

黄芪甲苷抑制粘着斑激酶磷酸化改善高糖环境下的足细胞黏附能力的研究

何东元 郑志贵 陈宜方 陈建国

【摘要】 目的 观察黄芪甲苷(AS-IV)对高糖环境下足细胞黏附能力的影响,并探讨其作用机制。方法 将条件永生小鼠足细胞分为正常对照组、高糖组、高糖+低剂量 AS-IV 组、高糖+高剂量 AS-IV 组,采用细胞黏附荧光定量试剂盒检测足细胞黏附能力,白蛋白流量率检测法测定足细胞单层屏障功能,Western blot 法检测粘着斑激酶(FAK)与磷酸化 FAK(p-FAK)表达。观察并比较 4 组足细胞黏附能力、单层屏障功能、FAK 与 p-FAK 表达情况。结果 4 组足细胞黏附能力、单层屏障功能比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),高糖环境会降低足细胞的黏附能力、单层屏障功能,而 AS-IV 可明显增强高糖环境下足细胞的黏附能力、单层屏障功能,且对黏附能力的影响具有时间和剂量依赖性。4 组足细胞 FAK 表达情况比较无统计学差异(均 $P > 0.05$),而 p-FAK 表达情况比较有统计学差异(均 $P < 0.05$);高糖环境对足细胞 FAK 表达无明显影响,但会明显增加 FAK 磷酸化;AS-IV 可明显抑制高糖环境下足细胞 FAK 蛋白磷酸化,且该作用具有时间和剂量依赖性。结论 AS-IV 或通过抑制 FAK 磷酸化改善高糖环境下足细胞的黏附能力。

【关键词】 黄芪甲苷 足细胞 糖尿病肾病 粘着斑激酶 磷酸化

Astragaloside IV improves podocyte adhesion by inhibition of FAK phosphorylation HE Dongyuan, ZHENG Zhigui, CHEN Yifang, et al. Departments of Nephrology, Zhejiang Hospital, Hangzhou 310013, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of astragaloside IV (AS-IV) on podocyte adhesion function under high glucose circumstances and explore its mechanisms. Methods Conditionally immortalized mouse podocytes were divided into normal control group, high glucose group, high glucose with low dose AS-IV group and high glucose with high dose AS-IV group. Podocyte adhesion was measured by fluorescence. The filtration barrier function of podocyte monolayer was measured by albumin influx. The expression of focal adhesion kinase (FAK) and phosphorylated FAK (p-FAK) were measured by Western blot. The results of 4 groups were compared. Results The adhesion ability and monolayer barrier function of podocytes among 4 groups were significantly different (all $P < 0.05$). Compared with normal control group podocyte adhesion with basement membrane complex and monolayer filtration barrier function reduced significantly under high glucose circumstances and were improved by AS-IV. AS-IV attenuated podocyte adhesion reduction induced by high glucose in a time and dose dependent manner. The protein expression of FAK had no significant difference among 4 groups (all $P > 0.05$), but there were significant differences in p-FAK expression among 4 groups (all $P < 0.05$). The p-FAK expression in podocytes was increased significantly under high glucose circumstances, and was inhibited by AS-IV time- and dose-dependently. Conclusion The study indicates that AS-IV may improve podocyte adhesion function in diabetic nephropathy, which may be associated with the inhibition of FAK phosphorylation.

【Key words】 Astragaloside IV Podocyte Diabetic nephropathy Focal adhesion kinase Phosphorylation

糖尿病肾病是终末期肾病患者的首要病因,而足细胞损伤是糖尿病肾病发生、发展的关键环节^[1]。既往研究显示,糖尿病患者早期就可出现足细胞黏附功能下降,

足细胞脱落,导致肾小球基底膜裸露,加速糖尿病肾病进展^[2]。粘着斑激酶(FAK)在细胞黏附和迁移中发挥重要作用,若缺乏 FAK,细胞迁移能力会出现显著降低,且 FAK 磷酸化可改变细胞的黏附能力^[3]。有不少研究显示,传统中药黄芪的重要活性成分黄芪甲苷(AS-IV)对足细胞具有保护作用^[4-6],但作用机制尚未完全阐明。基于此,本研究旨在观察 AS-IV 对高糖环境下足细胞黏附能力的影响,并探讨其作用机制,现报道如下。

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.5.2018-2745

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(LY14H050004)

