

线粒体功能障碍参与糖尿病肾脏疾病足细胞损伤的初步研究

黄婉冰 叶增纯 李吟 张笑浩 陈小秋 姚子颖 娄探奇

【摘要】 目的 探讨糖尿病肾脏疾病足细胞是否存在线粒体功能障碍。**方法** 分别从 2 型糖尿病 db/db 小鼠及其同窝对照 db/m 小鼠肾脏中分离足细胞,提取线粒体检测线粒体复合物 I 和 III 功能,提取 RNA 行实时定量 PCR 检测足细胞线粒体代谢相关基因的表达;采用免疫组织化学检查检测足细胞标记蛋白 WT1 的表达。**结果** db/db 小鼠足细胞线粒体复合物 I 和复合物 III 的活性、线粒体 DNA 拷贝数均较 db/m 小鼠低 (P 均 <0.05), db/db 小鼠足细胞与线粒体代谢相关的基因 SIRT1、PGC-1 α 、TFAM、NRF1、NRF2 以及足细胞标记蛋白 nephrin mRNA 的表达均较 db/m 小鼠低 (P 均 <0.05), db/db 小鼠足细胞数量较 db/m 小鼠少 ($P < 0.05$)。**结论** 糖尿病小鼠足细胞存在线粒体功能障碍。

【关键词】 线粒体;足细胞;糖尿病肾脏疾病

Role of mitochondrial dysfunction in podocyte injury in diabetic kidney disease Huang Wanbing, Ye Zengchun, Li Yin, Zhang Xiaohao, Chen Xiaoqiu, Yao Ziyang, Lou Tanqi. Department of Nephrology, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China.

Corresponding author, Lou Tanqi, E-mail: lou.tq@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the presence of mitochondrial dysfunction in the podocytes of mouse models with diabetic kidney disease. **Methods** The podocytes were isolated from the kidney from db/db mice with type 2 diabetes mellitus and db/m control mice. The mitochondria was extracted for detection of the function of mitochondrial complex I and III. RNA extraction was performed. Real-time quantitative PCR was performed to detect the genes related to podocyte mitochondrial metabolism. The expression of podocyte-labeled protein WT1 was measured by immunohistochemical staining. **Results** In the db/db mice, the activity of podocyte mitochondrial complex I and III, and the copy number of mitochondrial DNA were significantly lower compared with those in the db/m mice (all $P < 0.05$). The expression levels of SIRT1, PGC-1 α , TFAM, NRF1, NRF2 and podocyte-labeled protein nephrin mRNA in the db/db mice were significantly down-regulated compared with those in db/m mice (all $P < 0.05$). The quantity of podocytes in the db/db mice was considerably less than that in the db/m mice ($P < 0.05$). **Conclusion** Mitochondrial dysfunction occurs in the podocytes of diabetes mellitus mice.

【Key words】 Mitochondria; Podocyte; Diabetic kidney disease

糖尿病肾脏疾病 (DKD) 是引发终末期肾脏病的主要病因之一,但其发病机制尚未清楚。目前有研究显示,足细胞损伤是 DKD 进展的中心事件,与肾功能恶化密切相关。有研究者发现,早期 DKD 患者肾脏中足细胞数量减少,而晚期患者足细胞数量减少更明显^[1]。线粒体是细胞有氧代谢的重要枢纽,不仅参与了细胞能量代谢,还在维持

铁稳态、调节活性氧自由基 (ROS) 和调控细胞凋亡等方面起了重要的作用。足细胞具有丰富的线粒体,用以维持肌动蛋白为主的细胞骨架结构,而这些骨架结构是足细胞发挥正常功能的基础。但目前对于 DKD 时足细胞线粒体功能是否有改变,尚缺乏足够证据。本研究拟通过分离糖尿病小鼠肾脏足细胞,提取足细胞线粒体,检测线粒体功能,探讨

