

激活核因子 E2 相关因子 2 信号通路减轻高糖诱导足细胞的凋亡

李翠翠, 叶增纯, 龚文玉, 彭 晖, 娄探奇, 王 成*

(中山大学附属第三医院 肾脏内科, 广东 广州 510630)

摘 要: 【目的】探讨激活核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)通路能否减轻高糖诱导足细胞的凋亡。【方法】体外培养小鼠足细胞,分为 5 组:对照组、高渗组、高糖组、高糖+叔丁基对苯二酚(tBHQ)、高糖+N-乙酰半胱氨酸(NAC)。流式细胞仪检测细胞内活性氧和凋亡;Western blot 及 real time-PCR 检测 Nrf2、醌氧化还原酶 1(NQO1)、血红素加氧酶(HO-1)的表达;检测足细胞丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)及过氧化氢酶(CAT)。【结果】高糖组足细胞凋亡率、活性氧及细胞 MDA 高于对照组($P < 0.05$),而该组足细胞 SOD、GSH 及 CAT 低于对照组($P < 0.05$);高糖+NAC 组的足细胞凋亡率、活性氧及细胞内丙二醛低于高糖组($P < 0.05$);高糖+tBHQ 组足细胞的总 Nrf2 及核 Nrf2、HO-1、NQO1 的表达高于高糖组($P < 0.05$),细胞内 SOD、GSH 及 CAT 高于高糖组($P < 0.05$),高糖+tBHQ 组足细胞的凋亡率、活性氧及细胞内丙二醛低于高糖组($P < 0.05$)。【结论】激活 Nrf2 通路降低高糖诱导足细胞的氧化应激,减轻足细胞凋亡。

关键词:核因子 E2 相关因子 2;足细胞;氧化应激

中图分类号:R587.2

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2013)06-0831-07

Activation of Nuclear Factor Erythroid-2 Related Factor Signal Pathway Reduced Apoptosis in Podocyte Induced by High Glucose

LI Cui-cui, YE Zeng-chun, GONG Wen-yu, PENG Hui, LOU Tan-qi, WANG Cheng*

(Department of Nephrology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】To investigate whether activation of nuclear factor erythroid-2 related factor (Nrf2) signal pathway reduced apoptosis in podocyte induced by high glucose. 【Methods】Cultured mouse podocytes were divided into five groups: normal glucose (NG), mannitol group (MA), high glucose+ tert-Butyl-hydroquinone group (HG+tBHQ) and high glucose+N-acetylcysteine (HG+NAC). Reactive oxygen species (ROS) and apoptotic rate in podocytes were assessed by flow cytometry. The expression of Nrf2, quinone oxidoreductase-1 (NQO1) and hemeoxygenase-1 (HO-1) in podocytes were measured by Western blot and real time PCR, what's more, the levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH) and catalase (CAT) in podocytes were measured at the same time. 【Results】The apoptotic rate, ROS and MDA levels in podocytes exposed high glucose were higher than podocytes in NG group ($P < 0.05$), while the levels of SOD, GSH, and CAT in these podocytes were lower than podocytes in NG group ($P < 0.05$). The apoptotic rate, ROS and MDA levels of podocytes in HG+NAC group were lower than podocytes from HG group ($P < 0.05$). The expression of total Nrf2, nuclear Nrf2, NQO1 and HO-1 in podocytes from HG+tBHQ group were significantly increased than podocytes in HG group ($P < 0.05$), and the levels of SOD, GSH and CAT in podocytes from HG+tBHQ group were higher than podocytes in HG group ($P < 0.05$), what's more, the apoptotic rate, ROS and MDA levels in podocytes from HG+tBHQ group were lower than podocytes in HG group ($P < 0.05$). 【Conclusion】Activation of Nrf2 signal pathway could alleviate oxidative stress and reduce apoptosis in podocytes induced by high glucose.

Key words: nuclear factor erythroid-2 related factor; podocyte; oxidative stress

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(6):831-837]

收稿日期:2013-07-30

基金项目:中山大学附属第三医院杰出青年后备人才培养计划支持项目

作者简介:李翠翠,硕士研究生,研究方向:糖尿病肾病,E-mail:hnlicuicui@126.com; * 通信作者:王成,医学博士,副主任医师,E-mail:wczg@medmail.com.cn