作者单位:310013 杭州,浙江医院肾内科

通信作者:何东元, E-mail: hdy331@qq.com

1 材料和方法

1.1 材料 条件永生化小鼠足细胞(浙江医院实验室); AS-IV 单体(TLC 纯度 98%)、D-葡萄糖和 γ -IFN(美国 Sigma 公司);FBS、青霉素、链霉素和 RPMI 1640 培养液(美国 Gibco 公司);抗 FAK 抗体、抗磷酸化 FAK(p-FAK) 抗体、抗 GAPDH 抗体、辣根过氧化物酶标记的二抗和 ECL 化学发光剂(美国 Santa Cruz 公司);RAPA 蛋白裂解缓冲液(中国上海联硕生物科技有限公司);BCA 试剂盒(美国 Pierce 公司);Transwell-Col PTFE 过滤器(3 μ m 孔,美国 Corning 公司);细胞黏附荧光定量试剂盒(美国 Calbiochem 公司);Bio-Rad 2000 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);FlexStation 3 荧光读板仪(美国 Molecular Devices 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和分组 条件永生化小鼠足细胞生长在 RPMI 1640 培养液(含 10% FBS、100U/ml 青霉素和 100mg/L 链霉素)中。在 33 $^{\circ}$ C、10U/ml γ -IFN 条件下传代,在 37 $^{\circ}$ C、无 γ -IFN 条件下诱导分化。分化后的足细胞用 1% FBS 培养液培养 24h 同步化后分为以下 4 组。正常对照组(Con 组):D-葡萄糖 5mmol/L;高糖组(HG 组):D-葡萄糖 30mmol/L;高糖+低剂量 AS-IV 组(HG+LD 组):D-葡萄糖 30mmol/L + AS-IV 50mg/L;高糖+高剂量 AS-IV 组(HG+HD 组):D-葡萄糖 30mmol/L + AS-IV 100mg/L。

1.2.2 足细胞黏附能力测定 使用细胞黏附荧光定量试剂盒检测足细胞黏附能力。分化的足细胞种植在分别铺有基底膜复合物(BMC)、小牛血清白蛋白(阴性对照)和多聚赖氨酸(阳性对照)的 96 孔培养板中,按上述分组进行干预。各组于干预 3、6、12 和 24h 后分别随机选取 24 孔弃去培养液,每孔 200 μ l PBS 冲洗 2 次除去未

黏附的细胞,每孔加入 100 μ l 荧光 Calcein-A M 工作液,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 1h,荧光读板仪(FlexStation 384)上检测每孔相对荧光强度(RFU),激发波长 485 nm、发射波长 520 nm。RFU 值越大,说明黏附的细胞数量越多,细胞黏附能力越强。

1.2.3 白蛋白流量率检测法测定足细胞单层屏障功能(单层渗漏白蛋白浓度) 5×10^5 个分化的足细胞接种于 I 型胶原包被 Transwell 上室(3 μ m 孔),不同条件下培养 48h。丢弃培养液,用含 1mmol/L CaCl₂ 和 1mmol/L MgCl₂ 的 PBS 洗 2 次。然后,上室填充 0.15ml 的 RPMI 1640,底腔填充 1ml 含 40mg/ml 小牛血清白蛋白的 RPMI 1640 培养液 37 $^{\circ}$ C 孵育 6h。BCA 试剂盒检测上室培养液白蛋白浓度。

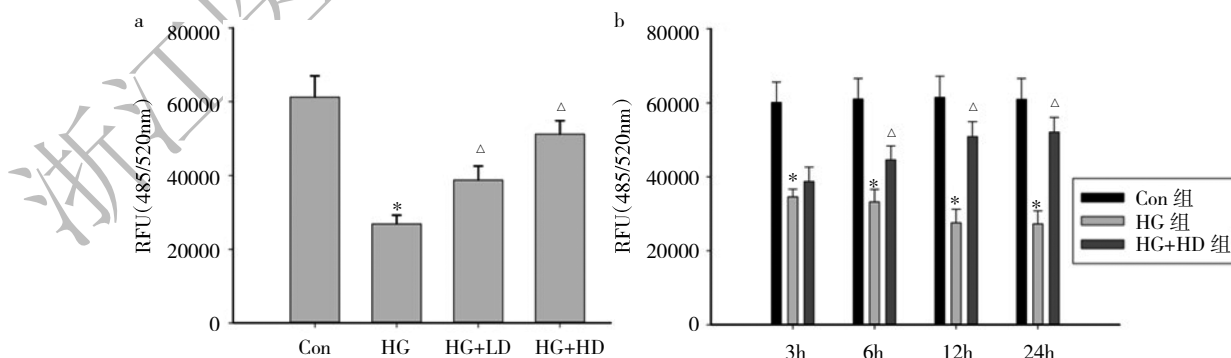
1.2.4 Western blot 法检测 FAK 与 p-FAK 表达 各组细胞干预 24、48h 后,蛋白裂解液裂解各组细胞,10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离,2%小牛血清白蛋白的 TBST 室温封闭 60min,加入抗 FAK、抗 p-FAK 和抗 GAPDH 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育 24h,加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 60min,ECL 发光剂在 X 线片上曝光显影。Bio-Rad 2000 凝胶成像系统扫描光密度。实验重复 3 次,得出目的蛋白与 GAPDH 光密度比值作为目的蛋白表达水平。

