

泌尿系疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002239

ATF4通过调节 Parkin 减轻棕榈酸诱导的肾小球足细胞凋亡

徐凌珂, 吴 玥, 刘 婷, 万姜敏, 杜晓刚

(重庆医科大学附属第一医院肾内科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨转录激活因子 4(activating transcription factor-4, ATF4)调节 Parkin 在棕榈酸(palmitic acid, PA)诱导的肾小球足细胞凋亡中的作用。**方法:**SD 大鼠 20 只随机分 2 组:普通饮食组($n=10$)及高脂饮食组($n=10$)喂养 12 周后,采集血清检测甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇酯(total cholesterol, TC);Tunel 染色检测肾组织细胞凋亡情况;免疫组化、Western blot 检测肾组织 Cleaved-caspase3 和 ATF4、Parkin 蛋白的表达。在体外实验中,采用 PA 刺激足细胞,或用质粒转染过表达 Parkin 或用腺病毒敲低 ATF4 表达,Western blot 检测足细胞凋亡相关蛋白 Cleaved-caspase3 表达水平,流式细胞术检测足细胞的凋亡率。**结果:**高脂饮食组大鼠 TG 和 TC 的表达水平(2.700 ± 0.565 、 2.620 ± 0.565)分别与普通饮食组(0.780 ± 0.165 、 1.540 ± 0.377)相比明显增加($t=-7.987$, $P=0.000$; $t=-3.895$, $P=0.003$)。肾组织凋亡相关蛋白 Cleaved-caspase3、Parkin 蛋白和 ATF4 蛋白表达水平,高脂饮食组(2.257 ± 0.326 、 1.587 ± 0.162 、 1.851 ± 0.347)较普通饮食组(1.000 ± 0.190 、 1.000 ± 0.323 、 1.000 ± 0.186)明显增加($P=0.000$, $P=0.003$, $P=0.000$)。采用不同浓度 PA 刺激发现,足细胞 ATF4、Parkin 及 Cleaved-caspase3 的表达量 150 $\mu\text{mol/L}$ PA 组(1.689 ± 0.235 、 1.529 ± 0.057 、 1.773 ± 0.186)、300 $\mu\text{mol/L}$ PA 组(1.702 ± 0.228 、 2.047 ± 0.086 、 2.282 ± 0.155)较对照组(1.000 ± 0.030 、 1.000 ± 0.066 、 1.000 ± 0.039)明显增加($P=0.002$, $P=0.002$; $P=0.000$, $P=0.000$; $P=0.000$, $P=0.000$)。采用 Parkin 过表达质粒转染足细胞后,与对照组(1.000 ± 0.253)相比, Parkin 过表达组的 Parkin 表达(105.242 ± 24.108)明显升高($P=0.000$)。进一步予以 PA 刺激, PA+Parkin 过表达组足细胞[1.943 ± 0.200 , (9.590 ± 0.418)%]较 PA+空载质粒组[3.398 ± 0.164 , (15.140 ± 1.227)%]其 Cleaved-caspase3 明显减少($P=0.000$),细胞凋亡率明显降低($P=0.000$)。进行腺病毒转染敲低 ATF4 后,与对照组(1.000 ± 0.112 、 1.000 ± 0.104 、 1.000 ± 0.279)相比, shATF4 3 组 ATF4 蛋白表达(0.175 ± 0.064)、Parkin 蛋白表达(0.518 ± 0.130)明显减少($P=0.000$, $P=0.004$), Cleaved-caspase3 表达(2.305 ± 0.150)明显增加($P=0.000$)。细胞凋亡率 shATF4 组[(14.230 ± 0.278)%]较对照组[(7.020 ± 0.773)%]明显增加($P=0.000$)。PA 刺激已敲低 ATF 的足细胞, Cleaved-caspase3 及细胞凋亡率相比 PA+shRNA 组[1.926 ± 0.215 , (20.943 ± 4.194)%], PA+shATF4 组[2.483 ± 0.114 , (46.643 ± 10.675)%]明显增加($P=0.007$, $P=0.018$)。**结论:** ATF4 可以调节 Parkin 来减轻棕榈酸诱导的肾小球足细胞凋亡。

【关键词】棕榈酸;肾小球足细胞;内质网应激;ATF4;Parkin;凋亡**【中图分类号】**R334.1;R322.61;R361.3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-03-25

ATF4 alleviates palmitic acid-induced apoptosis of glomerular podocytes by regulating Parkin

Xu Lingke, Wu Yue, Liu Ting, Wan Jiangmin, Du Xiaogang

(Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the role of activating transcription factor-4 (ATF4) in palmitic acid (PA)-induced apoptosis of glomerular podocytes by regulating Parkin. **Methods:** Twenty Sprague Dawley rats were randomly divided into two groups: normal diet group with 10 rats and high-fat diet group with 10 rats. After 12 weeks of feeding, serum was collected for measurement of triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) levels. Cell apoptosis in renal tissues was evaluated by Tunel staining. Immunohistochemical method and Western blot were used to measure the protein expression of cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase -3 (Cleaved caspase-3), ATF4, and Parkin in renal tissues. PA was used to stimulate glomerular podocytes in vitro, plasmids were transfected with overexpressed Parkin, or adenovirus was used to knock down the expression of ATF4. Western blot was used to measure the expression of Cleaved caspase-3, and flow cytometry was used to determine the apoptosis rate of glomerular

作者介绍:徐凌珂, Email: 464579683@qq.com,

研究方向:肾小球足细胞自噬与凋亡的关系。

通信作者:杜晓刚, Email: dxgxm@163.com。**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(编号:81370816);重庆市自然科学基金重点资助项目(编号:csts2012jjA10136);重庆市卫生局资助项目(编号:2011-1-016)。**优先出版:** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190708.1604.012.html>
(2019-07-10)

