < 0.05$), 所以本研究选择高浓度组进行后续



* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与高糖组相比。

* $P < 0.05$ compared with the control group; # $P < 0.05$ compared with high glucose group.

图1 雷帕霉素对D-葡萄糖诱导的HGPC细胞中IL-8和TNF- α 表达的影响

Fig.1 Effects of rapamycin on the expression of IL-8 and TNF- α in HGPC cells induced by D-glucose

PI3K/AKT通路验证实验。

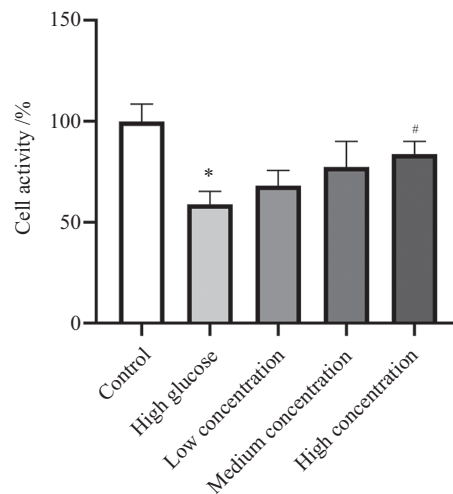
2.2 雷帕霉素通过抑制PI3K/AKT通路促进D-葡萄糖诱导的HGPC细胞的增殖并抑制其迁移

分别使用EdU法和划痕法检测雷帕霉素对D-葡萄糖诱导的HGPC细胞增殖和迁移情况的影响,结果显示,与对照组相比,高糖组细胞增殖率显著降低,细胞迁移率显著升高($P<0.05$);与高糖组相比,雷帕霉素组和LY294002组细胞增殖率显著升高,细胞迁移率显著降低($P<0.05$);与雷帕霉素组

相比,雷帕霉素+LY294002组细胞增殖率进一步显著升高,细胞迁移率进一步显著降低,而雷帕霉素+SC79组细胞增殖率显著降低,细胞迁移率显著升高($P<0.05$)(图3和图4)。

2.3 雷帕霉素通过抑制PI3K/AKT通路抑制D-葡萄糖诱导的HGPC细胞EMT相关蛋白表达

用WB对E-cadherin、N-cadherin、Vimentin和FN蛋白表达水平进行检测(图5)。与对照组相比,高糖组N-cadherin、Vimentin和FN蛋白表达水