足细胞线粒体功能在 DKD 中的变化。

材料与方法

一、足细胞分离技术

分别采用 24 周龄的 2 型糖尿病 db/db 雄性小鼠及其同窝对照小鼠 db/m 各 6 只, db/db 小鼠体质量 45 ~ 55 g, db/m 小鼠体质量 20 ~ 25 g, 购自南京大学-南京生物医药研究院。麻醉处死小鼠后, 分离肾脏置冰上, 切成碎片后置于以下溶液: RPMI 1640 + 1% 青霉素链霉素溶液(PS) + 5% 胎牛血清 + 2 mg/ml 胶原酶 A。震荡后滤过的溶液离心去上清, 加入 $1 \times$ 的小鼠裂解缓冲液(Sigma)室温放置 10 min。再加入 10 ml Hank's 平衡溶液(HBSS)中和裂解液, 离心去上清液后加入以下溶液: RPMI 1640 + PS + 5% 胎牛血清 + 0.5 mg/ml 胶原酶/分散酶和 0.075% 胰酶。滤过后离心去上清液并加入以下溶液: MACS 溶液和牛血清白蛋白(BSA)溶液按 40:1 比例配置(标记缓冲液), 然后加入 Biotynlated-Podocalyxin 抗体和 Biotynlated-Kirrel2 (Neph3) 抗体。孵育 45 min 后离心去上清液重复 1 次; 清洗 Dynabeads® M280 链霉亲和素磁珠后加入标记缓冲液和离心后的细胞, 置于 4℃ 摇床上孵育 45 min。离心去上清液后加入标记缓冲液。将离心管放置在多功能磁性分离架上收集足细胞。取得小鼠足细胞样本进行后续实验检测, 实验重复 3 次。

二、线粒体分离技术

细胞线粒体分离试剂盒购自碧云天生物公司。步骤简述如下: 用胰酶消化细胞, 离心收集细胞。细胞 $600 \times g$ 、4℃ 离心 5 min 后作沉淀。弃上清液后加入 1 ~ 2.5 ml 线粒体分离试剂至细胞中, 轻轻悬浮细胞, 冰浴放置 10 ~ 15 min。把细胞悬液转移到一适当大小的玻璃匀浆器中, 匀浆 10 ~ 30 次。把细胞匀浆在 $600 \times g$ 、4℃ 离心 10 min。把上清液转移到另一离心管中, $11\,000 \times g$ 、4℃ 离心 10 min 后去除上清。沉淀即为分离得到的细胞线粒体。

三、线粒体复合物活性检测

分离足细胞线粒体, 分别使用 MitoSciences 的线粒体复合物 I 和复合物 III 酶活性检测试剂盒检测线粒体呼吸链复合物的活性。

四、线粒体 DNA 拷贝数检测

使用 DNeasy Tissue Kit (Qiagen) 提取足细胞总 DNA, 实时定量 PCR (RT-PCR) 分别检测小鼠线粒体 ND1 和 CytB DNA, 以及小鼠核 H19 DNA。

计算 ND1: H19 和 CytB: H19 比值。

五、线粒体代谢相关基因检测

将足细胞加入 Trizol 中提取总 RNA 后使用 TAKARA 逆转录试剂盒转录为 cDNA, 再使用 TAKARA PCR 反应试剂进行 RT-PCR, 取得结果采用最大二阶导数法分析目的基因 SIRT1、PGC-1 α 、TFAM、NRF1、NRF2 的 mRNA 相对表达量。

六、免疫组织化学检查(免疫组化)

将小鼠肾脏石蜡切片脱蜡至水, 用 3% 过氧化氢室温孵育以消除内源性过氧化物酶的活性。清洗后用 10% 正常山羊血清(磷酸缓冲盐稀释)封闭 1 h, 去封闭液后加抗 WT1 抗体(Santa Cruz)工作液于 4℃ 过夜。第 2 日用 PBS 冲洗后, 加入二抗室温孵育 1 h, 使用 Vectastain® ABC 试剂盒(Vector)进行显色镜下观察, 检测足细胞标记物 nephrin 的表达。根据 WT1 的位置和阳性染色, 鉴定细胞, 并在随机选择的动物肾切片中, 对每只动物的 10 个肾小球进行足细胞总计数。

七、统计学处理

使用 SPSS 22.0 统计学软件处理数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较使用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、db/db 小鼠足细胞中的线粒体复合物活性降低

24 周龄小鼠足细胞线粒体复合物活性检测结果发现, db/db 小鼠与 db/m 小鼠相比, 足细胞线粒体复合物 I 活性明显下降 ($t = 21.695$, $P = 0.002$, 见图 1A), 此外, 足细胞线粒体复合物 III 活性也有所下降 ($t = 4.396$, $P = 0.048$, 见图 1B)。