糖尿病发病率逐年上升,我国已经成为全球糖尿病患者最多的国家^[1]。高达 40% 的糖尿病患者会出现肾损伤,即糖尿病肾脏病(diabetic kidney disease,DKD),DKD 是糖尿病患者致死和致残的主要原因,其防治需要消耗大量的资金和卫生资源^[2]。高血糖是糖尿病最基本的病理生理改变,是 DKD 发生和发展的最基本因素^[3]。足细胞损伤是早期 DKD 的重要标志,显著的足细胞损伤促进 DKD 的发生和发展^[4]。凋亡是足细胞损伤重要机制之一^[5]。氧化应激是高糖引起的肾损伤发生和发展的关键因素,在糖尿病及其微血管并发症的发生和发展中起关键作用^[6]。核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid-2 related factor, Nrf-2)是内源性抗氧化应激的重要调控因子,激活抗氧化组分(antioxidant response element,ARE)的相关基因,调控 100 多种抗氧化和 2 期解毒酶的表达,发挥生物学效应^[7]。据此,我们设想激活 NRF-2-ARE 通路可减轻高糖诱导足细胞氧化应激,减轻足细胞的凋亡。

1 材料与方法

1.1 小鼠肾小球足细胞培养

小鼠足细胞由中山大学附属第一医院余学清教授惠赠,实验使用 10~18 代细胞,使用 100 mL/L 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI 1640 培养基(Gibco BRL),具体培养方法同前^[8]。

1.2 实验分组

将细胞分为 5 组:正常组(Normal glucose, NG 组),足细胞与 5 mmol/L 葡萄糖培养;高渗组(mannitol, MA 组),足细胞与 5 mmol/L 葡萄糖+25 mmol/L 甘露醇培养;高糖组(high glucose, HG 组),足细胞与 30 mmol/L 葡萄糖;高糖+叔丁基对苯二酚组(tert-Butyl-hydroquinone, tBHQ)(HG+tBHQ 组),20 μ mol/L tBHQ 预处理足细胞 4 h,而后加入 30 mmol/L 葡萄糖;高糖+N-乙酰半胱氨酸组(N-acetylcysteine, NAC)(HG+NAC 组),10 mmol/L NAC 预处理足细胞 4 h,而后加入 30 mmol/L 葡萄糖,其中 tBHQ 为 Nrf-2 的激动剂, NAC 是抗氧化剂。

1.3 细胞内活性氧的检测

细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)

的生成量采用荧光探针 DCFDA(Sigma)检测。细胞收集后悬浮于稀释好的 DCFDA 中,37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱内孵育 20 min,用 PBS 洗涤细胞 3 次,流式细胞仪测定荧光值。

1.4 细胞凋亡检测

流式细胞仪检测细胞凋亡(Annexin-FITC apoptosis detection kit I; BD Biosciences),缓冲液重悬细胞,调整细胞数量为 1×10^6 /mL。取 100 μ L 加入流式管,再分别加入 5 μ L Annexin V-FITC (AV)和 5 μ L 碘化丙啶(Propidium Iodide, PI),轻微振荡,于室温避光孵育 15 min,之后再加入 400 μ L 结合缓冲液,流式细胞仪检测细胞凋亡。AV(-)和 PI(-)为活体细胞,AV(-)和 PI(+)为坏死细胞,AV(+)和 PI(-)为早期凋亡细胞,AV(+)和 PI(+)为晚期凋亡细胞,足细胞凋亡的评价是早期凋亡加晚期凋亡^[8]。

1.5 Western blot 检测

提取总蛋白和核蛋白,SDS-PAGE 凝胶电泳后,转膜,封闭,分别加入抗激活核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid-2 related factor, Nrf-2)(1:500, Santa Cruz Biotechnology),醌氧化还原酶 1(quinone oxidoreductase-1, NQO1)(1:1 000, Abcam),血红素加氧酶(hemeoxygenase-1, HO-1)和 Lamin B1(1:1 000, Cell Signaling Technology), GAPDH(1:10 000, ProteinTech Group),加入辣根过氧化酶标记的羊抗兔 IgG(1:40 000 稀释),曝光,显片。

1.6 Real Time PCR 检测

各组细胞提取 RNA,逆转录,加入相应引物(表 1),PCR 使用 ABI PRISM 7500 Fast Real-Time PCR System(Applied Biosystems)和 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II(Perfect Real time TaKaRa)进行。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of Primers

Name	Sequence(5'→3')	Length /bp
Nrf2	Sense TTTTCCATTCCCGAATTACAGT	130
	Antisense AGGAGATCGATGAGTAAAAATCGT	
HO-1	Sense CGTGCTCGAATGAACACTCT	286
	Antisense GGAAGCTGAGAGTGAGGACC	
NQO1	Sense CAAGTTTGGCCTCTCTGTGG	111
	Antisense AAGCTGCGTCTAACTATATGT	
GAPDH	Sense TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	150
	Antisense TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	