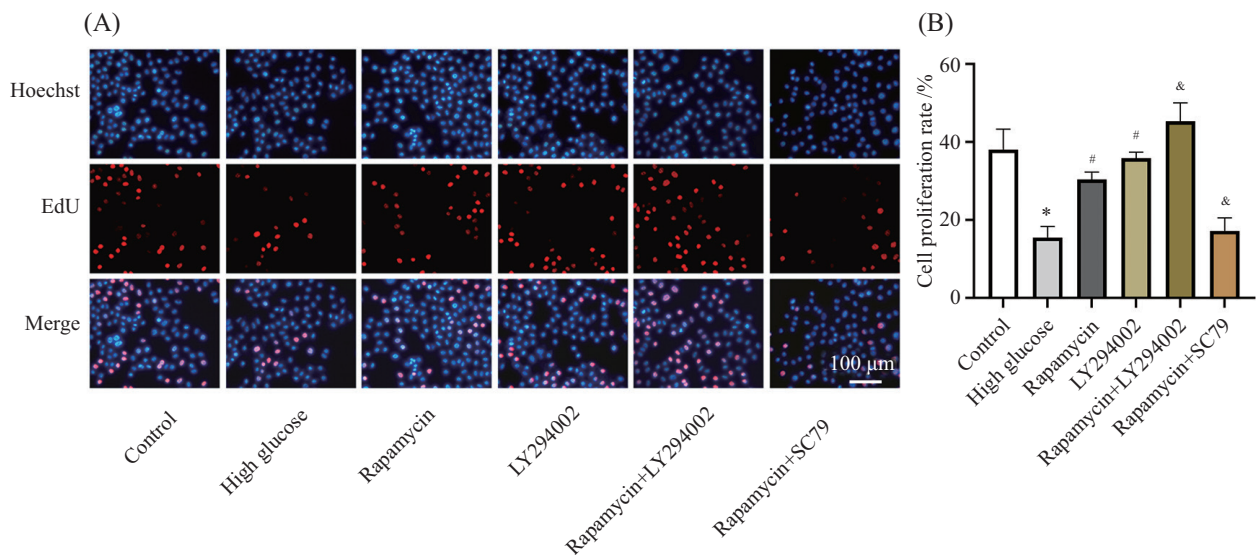


* $P<0.05$, 与对照组相比; # $P<0.05$, 与高糖组相比。

* $P<0.05$ compared with the control group; # $P<0.05$ compared with high glucose group.

图2 雷帕霉素对D-葡萄糖诱导的HGPC细胞活力的影响

Fig.2 Effect of rapamycin on D-glucose-induced HGPC cell viability

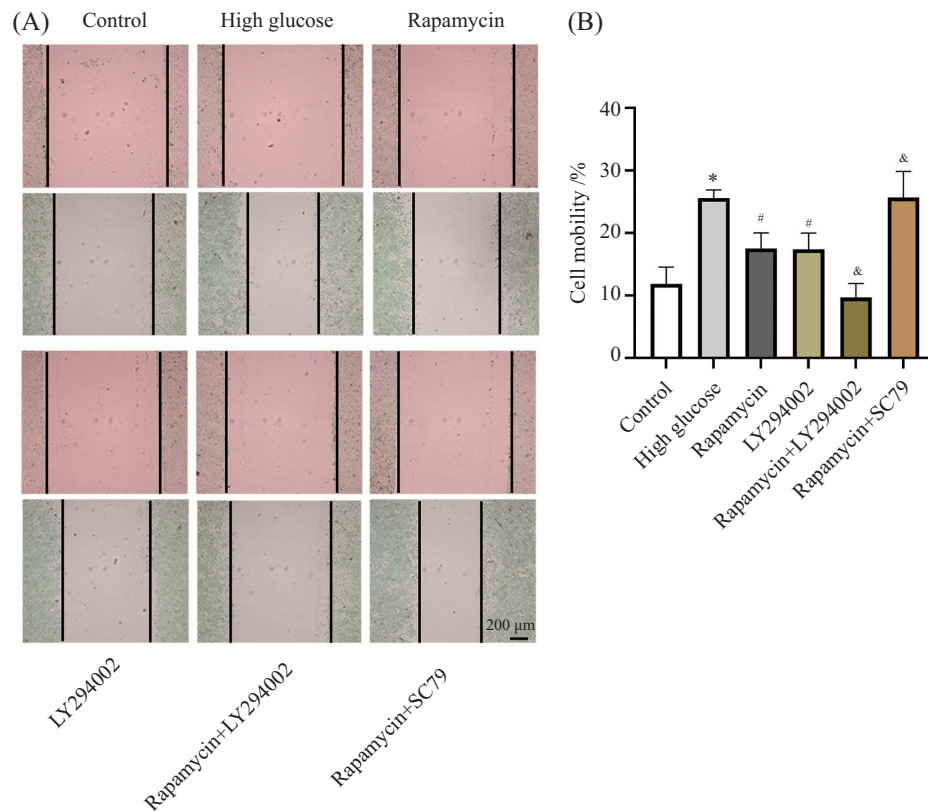


A: 细胞EdU增殖图; B: 细胞增殖率; * $P<0.05$, 与对照组相比; # $P<0.05$, 与高糖组相比; & $P<0.05$, 与雷帕霉素组相比。

A: cell proliferation EdU image; B: cell proliferation rate; * $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with high glucose group; & $P<0.05$ compared with rapamycin group.