二、db/db 小鼠足细胞线粒体复合物组分的基因表达下降

从 24 周龄小鼠肾脏中提取足细胞并分析其线粒体复合物组分的基因表达, 结果可见, 与 db/db 小鼠比较, db/db 小鼠的足细胞线粒体复合物 I 组分 mt-ND1 及 NDUF2 的 mRNA 表达水平明显下降 (mt-ND1: $t = 18.771$, $P = 0.003$; NDUF2: $t = 31.344$, $P < 0.001$, 见图 2A); 线粒体复合物 III 组分 Uqcrb 和 Uqcrc1 的 mRNA 表达也明显降低 (Uqcrb: $t = 8.264$, $P = 0.014$; Uqcrc1: $t = 21.047$, $P = 0.002$, 见图 2B)。

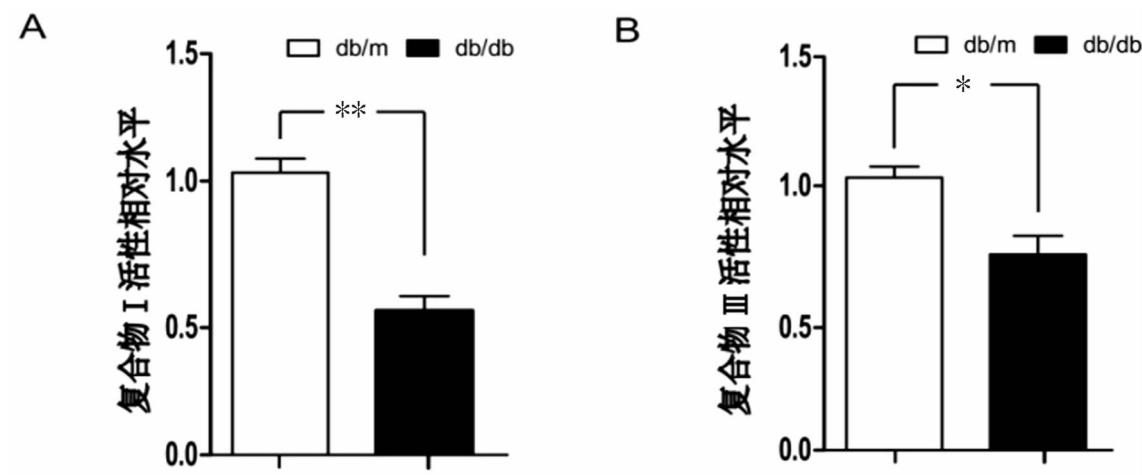


图1 24 周龄 db/m 小鼠及 db/db 小鼠肾脏足细胞线粒体中的线粒体复合物 I 及 III 的活性检测

* 为 $P < 0.05$, ** 为 $P < 0.01$

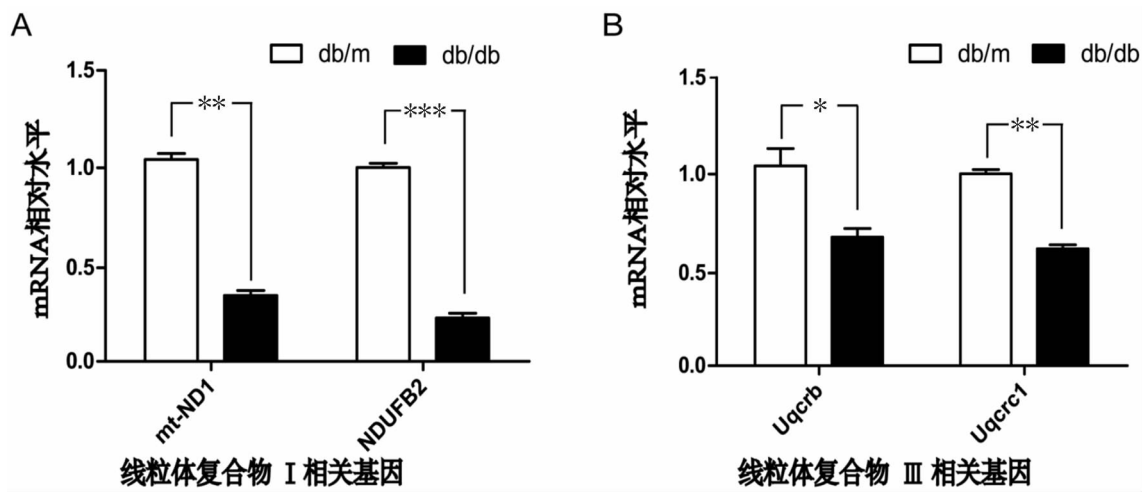


图2 24 周龄 db/m 小鼠及 db/db 小鼠足细胞中的线粒体复合物 I 和 III 组分的基因表达

* 为 $P < 0.05$, ** 为 $P < 0.01$, *** 为 $P < 0.001$

三、db/m 小鼠足细胞的线粒体 DNA 拷贝数下降

从 24 周龄的 db/m 和 db/db 小鼠肾脏足细胞中提取 DNA, RT-PCR 分别检测小鼠线粒体 ND1 和 CytB DNA, 以及小鼠核 H19 DNA。结果显示,