1.7 其他指标的检测

检测细胞内丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 及过氧化氢酶 (catalase, CAT) (南京凯基生物工程有限公司), 操作按相应说明书进行。

1.8 统计学分析

所有数据用均数 ± 标准差表示, 计量资料比较采用方差分析, 计数资料使用卡方检验, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计。

2 结 果

2.1 足细胞凋亡率的比较

高糖可诱导足细胞凋亡, 该组细胞的凋亡率是 NG 组的 4.58 倍 ($P < 0.05$); HG+tBHQ 组足细

胞凋亡率是 NG 组的 2.88 倍 ($P < 0.05$), 低于 HG 组 ($P < 0.05$); HG+NAC 组足细胞凋亡率是 NG 组 2.96 倍 ($P < 0.05$), 低于 HG 组 ($P < 0.05$, 图 1)。

2.2 足细胞 ROS 的比较

高糖可升高足细胞的 ROS, 该组的足细胞 ROS 为 NG 组的 3.05 倍 ($P < 0.05$); HG+tBHQ 组足细胞 ROS 是 NG 组的 1.66 倍 ($P < 0.05$), 低于 HG 组 ($P < 0.05$); HG+NAC 组足细胞 ROS 为 NG 组的 1.43 倍 ($P < 0.05$), 低于 HG 组 ($P < 0.05$, 图 2)。

2.3 足细胞 MDA 的比较

高糖可升高足细胞 MDA, 该组的足细胞 MDA 为 NG 组的 2.19 倍 ($P < 0.05$); HG+tBHQ 组足细胞 MDA 为 NG 组的 1.61 倍 ($P < 0.05$), 低于 HG 组 ($P < 0.05$); HG+NAC 组足细胞 MDA 为 NG 组的 1.12 倍, 低于 HG 组 ($P < 0.05$, 见图 3)。