图3 雷帕霉素对D-葡萄糖诱导的HGPC细胞增殖的影响

Fig.3 Effect of rapamycin on D-glucose-induced HGPC cells proliferation



A: 细胞迁移图; B: 细胞迁移率; * $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与高糖组相比; & $P < 0.05$, 与雷帕霉素组相比。

A: cell migration map; B: cell mobility; * $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with high glucose group; & $P < 0.05$ compared with rapamycin group.

图4 雷帕霉素对D-葡萄糖诱导的HGPC细胞迁移的影响

Fig.4 The effect of rapamycin on D-glucose-induced HGPC cell migration

平显著升高, 而E-cadherin蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$); 与高糖组相比, 雷帕霉素组和LY294002组N-cadherin、Vimentin和FN蛋白表达水平显著降低, E-cadherin蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$); 与雷帕霉素组相比, 雷帕霉素+LY294002组N-cadherin、Vimentin和FN蛋白表达水平进一步显著降低, E-cadherin蛋白表达水平进一步显著升高, 而雷帕霉素+SC79组N-cadherin、Vimentin和FN蛋白表达水平显著升高, E-cadherin蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。

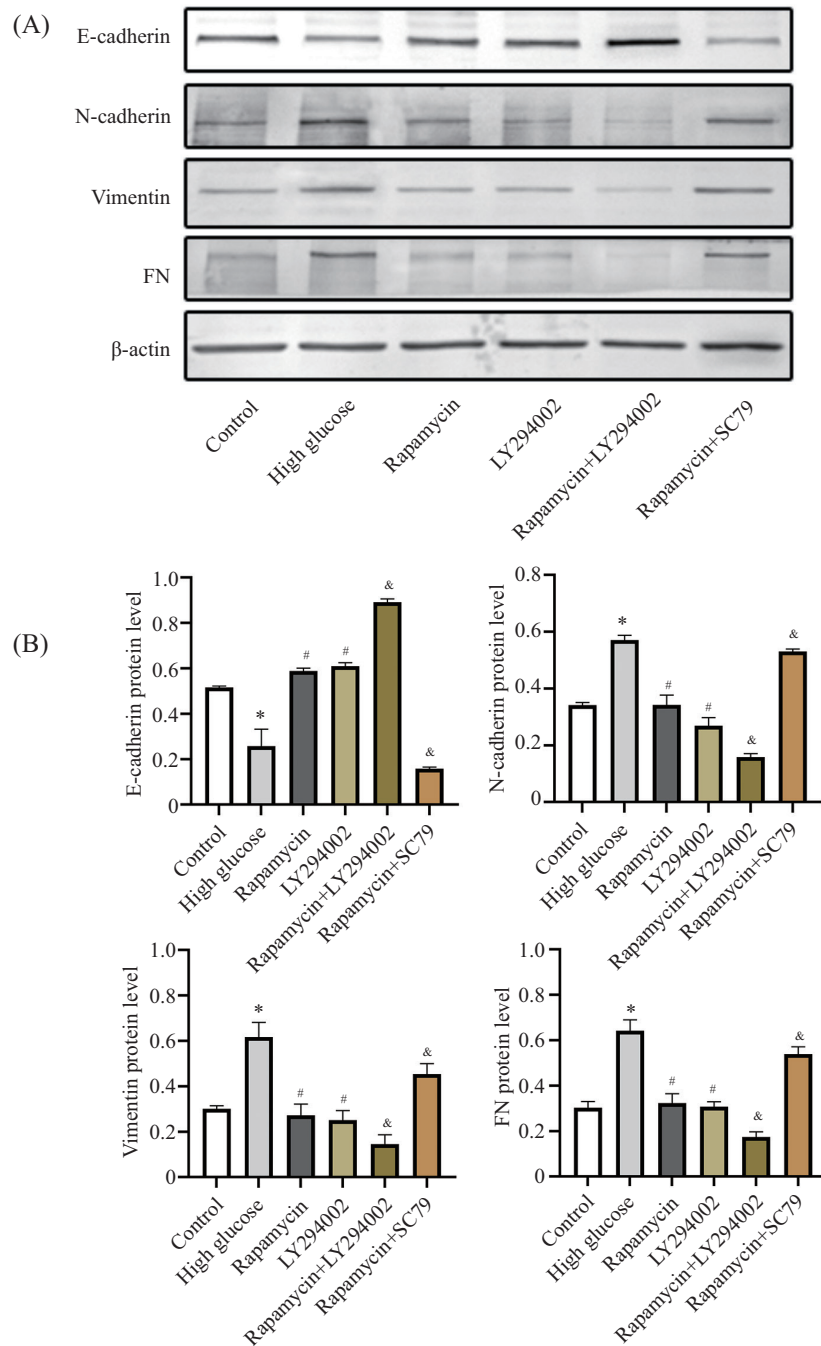