podocytes. **Results:** The high-fat diet group had significantly higher expression of TG and TC compared with the normal diet group (2.700 ± 0.565 vs. 0.780 ± 0.165 , $t=-7.987$, $P=0.000$; 2.620 ± 0.565 vs. 1.540 ± 0.377 , $t=-3.895$, $P=0.003$). The protein expression of Cleaved caspase-3, Parkin, and ATF4 were significantly higher in the high-fat diet group than in the normal diet group (2.257 ± 0.326 vs. 1.000 ± 0.190 , $P=0.000$; 1.587 ± 0.162 vs. 1.000 ± 0.323 , $P=0.003$; 1.851 ± 0.347 vs. 1.000 ± 0.186 , $P=0.000$). After being stimulated with different concentrations of PA, compared with the control group, the expression of ATF4, Parkin, and Cleaved caspase-3 in podocytes was significantly increased in the 150 $\mu\text{mol/L}$ PA group (1.689 ± 0.235 vs. 1.000 ± 0.030 , $P=0.002$; 1.529 ± 0.057 vs. 1.000 ± 0.066 , $P=0.000$; 1.773 ± 0.186 vs. 1.000 ± 0.039 , $P=0.000$) and in the 300 $\mu\text{mol/L}$ PA group (1.702 ± 0.228 vs. 1.000 ± 0.030 , $P=0.002$; 2.047 ± 0.086 vs. 1.000 ± 0.066 , $P=0.000$; 2.282 ± 0.155 vs. 1.000 ± 0.039 , $P=0.000$). After the Parkin overexpression plasmid was transfected into podocytes, the expression of Parkin in the Parkin overexpression group was significantly increased compared with the control group (105.242 ± 24.108 vs. 1.000 ± 0.253 , $P=0.000$). After stimulation with PA, the expression of Cleaved caspase-3 in podocytes and PA-induced apoptosis rate in PA+Parkin overexpression group were significantly reduced compared with the PA+empty plasmid group [1.943 ± 0.200 vs. 3.398 ± 0.164 , $P=0.000$; $(9.590 \pm 0.418)\%$ vs. $(15.140 \pm 1.227)\%$, $P=0.000$]. After adenovirus transfection and knockdown of ATF4, the protein expression of ATF4 and Parkin in the shATF4 group was significantly reduced and the expression of Cleaved caspase-3 was significantly increased compared with the control group (0.175 ± 0.064 vs. 1.000 ± 0.112 , $P=0.000$; 0.518 ± 0.130 vs. 1.000 ± 0.104 , $P=0.004$; 2.305 ± 0.150 vs. 1.000 ± 0.279 , $P=0.000$). The cell apoptosis rate of podocytes was significantly higher in the shATF4 group than in the control group [$(14.230 \pm 0.278)\%$ vs. $(7.020 \pm 0.773)\%$, $P=0.000$]. After podocytes were stimulated with ATF knockdown, the expression of Cleaved caspase-3 and apoptosis rate were significantly higher in the PA+shATF4 group than in the PA+shRNA group [2.483 ± 0.114 vs. 1.926 ± 0.215 , $P=0.007$; $(46.643 \pm 10.675)\%$ vs. $(20.943 \pm 4.194)\%$, $P=0.018$]. **Conclusion:** ATF4 can alleviate PA-induced apoptosis of glomerular podocytes by regulating Parkin.

[Key words] palmitic acid; glomerular podocytes; endoplasmic reticulum stress; ATF4; Parkin; apoptosis

慢性肾脏病(chronic kidney diseases, CKD)及其导致的终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)已成为一个全球性的健康问题。慢性肾脏病常常合并脂质代谢紊乱,主要表现为高甘油三酯血症^[1-2]。既往研究发现,高脂血症本身可导致肾脏损害,如系膜细胞增殖、肾小球硬化、肾小管间质纤维化等,是CKD进展最重要的危险因素之一。足细胞作为构成肾小球滤过屏障的肾小球固有细胞,在高脂血症早期即可发生足突融合、细胞骨架异常、细胞凋亡、脱落等^[3],但机制有待于进一步研究。

内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是真核细胞的一种保护性应激反应。内质网通过激活未折叠蛋白质反应(unfolded protein response, UPR)以保护由内质网应激所引起的细胞损伤^[4]。适度的内质网应激可保护细胞免受各种刺激的损害作用,而过强或过长时间的内质网应激则扰乱内质网稳态,诱导细胞凋亡发生^[5]。越来越多的研究显示,脂质异常、血糖升高、缺氧等都能诱导肾脏细胞的内质网应激,可参与多种肾脏疾病的发生发展^[6-8]。转录激活因子4(activating transcription factor-4, ATF4)是内质网应激主要效应蛋白。研究显示,在高脂诱导的糖尿病肾病大鼠模型中 ATF4 表达明显增

加^[9]。在帕金森病(Parkinson's disease, PD)模型中研究发现,ATF4 可通过维持 Parkin 的表达减少神经细胞的凋亡^[10]。但是在高脂诱导的肾小球足细胞凋亡中,ATF4 是否可通过调节 Parkin 的表达而发挥保护作用? 本研究拟采用高脂喂养大鼠建立高脂肾损害动物模型,采用棕榈酸诱导肾小球足细胞,以研究 ATF4 是否调节 Parkin 表达及其在高脂诱导的肾小球足细胞的凋亡中的重要作用。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

RPMI-1640 培养基(江苏凯基)、胎牛血清(美国 Invitrogen)、小鼠重组干扰素 γ (美国 Perprotech)、棕榈酸(美国 Sigma)、ATF 抗体(美国 Abcam)、Parkin 抗体(美国 Abcam)、Cleaved-caspase 3 抗体(美国 CST)、 β -actin 抗体(天津三箭生物有限公司)、ECL 化学发光试剂盒(美国 Adavansta)、油红染料(美国 Sigma)、荧光二抗(Invitrogen)、DAPI(美国 Invitrogen)、HE 染色试剂盒(中国碧云天 Beyotime)、TUUNEL 细胞凋亡试剂盒(中国碧云天 Beyotime)、shATF4(汉恒生物科技上海有限公司)、Parkin 过表达质粒(中国上海吉玛公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物实验 4 周龄雄性 SD 大鼠购于重庆医科大学

动物中心,共 20 只,随机分为 2 组:普通饮食组(normal chow diet, NCD)($n=10$)及高脂饮食组(high fat diet, HFD)($n=10$),喂养 12 周。采用的高脂饮食配方为 2%胆固醇、0.3%去氧胆酸钠、7.5%猪油、0.2%丙基硫氧嘧啶、5%蛋黄粉、85%基础饲料。实验结束时穿刺股动脉采血,分离血清,检测甘油三酯(triglyceride, TG)含量及总胆固醇酯(total cholesterol, TC)含量。处死大鼠留取部分肾脏标本,储存于液氮罐中或用 4%多聚甲醛浸泡固定备用。

1.2.2 细胞培养 条件性永生性小鼠足细胞(MPC5)由重庆医科大学阮雄中教授赠送。细胞用含 10%胎牛血清及含青/链霉素的 PRIM1640 培养基在温度为 37 °C、含 5%CO₂ 的孵箱内培养并传代进行后续试验。细胞采用不同浓度 PA 刺激,或基因转染过表达 Parkin,或腺病毒转染 GFP-shATF4 敲低 ATF 表达。

1.2.3 Parkin 质粒转染 pcmv5-HA-Parkin 购买于上海吉玛制药技术有限公司。Parkin 过表达质粒转染前一天数细胞,取 5×10^4 个细胞接种于 24 孔板上。取 0.8 μ g Parkin 过表达质粒加入 50 μ L 无血清 DMEM 培养基混匀。取 1 μ L Lipo2000 加入 50 μ L 无血清 DMEM 培养基混匀,室温放置 5 min。将 2 种稀释液混合,室温放置 20 min 后均匀滴入孔板中。将孔板放入 37 °C 孵箱孵育 24~48 h 后继续后续试验。