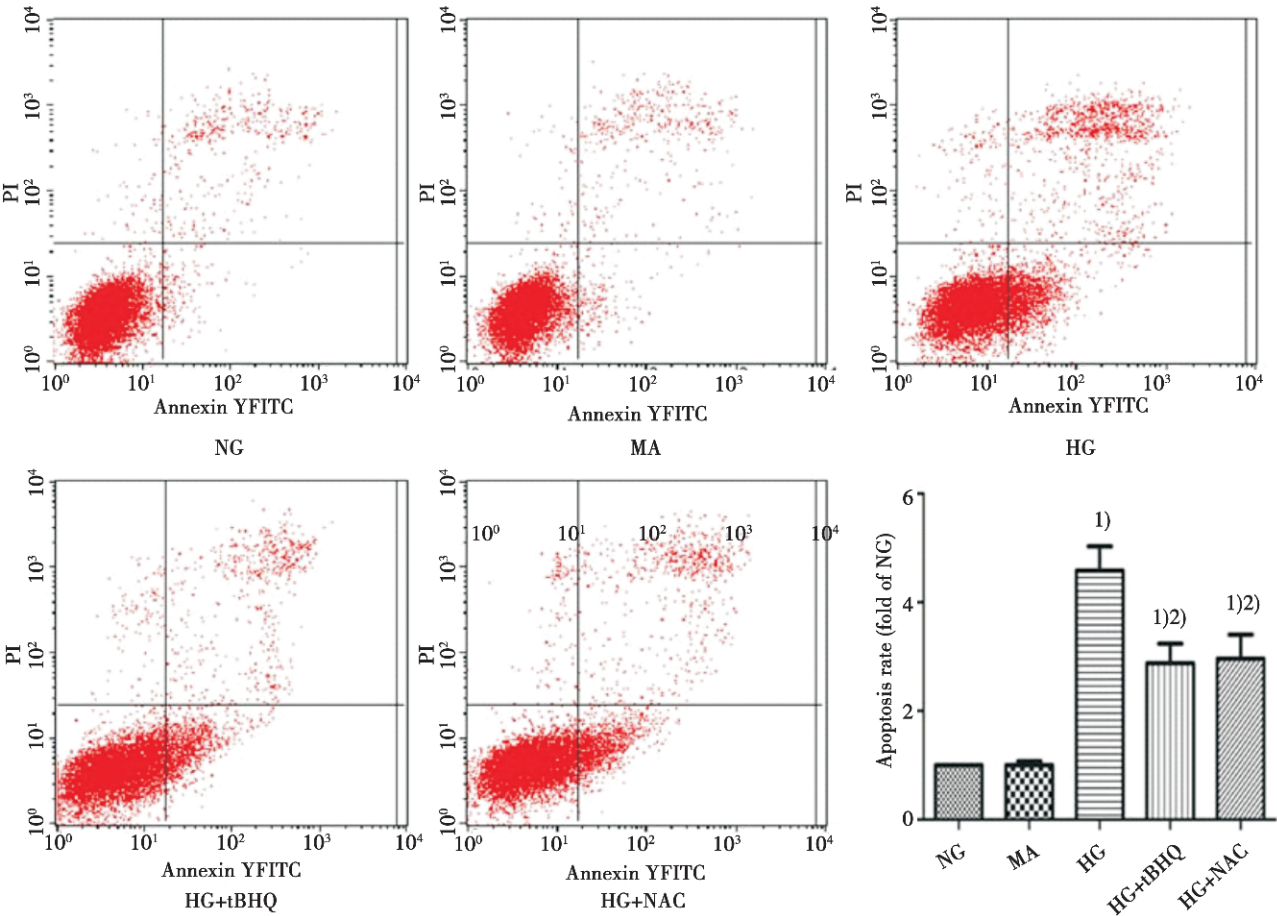


图 1 足细胞凋亡率的比较

Fig.1 Comparison of the podocytes apoptotic rate

$n = 3$, NG: Normal glucose; MA: Mannitol; HG: High glucose; HG + tBHQ: High glucose + tert-Butyl-hydroquinone; HG+NAC: High glucose + N-acetylcysteine, 1) $P < 0.05$ vs NG, 2) $P < 0.05$ vs HG.