1.3 观察指标 观察并比较(1)4 组足细胞黏附能力;(2)4 组足细胞单层屏障功能;(3)4 组足细胞 FAK 与 p-FAK 表达情况。

1.4 统计学处理 应用 SigmaStat 12.0 统计软件;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组足细胞黏附能力比较 见图 1。



注:a:干预 12h;b:干预 3、6、12、24h(实验只观察了 Con 组、HG 组、HG+HD 组);与 Con 组比较,* $P < 0.05$;与 HG 组比较, $\Delta P < 0.05$

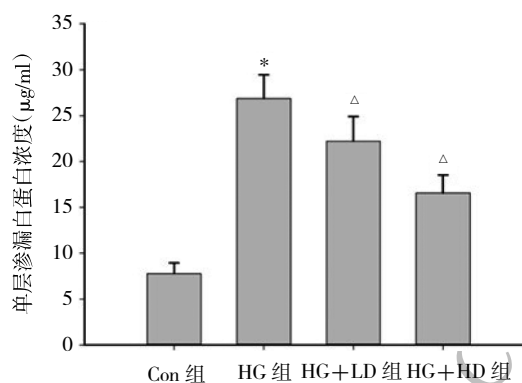
图 1 4 组足细胞黏附能力比较

由图 1 可见, 干预 12h 后, 4 组足细胞黏附能力比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 干预 3、6、12、24h 后, Con、HG、HG+HD 组足细胞黏附能力比较差异亦均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。即高糖环境会降低足细胞的黏附能力, 而 AS-IV 可明显增强高糖环境下足细胞的黏附能力, 且该作用具有时间和剂量依赖性。

2.2 4 组足细胞单层屏障功能比较 见图 2。

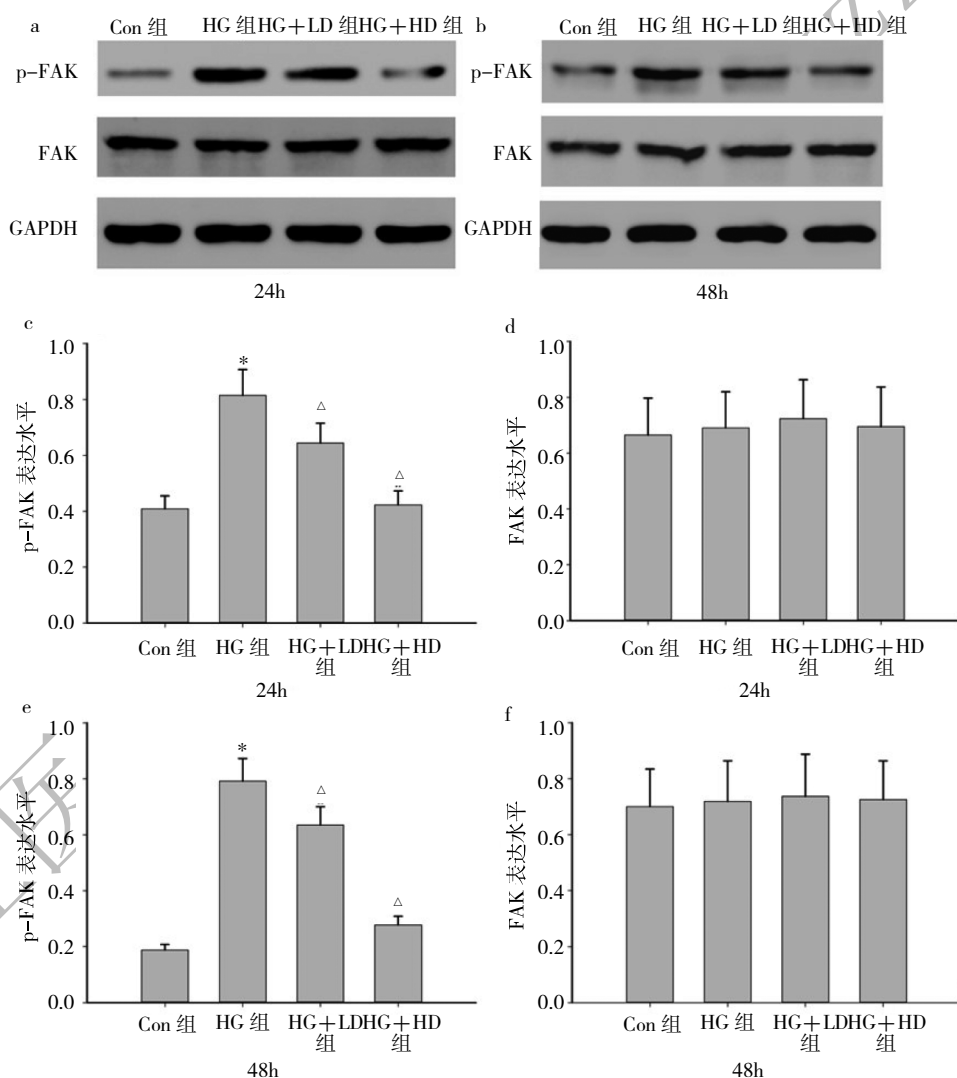
由图 2 可见, 4 组足细胞单层屏障功能比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。即高糖环境会降低足细胞单层屏障功能, 而 AS-IV 可剂量依赖性地增强高糖环境下足细胞单层屏障功能。