db/db 小鼠的 CytB/H19 及 ND1/H19 比值均较 db/m 小鼠低 (CytB/H19: $t = 4.459$, $P = 0.047$; ND1/H19: $t = 4.608$, $P = 0.044$, 见图 3A, 3B), 以上结果证明了糖尿病小鼠足细胞线粒体的 DNA 拷贝数量下降。

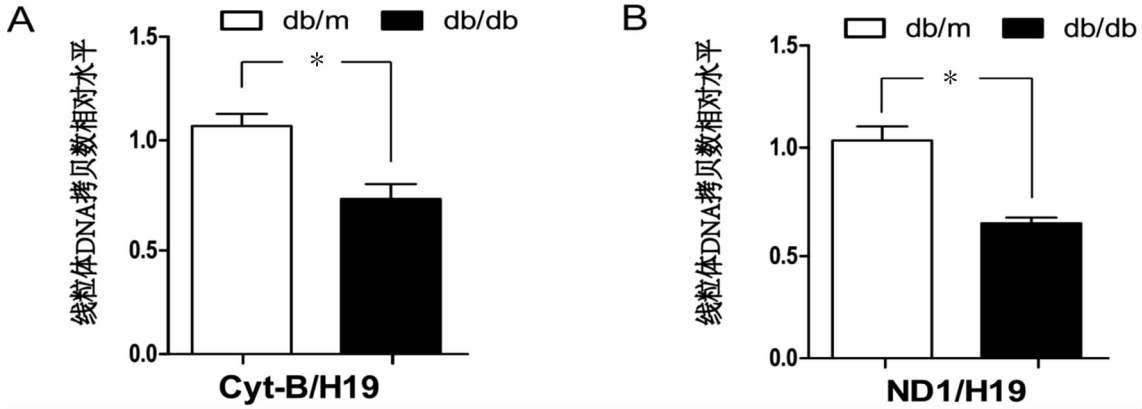


图3 24 周龄 db/m 小鼠及 db/db 小鼠肾脏足细胞中的线粒体 DNA 拷贝数表达

* 为 $P < 0.05$

四、db/m 小鼠足细胞的线粒体代谢相关基因表达降低

检测 24 周龄的 db/m 和 db/db 小鼠足细胞线粒体代谢相关基因 mRNA 表达情况，结果显示相比 db/m 小鼠，db/db 小鼠中 SIRT1、PGC-1 α 、TFAM、NRF1、NRF2 的 mRNA 表达均下降（SIRT1： $t=10.589$ ， $P=0.009$ ；PGC-1 α ： $t=9.648$ ， $P=0.011$ ；TFAM： $t=12.491$ ， $P=0.006$ ；NRF1： $t=9.624$ ， $P=0.011$ ；NRF2： $t=5.308$ ， $P=0.034$ ，见图 4）。

五、db/db 小鼠的足细胞数量下降

检测 db/m 和 db/db 小鼠足细胞中足细胞标记物 nephrin 的表达，结果显示，与 db/m 小鼠相比，24 周龄的 db/db 小鼠 nephrin 表达下降（ $t=4.716$ ， $P=0.042$ ，见图 5A）。而 24 周龄小鼠肾脏中的足细胞用 WT1 标记，免疫组化示 db/db