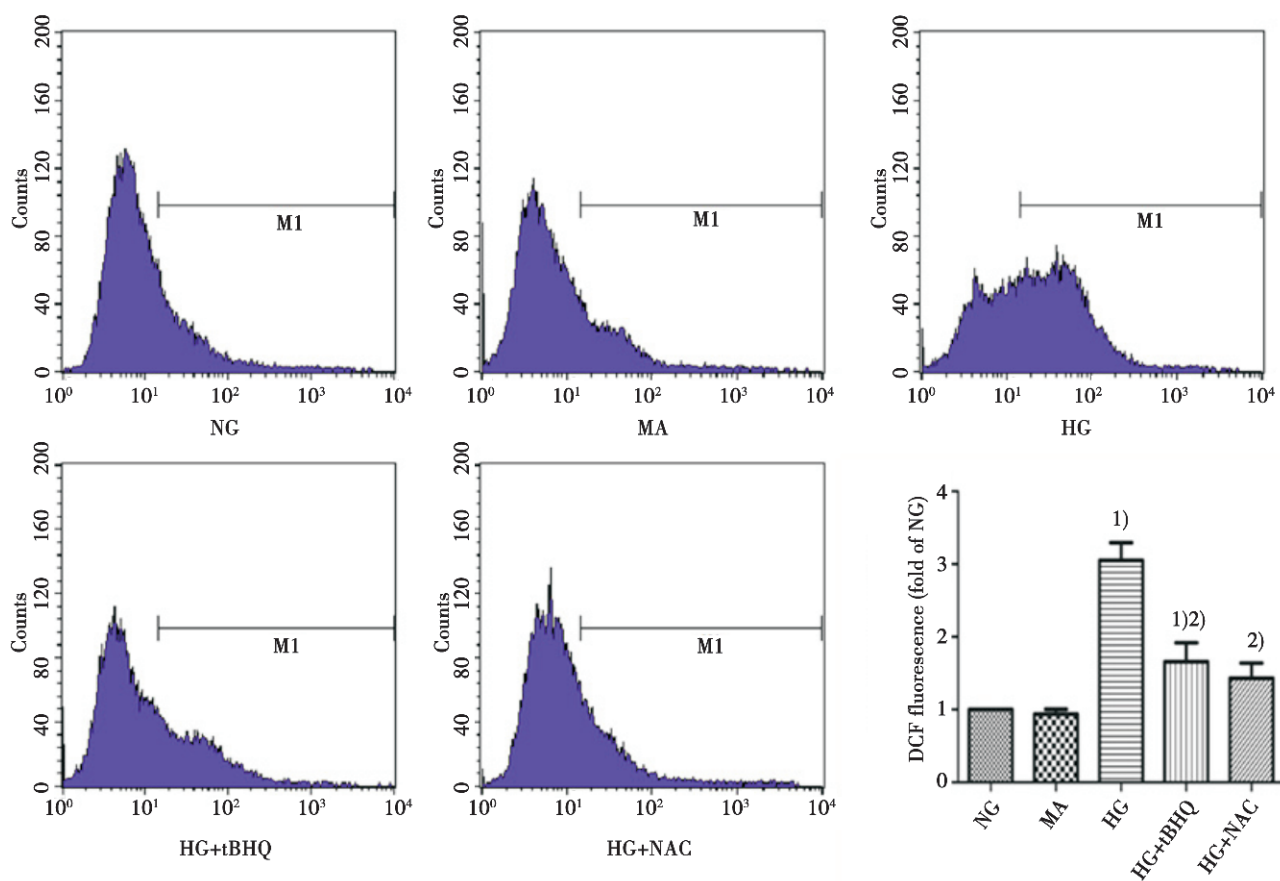


图 2 足细胞活性氧的比较

Fig.2 Comparison of Reactive oxygen species in podocytes

$n = 3$, NG: Normal glucose; MA: Mannitol; HG: High glucose; HG+tBHQ: High glucose + tert-Butyl-hydroquinone; HG+NAC: High glucose+N-acetylcysteine, 1) $P < 0.05$ vs NG, 2) $P < 0.05$ vs HG

2.4 足细胞 SOD、GSH 及 CAT 的比较

HG 组足细胞 SOD 低于 NG 组和 MA 组 ($P < 0.05$), HG+tBHQ 组足细胞 SOD 高于 HG 组 ($P < 0.05$), 但低于 NG 组 ($P < 0.05$), HG+NAC 组足细胞 SOD 低于 NG 组 ($P < 0.05$), 与 HG 相比差异无统计学意义; HG 组足细胞 GSH 低于 NG 组和 MA 组 ($P < 0.05$), HG+tBHQ 组足细胞 GSH 高于 HG 组 ($P < 0.05$), 但低于 NG 组 ($P < 0.05$), HG+NAC 组足细胞 GSH 高于 HG 组 ($P < 0.05$), 与 NG 相比差异无统计学意义; HG 组足细胞 CAT 低于 NG 组和 MA 组 ($P < 0.05$), HG+tBHQ 组足细胞 CAT 高于 HG 组 ($P < 0.05$), 但低于 NG 组 ($P < 0.05$), HG+NAC 组足细胞 CAT 低于 NG 组 ($P < 0.05$), 与 HG 相比差异无统计学意义 (见图 3)。

2.5 足细胞 Nrf2 表达的比较

HG 组足细胞 Nrf2-mRNA 表达高于 NG 组和

MA 组 ($P < 0.05$); HG+tBHQ 组足细胞 Nrf2-mRNA 表达高于 HG 组 ($P < 0.05$); HG+NAC 组足细胞 Nrf2-mRNA 表达水平低于 HG 组 ($P < 0.05$), 但高于 NG 组 ($P < 0.05$)。HG 组足细胞 Nrf2 表达高于 NG 组和 MA 组 ($P < 0.05$); HG+tBHQ 组足细胞 Nrf2 表达高于 HG 组 ($P < 0.05$); HG+NAC 组足细胞 Nrf2 表达水平低于 HG 组 ($P < 0.05$), 但高于 NG 组 ($P < 0.05$); 各组的足细胞核内 Nrf2 表达类似总 Nrf2 表达 (见图 4)。

2.6 足细胞 NQO1 及 HO-1 表达的比较

HG 组足细胞 NQO1 及 HO-1-mRNA 表达高于 NG 组和 MA 组 ($P < 0.05$); HG+tBHQ 组足细胞 NQO1 及 HO-1-mRNA 表达高于 HG 组 ($P < 0.05$); HG+NAC 组足细胞 NQO1 及 HO-1-mRNA 表达水平低于 HG 组 ($P < 0.05$), 但高于 NG 组 ($P < 0.05$); 各组的 NQO1 及 HO-1 蛋白水平表达与 mRNA 水平类似 (见图 4)。