2.4 雷帕霉素抑制D-葡萄糖诱导HGPC细胞PI3K/AKT通路的活化

为了确定雷帕霉素对PI3K/AKT信号通路活化状态的影响, 本研究检测了该通路的关键性蛋白PI3K、AKT、p-PI3K和p-AKT的表达水平(图6A)。蛋白定量分析结果(图6B)显示: 与对照组相比, 高糖组p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT表达水平显著升高($P < 0.05$); 与高糖组相比, 雷帕霉素组和LY294002

组p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT表达水平显著降低($P < 0.05$); 与雷帕霉素组相比, 雷帕霉素+LY294002组p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT表达水平进一步显著降低, 雷帕霉素+SC79组p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT表达水平则显著升高($P < 0.05$)。

3 讨论

糖尿病肾病是糖尿病的常见并发症之一, 是由于胰岛素缺乏引起的糖代谢失调, 进而导致肾脏功能障碍^[9]。目前主要治疗手段是通过饮食与习惯来控制的, 治疗效果不明显, 终末期肾脏病治疗手段是透析和肾移植手术, 但预后不佳、副作用大, 开发新的药物势在必行^[10]。足细胞损伤是原发性肾小球疾病的主要发病机制, 可导致大量蛋白尿发生和肾功能衰竭, 所以本研究选择肾小球足细胞HGPC细胞来进行实验^[11]。雷帕霉素是土壤链霉菌分泌的次生代谢物, 具有抗肿瘤和免疫抑制活性^[12]。有研究报道, SI等^[13]发现, 雷帕霉素以浓度依赖的方式诱导人



A: WB检测细胞中EMT相关蛋白表达水平; B: EMT相关蛋白相对表达量; * $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与高糖组相比; & $P < 0.05$, 与雷帕霉素组相比。