1.2.4 腺病毒转染 GFP-shATF4 序列 1:5'-GCTGCTTA-CATTACTCTAATC-3', 序列 2:5'-GACCACGTTGGATGACA-CATGTGAT-3', 序列 3:5'-GCTAGGCAGTGAAGTTGATAT-CTCT-3', 对照组 GFP-siRNA 序列:5'-TTCTCCGAACGTG-TCACGTAA-3'。当细胞密度长至培养瓶面积约 70%时转染病毒。算出 MOI=300 时需要的病毒体积,取相应的病毒体积加入 5 mL PRIM1640 培养基,混匀后均匀滴入孔板中。细胞于 37 °C 孵箱孵育 6 h 后换液,24 h 后换液,再根据细胞的密度进行后续试验。

1.2.5 TUNEL 染色 取肾组织冰冻切片于室温复温 50 min,再用 4%多聚甲醛固定 40~45 min, PBS 每次 10 min 清洗 2 次,用 5% Triton X-100 通透切片 5 min。PBS 清洗切片 2 次后放于湿盒中滴加 TUNEL 染色工作液进行染色,37 °C 恒温箱中避光染色 1 h。PBS 清洗 2 次后封片,于荧光显微镜(400 $\times$)下采集图片。

1.2.6 Western blot 检测蛋白表达 取适量肾组织放入含 500 μ L 裂解液的 EP 管中,用组织匀浆器打碎组织,4 °C 15 000 g 离心 20 min,取上清液。细胞处理完成后,每管细胞加入 1 mL 裂解液。在 4 °C, 14 000 g 条件下离心 15 min,取上清液。组织和细胞蛋白样品采用 BCA 测蛋白浓度并配平。取适量蛋白配平液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,后电转 30~60 min。条带浸泡入 5%脱脂牛奶,室温下摇床 60 r/min 慢摇封闭 3 h。一抗 ATF4(1:1 000)、Parkin(1:1 000)、Cleaved-caspase 3(1:1 000)、 β -actin(1:5 000),4 °C 孵育过夜。二抗(1:5 000)室温条件孵育 1 h。使用 ECL 化学发光试剂盒避光显色,凝胶成像仪采集图片。

1.2.7 免疫荧光 将细胞均匀种入 12 孔板,当细胞密度长至爬片约 70%,用 PA 150 μ mol/L 刺激细胞 24 h。再用 4%多聚甲醛固定细胞 40 min, PBS 润洗 3 次,每次 5 min。用 5% BSA 封闭 1 h 后,爬片敷 ATF、Parkin 抗体(1:150)于 4 °C 冰箱过夜。第 2 天,爬片复温 30 min,避光敷二抗 1 h, PBS 润洗 3 次,每次 5 min,后用抗荧光淬灭剂封片。荧光显微镜(400 $\times$)下照相,荧光图像采用 Image J 进行半定量分析。

1.2.8 流式细胞术 将处理后的细胞吸取培养基于 EP 管 a, PBS 润洗 1 次后同样吸取 PBS 于 EP 管 a。滴加 1 mL 胰酶于 37 °C 孵箱中消化 1 min 后,加入 1 mL 完全培养基中和胰酶,吸取细胞悬液于 EP 管 b。将 a+b 细胞混合液以 800 r/min 离心 5 min。去上清液, PBS 清洗细胞后再离心,重复 2 次。最后于 EP 管中加入约 500 μ L PBS,送至重庆医科大学生命科学院进行检测,采用 FITC-Annexin 双染色法测细胞凋亡。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 21.0 分析软件对实验数据进行分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。体外实验均重复 3 次,正态分布数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐者用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验。

2 结果

2.1 高脂饮食及 PA 刺激下肾脏损害和足细胞凋亡增加

高脂饮食组大鼠血清的 TG (2.700 ± 0.565) 和 TC 水平 (2.620 ± 0.565) 较普通饮食组 TG (0.780 ± 0.165)、TC (1.540 ± 0.377) 明显增高,差异有统计学意义($t=-7.987, P=0.000; t=-3.895, P=0.003$),如图 1A 所示。采用 TUNEL 染色及 Western blot 检测发现,高脂饮食组肾组织细胞凋亡率[(5.677 ± 0.517)%]及 Cleaved-caspase 3 表达(2.257 ± 0.326)较普通饮食组[(1.000 ± 0.214)%, 1.000 ± 0.190]明显增加,差异有统计学意义($t=-14.479, P=0.000; t=-8.169, P=0.000$),如图 1B、C 所示。体外实验中,Western blot 检测显示,PA 可剂量依赖性增加足细胞后 Cleaved-caspase 3 的表达,其对照组、50 μ mol/L 组、150 μ mol/L 组、300 μ mol/L 组分别为 1.000 ± 0.039 、 1.127 ± 0.055 、 1.773 ± 0.186 、 2.282 ± 0.155 ,各组比较差异有统计学意义($F=67.655, P=0.000$)。进一步 LSD 法分析发现,与对照组比较,150 μ mol/L PA 组、300 μ mol/L PA 组 Cleaved-caspase 3 的表达明显增加,差异有统计学意义($P=0.000, P=0.000$),如图 1D 所示。采用流式细胞术检测发现,PA 刺激下的足细胞凋亡明显增加。0 μ mol/L PA 组、50 μ mol/L PA 组、150 μ mol/L PA 组、300 μ mol/L PA 组足细胞凋亡率分别为 (7.380 ± 1.795)%、(13.353 ± 0.230)%、(16.460 ± 1.052)%、(16.720 ± 1.064)%,各组间差异有统计学意义($F=41.067, P=0.000$),进一步采用 LSD 法分析,50 μ mol/L PA 组、150 μ mol/L PA 组、300 μ mol/L PA 组分别与 0 μ mol/L PA 组比较,差异有统计学意义($P=0.000, P=0.000, P=0.000$),如图 1E 所示。