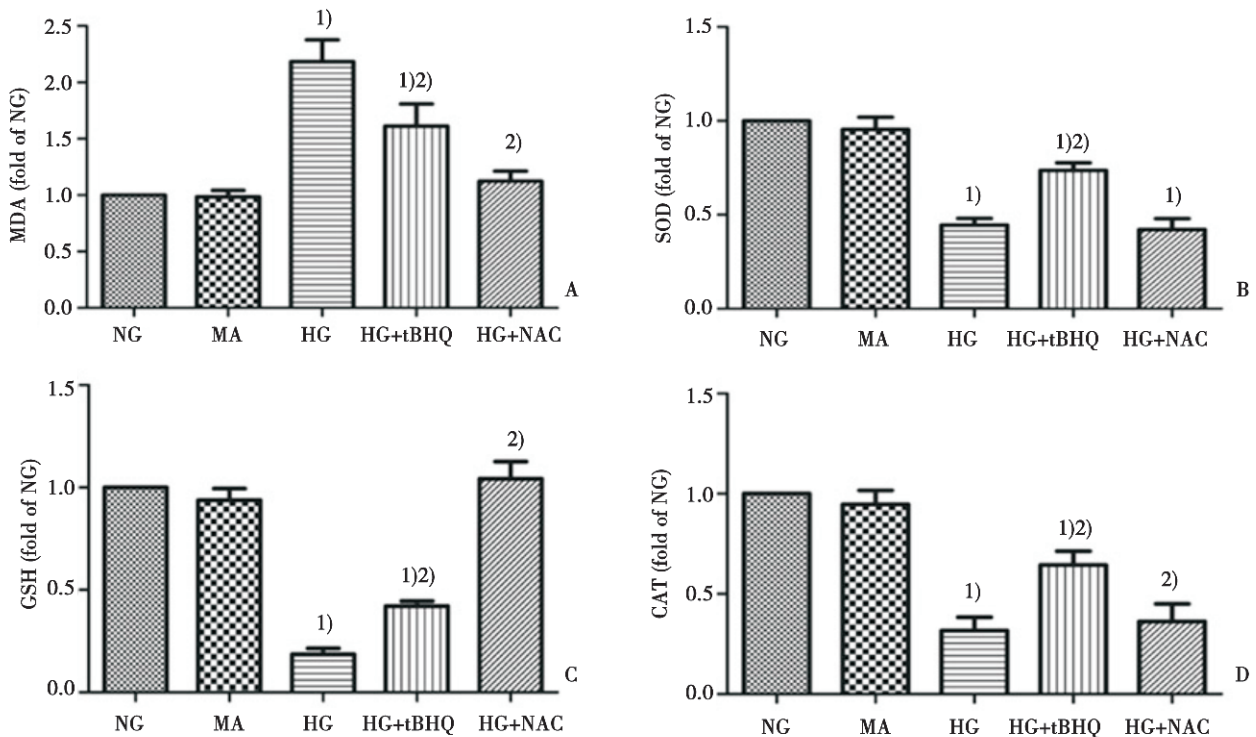


图 3 足细胞 MDA, SOD, GSH 及 CAT 的比较

Fig.3 Comparison of MDA, SOD, GSH and CAT in podocytes

$n = 3$, NG: Normal glucose; MA: Mannitol; HG: High glucose; HG+tBHQ: High glucose+tert-Butyl-hydroquinone; HG+NAC: High glucose+N-acetylcysteine; MDA: Malondialdehyde; SOD: Superoxide dismutase; GSH: Glutathione; CAT: Catalase; 1) $P < 0.05$ vs NG, 2) $P < 0.05$ vs HG

3 讨论

我们的体外研究发现,高糖可诱导足细胞凋亡,伴氧化应激增强,而抗氧化因素损伤;使用 NAC 这一经典抗氧化剂处理后,显著减轻高糖诱导的足细胞凋亡,减轻氧化应激,这提示氧化应激是高糖诱导足细胞凋亡的重要机制。我们还发现,体外应用 NRF2 的激动剂 tBHQ 后,可显著激活其下游产物,增强抗氧化指标的表达,减轻高糖诱导的细胞氧化应激水平,减轻足细胞凋亡。这提示,激活 NRF2-ARE 通路,可有效控制高糖诱导的氧化应激,减轻足细胞的凋亡。

DKD 是典型的足细胞病,1 型和 2 型 DKD 患者均有明显足细胞损伤:数目和密度的下降,足突融合^[9-10]。糖尿病动物模型出现足细胞损伤后,残余的足细胞出现肥大、足突增宽和蛋白尿,进而出现系膜基质增多和肾小球的硬化^[4]。2 型糖尿病大鼠模型可观察到早期 DKD 的表现:显著的足细胞

损伤,系膜基质无增多^[4,9]。在人类,很难观察到早期 DKD 的改变,但足细胞的丢失或脱落会导致基底膜裸露,启动不可逆的肾小球损伤。各种证据表明,足细胞损伤是早期 DKD 的重要标志,显著的足细胞损伤促进 DKD 的发生和发展。早期干预足细胞损伤,可延缓甚至逆转 DKD 的发生和发展^[4]。