小鼠的足细胞数量较 db/m 小鼠的少（见图 5B）。以上均表明了 db/db 小鼠中的足细胞数量减少。

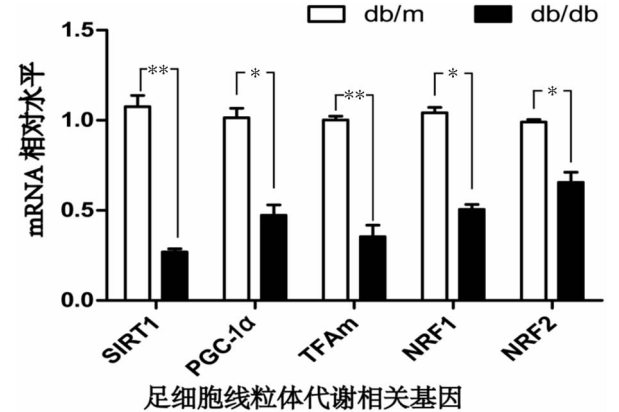


图 4 24 周龄 db/db 小鼠相比 db/m 小鼠足细胞中的线粒体代谢相关基因 mRNA 表达
* 为 $P<0.05$ ，** 为 $P<0.01$

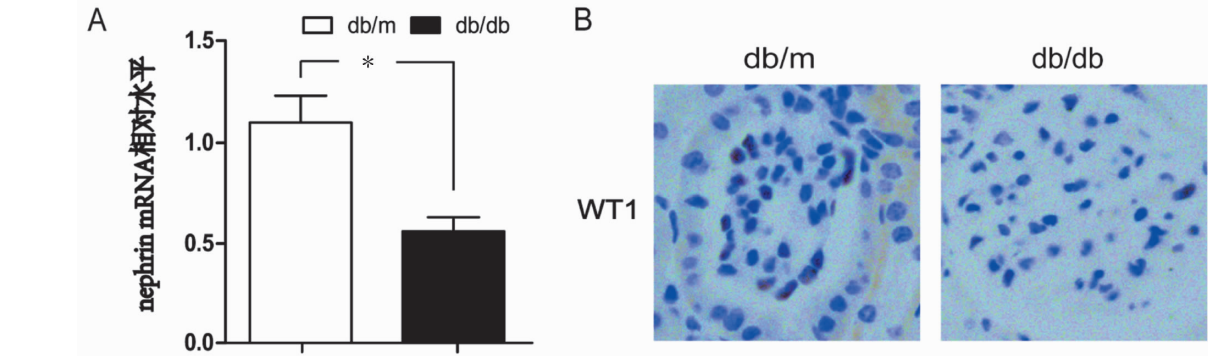


图 5 24 周龄 db/m 小鼠及 db/db 小鼠肾脏足细胞检测图
A：肾脏足细胞 nephrin mRNA 表达，* 为 $P<0.05$ ；B：WT1 免疫组化染色显示足细胞的数量（ $\times 400$ ）

讨 论

本研究选用自发性 2 型糖尿病 db/db 小鼠作为糖尿病动物模型，db/m 小鼠（糖尿病 db/db 小鼠同窝对照组小鼠）作为对照。db/db 小鼠在 12 ~ 18 周龄时出现早期 DKD 的表现，尿蛋白逐渐增加，伴有肾小球和肾小管损伤，以及肾脏纤维化，而 db/m 小鼠尿蛋白正常，无类似肾脏病理损害表现。本研究结果显示，db/db 小鼠足细胞存在明显的线粒体功能障碍。从 db/db 小鼠肾脏中分离足细胞，并从足细胞中提取线粒体，检测线粒体功能，结果显示 db/db 小鼠足细胞线粒体复合物 I 和复合物 III 功能明显下降。此外还发现部分线粒体复合物相关基因 mRNA 表达下降，伴有 mtDNA 拷贝数明显降低和足细胞数量减少。进一步研究发现，与 db/m 小鼠相比，db/db 小鼠足细胞与线粒体代谢相关的基因，如 SIRT1、PGC-1 α 、TFAM、NRF1、