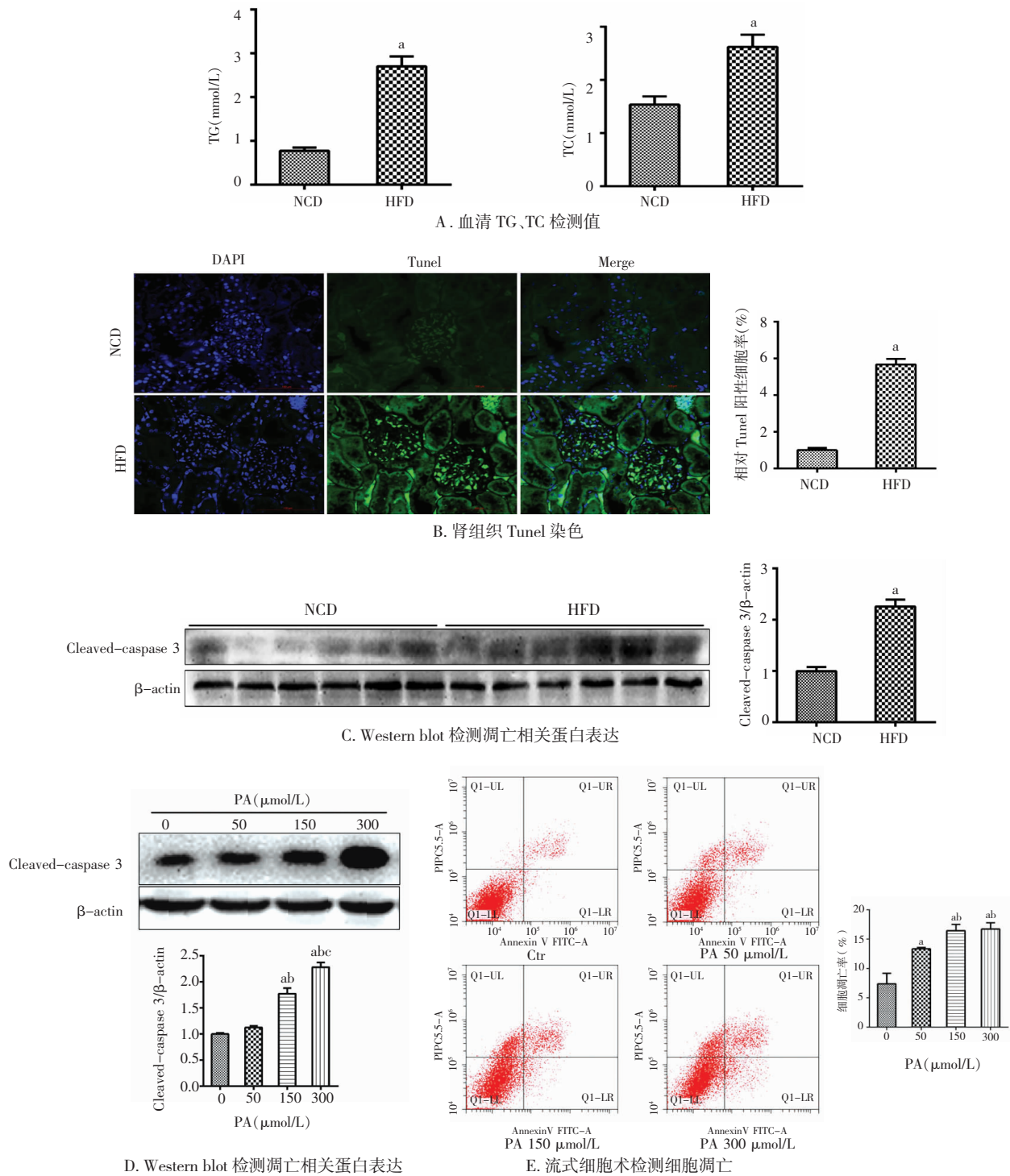


图 1 高脂饮食及 PA 刺激下肾脏损害和足细胞凋亡增加

2.2 高脂饮食及 PA 刺激下肾脏组织和足细胞 Parkin 表达增加

为研究高脂对肾脏组织 Parkin 表达的影响,采用 Western blot 检测 Parkin 的表达,结果显示高脂饮食组大鼠肾脏组织 Parkin 表达 (1.587 ± 0.162) 明显高于普通饮食组 (1.000 ± 0.323),差异有统计学意义 ($t = -3.980, P = 0.003$);免疫组化染色显示与 Western blot 检测结果相似,高脂饮食组 Parkin 表

达 (6.815 ± 0.875) 较对照组 (1.000 ± 0.167) 升高,差异有统计学意义 ($t = -11.295, P = 0.000$);如图 2A、B 所示。体外实验中采用 Western blot 检查显示,对照组、50 μmol/L PA 组、150 μmol/L PA 组、300 μmol/L PA 组足细胞 Parkin 表达分别为 1.000 ± 0.066 、 1.519 ± 0.169 、 1.529 ± 0.057 、 2.047 ± 0.086 ,各組间比较差异有统计学意义 ($F = 50.230, P = 0.000$),进一步 LSD 法分析显示,50 μmol/L PA 组、150 μmol/L PA 组、300 μmol/L

PA 组较对照组差异有统计学意义 ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$), 表明 PA 可浓度依赖性增加足细胞 Parkin 蛋白的表达, 如图 2C 所示。类似的, 采用免疫荧光检测显示, 150 $\mu\text{mol/L}$ PA 刺激后, 足细胞 Parkin 蛋白荧光表达强度 (3.219 ± 0.228) 较对照组 (1.000 ± 0.104) 明显增加, 差异有统计学意义 ($t=-15.343$, $P=0.000$), 如图 2D 所示。