2.3 4 组足细胞 FAK 与 p-FAK 表达情况比较 见图 3。



注: 与 Con 组比较, * $P < 0.05$; 与 HG 组比较, [△] $P < 0.05$

图 2 4 组足细胞单层屏障功能比较



注: a: 干预 24h, FAK 与 p-FAK 表达电泳图; b: 干预 48h, FAK 与 p-FAK 表达电泳图; c、d: 干预 24h, FAK 与 p-FAK 的半定量分析; e、f: 干预 48h, FAK 与 p-FAK 的半定量分析; 与 Con 组比较, * $P < 0.05$; 与 HG 组比较, [△] $P < 0.05$

图 3 4 组足细胞 FAK 与 p-FAK 表达情况比较

由图 3 可见, 干预 24、48h 后, 4 组足细胞 FAK 表达情况比较均无统计学差异(均 $P > 0.05$), p-FAK 表达

情况比较均有统计学差异(均 $P < 0.05$)。即高糖环境对足细胞 FAK 表达无明显影响, 但会明显增加 FAK 磷酸

化;AS-IV 可明显抑制高糖环境下足细胞 FAK 蛋白磷酸化,且该作用具有时间和剂量依赖性。

3 讨论

祖国传统医学认为黄芪具有补气升阳、益卫固表、利水消肿等功效。黄芪用于治疗糖尿病和肾脏疾病已有上千年的历史^[4]。AS-IV 是黄芪主要活性成分,具有调节免疫、抗炎因子、抗间质纤维化、抗凋亡和抗氧化应激等多方面药理作用。AS-IV 被 2005 版《中国药典》纳作评估黄芪药材质量的指标。既往研究显示,AS-IV 可通过抑制 PERK-ATF4-CHOP 信号通路抑制高糖环境下足细胞凋亡^[5],抑制 NF- κ B 改善糖尿病大鼠足细胞足突融合,降低蛋白尿^[6],但 AS-IV 对足细胞的保护作用机制尚未完全阐明。足细胞是肾小球滤过屏障的重要组成部分,足细胞数量减少和/或功能障碍与蛋白尿的发生、发展密切相关^[7]。高糖环境下足细胞黏附能力减弱是足细胞从肾小球基底膜脱落的重要原因,也是早期糖尿病肾病进展的重要原因^[1]。足细胞是终末分化细胞,几乎没有增殖能力^[7]。足细胞脱落或坏死将导致足细胞数量不可逆性减少,基底膜裸露,肾小球壁层上皮细胞和裸露的基底膜粘连,最终导致肾小球硬化和肾脏功能衰竭^[8]。研究显示,1 型糖尿病和 2 型糖尿病早期均有足细胞脱落和数量减少现象^[9]。减少足细胞脱落可能成为未来糖尿病肾病治疗的靶点。本研究采用细胞黏附荧光定量试剂盒检测足细胞和 BMC 之间的黏附能力,采用白蛋白流量率检测法检测足细胞单层屏障功能。结果显示,高糖环境下足细胞与 BMC 之间的黏附能力明显下降,足细胞单层屏障功能明显下降,而 AS-IV 干预可增强高糖环境下足细胞黏附能力,增强足细胞单层屏障功能,其作用具有时间和剂量依赖性。