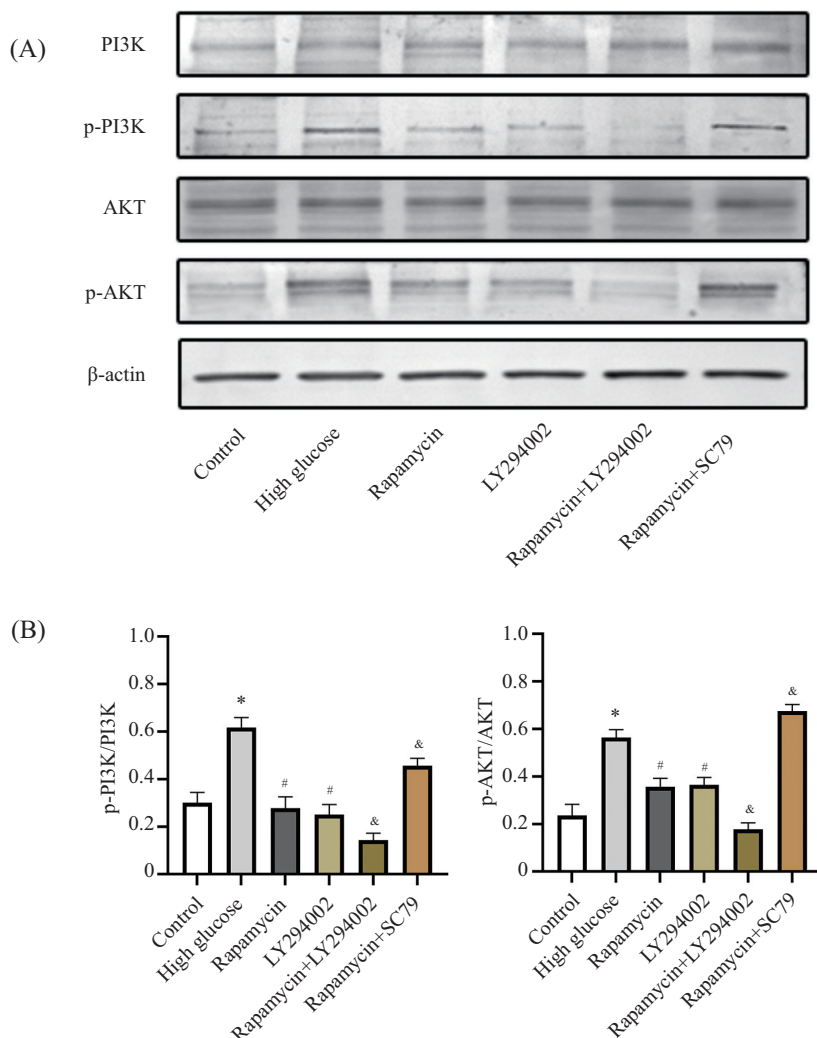
A: the expression levels of EMT related proteins in cells were detected by WB; B: EMT relative protein expression; * $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with high glucose group; & $P < 0.05$ compared with rapamycin group.

图5 WB检测雷帕霉素对D-葡萄糖诱导的HGPC细胞中EMT相关蛋白表达水平的影响

Fig.5 The effect of rapamycin on EMT-related protein expression in D-glucose-induced HGPC cells detected by WB

静脉畸形内皮细胞凋亡、抑制其增殖和迁移; LIU等^[14]发现, 雷帕霉素能有效抑制人气管成纤维细胞的增殖和迁移, 并诱导其凋亡。雷帕霉素还能够减轻高糖诱导的足细胞损伤^[15]。但雷帕霉素对高糖诱导的肾小球足细胞的作用机制仍不完全清楚, 因此, 本文

在体外利用D-葡萄糖诱导肾小球足细胞进行造模, 造模成功后利用雷帕霉素干预, 研究其对D-葡萄糖诱导的肾小球足细胞的增殖和迁移及对PI3K/AKT信号传导的调控机制, 结果发现, 与对照组相比, 高糖组D-葡萄糖诱导后细胞炎症因子IL-8和TNF- α 表达水平



A: WB检测细胞中PI3K/AKT信号通路相关蛋白表达水平; B: PI3K/AKT信号通路相关蛋白相对表达量; * $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与高糖组相比; & $P < 0.05$, 与雷帕霉素组相比。

A: the expression levels of PI3K/AKT signaling pathway related proteins in cells were detected by WB; B: relative protein expression of PI3K/AKT signaling pathway; * $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with high glucose group; & $P < 0.05$ compared with rapamycin group.

