

· 基础研究 ·

抑制细胞周期素依赖性蛋白激酶 5 对小鼠足细胞凋亡的影响*

张悦¹, 张怡², 郭庆军¹, 刘巍^{3△}

(1. 河北医科大学诊断学教研室, 石家庄 050017; 2. 河北省保定市传染病医院介入科 070000;

3. 河北医科大学病理学教研室, 石家庄 050017)

摘要:目的 探讨细胞周期素依赖性蛋白激酶 5(Cdk5)在高糖刺激体外培养小鼠足细胞中的表达及抑制 Cdk5 表达对高糖诱导足细胞凋亡的影响。方法 (1)体外培养条件性小鼠足细胞,分为正常糖组、甘露醇组、高糖组,高糖组按不同刺激时间分为 0、6、12、24、48 h 5 组,应用蛋白质印迹(Western blot)法检测足细胞中 Cdk5 蛋白表达水平。(2)应用 Cdk5 miRNA 干扰质粒抑制足细胞中 Cdk5 基因的表达水平。分别设立:NG 组(正常糖);HG 组(高糖);HG+S 组(高糖+Scrambled 阴性质粒);HG+C 组(高糖+Cdk5 miRNA 质粒)。以上各组细胞培养 48 h 后,应用流式细胞术和末端脱氧核苷酰基转移酶介导性 dUTP 切口末端标记(TUNEL)法检测足细胞凋亡水平,Western blot 法检测凋亡相关蛋白 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)和分裂型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cleaved caspase-3)的蛋白表达水平。结果 与正常糖组相比,高糖刺激后,足细胞中 Cdk5 的蛋白表达水平明显增加($P<0.05$)。Cdk5 miRNA 干扰质粒能显著抑制足细胞中 Cdk5 的表达水平。与 HG 组和 HG+S 组相比,HG+C 组足细胞凋亡率显著降低($P<0.05$),凋亡相关蛋白 cleaved caspase-3 蛋白表达水平和 Bax/Bcl-2 蛋白表达比率也有明显降低($P<0.05$)。结论 高糖刺激可以增加足细胞中 Cdk5 蛋白的表达水平;抑制 Cdk5 表达可以降低高糖刺激诱导的足细胞凋亡。

关键词:细胞周期素依赖性蛋白激酶 5;糖尿病肾病;足细胞;细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.34.022

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)34-4162-04

Effects of cyclin-dependent kinase 5 expression inhibition on apoptosis of mouse podocyte*

Zhang Yue¹, Zhang Yi², Guo Qingjun¹, Liu Wei^{3△}

(1. Department of Diagnostics, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050017, China; 2. Department of

Invasive Technology, Infectious Disease Hospital of Baoding City, Baoding, Hebei 070000, China;

3. Department of Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050017, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of Cdk5 in high glucose-induced mouse podocytes and the effects of inhibiting Cdk5 expression on podocyte apoptosis. **Methods** (1) Mouse podocytes cultured in vitro were divided into normal glucose group, mannitol group, high glucose group and the high glucose group was further divided in to 0, 6, 12, 24, 48 h group depend on the induce time. Changes of Cdk5 expression in each group were detected by Western blotting. (2) The expression of Cdk5 in podocyte was inhibited by Cdk5 miRNA plasmid. The podocytes were divided into 4 groups: NG group(normal glucose), HG group(high glucose), HG+S group(high glucose + scrambled plasmid) and HG+C group(high glucose + Cdk5 miRNA plasmid). The podocyte apoptosis rates were detected by flow cytometry and terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling(TUNEL), and the expressions of Bcl-2, Bax and cleaved caspase-3 were detected by Western blotting respectively after 48 h. **Results** Compared with normal glucose group, the expression of Cdk5 was significantly increased in podocytes of high glucose group($P<0.05$). The expression of Cdk5 in podocytes was inhibited by Cdk5 miRNA plasmid. Compared with HG and HG+S group, the podocyte apoptosis rate of HG+C group was significantly decreased($P<0.05$). The expression of cleaved caspase-3 protein and Bax/Bcl-2 ratio were also decreased($P<0.05$). **Conclusion** High glucose could increased the expression of Cdk5 in podocytes. The downregulation of Cdk5 expression could decrease the podocyte apoptosis induced by high glucose.