FAK 是一种非受体酪氨酸激酶,在细胞黏附中起重要作用。目前认为 FAK 和 β 整合素直接相连,是整合素信号传导的中枢介质,也是其他细胞表面受体信号传递的重要组成部分^[10]。FAK 磷酸化是整合素、生长因子和细胞外基质蛋白启动的信号通路中的早期事件,FAK 调节细胞迁移在许多类型细胞中已被证实。表皮伤口愈合过程中迁移的角质形成细胞 FAK 表达或激活增加,在体外培养的内皮细胞迁移过程中也观察到相同现象^[11-12]。FAK 在肾脏发育和细胞分化中起重要作用。FAK 基因敲除的小鼠出现严重的中胚层缺陷,在胚胎早期死亡^[13]。FAK 沉默的成纤维细胞迁移能力严重缺陷^[14]。抑制 FAK 磷酸化可导致成纤维细胞和内皮细胞迁移能力下降,过度表达 FAK 可导致多种细胞迁移能力增加^[15]。

既往研究显示,足细胞表达 FAK,足细胞损伤后 FAK 磷酸化增加。FAK 磷酸化后可以激活多个下游信号通路,其中 FAK/p38 MAPK 通路是重要的一条。p38 MAPK 属于丝氨酸/苏氨酸激酶家族,在炎症、氧化应激、衰老、自噬以及细胞凋亡中均有重要作用^[16]。FAK/p38 MAPK 通路参与阿霉素^[17]和转化生长因子 β 1 诱导的足细胞损伤^[18]。足细胞特异性敲除 FAK 基因或药物抑制 FAK/p38 MAPK 信号通路可缓解蛋白尿和足细胞足突融合^[17, 19]。本研究结果与既往研究结果相符,高糖环境对足细胞 FAK 表达无明显影响,但会明显增加 FAK 磷酸化;AS-IV 可明显抑制高糖环境下足细胞 FAK 蛋白磷酸化,且该作用具有时间和剂量依赖性。

综上所述,AS-IV 可能通过抑制 FAK 磷酸化改善高糖环境下足细胞的黏附能力。本研究结果或将为糖尿病肾病的早期治疗提供理论参考。

4 参考文献

- [1] Marshall SM. The podocyte: a potential therapeutic target in diabetic nephropathy?[J]. *Current pharmaceutical design*, 2007, 13(26): 2713-2720.
- [2] Liapis H, Romagnani P, Anders HJ. New insights into the pathology of podocyte loss: mitotic catastrophe[J]. *The American journal of pathology*, 2013, 183(5): 1364-1374.
- [3] Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility[J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2005, 6(1): 56-68.
- [4] Hu M, Fan M, Zhen J, et al. FAK contributes to proteinuria in hypercholesterolaemic rats and modulates podocyte F-actin re-organization via activating p38 in response to ox-LDL [J]. 2016, 21(3): 552-567
- [5] Chen Y, Gui D, Chen J, et al. Down-regulation of PERK-ATF4-CHOP pathway by Astragaloside IV is associated with the inhibition of endoplasmic reticulum stress-induced podocyte apoptosis in diabetic rats[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2014, 33(6): 1975-1987.
- [6] Gui D, Huang J, Guo Y, et al. Astragaloside IV ameliorates renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats through inhibiting NF- κ B-mediated inflammatory genes expression [J]. *Cytokine*, 2013, 61(3): 970-977.
- [7] Greka A, Mundel P. Cell biology and pathology of podocytes[J]. *Annual review of physiology*, 2012, 74(1): 299.
- [8] Kriz W, Lehir M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases—insights from animal models[J]. *Kidney international*, 2005, 67(2): 404-419.
- [9] Lemley KV. Diabetes and chronic kidney disease: lessons from the Pima Indians[J]. *Pediatric Nephrology*, 2008, 23(11): 1933-1940.
- [10] Parsons JT, Schaller MD, Hildebrand J, et al. Focal adhesion kinase: structure and signalling[J]. *J Cell Sci*, 1994, 1994(Supple-