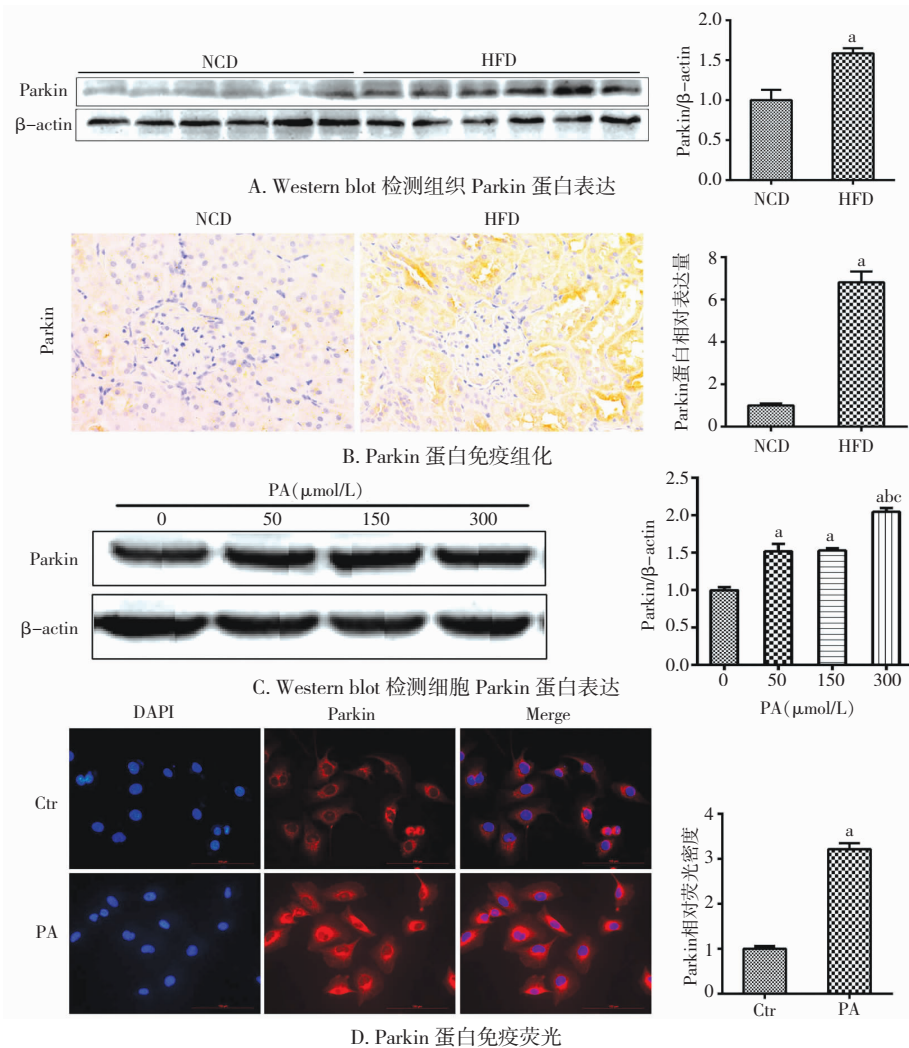
2.3 过表达 Parkin 对 PA 诱导的足细胞凋亡的影响

本文采用质粒转染足细胞后, Western blot 检测转染质粒对各组 Pakin 蛋白表达的影响, 结果显示差异有统计学意义 ($F=56.183$, $P=0.000$), 表明质粒转染成功。进一步 LSD 分析, 足细胞转染组 Parkin 表达 (105.242 ± 24.108) 较对照组 (1.000 ± 0.253)、空载质粒组 (0.766 ± 0.506) 明显升高 ($P=0.000$, $P=0.000$), 如图 3A 所示。为研究过表达 Parkin 对 PA 诱导的足细胞凋亡的影响, 将细胞分为对照组、空载质粒组、PA+空载质粒组、PA+Parkin 过表达组。采用 Western blot 检测凋亡相关蛋白 Cleaved-caspase 3 表达分别为 1.000 ± 0.117 、 1.190 ± 0.196 、 3.398 ± 0.164 、 1.943 ± 0.200 , 各组间比较差异有统计学意义 ($F=119.754$, $P=0.000$)。进一步 LSD 法

分析发现, PA+Parkin 过表达组较 PA+空载质粒组 Cleaved-caspase 3 明显减少 ($P=0.000$)。流式细胞术检测结果显示上述各种其细胞凋亡分别为 (6.140 ± 0.636)%、(5.410 ± 0.291)%、(15.140 ± 1.227)%、(9.590 ± 0.418)%, 各组差异有统计学意义 ($F=109.083$, $P=0.000$)。进一步 LSD 法分析显示, PA+Parkin 过表达组相比 PA+空载质粒组细胞凋亡率明显减少 ($P=0.000$), 如图 3B、C 所示。

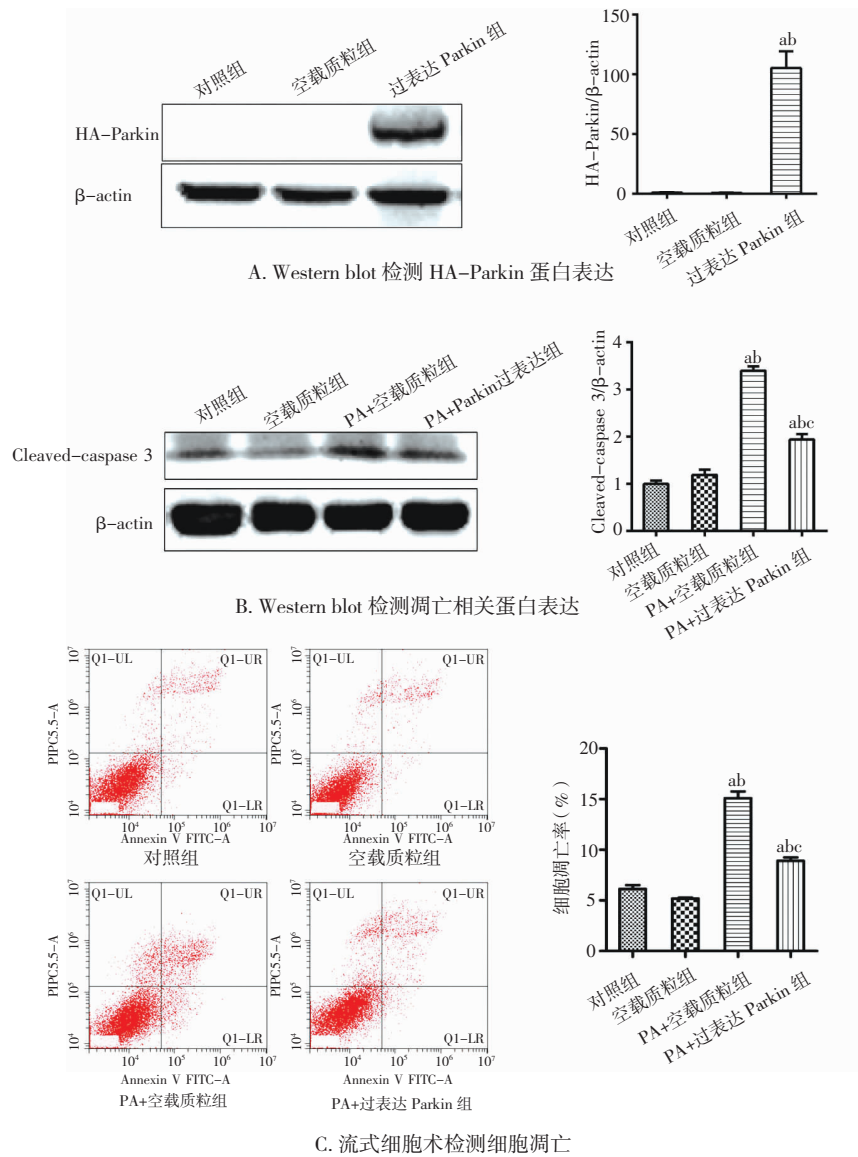
2.4 高脂饮食及 PA 刺激下肾脏组织和足细胞 ATF4 表达增加

Western blot 检测大鼠肾脏组织 ATF4 的表达, 发现与普通饮食组 ATF4 表达 (1.000 ± 0.186) 比较, 高脂饮食组的肾脏组织 ATF4 表达 (1.851 ± 0.347) 明显增加, 2 组比较差异有统计学意义 ($t=-5.292$, $P=0.000$)。免疫组化染色显示与 Western blot 检测结果相似, 高脂饮食组大鼠肾脏组织 ATF4 表达 (4.711 ± 0.832) 较对照组 (1.000 ± 0.300) 升高, 差异有统计学意义 ($t=-7.268$, $P=0.002$); 如图 4A、B 所示。在体外实验中, Western blot 检测 PA 呈浓度依赖性刺激足细胞 ATF4 表达增加, 其对照组、50 $\mu\text{mol/L}$ PA 组、150 $\mu\text{mol/L}$ PA 组、300 $\mu\text{mol/L}$ PA 组表达分别为 1.000 ± 0.030 、 1.235 ± 0.195 、 1.689 ± 0.235 、



