

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001587

自噬在低氧诱导人肾小管上皮细胞凋亡中的作用

杨 珊, 李冠胜, 陈雪梅

(重庆医科大学附属第一医院急诊科, 重庆 400042)

【摘要】目的:探讨自噬在低氧诱导人肾小管上皮细胞株(HK-2)凋亡中的作用。**方法:**培养 HK-2 细胞,根据培养环境氧浓度不同分为对照组(21%O₂)和低氧组(1%O₂);根据低氧培养时间不同,低氧处理细胞进一步分为:低氧 6 h 亚组、低氧 12 h 亚组、低氧 18 h 亚组和低氧 24 h 亚组。Western blot 检测 HK-2 细胞自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 II/LC3 I、P62 和凋亡相关蛋白活化的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(cleaved-caspase3)表达水平,流式细胞仪检测 HK-2 细胞凋亡情况;采用低氧诱导稳定表达 GFP-LC3 的 HK-2 细胞 18 h,在荧光显微镜下观察 GFP-LC3 自噬小体的变化;进一步采用低氧联合自噬诱导剂雷帕霉素(rapamycin, RP)或自噬抑制剂巴弗洛霉素 A1(bafilomycin A1, BafA1)处理 HK-2 细胞,细胞分为常氧对照组、常氧+雷帕霉素/或巴弗洛霉素组、低氧对照组、低氧+雷帕霉素/或巴弗洛霉素组。Western blot 检测 Beclin1、LC3 II/LC3 I、P62 和 cleaved-caspase3 表达水平,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。**结果:**与对照组(0.161±0.043)相比较,低氧 12 h[(0.315±0.060), $P=0.019$], 18 h [(0.586±0.063), $P=0.000$], 24 h [(0.698±0.085), $P=0.000$]亚组 HK-2 细胞 cleaved-caspase3 蛋白表达明显增多;低氧 12 h、18 h、24 h 亚组 HK-2 细胞凋亡率分别为(23.633±5.346)%、(25.200±4.782)%、(38.567±8.046)%,较对照组(11.800±3.966)%明显增多($P=0.036$, $P=0.021$, $P=0.000$)。同时,低氧 18 h、24 h 亚组 HK-2 细胞表达 Beclin1 蛋白[(0.557±0.071), (0.897±0.074)]较对照组(0.249±0.040)明显上调($P=0.001$, $P=0.000$);低氧 6 h、12 h、18 h、24 h 亚组细胞表达 LC3 II/LC3 I 蛋白[(1.795±0.143), (2.873±0.078), (3.029±0.089), (3.735±0.059)]较对照组(1.322±0.191)明显上调($P=0.036$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$);细胞表达自噬底物 P62 蛋白[(0.776±0.061), (0.602±0.119), (0.419±0.117), (0.384±0.068)]较对照组(0.957±0.035)明显下调($P=0.028$, $P=0.001$, $P=0.000$, $P=0.000$);低氧组细胞 GFP-LC3 斑点计数相对值为(40.667±6.028),较对照组(18.667±5.508)明显增加($P=0.010$)。雷帕霉素增加自噬后,低氧诱导的 HK-2 细胞凋亡(26.433±3.402)及 cleaved-caspase3 蛋白表达(0.265±0.066)较低氧对照组[(36.133±5.856), (0.358±0.060)]明显减少($P=0.012$, $P=0.000$);巴弗洛霉素 A1 抑制自噬后,低氧诱导的 HK-2 细胞凋亡增多(49.233±3.412)及 cleaved-caspase3 蛋白表达(1.242±0.110)较低氧对照组[(25.933±3.650), (0.659±0.060)]明显增加($P=0.000$, $P=0.000$)。**结论:**自噬在低氧诱导的 HK-2 细胞凋亡中起保护作用。

【关键词】低氧;人肾小管上皮细胞;自噬;凋亡**【中图分类号】**R692.5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-07-30

作者介绍:杨 珊, Email: 907508930@qq.com,

研究方向:急性肾损伤。

通信作者:陈雪梅, Email: 1557451771@qq.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180408.1426.016.html>

(2018-04-08)

reperfusion injury in rats[J]. Exp Eye Res, 2013, 113:49-59.

[7] Agarwal A, Ahmad G, Sharma R. Reference values of reactive oxygen species in seminal ejaculates using chemiluminescence assay[J]. J Assist Reprod Genet, 2015, 32(12):1721-1729.

[8] Chvanov M, Petersen OH, Tepikin A. Free radicals and the pancreatic acinar cells: role in physiology and pathology[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005, 360(1464):2273-2284.

[9] Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE, et al. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 85(6):705-717.

[10] Chi PL, Lin CC, Chen YW, et al. CO induces Nrf2-dependent heme oxygenase-1 transcription by cooperating with Sp1 and c-Jun in rat brain astrocytes[J]. Mol Neurobiol, 2015, 52(1):277-292.

[11] Alfieri A, Srivastava S, Siow RC, et al. Sulforaphane precondition-

ing of the Nrf2/HO-1 defense pathway protects the cerebral vasculature against blood-brain barrier disruption and neurological deficits in stroke[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 65:1012-1022.

[12] Ding Y, Chen M, Wang M, et al. Posttreatment with 11-Keto- β -boswellic acid ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury: Nrf2/HO-1 pathway as a potential mechanism[J]. Mol Neurobiol, 2015, 52(3):1430-1439.

