

低氧、高糖环境对肾脏足细胞焦亡相关机制的研究

孟智敏¹,刘川川²,计亚亚³,朱青³,尹凤娇³,张瑞霞¹,巴应贵⁴

摘要 目的 探讨低氧、高糖单因素和低氧高糖复合因素对大鼠肾小球足细胞焦亡的影响。方法 体外培养大鼠肾小球足细胞,随机分为对照组、高糖组、低氧组及低氧高糖组,EdU 法检测各组细胞增殖情况,透射电镜观察细胞核与线粒体形态及大小的变化,Western blot 法检测焦亡相关蛋白核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)、消皮素 D(GSDMD)及炎症因子白细胞介素-1 β 前体(Pro-IL-1 β)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-18 的表达水平,分析低氧和高糖环境对大鼠肾小球足细胞焦亡的影响。结果 EdU 结果显示低氧和高糖抑制了大鼠肾小球足细胞的增殖能力($P < 0.05$)。透射电镜结果提示低氧和高糖条件促进大鼠肾小球足细胞焦亡的发生。Western blot 显示低氧和高糖条件促进大鼠肾小球足细胞焦亡,使焦亡相关蛋白 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 的表达增加,其中低氧高糖组焦亡蛋白的表达量增加最为显著($P < 0.05$)。同时也促使炎症因子 Pro-IL-1 β 、IL-1 β 、IL-18 的表达增加($P < 0.05$)。结论 低氧、高糖条件可诱导大鼠肾小球足细胞发生焦亡,其中的机制之一可能是通过影响 NLRP3-Caspase-1-GSDMD 及其下游炎症因子而发挥作用。

关键词 低氧;高糖;足细胞;NLRP3;细胞焦亡

中图分类号 R 589.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)11-1916-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.019

糖尿病肾病已成为终末期肾病的主要病因,也是糖尿病患者中最严重的并发症之一,对人们的健康构成了极大的威胁^[1]。青海地区属于中国糖尿病肾病的高发地区之一,而本地区高原低氧环境对该病的病理特征有明显影响。有研究^[2]表明,糖尿病肾病患者的肾脏足细胞数量显著减少。足细胞焦亡是糖尿病肾病炎症性足细胞损伤的主要形式之

一,而且与糖尿病肾病进展至终末期肾病密切相关^[3]。抑制足细胞损伤是预防糖尿病肾病蛋白尿和肾小球硬化的关键^[4]。因此,探索细胞焦亡在足细胞损伤中的发生机制以采取有效的措施去减少足细胞损伤,从而减缓糖尿病肾病的发展,该研究将以此为切入点进行实验设计。

1 材料与方法

1.1 材料 大鼠肾小球足细胞购自北京 BNCC 公司,DMEM 低糖培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、细胞裂解液购自武汉 PROCELL 公司,D-无水葡萄糖购自北京索莱宝公司,BCA 蛋白定量试剂盒、ECL 发光液购自美国 Thermo Scientific 公司,PVDF 膜购自美国 Millipore 生物公司,核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(cysteiny aspartate specific proteinase-1, Caspase-1)、消皮素 D(gasdermin, GSDMD)、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-18 一抗购自武汉 ABclonal 公司,CCK-8 试剂盒购自武汉 Elabscience 公司,EdU 试剂盒购自上海碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养及干预 将大鼠足细胞复苏后用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液于 37 °C 含 5% CO₂ 的培养箱中培养,当细胞贴满培养皿底部 80%~90% 时即可进行传代,进行干预培养。将大鼠足细胞随机分为 4 组,正常对照组(NC 组):21% 氧浓度,5.5 mmol/L D-葡萄糖;高糖组(HG 组):21% 氧浓度,30 mmol/L D-葡萄糖;低氧组(HO 组):1% 氧浓度,5.5 mmol/L D-葡萄糖;低氧高糖组(HOHG 组):1% 氧浓度,30 mmol/L D-葡萄糖。

1.2.2 EdU 法检测细胞增殖情况 将细胞接种于 24 孔细胞培养板,放入培养箱中,每组 3 个复孔进行干预培养。在 48 h 后,按照 EdU 说明书的指示,将终浓度为 10 μ mol/L 的 EdU 添加到每个孔中,并将其放入培养箱中继续培养,2 h 后取出,按照说明书的步骤进行后续操作。在荧光显微镜下,随机抽取 6 个不同视野做样本,并对每组细胞进行拍照,以