注: a, 与对照组 (NCD 或 0 $\mu\text{mol/L}$ PA 组) 相比, $P<0.05$; b, 与 50 $\mu\text{mol/L}$ PA 组相比, $P<0.05$; c, 与 150 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸组相比较, $P<0.05$

图 2 高脂饮食及 PA 诱导 Parkin 表达增加



注:a, 与对照组相比, $P < 0.05$; b: 与空载质粒组相比, $P < 0.05$; c: 与 PA+空载质粒组相比, $P < 0.05$

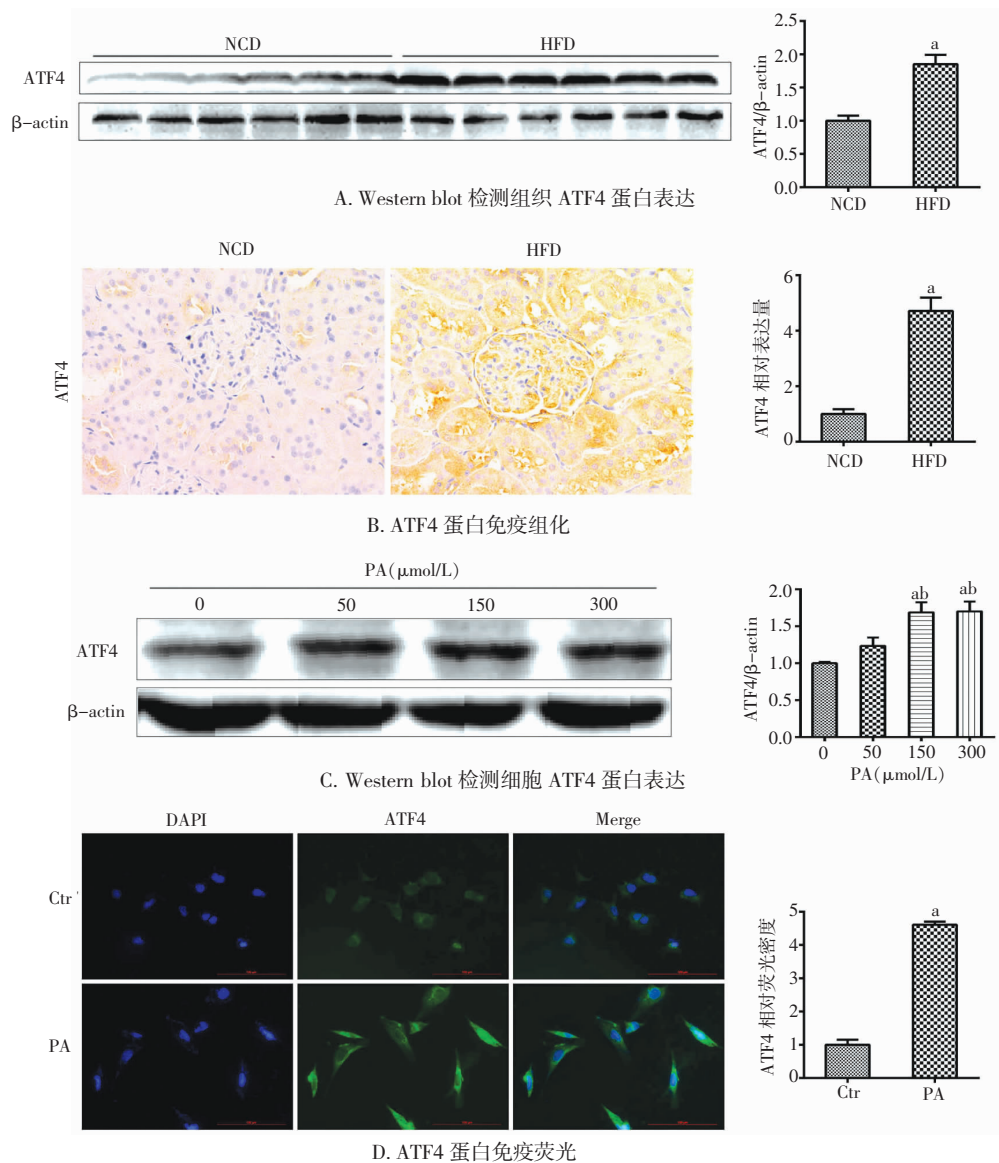
图3 Parkin 过表达对 PA 诱导的足细胞凋亡的影响

1.702 ± 0.228 , 各组间方差分析显示有统计学差异 ($F=9.925$, $P=0.005$), 进一步 LSD 法分析显示较对照组, $150 \mu\text{mol/L}$ 、 $300 \mu\text{mol/L}$ PA 组足细胞 ATF 表达明显增加 ($P=0.002$, $P=0.002$), 如图 4C 所示。同样, 采用免疫荧光染色显示, $150 \mu\text{mol/L}$ PA 刺激足细胞的 ATF4 荧光表达强度 (4.612 ± 0.162) 明显高于对照组 (1.000 ± 0.265), 差异有统计学意义 ($t=-20.165$, $P=0.000$), 如图 4D 所示。

2.5 敲低 ATF4 可减少足细胞 Parkin 的表达并增加足细胞凋亡

本研究采用体外腺病毒转染 shATF1、shATF2、shATF3 的方式敲低 ATF4, 转染 48 h 后用荧光显微镜可见病毒转染效率较高, 如图 5A 所示。Western blot 检测发现, 敲低 ATF4 对各组间 ATF4 蛋白表达差异有统计学意义 ($F=17.036$, $P=0.000$)。进一步 LSD 法分析 shATF4 3 组的 ATF4 表达

(0.175 ± 0.064) 分别较对照组 (1.000 ± 0.112)、阴性对照组 (0.973 ± 0.064)、shATF4 1 (0.992 ± 0.195) 及 shATF4 2 (0.980 ± 0.239) 明显减少, 差异有统计学意义 ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$), 如图 5B 所示。因此本研究选取 shATF3 继续后续敲低 ATF4 相关试验。结果发现, Western blot 检测敲低 ATF4 后各组间 Parkin 蛋白表达, 对照组、阴性对照组、shATF4 1 组、shATF4 2 组、shATF4 3 组蛋白表达分别为 1.000 ± 0.104 、 1.011 ± 0.128 、 1.042 ± 0.203 、 0.951 ± 0.188 、 0.518 ± 0.130 , 各组间差异有统计学意义 ($F=5.918$, $P=0.010$)。进一步 LSD 法分析, shATF4 3 组分别较对照组、阴性对照组明显减少 ($P=0.004$, $P=0.003$)。Western blot 检测敲低 ATF4 后各组间 Cleaved-caspase 3 蛋白表达, 对照组、阴性对照组、shATF4 1 组、shATF4 2 组、shATF4 3 组分别为 1.000 ± 0.279 、 1.247 ± 0.419 、 1.372 ± 0.325 、 1.150 ± 0.133 、 2.305 ± 0.150 ,