Key words: cyclin-dependent kinase 5; diabetic nephropathy; podocyte; apoptosis

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病患者最常见的微血管并发症,也是糖尿病患者致残与死亡的重要因素之一。大量蛋白尿的发生是糖尿病肾组织损伤的典型标志。研究表明,足细胞数目减少与 DN 密切相关,可以引起肾小球

硬化并加重蛋白尿。凋亡是足细胞数目减少的重要原因之一。

细胞周期素依赖性蛋白激酶 5(cyclin-dependent kinase 5, Cdk5)是脯氨酸限定性丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶,属于细胞周期素依赖性蛋白激酶家族。研究表明,在中枢神经系

* 基金项目:河北省自然科学基金资助项目(H2013206139);河北省高等学校科学技术研究指导项目(Z2010155);河北省高等学校科学技术研究优秀青年基金项目(No. Y2012001)。 作者简介:张悦(1978~),博士,讲师,主要从事糖尿病及其并发症研究。 △ 通讯作者, Tel:0311-86265734; E-mail: lwei929@126.com。

统中,Cdk5 过度激活可引起 Tau 蛋白异常磷酸化,导致细胞骨架破坏,诱发细胞凋亡。在肾组织中,Cdk5 表达于肾小球足细胞,对调节足细胞的增殖、分化和形态结构具有重要作用。然而,Cdk5 是否参与了 DN 中足细胞的凋亡过程,目前尚无报道。本研究旨在通过体外培养小鼠足细胞,探讨高糖刺激后 Cdk5 的表达情况;并通过转染特异性 Cdk5 miRNA,研究抑制 Cdk5 表达对高糖刺激足细胞凋亡的影响,以期对 DN 的临床治疗提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

条件性永生化小鼠足细胞购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。pcDNA6.2-GW/miRNA Cdk5 干扰质粒和 Scrambled 阴性质粒由英潍捷基(上海)贸易有限公司设计合成。FuGENE HD 转染试剂购自美国 Promega 公司。鼠抗 Cdk5 单克隆抗体购自美国 Thermo Scientific 公司,鼠抗分裂型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cleaved caspase-3)单克隆抗体购自美国 Cell Signal 公司,兔抗 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-Associated X Protein, Bax)多克隆抗体购自美国 Protein Tech 公司。Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自杭州联科生物公司。末端脱氧核糖核苷酰基转移酶介导性 dUTP 切口末端标记(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL)凋亡检测试剂盒购自瑞士 Roche 公司。重组小鼠 γ -干扰素(γ -interferon, γ -IFN)、I 型胶原蛋白购自美国 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

小鼠足细胞培养方法参照文献[1]。培养时,培养瓶及培养板底部均预先铺被 0.1 mg/mL 的 I 型胶原蛋白。未分化足细胞在 33 °C, 5% CO₂ 培养箱中,用含有 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、20 U/mL 重组小鼠 γ -IFN、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基培养,促进细胞增殖并传代(许可条件)。许可条件下培养的足细胞按 1:10 传代后,在 37 °C,用不添加重组小鼠 γ -IFN、含有 10% FBS 及 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基培养 10~15 d(非许可条件),诱导足细胞分化成熟。

1.2.2 实验分组

Cdk5 蛋白表达检测:足细胞在无血清培养基培养 24 h 后分为 3 组:(1)NG 组(5.5 mM 正常糖, normal glucose, NG);(2)NG+M 组(24.5 mM 甘露醇, mannitol NG+M);(3)HG 组(30 mM 高糖, high glucose, HG)。高糖组按不同刺激时间分为 0、6、12、24、48 h 组。

干扰质粒转染和足细胞凋亡检测:将足细胞分为 3 组:(1)Control 组(正常对照);(2)S 组(转染 Scrambled 阴性质粒);(3)Cdk5 miR 组(转染 Cdk5 miRNA 质粒)。应用 FuGENE HD 转染试剂分别转染 pcDNA6.2-GW/ miR Cdk5 干扰质粒和 Scrambled 阴性质粒。采用杀稻瘟菌素 5 μ g/mL 筛选阳性克隆。