2023-07-04 接收

基金项目:青海省科技计划项目(编号:2022-ZJ-763)

作者单位:¹青海大学附属医院内分泌科、²青海大学高原医学研究中心、³青海大学研究生院、⁴青海大学附属医院肾内科,西宁 810001

作者简介:孟智敏,女,硕士研究生;

张瑞霞,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: qhzrx@126.com;

巴应贵,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: bayingui@163.com

计算出阳性细胞在总细胞中的比例,将其各组进行比较。

1.2.3 透射电镜下观察细胞器的改变 细胞经不同条件处理后,收集细胞沉淀,经 PBS 缓冲液洗涤 2 次后,10 000 r/min 离心 5 min 后去上清液,于细胞沉淀中加入 1.5 ml 2.5% 戊二醛缓冲液 (pH = 7.25),4 ℃ 固定 24 h。接下来用 1% 锇酸溶液固定细胞 2 h。洗涤后,用 1% 醋酸锂溶液处理 30 min。之后使用无菌去离子水清洗,在连续梯度的乙醇中进行彻底脱水 3 次后进行渗透和包埋。使用高精度的超薄切片机进行切割,使用醋酸铀和枸橼酸铅染色后在透射电镜下观察并拍照。

1.2.4 蛋白质印记分析 收集细胞,冰上裂解 30 min,通过 BCA 蛋白定量试剂盒对蛋白样品的具体浓度进行检测。将制备好的蛋白样品进行电泳、转膜。转膜结束后取出 PVDF 膜,配置 5% 的脱脂牛奶,将 PVDF 膜正面朝上室温封闭 1 h。TBST 清洗 3 遍后将 PVDF 膜与 NLRP3 (1 : 1 000)、Caspase-1 (1 : 1 500)、GSDMD (1 : 1 500)、Pro-IL-1 β (1 : 1 500)、IL-1 β (1 : 1 500)、IL-18 (1 : 1 500) 和 β -actin (1 : 1 000) 抗体在 4 ℃ 冰箱中进行孵育过夜。TBST 清洗 3 次。将 PVDF 膜与 HRP Goat anti-Rabbit IgG (1 : 5 000) 室温孵育 1 h。TBST 清洗 3 次。暗室条件下,将孵育好的 PVDF 膜平铺于显色板,滴加 ECL 显影剂,使用化学发光仪进行印记检测。

1.3 统计学处理 结果采用 SPSS 21.0 进行统计学分析,实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。每组实验至少重复 3 次,统计显著性用单因素方差分

析 (One-way ANOVA),组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EdU 检测细胞增殖 为明确大鼠肾小球足细胞增殖情况,于高糖、低氧等不同条件下培养大鼠肾小球足细胞,使用 EdU 染色法对大鼠肾小球足细胞进行染色。结果显示,与 NC 组相比,HG 组、HO 组及 HOHG 组的肾小球足细胞增殖能力明显下降,差异有统计学意义 ($F = 13.45, P < 0.05$)。见图 1。

2.2 电镜观察细胞超微结构 透射电镜结果显示高糖低氧环境均使大鼠肾小球足细胞形态结构出现异常。细胞核 (N) 呈不规则形;部分线粒体 (Mi) 出现肿胀;部分粗面内质网 (RER) 扩张呈囊状;高尔基体扩张;胞质中出现自噬和空泡;细胞膜受损,表面有微绒毛,焦亡趋势明显,其中组间比较结果显示 HOHG 组出现自噬和空泡数量更多,焦亡情况更明显。提示低氧、高糖、低氧联合高糖条件促进大鼠肾小球足细胞焦亡的发生。见图 2。

2.3 细胞焦亡相关蛋白的表达水平

2.3.1 NLRP3-Caspase-1-GSDMD 信号通路蛋白的表达水平 各组干预处理 48 h 后,用 Western blot 技术检测 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白的表达情况。结果显示,与 NC 组相比,HG 组、HO 组及 HOHG 组 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 的蛋白表达水平出现明显上调,其中 HOHG 组蛋白的表达量增加最为显著,差异有统计学意义 ($F = 16.27, P < 0.05; F = 32.64, P < 0.05; F = 44.51, P < 0.05$)。见图 3。