核因子 E2 相关因子 2 是内源性抗氧化应激的重要调控因子。生理状态下, Nrf2 主要位于细胞浆,与 Keap1 (kelch-like ECH associated protein-1) 紧密结合,被 26S 蛋白酶降解。当机体出现氧化应激时, Keap1 被氧化,与 Nrf2 结合力下降, Nrf2 被释放并进入细胞核,与小 maf 形成异构体,激活 ARE 相关基因,调控 100 多种抗氧化和 2 期解毒酶的表达,发挥生物学效应。目前,比较重要的如 NQO1, HO-1, GSH, SOD2 及过氧化氢酶等,这些酶和蛋白形成一个复杂的网络,相互作用,保持细胞的氧化平衡状态。体外实验证实激活 Nrf2 可有效控制氧化应激:激活 Nrf2 可减低高糖诱导内皮细胞活性氧水平,改善己糖胺和蛋白激酶 C 的代

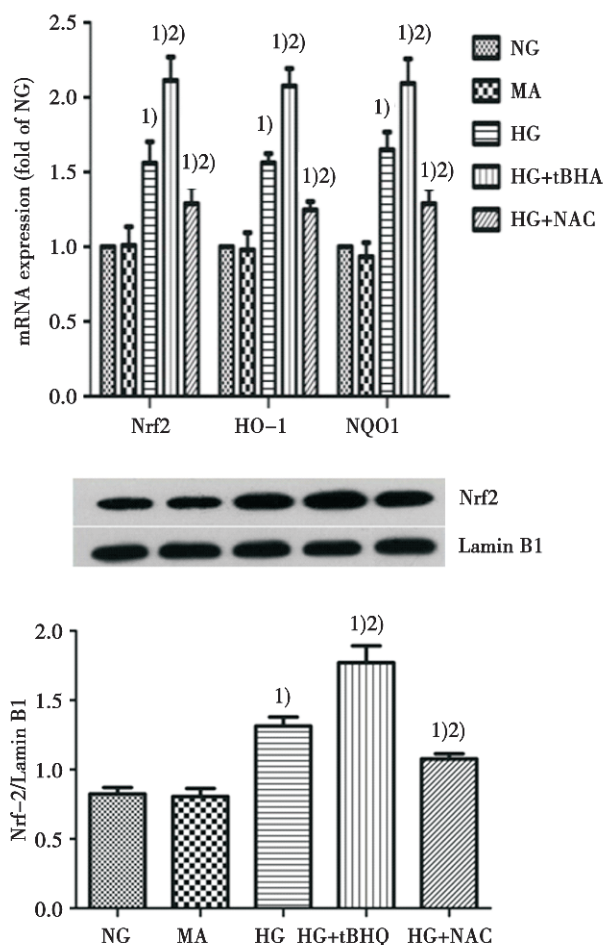


图 4 足细胞 Nrf2、NQO1 及 HO-1 的比较

Fig.4 Comparison of Nrf2, NQO1, and HO-1 in podocytes

A: the mRNA expression of Nrf2, NQO1 and HO-1, B: the protein expression of Nrf2, NQO1 and HO-1, C: the protein expression of nuclear Nrf2; $n = 3$, NG: Normal glucose; MA: Mannitol; HG: High glucose; HG+tBHQ: high glucose+tert-Butyl-hydroquinone; HG+NAC: High glucose+N-acetylcysteine, Nrf2: Nuclear factor erythroid-2 related factor; NQO1: Quinone oxidoreductase-1; HO-1: Hemeoxygenase-1, 1) $P < 0.05$ vs NG, 2) $P < 0.05$ vs HG

谢^[11]。高糖诱导 Nrf2 敲除的心肌细胞产生更高凋亡率^[12]。糖尿病肾脏病患者的肾组织 Nrf2 表达增高,这与高氧化应激状态有关;Nrf2(-/-)糖尿病小鼠,较 Nrf2(+/+)糖尿病小鼠产生更高的 ROS 和更严重的肾损伤^[13];激活 Nrf2 可改善 Nrf2(+/+)糖尿病小鼠的代谢紊乱症状,减轻肾脏病理损害,对 Nrf2(-/-)糖尿病小鼠无类似治疗效果^[14]。我们研究发现:高糖可激活 Nrf2、NQO1 及 HO-1,伴有氧化应激水平增加,使用 NAC 抗氧化治疗后,激活的 Nrf2、NQO1 及 HO-1 表达有一定程度的下降,这表明,高糖诱导 Nrf2 及其通路的激活与氧化应激有密切关系,但激活程度有限,难以有效控制氧化应激状态,所以,为了有效改善氧化应激水平,需要进一步激活 Nrf2 及其信号通路。我们使用 tBHQ 预处理高糖作用的足细胞,发现其可显著激活 Nrf2 及其信号通路,上调 NQO1、HO-1, SOD、GSH 及过氧化氢酶,增强足细胞抗氧化指标的表达,有效控制高糖诱导氧化应激,减轻足细胞的凋亡,这证实激活 Nrf2ARE 通路的抗氧化策略