图6 WB检测雷帕霉素对D-葡萄糖诱导HGPC细胞PI3K/AKT信号通路相关蛋白表达的影响

Fig.6 The effect of rapamycin on PI3K/AKT signaling pathway expression in D-glucose-induced HGPC cells detected by WB

显著升高, 细胞活力显著降低, 表明D-葡萄糖可以诱导HGPC细胞的炎症发生, 提示模型构建成功, 且高糖组抑制了正常HGPC细胞的活力。与高糖组相比, 高浓度组IL-8和TNF- α 表达水平显著降低, 细胞活力显著升高, 说明10.0 $\mu\text{mol/L}$ 雷帕霉素可以抑制D-葡萄糖诱导的HGPC细胞炎症, 增加细胞的活力, 提示其减轻了D-葡萄糖诱导的HGPC足细胞损伤, 所以本研究选择10.0 $\mu\text{mol/L}$ 雷帕霉素进行后续的实验, 结果显示, 与对照组相比, 高糖组D-葡萄糖诱导后细胞增殖率显著降低, 细胞迁移率显著增加, 提示D-葡萄糖诱导可抑制HGPC细胞增殖, 促进其迁移, 加入10.0 $\mu\text{mol/L}$ 雷帕霉素和10.0 $\mu\text{mol/L}$ PI3K/AKT通路

抑制剂LY294002处理, 转变了HGPC细胞的增殖和迁移变化, 证明了雷帕霉素可以促进D-葡萄糖诱导的HGPC细胞的增殖、抑制其迁移, 有良好的医学应用前景。

EMT在糖尿病肾病细胞的迁移及转移中发挥重要作用, 对其间质基质沉积有显著影响^[16]。潘春勤等^[17]报道, TGF- β 抑制剂能够减少糖尿病肾病大鼠促炎因子的分泌, 抑制肾小管上皮细胞EMT的发展, 提示EMT与糖尿病肾病细胞的发展密切相关, 因此, 本文检测了EMT相关因子E-cadherin、N-cadherin、Vimentin和FN蛋白的表达水平, 结果发现, 与对照组相比, 高糖组D-葡萄糖诱导后细胞N-cadherin、

Vimentin和FN蛋白表达水平显著升高,而E-cadherin蛋白表达水平显著降低,说明D-葡萄糖诱导HGPC细胞促进了EMT进程,加入10.0 $\mu\text{mol/L}$ 雷帕霉素和10.0 $\mu\text{mol/L}$ PI3K/AKT通路抑制剂LY294002处理,显著扭转了EMT相关蛋白的表达变化趋势,提示雷帕霉素可以抑制D-葡萄糖诱导肾小球足细胞的EMT进程,以上结果说明雷帕霉素可能是通过阻断EMT抑制D-葡萄糖诱导的HGPC细胞的迁移。PI3K/AKT信号通路作为一条基础信号通路,可调节细胞增殖、迁移和糖代谢等活动,也是胰岛素主要下游的通路,与糖尿病肾病发生发展相关^[18]。OU等^[19]研究表明,黄芩苷通过抑制PI3K/AKT信号通路的活性,延缓糖尿病肾病足细胞损伤。张春晓等^[20]报道雷帕霉素可通过抑制PI3K-AKT信号通路来减轻心肌细胞损伤。但关于雷帕霉素对D-葡萄糖诱导的肾小球足细胞中PI3K/AKT信号通路的调控作用未见报道,因此本研究分析了雷帕霉素对PI3K/AKT通路相关关键蛋白的表达水平,结果显示,与对照组相比,D-葡萄糖诱导后细胞p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT蛋白表达水平显著升高,说明D-葡萄糖激活了HGPC细胞PI3K/AKT通路,此结果与OU等^[19]研究一致,但与鲁庆红等^[6]的研究相反,分析原因可能是由PI3K/AKT受到上游多种分子的调节,在不同的细胞来源及细胞培养条件下上游因子对PI3K/AKT产生的不同作用导致的。与高糖组相比,加入10.0 $\mu\text{mol/L}$ 雷帕霉素和10.0 $\mu\text{mol/L}$ PI3K/AKT通路抑制剂LY294002处理后,p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT蛋白表达水平比值显著降低,这提示雷帕霉素可能抑制了D-葡萄糖诱导的HGPC细胞中PI3K/AKT通路的信号转导。雷帕霉素抑制高糖诱导的肾小球足细胞PI3K/AKT通路的原因可能是因为抑制雷帕霉素靶蛋白(mTOR)磷酸化后,在高糖条件下,PI3K发生磷酸化,激活p-AKT和p-mTOR,而雷帕霉素作为一种mTOR的抑制剂,能够同时抑制通路中mTORC1和mTORC2的活性,其中抑制p-mTORC2的活化可以抑制AKT的磷酸化,通过核糖体蛋白S6激酶 β 1(S6K1)调控PI3K上游信号,进而导致p-PI3K水平的降低^[21],故而阻断了PI3K/AKT信号通路的转导。本研究进一步在雷帕霉素组中加入PI3K/AKT信号通路抑制剂LY294002和激动剂SC79分别作为雷帕霉素+LY294002组和雷帕霉素+SC79组进行PI3K/AKT通路验证实验,发现与雷帕霉素组相比,雷帕霉素+LY294002组细胞增殖率和E-cadherin