将选出的阳性克隆细胞进行传代培养。待细胞达到 60%~80% 融合后在无血清培养基培养 24 h 后分为 4 组:(1)NG 组(与前分组相同);(2)HG 组(与前分组相同);(3)HG+S 组(高糖+Scrambled 阴性质粒);(4)HG+C 组(高糖+Cdk5

miRNA 质粒)。3 孔/组,48 h 后收集细胞,进行以下观察。

1.2.3 流式细胞术(FMC)检测足细胞凋亡

各组实验细胞刺激结束后,加入胰酶-乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)消化液消化收集细胞。生理盐水洗涤细胞 2 次(1 000 r/min,离心 4 min);向沉淀的细胞中加入已稀释好的结合缓冲液(binding buffer),每管 500 μ L(按 1:4 用灭菌蒸馏水稀释),反复吹打均匀;分别加入 10 μ L 异氰酸荧光素(fluorescein isocyanate, FITC)标记的 Annexin V 和 5 μ L 碘化丙啶(propidium iodide, PI),混匀后避光室温孵育 10 min, FCM 检测, CellQuest 软件分析数据。

1.2.4 TUNEL 法检测足细胞凋亡

各组细胞接种于铺有盖玻片的 6 孔板中,于刺激 48 h 后收集细胞。4% 多聚甲醛(pH 7.4)室温固定 1 h,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)冲洗;3% 过氧化氢-甲醇室温孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次;0.1% TritonX-100(0.1% 柠檬酸钠溶解)冰上孵育 2 min, PBS 冲洗;每张盖玻片加 50 μ L TUNEL 反应混合物,放入湿盒中,避光,37 °C 孵育 1 h, PBS 冲洗;每张玻片加 50 μ L Hoechst(1 μ g/mL),湿盒中 37 °C 孵育 15 min, PBS 冲洗。荧光显微镜下观察结果。TUNEL 阳性信号呈绿色, Hoechst 呈蓝色。每张切片随机选取 5 个视野($\times 400$),观察阳性细胞核(绿色)和阴性细胞核(蓝色),计算细胞凋亡指数(apoptotic index, AI):阳性细胞核/总细胞核 $\times 100\%$,结果用每视野细胞凋亡指数平均值表示。

1.2.5 蛋白质印迹(Western Blot)检测足细胞中 Cdk5、Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3 蛋白表达

收集各组细胞提取总蛋白,每组样品取 50 μ g 总蛋白,加 6 \times 上样缓冲液,100 °C 变性 5 min,经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)后电转移至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)。5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 2 h,加入一抗 Cdk5(1:500)、Bcl-2(1:200)、Bax(1:1 000)、cleaved caspase-3(1:1 000)和 β -actin(1:1 000),4 °C 孵育过夜。吐温-三羟甲基氨基甲烷缓冲液(tween-tris buffered saline, TTBS)洗膜后加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔/鼠 IgG(1:5 000),37 °C 孵育 2 h, TTBS 洗膜,滴加增强型化学发光剂(enhanced chemiluminescence, ECL),于 Odyssey FC 成像系统中显影,并对条带进行定量分析。以目的条带和 β -actin 条带积分光密度值比值作为蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计学软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两组间均数比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

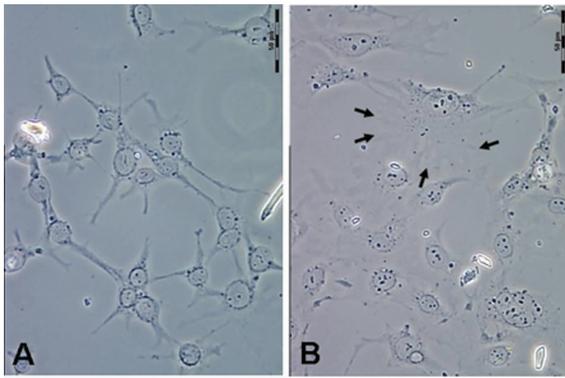
2.1 小鼠肾小球足细胞形态

在 33 °C, γ -IFN 存在的许可条件下,培养的未分化足细胞呈梭形或三角形,细胞接触融合后,呈椭圆形或“鹅卵石”样。传代后,足细胞转入 37 °C 无 γ -IFN 存在的非许可条件下培养 10~14 d,细胞停止增殖,逐渐分化成熟,胞质向周边展开,胞体变得比较宽大,从胞体伸出主突和次级足突,细胞呈“树枝状”形态,见图 1。