注:a,与对照组(NCD 或 0 μmol/L PA 组)相比, $P<0.05$;b:与 50 μmol/L PA 组相比, $P<0.05$

图 4 高脂饮食及 PA 诱导 ATF4 表达增加

各组间差异有统计学意义($F=9.971, P=0.020$)。进一步 LSD 法分析,shATF4 3 组分别较对照组、阴性对照组凋亡相关蛋白 Cleaved-caspase 3 表达明显增加($P=0.000, P=0.001$),如图 5C 所示。流式细胞术检测细胞凋亡结果显示,对照组[(7.020 ± 0.773)%],shRNA 组[(6.743 ± 0.676)%],shATF4 组[(14.230 ± 0.278)%]各组间细胞凋亡率差异有统计学意义($F=143.151, P=0.000$)。进一步 LSD 分析显示,与对照组、shRNA 组相比较,shATF 组细胞凋亡率明显增加($P=0.000, P=0.000$),如图 5D 所示。可见,基础条件下足细胞中 ATF4 可通过调节 Parkin 蛋白的表达减少足细胞的凋亡。

为进一步研究 PA 刺激下 ATF4 调节 Parkin 对足细胞凋亡的影响,采用 Western blot 检测,发现各组间 Cleaved-caspase 3 蛋白表达,对照组(1.000 ± 0.207)、阴性对照组(shRNA)(1.126 ± 0.136)、PA+shRNA 组(1.926 ± 0.215)、shATF4 组

(2.380 ± 0.289)、PA+shATF4 组(2.483 ± 0.114)差异有统计学意义($F=35.081, P=0.000$)。进一步 LSD 分析显示 PA+shRNA 组较对照组、阴性对照组(shRNA)Cleaved-caspase 3 蛋白表达明显增加($P=0.000, P=0.001$),shATF4 组较对照组、shRNA 组明显增加($P=0.000, P=0.000$),PA+shATF4 组较 PA+shRNA 组明显增加($P=0.007$),如图 5E 所示。类似的,流式细胞术检测发现各组间细胞凋亡率对照组[(7.947 ± 0.915)%]、阴性对照组[(15.520 ± 1.680)%]、PA+shRNA 组[(20.943 ± 4.194)%]、shATF 组[(32.423 ± 7.417)%]、PA+shATF 组[(46.643 ± 10.675)%]各组间差异有统计学意义($F=18.142, P=0.000$)。进一步 LSD 分析显示,shATF 组较对照组和阴性对照组足细胞凋亡率明显增加($P=0.001, P=0.007$);PA+shATF 组较 shATF4 组、PA+shRNA 组细胞凋亡率明显增加($P=0.000, P=0.018$),如图 5F 所示。

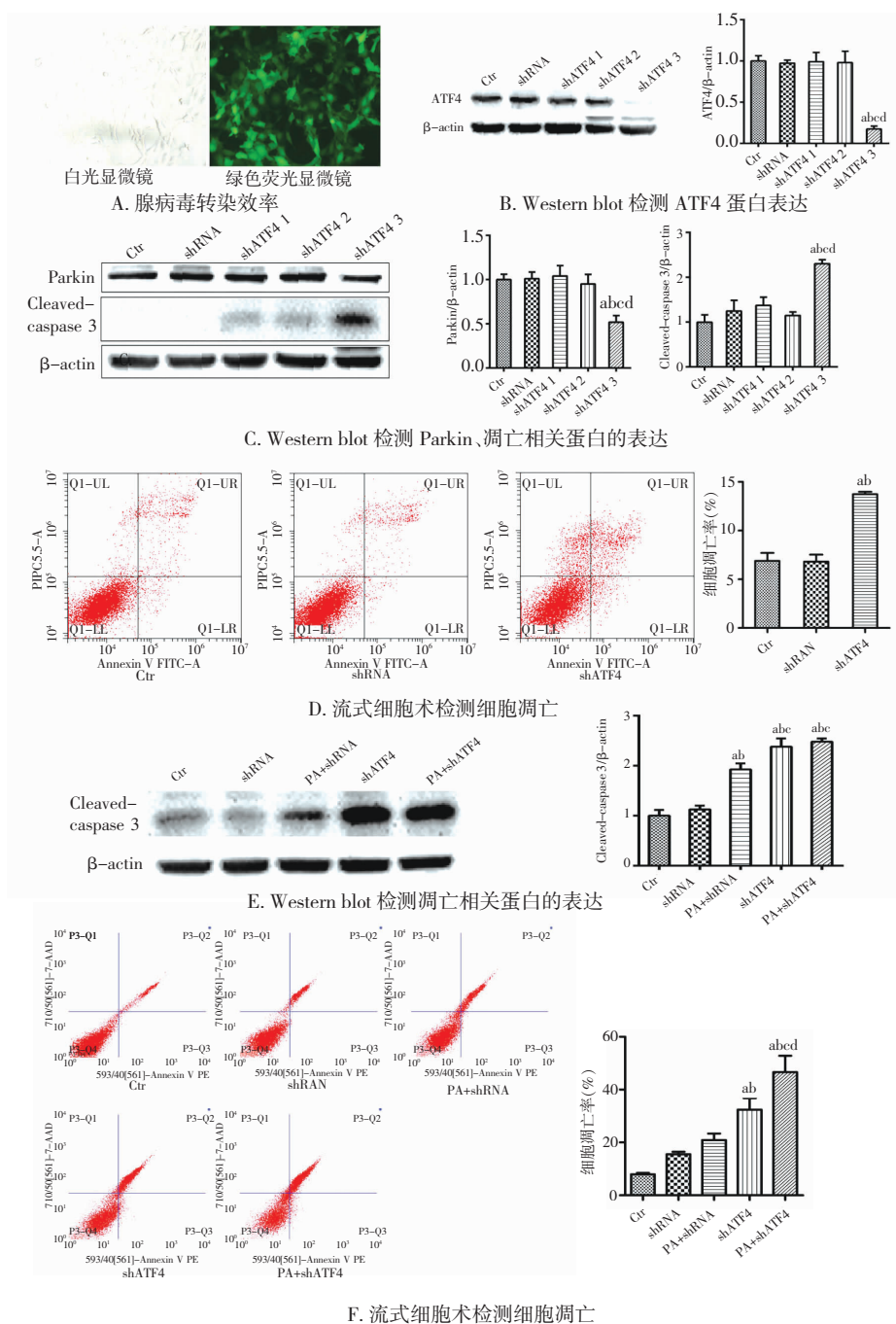


图 5 敲低 ATF4 可减少足细胞 Parkin 的表达并增加足细胞凋亡

注:a,与对照组相比, $P<0.05$;b:与阴性对照组(shRNA)相比, $P<0.05$;c:与 shATF4 1 敲除组/PA+shATF4 组相比, $P<0.05$;d:与 shATF4 2 敲除组/shATF4 组相比, $P<0.05$

3 讨论

越来越多的研究显示,脂质代谢紊乱是促进慢性肾脏病向终末期肾病发展的主要因素^[11]。凋亡作为一种细胞降解途径,是细胞的程序性死亡,在维持机体稳态中发挥重要作用^[12],而肾小球足细胞凋亡是高脂早期导致肾损害的关键机制之一^[13]。本研