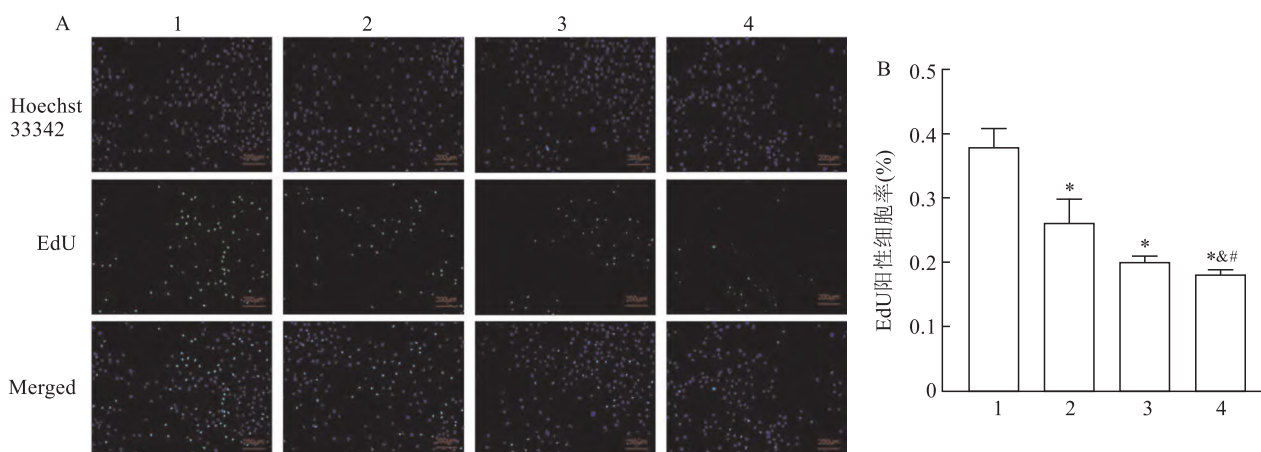


图 1 EdU 检测细胞增殖

A: EdU 检测细胞增殖荧光图 $\times 100$; B: 细胞增殖情况分析直方图; 1: NC 组; 2: HG 组; 3: HO 组; 4: HOHG 组; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$; 与 HG 组比较: &# $P < 0.05$; 与 HO 组比较: # $P < 0.05$

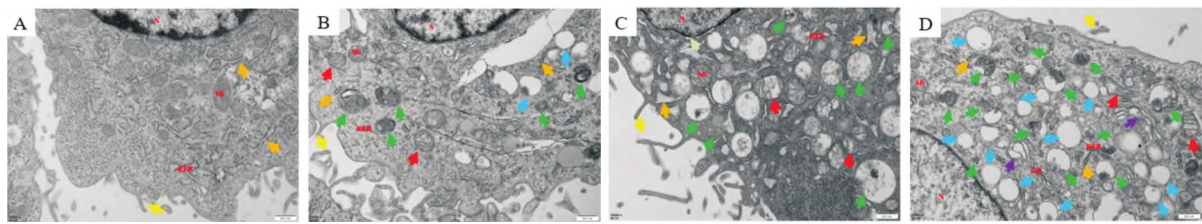


图2 电镜下观察细胞超微结构变化 ×25 000

A: NC 组细胞核及细胞器的形态结构; B: HG 组细胞核及细胞器的形态结构; C: HO 组细胞核及细胞器的形态结构; D: HOHG 组细胞核及细胞器的形态结构; ↑: 线粒体肿胀; ↑: 粗面内扩张; ↑: 高尔基体扩张; ↑: 核周隙增宽; ↑: 自噬; ↑: 空泡; ↑: 微绒毛