蛋白表达水平显著增加,细胞迁移率和N-cadherin、Vimentin、FN、p-PI3K/PI3K及p-AKT/AKT蛋白表达显著降低,雷帕霉素+SC79组结果趋势与雷帕霉素+LY294002组相反,提示雷帕霉素可能是通过阻断PI3K/AKT信号通路抑制EMT进程进而促进细胞的增殖、抑制细胞迁移的。

综上所述,雷帕霉素可通过抑制EMT进程,促进D-葡萄糖诱导的人肾小球足细胞HGPC细胞增殖、抑制其迁移,其作用机制可能与抑制PI3K/AKT信号通路的活化有关。本研究从细胞增殖和迁移方面揭示了雷帕霉素对D-葡萄糖诱导的人肾小球足细胞系HGPC中的作用,证实了PI3K/AKT信号通路可以介导D-葡萄糖诱导的肾小球足细胞的增殖和迁移机制,但是否存在其他通路调控机制参与其生物学过程以及是何种基因启动诱发细胞的增殖和迁移有待进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] SAMSU N. Diabetic nephropathy: challenges in pathogenesis, diagnosis, and treatment [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 1497449.
- [2] SELVARANI R, MOHAMMED S, RICHARDSON A. Effect of rapamycin on aging and age-related diseases-past and future [J]. Geroscience, 2021, 43(3): 1135-58.
- [3] GAO X, ZHANG T, ZENG X Y, et al. Effect of silencing lncRNATUG1 on rapamycin-induced inhibition of endothelial cell proliferation and migration [J]. Exp Ther Med, 2018, 16(3): 1891-9.
- [4] WANG J, XU Z, CHEN B, et al. The role of sirolimus in proteinuria in diabetic nephropathy rats [J]. Iran J Basic Med Sci, 2017, 20(12): 1339-44.
- [5] WANG J, FU D, SENOUTHAI S, et al. Critical roles of PI3K/Akt/NF κ B survival axis in angiotensin II induced podocyte injury [J]. Mol Med Rep, 2019, 20(6): 5134-44.
- [6] 鲁庆红, 李益明, 王志芳, 等. 香豆素苷通过PI3K/AKT/mTOR通路保护糖尿病肾病大鼠足细胞损伤的机制研究[J]. 医学分子生物学杂志(LU Q H, LI Y M, WANG Z F, et al. Coumarin glycosides protects podocyte injury in diabetic nephropathy rats through PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Journal of Medical Molecular Biology), 2022, 19(2): 151-6.
- [7] 成芳, 涂珍珍, 周利利, 等. 雷帕霉素对肾小管上皮细胞生物学行为的影响及其治疗糖尿病肾病分子机制的初步研究[J]. 安徽医科大学学报(CHENG F, TU Z Z, ZHOU L L, et al. On rapamycin regulating biological behaviours of renal tubular epithelial cells and its potential mechanisms related to treatment for diabetic nephropathy [J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui), 2017, 52(1): 1-6.
- [8] LIU T, LIANG X, SUN Y, et al. Rapamycin suppresses the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway by targeting SIRT1 in esophageal cancer [J]. Exp Ther Med, 2021, 22(4): 1190.
- [9] FASELIS C, KATSIMARDOU A, IMPRIALOS K, et al. Micro-