2.2 高糖刺激对足细胞 Cdk5 蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示,高糖刺激 48 h 后,足细胞 Cdk5 蛋白表达水平

明显增高,并呈时间依赖性($P < 0.05$),见图 2。而 NG 组和 NG+M 组未检测到 Cdk5 蛋白表达变化。



A:33 °C;B:37 °C。

图 1 小鼠肾小球足细胞形态

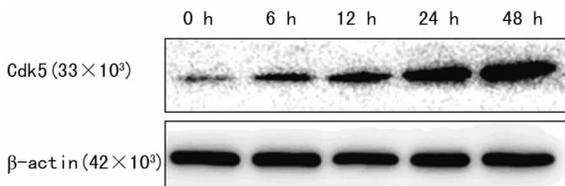


图 2 高糖刺激后不同时间点 Cdk5 蛋白表达水平

2.3 抑制 Cdk5 表达对高糖诱导足细胞凋亡率的影响

Western blot 检测结果显示,与 Control 组和 S 组相比,Cdk5 miRNA 干扰质粒转染后,Cdk5 miR 组足细胞中 Cdk5 蛋白表达水平显著降低,说明足细胞中 Cdk5 的表达水平被有效抑制,见图 3。

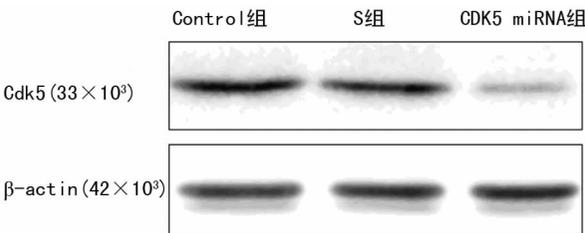


图 3 干扰质粒转染后各组细胞 Cdk5 蛋白的表达水平

2.4 FMC 和 TUNEL 检测结果 与 NG 组和 NG+M 相比,

高糖刺激 48 h 后,足细胞凋亡率显著增高($P < 0.05$),见表 1。与 HG 组和 HG+S 组相比,Cdk5 miRNA 干扰质粒转染后,HG+C 组足细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$),说明抑制 Cdk5 的表达可以降低足细胞凋亡率,见表 1。

表 1 各组细胞凋亡率的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	FMC	TUNEL
NG 组	3.69 ± 0.64	2.96 ± 0.52
NG+M 组	3.56 ± 0.55	2.85 ± 0.44
HG 组	17.15 ± 0.45 ^a	13.71 ± 0.36 ^a
HG+S 组	16.95 ± 0.57 ^a	12.96 ± 0.45 ^a
HG+C 组	10.34 ± 0.84 ^{abc}	8.27 ± 0.67 ^{abc}

^a: $P < 0.05$,与 NG 组比较;^b: $P < 0.05$,与 HG 比较;^c: $P < 0.05$,与 HG+S 组比较。

2.4 抑制 Cdk5 表达对凋亡相关蛋白表达的影响 与 NG 组

相比,高糖刺激 48 h 后,HG 组足细胞中 cleaved caspase-3 的表达水平明显增高,Bax/Bcl-2 蛋白表达比率也明显升高($P < 0.05$);而加用 Cdk5 miRNA 干扰质粒转染后,与 HG 组和 HG+S 组相比,HG+C 组足细胞中 cleaved caspase-3 的表达水平及 Bax/Bcl-2 蛋白表达比率明显降低($P < 0.05$),说明抑制 Cdk5 表达降低了凋亡相关蛋白的表达水平,见图 4、5。