与传统的抗氧化治疗的不同:网络化、内源性、多组分,强大的抗氧化能力^[6]。但是文献表明,过度激活 Nrf2 与肿瘤发生及化疗耐药性有密切关系^[15]。我们需要动物实验,进一步明确 tBHQ 能否减轻糖尿病肾病的发生和发展。但是,我们的前期研究表明:安全、有效、适度的激活 Nrf2-ARE 通路有望成为糖尿病肾病新的治疗靶点^[16]。

总之,我们体外实验证实,氧化应激是高糖诱导足细胞凋亡重要机制之一,而激活 Nrf2-ARE Nrf2-ARE 通路,减低高糖诱导足细胞的氧化应激,减轻足细胞的凋亡。

参考文献:

- [1] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. N Eng J Med, 2010, 362(12): 1090-1101.
- [2] Ehrenkantz J. Glucose control, the kidney, and potential treatments for diabetes: more to the story [J]. Am J Kidney disease, 2009, 54(5): 583-587.

- [3] Gnudi L. Cellular and molecular mechanisms of diabetic glomerulopathy [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 27(7): 2642–2649.
- [4] Gassler N, Elger M, Kranzlin B, et al. Podocyte injury underlies the progression of focal segmental glomerulosclerosis in the fa/fa Zucker rat [J]. *Kidney Int*, 2001, 60(1): 106–116.
- [5] Tharaux PL, Huber TB. How many ways can a podocyte die? [J]. *Semin Nephrol*, 2012, 32(4): 394–404.
- [6] Lederer ED, Klein JB. New treatments for CKD—new insights into pathogenesis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(10): 1601–1603.
- [7] Thornalley PJ, Rabbani N. Dietary and synthetic activators of the antistress gene response in treatment of renal disease [J]. *J Ren Nutr*, 2012, 22(1): 195–202.
- [8] 王成, 汤颖, 彭晖, 等. IgA 肾病患者血清 IgA1 与系膜细胞共培养上清诱导足细胞凋亡[J]. *中华肾脏病杂志*, 2008, 24(6): 387–391.
- Wang C, Tang Y, Peng H, et al. Supernatant of cultured mesangial cells with IgA1 from IgA nephropathy induces apoptosis of podocyte [J]. *Chin J Nephrol*, 2008, 24(6): 387–391.
- [9] Lemley KV, Abdullah I, Myers BD, et al. Evolution of incipient nephropathy in type 2 diabetes mellitus [J]. *Kidney Int*, 2000, 58(3): 1228–1237.
- [10] White KE, Bilous RW, Marshall SM, et al. Podocyte number in normotensive type 1 diabetic patients with albuminuria[J]. *Diabetes*, 2002, 51(10): 3083–3089.
- [11] Xue M, Qian Q, Adaikalakoteswari A, et al. Activation of NF- κ B-related factor-2 reverses biochemical dysfunction of endothelial cells induced by hyperglycemia linked to vascular disease[J]. *Diabetes*, 2008, 57(10): 2809–2817.
- [12] He X, Kan H, Cai L, et al. Nrf2 is critical in defense against high glucose-induced oxidative damage in cardiomyocytes[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 46(1): 47–58.
- [13] Jiang T, Huang Z, Lin Y, et al. The Protective Role of Nrf2 in Streptozotocin-Induced diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*, 2010, 59(4): 850–860.
- [14] Zheng H, Whitman SA, Wu W, et al. Therapeutic potential of Nrf2 activators in streptozotocin-induced diabetic nephropathy [J]. *Diabetes*, 2011, 60(11): 3055–3066.
- [15] Xu T, Ren D, Sun X, et al. Dual roles of sulforaphane in cancer treatment[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2012, 12(9): 1132–1142.
- [16] Ahmad A, Mondello S, Di Paola R, et al. Protective effect of apocynin, a NADPH-oxidase inhibitor, against contrast-induced nephropathy in the diabetic rats: a comparison with n-acetylcysteine[J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 674(2–3): 397–406.

(编辑 孙慧兰)