NRF2 mRNA 表达明显降低。以上结果证实，糖尿病小鼠足细胞线粒体功能存在明显异常。

DKD 的发生发展是多因素综合作用的结果，目前认为，肾脏血流动力学的改变、代谢紊乱、炎症反应以及遗传背景等均起非常重要的作用。持续高血糖环境引起的大量细胞因子的释放、蛋白激酶 C 的活化、ROS 的产生在 DKD 的发展中起着至关重要的作用^[2-3]，而这些致病因素导致足细胞损伤被认为是引起蛋白尿和肾小球硬化最为重要的因素之一^[4-5]。

足细胞是肾小球滤过膜的重要组成部分，在维持滤过屏障的完整、修复基底膜、合成血管内皮生长因子和调节细胞外基质的合成中发挥重要作用。有研究提示，抑制线粒体分裂可以减轻糖尿病小鼠足细胞线粒体功能障碍，改善肾脏病变。足细胞特异性动力相关蛋白 1（DRP1）缺失的糖尿病小鼠中，尿蛋白较对照组的野生型糖尿病小鼠减少，超

微结构分析表明野生型糖尿病小鼠的足细胞线粒体分裂现象显著增加，但在足细胞 DRP1 缺失的糖尿病小鼠中线粒体结构明显改善^[6]。电镜观察足细胞线粒体形态学发现，db/db 小鼠足细胞线粒体嵴结构明显异常。线粒体嵴是线粒体内膜向线粒体基质折褶形成的一种结构。线粒体嵴的形成增大了线粒体内膜的表面积。同时，线粒体嵴上存在 ATP 合成酶和细胞色素等重要蛋白，是细胞有氧呼吸的重要场所。但导致足细胞线粒体嵴形态异常的机制目前尚未明确，有待进一步研究。

线粒体形态异常通常伴有功能障碍。有体外研究发现，长时间高浓度葡萄糖刺激小鼠足细胞，可以增加足细胞耗氧量和线粒体数量，下调线粒体复合物 I + III 的活性^[7]。我们通过分离 db/db 小鼠足细胞，进一步确认了糖尿病小鼠足细胞线粒体复合物功能较非糖尿病小鼠下降。而且结果证实线粒体复合物 I 和复合物 III 的部分组分 mRNA 表达明显减少，与线粒体能量代谢密切相关的 SIRT1、PGC-1 α 、NRF1、NRF2 及 TFAM mRNA 表达也明显减少。

由此可见，线粒体功能异常参与了足细胞的损伤过程。线粒体是真核细胞内的重要细胞器，不仅是供应细胞能量的主要来源，而且在调控细胞凋亡、维持铁稳态和调节 ROS 的生成与清除中具有重要作用。足细胞具有丰富的线粒体，通过电镜可以观察到，除了细胞体外，狭窄的足突部位同样有线粒体的存在。大量的线粒体除了支持足细胞的高

能量需求，还参与了足细胞钙信号调节和氧化还原稳态的维持。我们的研究显示，足细胞线粒体功能存在明显异常，可能是 DKD 足细胞损伤的机制之一。

参 考 文 献

[1] Liapis H, Romagnani P, Anders, HJ. New insights into the pathology of podocyte loss: mitotic catastrophe. *Am J Pathol*, 2013, 183 (5): 1364-1374.

[2] Gnudi L, Coward RJ, Long DA. Diabetic Nephropathy: Perspective on Novel Molecular Mechanisms *Trends Endocrinol Metab*, 2016, 27 (11): 820-830.

[3] Jha JC, Banal C, Chow BS, Cooper ME, Jandeleit-Dahm K. Diabetes and kidney disease: role of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 25 (12): 657-684.

[4] Lash LH. Mitochondrial glutathione in diabetic nephropathy. *J Clin Med*, 2015, 4 (7), 1428-1447 .

[5] 常欣蓓; 倪兆慧. 足细胞在蛋白尿产生中的作用新进展. *新医学*, 2013, 44 (4): 223-226.

[6] Ayanga BA, Badal SS, Wang Y, Galvan DL, Chang BH, Schumacker PT, Danesh FR. Dynamin-related protein 1 deficiency improves mitochondrial fitness and protects against progression of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27 (9): 2733-2247.

[7] Stieger N, Worthmann K, Teng B, Engeli S, Das AM, Haller H, Schiffer M. Impact of high glucose and transforming growth factor-beta on bioenergetic profiles in podocytes. *Metabolism*, 2012, 61 (8): 1073-1086.

(收稿日期: 2017-02-01)
(本文编辑: 洪悦民)