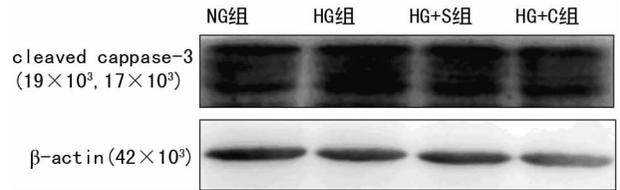


图 4 各组细胞 Cleaved caspase-3 蛋白表达水平

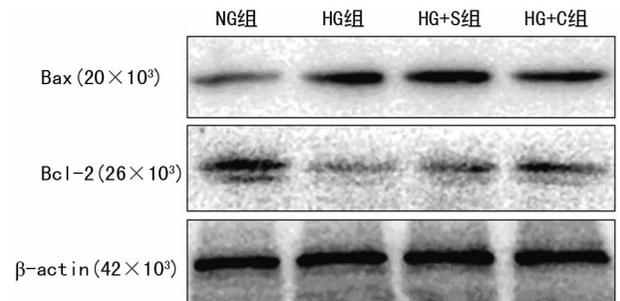


图 5 各组细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平

3 讨 论

足细胞是附着于肾小球基底膜外侧高度分化的细胞,它与肾小球毛细血管内皮细胞、基底膜共同构成肾小球滤过屏障。当 DN 病情进展时,足细胞除了出现足突增宽,还会发生细胞密度和数目的减少,而且足细胞数目减少的越多,其 DN 的进展越快^[2-5]。足细胞数目的减少与 DN 患者的蛋白尿、肾功能损害和肾小球硬化等密切相关;同时参与诱导肾小管萎缩和肾小球间质纤维化。目前,足细胞数目减少的具体机制并不清楚,凋亡是其发生的重要原因之一。

Cdk5 并不直接参与细胞周期的调节。Cdk5 主要通过对其他众多底物的磷酸化来发挥其生理作用^[6-8]。中枢神经系统中,Cdk5 主要存在与大脑皮层,参与神经细胞迁移、轴突导向、胞膜转运、微管稳定性的调节等,在神经系统发育和维持神经元正常功能中起重要作用。许多研究显示,Cdk5 的过度激活具有明显的神经毒性,可导致神经元中 Tau 蛋白的异常磷酸化,导致细胞骨架破坏,诱发细胞凋亡,而引起神经退行性疾病,如阿尔茨海默病^[9-10]。

在肾组织中,Cdk5 表达于成熟肾小球的足细胞中,对维持足细胞的分化、增殖和细胞形态具有重要作用^[11]。在实验性抗基底膜肾小球肾炎和 HIV 肾病模型中,足细胞中 Cdk5 的表达有不同程度的减低^[11]。而在糖尿病肾病大鼠模型中,Cdk5 抑制剂 Roscovitine 能显著减轻肾脏足细胞的损伤^[12]。以上结果提示,在肾小球疾病中,Cdk5 表达的异常与足细胞的损伤密切相关。在 DN 中,Cdk5 与足细胞凋亡的关系目前未见报道。本研究采用高糖处理条件性永生小鼠足细胞,观察 Cdk5 的表达情况及其与足细胞凋亡的关系。实验结果显示,在正常糖和甘露醇中培养的足细胞中,Cdk5 蛋白水平呈低表达,而经高

糖处理后,足细胞中 Cdk5 蛋白表达水平显著增高,并且呈时间依赖性。这表明 Cdk5 蛋白的高表达不受渗透压的影响,而是高糖刺激的结果。继而本研究应用 RNA 干扰技术,将 Cdk5 miRNA 干扰质粒成功转染至足细胞中抑制 Cdk5 基因的表达,FMC 和 TUNEL 检测结果显示,给予高糖刺激后,Cdk5 miRNA 干扰质粒组足细胞凋亡率显著低于单纯高糖刺激组和阴性质粒对照组,说明高糖刺激引起的 Cdk5 表达增高可能与足细胞凋亡有关。

Bcl-2 蛋白家族在细胞凋亡中发挥重要作用,是线粒体凋亡途径的中心^[13]。此家族中主要包含两类蛋白:促凋亡蛋白(Bax 等);抗凋亡蛋白(Bcl-2 等)。本研究选择 Bcl-2 和 Bax 作为代表观察抑制 Cdk5 蛋白表达对高糖诱导足细胞凋亡的影响。结果显示,与 HG 组和 HG+S 组相比,HG+C 组 Bax 蛋白表达降低,而 Bcl-2 表达增高,Bax/Bcl-2 比率显著降低。cleaved caspase-3 蛋白表达水平在 HG+C 组也明显低于 HG 组和 HG+S 组,说明 Cdk5 可能是通过线粒体途径参与了高糖诱导的足细胞凋亡。

参考文献:

- [1] Chittiprol S, Chen P, Petrovic-Djergovic D, et al. Marker expression, behaviors, and responses vary in different lines of conditionally immortalized cultured podocytes [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 301(3): F660-671.
- [2] Diez-Sampedro A, Lenz O, Fornoni A. Podocytopathy in diabetes: a metabolic and endocrine disorder [J]. *Am J Kidney Dis*, 2011, 58(4): 637-646.
- [3] Pyram R, Kansara A, Banerji MA, et al. Chronic kidney disease and diabetes [J]. *Maturitas*, 2012, 71(2): 94-103.
- [4] Stitt-Cavanagh E, MacLeod L, Kennedy C. The podocyte in diabetic kidney disease [J]. *Scientific World Journal*, 2009(9): 1127-1139.

- [5] Weil EJ, Lemley KV, Mason CC, et al. Podocyte detachment and reduced glomerular capillary endothelial fenestration promote kidney disease in type 2 diabetic nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2012, 82(9): 1010-1017.
- [6] Cheung ZH, Ip NY. Cdk5: a multifaceted kinase in neurodegenerative diseases [J]. *Trends Cell Biol*, 2012, 22(3): 169-175.
- [7] Barnett DG, Bibb JA. The role of Cdk5 in cognition and neuropsychiatric and neurological pathology [J]. *Brain Res Bull*, 2011, 85(1/2): 9-13.
- [8] Lalioti V, Pulido D, Sandoval IV. Cdk5, the multifunctional surveyor [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(2): 284-311.
- [9] López-Tobón A, Castro-Álvarez JF, Piedrahita D, et al. Silencing of CDK5 as potential therapy for Alzheimer's disease [J]. *Rev Neurosci*, 2011, 22(2): 143-152.
- [10] Zhu J, Li W, Mao Z. Cdk5: mediator of neuronal development, death and the response to DNA damage [J]. *Mech Ageing Dev*, 2011, 132(8-9): 389-394.
- [11] Griffin SV, Hiromura K, Pippin J, et al. Cyclin-dependent kinase 5 is a regulator of podocyte differentiation, proliferation, and morphology [J]. *Am J Pathol*, 2004, 165(4): 1175-1185.
- [12] Liu W, Zhang Y, Liu S, et al. The expression of intermediate filament protein nestin and its association with cyclin-dependent kinase 5 in the glomeruli of rats with diabetic nephropathy [J]. *Am J Med Sci*, 2013, 345(6): 470-477.
- [13] García-Sáez AJ. The secrets of the Bcl-2 family [J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(11): 1733-1740.

(收稿日期: 2013-08-04 修回日期: 2013-09-03)

(上接第 4161 页)

- [10] Trumm CG, Jakobs TF, Stahl R, et al. CT fluoroscopy-guided vertebral augmentation with a radiofrequency-induced, high-viscosity bone cement (StabiliT()): technical results and polymethylmethacrylate leakages in 25 patients [J]. *Skeletal Radiol*, 2013, 42(1): 113-120.
- [11] Alhawagri M, Yamanaka Y, Ballard D, et al. Lysine392, a K63-linked ubiquitination site in NEMO, mediates inflammatory osteoclastogenesis and osteolysis [J]. *J Orthop Res*, 2012, 30(4): 554-560.
- [12] Lochner K, Fritsche A, Jonitz A, et al. The potential role of human osteoblasts for periprosthetic osteolysis following exposure to wear particles [J]. *Int J Mol Med*, 2011, 28(6): 1055-1063.

- [13] Yamanaka Y, Karuppaiah K, Abu-Amer Y, et al. Polyubiquitination events mediate polymethylmethacrylate (PMMA) particle activation of NF-kappaB pathway [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(27): 23735-23741.
- [14] Fang Q, Wang H, Zhu S, et al. N-acetyl-L-cysteine inhibits wear particle-induced prosthesis loosening [J]. *J Surg Res*, 2011, 168(2): 163-172.
- [15] Burton L, Paget D, Binder NB, et al. Orthopedic wear debris mediated inflammatory osteolysis is mediated in part by NALP3 inflammasome activation [J]. *J Orthop Res*, 2013, 31(1): 73-80.

(收稿日期: 2013-09-10 修回日期: 2013-10-30)