究通过高脂饮食喂养 SD 大鼠建立高脂肾损害模型,结果发现高脂饲养动物血清甘油三酯和胆固醇酯水平明显升高,采用 Tunel 染色及 Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达均证明高脂可诱导动物组织细胞凋亡的增加。进一步在体外实验中采用 PA 刺激足细胞模拟高脂环境,结果发现肾小球足细胞凋亡及其凋亡相关蛋白 Cleaved-caspase 3 表达均明显增加,再一次证实高脂可以诱导足细胞凋亡,

但其具体机制有待进一步研究。

Parkin 是一种泛素蛋白连接酶,与泛素-蛋白酶体通路直接相关,其突变会导致常染色体隐性遗传性青少年型帕金森病^[14]。近年发现,Parkin 作为介导线粒体自噬的启动信号蛋白,其活化可启动线粒体自噬,对防止细胞凋亡有重要作用^[15-16]。有研究表明,Parkin 的活化可明显减少人急性早幼粒白血病细胞凋亡^[17]。本研究首次发现,高脂喂养的 SD 大鼠肾组织 Parkin 表达增加,进一步在体外实验中也显示,棕榈酸刺激下,肾小球足细胞 Parkin 表达也明显增加。为了进一步研究 Parkin 在高脂诱导的足细胞凋亡中的作用,本研究采用基因转染足细胞,结果发现过表达 Parkin 可有效减少 PA 诱导的足细胞凋亡,表明高脂环境下肾小球足细胞 Parkin 表达增加在防治细胞凋亡方面具有重要的保护效应。

内质网应激是真核细胞内质网通过激活未折叠蛋白质反应以保护由内质网应激所引起的细胞损伤^[4]。过度的内质网应激可扰乱内质网稳态,诱导细胞凋亡发生^[5]。有研究发现 PA 可通过内质网应激、活性氧(reactive oxygen specie,ROS)过量产生等不同途径诱导足细胞凋亡^[18]。ATF4 作为内质网应激的效应蛋白之一,可以从转录水平上调节 Parkin 的表达以减少神经细胞凋亡^[19-20]。本研究在体内外试验中均发现,高脂环境下肾组织及肾小球足细胞 ATF 表达增加,表明高脂环境下内质网应激活化。为进一步研究 ATF4 与 Parkin 的关系,本试验采用腺病毒敲低 ATF4 后发现足细胞基础水平的 Parkin 减少,细胞凋亡增加,表明 ATF4 在维持 Parkin 的表达、防治基础水平的足细胞凋亡方面具有重要作用。本研究进一步在体外试验中发现,敲除肾小球足细胞 ATF4,可加重棕榈酸诱导的足细胞凋亡,再一次证明 ATF4 可通过维持 Parkin 的表达而防治高脂诱导的肾小球足细胞凋亡。

综上所述,本研究揭示了高脂环境诱导的内质网应激中 ATF4 调节 Parkin 的表达与细胞凋亡的关系。结果发现,高脂可诱导大鼠肾脏足细胞凋亡增加。高脂环境下,肾组织的 ATF4 和 Parkin 蛋白表达增加,ATF4 可通过维持肾小球足细胞 Parkin 的表达减轻 PA 诱导的足细胞凋亡,然而其具体机制仍需深入研究。

参 考 文 献

[1] Zubovic SV, Kristic S, Prevljak S, et al. Chronic kidney disease and lipid disorders[J]. Med Arch, 2016, 70(3): 191-192.

[2] Bianchi S, Baronti A, Cominotto R, et al. Lipid metabolism abnormalities in chronic kidney disease[J]. G Ital Nefrol, 2016, 33(S68): 2.

[3] Joles JA, Kunter U, Janssen U, et al. Early mechanisms of renal injury in hypercholesterolemic or hypertriglyceridemic rats[J]. J Am Soc Nephrol, 2000, 11(4): 669-683.

[4] Remondelli P, Renna M. The endoplasmic reticulum unfolded protein response in neurodegenerative disorders and its potential therapeutic significance[J]. Front Mol Neurosci, 2017, 10: 187.

[5] Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation[J]. Science, 2011, 334(6059): 1081-1086.

[6] Guo J, Zhu J, Ma L, et al. Chronic kidney disease exacerbates myocardial ischemia reperfusion injury: role of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis[J]. Shock, 2017, 49(6): 712-720.

[7] Wang WD. Endoplasmic reticulum stress and kidney diseases[J]. J Sun Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(2): 196-203.

[8] Taniguchi M, Yoshida H. Endoplasmic reticulum stress in kidney function and disease[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2015, 24(4): 345-350.

[9] Yuan D, Liu XM, Fang Z, et al. Protective effect of resveratrol on kidney in rats with diabetic nephropathy and its effect on endoplasmic reticulum stress[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(5): 1485-1493.

[10] Sun X, Liu J, Crary JF, et al. ATF4 protects against neuronal death in cellular Parkinson's disease models by maintaining levels of Parkin[J]. J Neurosci, 2013, 33(6): 2398-2407.

[11] Moradi H, Vaziri ND. Molecular mechanisms of disorders of lipid metabolism in chronic kidney disease[J]. Front Biosci, 2018, 23(1): 146-161.

[12] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death[J]. Toxicol Pathol, 2007, 35(4): 495-516.

[13] Dai H, Liu Q, Liu B. Research progress on mechanism of podocyte depletion in diabetic nephropathy[J]. J Diabetes Res, 2017, 2017: 2612865.

[14] Shimura H, Hattori N, Kubo S, et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase[J]. Nat Genet, 2000, 25(3): 302-305.

[15] Poole AC, Thomas RE, Andrews LA, et al. The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2008, 105(5): 1638-1643.

[16] Wang S. Regulation of mitochondrial fates and cellular metabolism via parkin-mediated mitophagy and interaction between apoptosis and autophagy pathways in cancer[D]. Iowa: University of Iowa, 2012.

[17] Zhang C, Yu X, Gao J, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy was activated against 1,4-enzoquinone-induced apoptosis in HL-60 cells[J]. Toxicol In Vitro, 2018, 50: 217-224.

[18] Liu T, Chen XM, Sun JY, et al. Palmitic acid-induced podocyte apoptosis via the reactive oxygen species-dependent mitochondrial pathway[J]. Kidney Blood Press Res, 2018, 43(1): 206-219.

[19] Wu L, Luo N, Zhao HR, et al. Salubrinal protects against rotenone-induced SH-SY5Y cell death via ATF4-parkin pathway[J]. Brain Res, 2014, 1549: 52-62.

[20] Bouman L, Schlierf A, Lutz AK, et al. Parkin is transcriptionally regulated by ATF4: evidence for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress[J]. Cell Death Differ, 2011, 18(5): 769-782.

(责任编辑: 张辉洁)