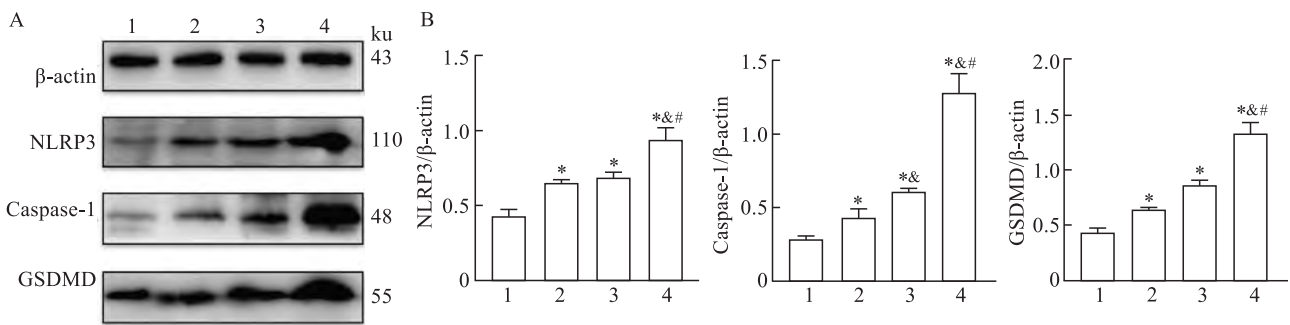


图3 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达情况

A: NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白印记图; B: NLRP3、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达情况分析直方图; 1: NC 组; 2: HG 组; 3: HO 组; 4: HOHG 组; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$; 与 HG 组比较: $\&P < 0.05$; 与 HO 组比较: # $P < 0.05$

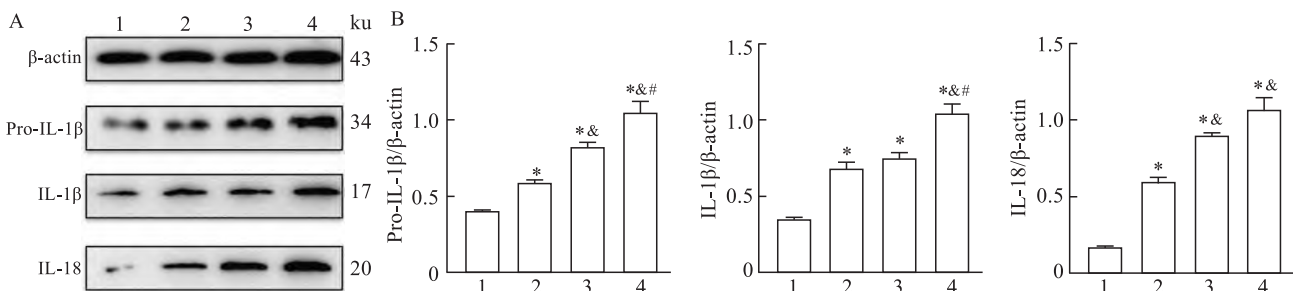


图4 IL-1β、IL-18 蛋白表达情况

A: Pro-IL-1β、IL-1β、IL-18 蛋白印记图; B: Pro-IL-1β、IL-1β、IL-18 蛋白表达情况分析直方图; 1: NC 组; 2: HG 组; 3: HO 组; 4: HOHG 组; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$; 与 HG 组比较: $\&P < 0.05$; 与 HO 组比较: # $P < 0.05$

2.3.2 Pro-IL-1β、IL-1β、IL-18 蛋白表达水平 各组干预处理 48 h 后,用 Western blot 技术检测 Pro-IL-1β、IL-1β、IL-18 蛋白的表达情况。结果显示,与 NC 组相比,HG 组、HO 组及 HOHG 组 Pro-IL-1β、IL-1β、IL-18 的蛋白表达水平出现明显上调,其中 HOHG 组蛋白的表达量增加最为显著,差异有统计学意义($F = 41.09, P < 0.05$; $F = 34.33, P < 0.05$; $F = 68.93, P < 0.05$)。见图 4。

3 讨论

有研究^[5]表明高原地区 2 型糖尿病肾病早期即

会出现明显的蛋白尿、血尿,后期肾小球滤过率急剧下降并发症多且严重。在高原地区,最显著的地域特征是低氧环境,这种环境会导致缺氧诱导因子的表达增加,进而影响葡萄糖摄取和糖酵解等代谢过程,以产生低氧适应。此外,糖尿病肾病患者体内的高糖环境也会通过多种途径上调缺氧诱导因子的表达,进而加速糖尿病肾病的发展^[6]。长期慢性低氧会导致肾纤维化、糖尿病肾病、高血压肾病等^[7]。

足细胞内的炎症反应是足细胞损伤发生的典型机制^[8]。足细胞损伤和糖尿病肾病关系密切,其中 NLRP3 炎症小体对促炎因子的作用在其中发挥关

键作用,NLRP3 的激活会加速糖尿病肾病患者的肾损伤^[9]。国外有研究^[10]表明足细胞容易受到各种有害刺激影响,包括缺氧。在该研究中,同样也可以表明与对照组相比,低氧组、高糖组、低氧高糖组都出现了焦亡相关蛋白表达的增加,另外研究表明相比较低氧高糖单因素,低氧高糖复合因素对细胞的影响更为明显。国外有研究^[11]表明,糖尿病肾病患者肾脏足细胞中 Caspase 的表达水平和 GSDMD 的裂解水平显著升高,同时伴有足突消失和融合以及炎症细胞因子增加。结果显示,Caspase 和 GSDMD 介导的细胞焦亡被激活并参与高血糖条件下的足细胞丢失和糖尿病肾病的发展。这与该研究一致,在该研究中,相比较对照组,低氧组和高糖组中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 的表达显著增加,尤其低氧高糖复合因素对足细胞损伤最明显,焦亡相关蛋白的表达增加更为显著。