- vascular complications of type 2 diabetes mellitus [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2020, 18(2): 117-24.
- [10] KOYE D N, MAGLIANO D J, NELSON R G, et al. The global epidemiology of diabetes and kidney disease [J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2018, 25(2): 121-32.
- [11] 金山祥, 马林, 韩笑. 高糖刺激对人足细胞 miR-34a 和相关蛋白表达的影响[J]. *解剖科学进展*(JIN S X, MA L, HAN X. The effect of high glucose on human podocyte injury via regulating miR-34a and Notch pathway [J]. *Progress of Anatomical Sciences*), 2019, 25(5): 570-4.
- [12] 吴加东, 王爱飞, 徐又佳, 等. 雷帕霉素药理作用的研究进展[J]. *医药导报*(WU J D, WANG A F, XU Y J, et al. Research progress of pharmacological action of rapamycin [J]. *Herald of Medicine*), 2022, 41(1): 99-102.
- [13] SI Y, CHU H, ZHU W, et al. Concentration-dependent effects of rapamycin on proliferation, migration and apoptosis of endothelial cells in human venous malformation [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(6): 4595-601.
- [14] LIU Y, ZHANG J, LONG J, et al. The effects of rapamycin on the proliferation, migration, and apoptosis of human tracheal fibroblasts (HTrF) and human tracheal epithelial cells (HTEpiC) [J]. *J Clin Med*, 2022, 11(3): 608.
- [15] 丁瑞, 张月, 余丹霞, 等. 雷帕霉素通过调节 mTOR-ULK1 信号通路减轻高糖诱导的足细胞损伤[J]. *中华肾病研究电子杂志*(DING R, ZHANG Y, YU D X, et al. Rapamycin alleviated podocyte injury induced by high glucose via regulation of mTOR-ULK1 signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Kidney Disease Investigation*), 2020, 9(5): 207-10.
- [16] LI Y, HU Q, LI C, et al. PTEN-induced partial epithelial-mesenchymal transition drives diabetic kidney disease [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(3): 1129-51.
- [17] 潘春勤, 周学才, 杜鹏举, 等. TGF- β /Smad/RUNX3 信号通路在糖尿病肾病大鼠肾小管上皮细胞 EMT 过程中的作用[J]. *西部医学*(PAN C Q, ZHOU X C, DU P J, et al. The role of TGF- β /Smad/RUNX3 signaling pathway in the EMT process of renal tubule epithelial cells in diabetic nephropathy rats [J]. *Medical Journal of West China*), 2021, 33(10): 1423-27,35.
- [18] HUANG X, LIU G, GUO J, et al. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(11): 1483-96.
- [19] OU Y, ZHANG W, CHEN S, et al. Baicalin improves podocyte injury in rats with diabetic nephropathy by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Open Med*, 2021, 16(1): 1286-98.
- [20] 张春晓, 栾红, 陈玉东, 等. 雷帕霉素调控 PI3K-AKT-mTOR 信号通路对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. *中国慢性病预防与控制*(ZHANG C X, LUAN H, CHEN Y D, et al. Effects of rapamycin on PI3K-AKT-mTOR signaling pathway on myocardial cell apoptosis in rats with heart failure [J]. *Chinese Journal of Prevention and Control of Chronic Diseases*), 2020, 28(5): 371-4.
- [21] SOULARD A, HALL M N. Snapshot: mTOR signaling [J]. *Cell*, 2007, 129(2): e1-434.