- ment 18): 109–113.
- [11] Romer LH, McLean N, Turner CE, et al. Tyrosine kinase activity, cytoskeletal organization, and motility in human vascular endothelial cells[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 1994, 5(3): 349–361.
- [12] Gates RE, King Jr LE, Hanks SK, et al. Potential role for focal adhesion kinase in migrating and proliferating keratinocytes near epidermal wounds and in culture[J]. *Cell Growth and Differentiation—Publication American Association for Cancer Research*, 1994, 5(8): 891–900.
- [13] Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, et al. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice[J]. *Nature*, 1995, 377(6549): 539–544.
- [14] Gilmore AP, Romer LH. Inhibition of focal adhesion kinase (FAK) signaling in focal adhesions decreases cell motility and proliferation[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 1996, 7(8): 1209–1224.
- [15] Owen JD, Ruest PJ, Fry DW, et al. Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1999, 19(7): 4806–4818.
- [16] Bonney EA. Mapping out p38 MAPK[J]. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2017, 77(5): e12652.
- [17] Ye M, Zheng J, Chen X, et al. Prednisone inhibits the focal adhesion kinase/receptor activator of NF- κ B ligand/mitogen-activated protein kinase signaling pathway in rats with adriamycin-induced nephropathy[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 12(5): 7471.
- [18] Yu-Jing Z, Zhi-Liang T, Xin-Yan Y, et al. Activation of integrin β 1-focal adhesion kinase-RasGTP pathway plays a critical role in TGF β 1-induced podocyte injury[J]. *Cellular Signaling*, 2013, 25(12): 2769–2779.
- [19] Ma H, Togawa A, Soda K, et al. Inhibition of podocyte FAK protects against proteinuria and foot process effacement[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2010, 21(7): 1145–1156.

(收稿日期:2018-11-07)

(本文编辑:李媚)

(上接第 408 页)
作用而致病。

7 DM 治疗进展

目前无特殊有效方法,重点是改善肌无力和肌强直症状,监测和防治并发症。肌无力的治疗:早期研究认为脱氢异雄酮(DHEA)可以改善肌强直和肌无力,但 2005 年在法国进行的多中心随机双盲研究中,75 例 DM1 型成人患者口服 DHEA 100mg/d,主要终点为徒手肌力试验评分从基线至 12 周的相对改变,但没有证据证明有效。早期研究表明胰岛素样生长因子可以改善胰岛素不敏感性和 DM 肌原细胞功能,但实验不能重复。肌酸的应用:磷酸肌酸对肌纤维三磷酸腺苷储备有潜在缓冲作用。运动训练:阻力训练和有氧训练可能会增加肌肉的力量、改善心肺功能、预防肌萎缩,研究表明适当强度训练对 DM 患者无害。肌强直的治疗:钠离子通道阻滞剂如慢心律、苯妥英钠等;三环类抗抑郁药;苯二氮卓类;钙离子拮抗剂;激素、丙咪嗪、牛磺酸等。心律失常治疗:30%的 DM 患者死于快速性心律失常和传导阻滞,需用电生理检查评估心律失常的危险性,必要时植入埋藏式除颤器或起搏器。呼吸道疾病:白天睡眠过多及呼吸睡眠暂停

需进行肺活量测定以预测患者是否发展为神经肌肉呼吸衰竭,必要时适量使用兴奋剂。

8 基因治疗策略

理论上基因治疗可通过以下途径:DNA 水平:防止(C/CTG) $_n$ 重复序列扩增,减少异常基因转录;RNA 水平:切断(C/CTG) $_n$ 折叠成 RNA 发卡二级结构,有效抑制 RNA 聚集灶与 MBNL1 蛋白异常结合;蛋白水平:增加游离 MBNL1 蛋白表达水平,抑制 PKC 通路过度磷酸化激活,降低 CUGBP1 表达水平。

9 小结

DM 具有丰富的临床和遗传异质性,给临床分型诊断带来一定难度,肌强直伴肌营养不良是 DM 特征性的临床表现,电生理检查可见肌强直与肌源性损害并存,基因分析成为诊断、分型诊断 DM 的金标准,基因治疗是治疗 DM 的最大希望,目前针对中国人 DM 流行病学、临床表型、基因变异特点的临床总结较少,并缺乏产前诊断平台,建立 DM 分子生物学研究、诊断平台是今后的任务。

(收稿日期:2019-02-22)

(本文编辑:陈丽)