该研究表明,高糖和低氧双重因素都可促进 IL-1 β 炎症因子的表达。IL-1 β 是一种强大的促炎细胞因子,可促进宿主的免疫反应,进而有效地抵抗外界的感染和损伤,其前体形式 Pro-IL-1 β 是一种无活性的物质,低氧时 Caspase-1 表达增高其可通过切割 Pro-IL-1 β 使其成为成熟的 IL-1 β ,成熟后的 IL-1 β 会从细胞中迅速分泌^[12]。IL-18 具有与 IL-1 β 相似的空间结构和胞内信号转导系统,也是参与细胞焦亡的重要炎症因子。国外有研究^[13]表明低氧应激通过激活 NLRP3 使 Caspase-1、GSDMD 显著增加进而促使炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-18 显著增加,是促使细胞焦亡的重要因素,这与该研究一致。

该实验通过电镜观察到自噬现象增多包括线粒体自噬。线粒体自噬作为一种应对线粒体损伤的应激反应机制,可以被诱导出现在各种病理过程中,例如氧化应激、低氧和炎症^[14]。有研究^[15]显示高葡萄糖可通过诱导细胞中的氧化应激和线粒体损伤抑制细胞的增殖并促进细胞凋亡和自噬的发生。此外还有研究^[16]表明,NLRP3 激活可诱导线粒体损伤,导致其 Parkin 依赖性线粒体自噬。线粒体自噬会通过产生大量的 mtROS 诱导 NLRP3 激活^[17]。NLRP3、Caspase-1 可引起细胞焦亡导致线粒体损伤,损伤的线粒体可被线粒体自噬消除使线粒体自噬增多,说明线粒体自噬和细胞焦亡相互作用,线粒体自噬可代偿细胞焦亡引起的线粒体损伤。

该研究表明低氧联合高糖环境对大鼠肾小球足细胞焦亡的发生有一定的影响。低氧联合高糖条件可激活 NLRP3-Caspase-1-GSDMD 信号通路蛋白表

达,结合 EdU 结果,提示了细胞焦亡参与高糖及低氧诱导的足细胞损伤。造成这一结果可能与多种因素相关,结合电镜结果,对于该信号通路与足细胞损伤的关系,该课题组趋向于低氧、高糖条件通过该信号通路促使足细胞发生焦亡现象。由此可见,是否可以通过调控细胞焦亡延缓糖尿病肾病病程进展,可以作为之后研究的方向,细胞焦亡使足细胞损伤在糖尿病肾病合并低氧环境的发病机制中具有重要作用,在未来,调控 NLRP3-Caspase-1-GSDMD 信号通路减少足细胞损伤可能为糖尿病肾病的防治提供新的治疗策略和靶点。

参考文献

- [1] Podgórski P, Konieczny A, Lis Ł, et al. Glomerular podocytes in diabetic renal disease [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2019, 28 (12): 1711 - 5.
- [2] Dai H, Liu Q, Liu B. Research progress on mechanism of podocyte depletion in diabetic nephropathy [J]. *J Diabetes Res*, 2017, 2017: 2615286.
- [3] Lin J, Cheng A, Cheng K, et al. New insights into the mechanisms of pyroptosis and implications for diabetic kidney disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (19): 7057.
- [4] Sankrityayan H, Kulkarni Y A, Gaikwad A B. Diabetic nephropathy: the regulatory interplay between epigenetics and microRNAs [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 141: 574 - 85.
- [5] 李海英,朱润生. 西藏地区糖尿病肾病临床特点分析 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2008, 24 (2): 115 - 8.
- [6] 杜小红. 缺氧诱导因子与糖尿病肾病 [J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2018, 27 (2): 178 - 81.
- [7] 党佳蓉,党琳慧,郭煦妍,等. 糖尿病肾病的发病机制研究 [J]. *医学信息*, 2022, 35 (17): 161 - 5.
- [8] Yan R, Zhang Y, Yang Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gene knockout promotes podocyte injury in diabetic mice [J]. *Biomed Research International*, 2022, 2022 (3): 9018379.
- [9] Shahzad K, Fatima S, Khawaja H, et al. Podocyte-specific Nlrp3 inflammasome activation promotes diabetic kidney disease [J]. *Kidney International*, 2022, 102 (4): 766 - 79.
- [10] Kolligundla L P, Kavvuri R, Singh A K, et al. Metformin prevents hypoxia-induced podocyte injury by regulating the ZEB2/TG2 axis [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2023, 28 (1): 60 - 71.
- [11] Cheng Q, Pan J, Zhou Z L, et al. Caspase-11/4 and gasdermin D-mediated pyroptosis contributes to podocyte injury in mouse diabetic nephropathy [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42 (6): 954 - 63.
- [12] Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011, 22 (4): 189 - 95.
- [13] Xin X, Yang K, Liu H, et al. Hypobaric hypoxia triggers pyroptosis in the retina via NLRP3 inflammasome activation [J]. *Apoptosis*, 2022, 27 (3 - 4): 222 - 32.

- [14] Xiong H, Chen S, Lai L, et al. Modulation of miR-34a/SIRT1 signaling protects cochlear hair cells against oxidative stress and delays age-related hearing loss through coordinated regulation of mitophagy and mitochondrial biogenesis [J]. *Neurobiol Aging*, 2019,79;30-42.
- [15] Zhang P, Liao J, Wang X, et al. High glucose promotes apoptosis and autophagy of MC3T3-E1 osteoblasts[J]. *Arch Med Sci*,2020, 19(1):138-50.
- [16] Zhong Z, Umemura A, Sanchez-Lopez E, et al. NF-kappaB restricts inflammasome activation *via* elimination of damaged mitochondria[J]. *Cell*,2016,164(5):896-910.
- [17] Zhang X, Zeng W, Zhang Y, et al. Focus on the role of mitochondria in NLRP3 inflammasome activation: a prospective target for the treatment of ischemic stroke[J]. *Int J Mol Med*,2022,49(6):74.

Study on the mechanism of a pyroptosis of renal podocytes in hypoxia and high glucose environment

Meng Zhimin¹, Liu Chuanchuan², Ji Yaya³, Zhu Qing³, Yin Fengjiao³, Zhang Ruixia¹, Ba Yinggui⁴

(¹*Dept of Endocrinology, Affiliated Hospital of Qinghai University,* ²*Qinghai University*

High Altitude Medical Research Center, ³*Graduate School of Qinghai University,*

⁴*Dept of Nephrology, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001*)

Abstract Objective To investigate the effects of hypoxia, high glucose single factor and hypoxia high glucose compound factors on the pyroptosis of rat glomerular podocytes. **Methods** Rat glomerular podocytes were cultured *in vitro* and randomly divided into control group, high glucose group, hypoxia group and hypoxia high glucose group, EdU method was used to detect the cell proliferation, transmission electron microscope was used to observe the morphology and size changes of nucleus and mitochondria, and Western blot was used to detect pyroptosis related proteins nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3), Cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (Caspase-1), gasdermin (GSDMD) and inflammatory factor pro-interleukin-1 β (Pro-IL-1 β), interleukin (IL)-1 β , IL-18. The effect of hypoxia and high glucose on the pyroptosis of rat glomerular podocytes was analyzed. **Results** EdU results showed that hypoxia and high glucose inhibited the proliferation ability of rat glomerular podocytes ($P < 0.05$). The results of transmission electron microscopy suggested that hypoxia and high glucose promoted the occurrence of pyroptosis of rat glomerular podocytes. Western blot showed that hypoxia and high glucose promoted pyroptosis of rat glomerular podocytes, and increased the expression of pyroptosis related proteins NLRP3, Caspase-1 and GSDMD, among which the expression of pyroptosis protein increased most significantly in hypoxia and high glucose group ($P < 0.05$). At the same time, it also increased the expression of pro-inflammatory factor Pro-IL-1 β , IL-1 β and IL-18 ($P < 0.05$). **Conclusion** hypoxia and high glucose can induce pyroptosis of rat glomerular podocytes, one of the mechanisms may be through affecting NLRP3-Caspase-1-GSDMD and its downstream inflammatory factors.

Key words hypoxia; high glucose; podocyte; NLRP3; pyroptosis