[13] Tucker D, Lu Y, Zhang Q. From mitochondrial function to neuroprotection—an emerging role for methylene blue[J]. Mol Neurobiol, 2017 [Epub ahead of print].

[14] Stack C, Jainuddin S, Elipenahli C, et al. Methylene blue upregulates Nrf2/ARE genes and prevents tau-related neurotoxicity[J]. Hum Mol Genet, 2014, 23(14):3716-3732.

(责任编辑:冉明会)

Effect of autophagy on the hypoxia-induced human renal proximal tubular cell apoptosis

Yang Shan, Li Guansheng, Chen Xuemei

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of autophagy on the hypoxia-induced apoptosis in human renal proximal tubular cells (HK-2). **Methods:** Human proximal tubular epithelial cells cultured in vitro were divided into the control group (21%O₂) and hypoxia group (1%O₂), based on the oxygen concentration. HK-2 cells cultured in hypoxia condition were then divided into 6 h hypoxia subgroup, 12 h hypoxia subgroup, 18 h hypoxia subgroup and 24 h hypoxia subgroup. The expression of autophagy-related proteins, Beclin1, LC3 II/LC3 I, P62 and apoptosis-related protein, activated cleaved-caspase 3 were detected by Western blot analysis, and the apoptosis was analyzed by flow cytometry assay. HK-2 cells stably expressing GFP-LC3 were induced by hypoxia for 18 hours, and the alteration of LC3 autophagosomes was examined by immunofluorescence (IF) assay. Then HK-2 cells were co-treated with hypoxia and autophagy inducer rapamycin or autophagy inhibitor Bafilomycin A1, and they were divided into normoxia control group, normoxia plus rapamycin/Bafilomycin A1 group, hypoxia control group, hypoxia plus rapamycin/Bafilomycin A1 group. The expression of Beclin1, LC3 II/LC3 I, P62 and cleaved-caspase3 were detected by Western blot analysis, while the apoptosis was analyzed by flow cytometry assay. **Results:** Compared with the control group (0.161 ± 0.043), the cleaved-caspase3 expression in 12 h [(0.315 ± 0.060), $P=0.019$], 18 h [(0.586 ± 0.063), $P=0.000$] and 24 h hypoxia subgroup [(0.698 ± 0.085), $P=0.000$] increased significantly. The apoptosis of HK-2 cells in 12 h [(23.633 ± 5.346)%], 18 h [(25.200 ± 4.782)%] and 24 h hypoxia subgroup [(38.567 ± 8.046)%] increased significantly as compared with the control group [(11.800 ± 3.966)%] ($P=0.036$, $P=0.021$, $P=0.000$). The Beclin1 expression in 18 h [(0.557 ± 0.071), $P=0.001$] and 24 h hypoxia subgroup [(0.897 ± 0.074), $P=0.000$] were higher than that in the control group (0.249 ± 0.04). The LC3 II/LC3 I expression in 6 h [(1.795 ± 0.143), $P=0.036$], 12 h [(2.873 ± 0.078), $P=0.000$], 18 h [(3.029 ± 0.089), $P=0.000$] and 24 h hypoxia subgroup [(3.735 ± 0.059), $P=0.000$] were higher than that in the control group (1.322 ± 0.191). The P62 expression in 6 h [(0.776 ± 0.061), $P=0.028$], 12 h [(0.602 ± 0.119), $P=0.001$], 18 h [(0.419 ± 0.117), $P=0.000$] and 24 h hypoxia subgroup [(0.384 ± 0.068), $P=0.000$] were lower than that in the control group (0.957 ± 0.035). The counting value of GFP-LC3 puncta in HK-2 cells in hypoxia group (40.667 ± 6.028) was obviously more than that in the control group (18.667 ± 5.508) ($P=0.010$). We also found that the treatment of the autophagy inducer rapamycin significantly reduced the hypoxia-induced apoptosis [(26.433 ± 3.402), $P=0.012$] and cleaved-caspase3 expression [(0.265 ± 0.066), $P=0.000$] of HK-2 cells compared with that in the hypoxia control group [(36.133 ± 5.856), (0.358 ± 0.060)], while the treatment of the autophagy inhibitor Bafilomycin A1 significantly increased the hypoxia-induced apoptosis [(49.233 ± 3.412), $P=0.000$] and cleaved-caspase3 expression [(1.242 ± 0.110), $P=0.000$] of HK-2 cells as compared to the hypoxia control group [(25.933 ± 3.650), (0.659 ± 0.060)]. **Conclusion:** Autophagy protects against the hypoxia-induced apoptosis of HK-2 cells.

[Key words] hypoxia; human renal proximal tubular cell; autophagy; apoptosis

急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 是重症监护 (intensive care medicine, ICU) 患者最常见、具有高死亡风险的急危重症, 每年约有 1.33 亿患者, 具有高患病率、高死亡率的特点^[1]。缺血性肾损伤是急性肾损伤的常见病因, 各种原因如脓毒症、创伤、消化道出血等多种因素均可导致机体有效循环血量急剧下降、肾脏低灌注, 即肾组织细胞缺血缺氧, 导致肾小管细胞损伤^[2]。研究显示, 在缺血性急性肾损伤病理特征中, 近端小管刷状缘消失, 管状细胞不规则, 近端小管扩张, 肾小管上皮细胞凋亡增加^[3],

是缺血性急性肾损伤的最重要发病机制之一。研究表明, 缺氧是缺血性肾损伤的重要病理生理过程, 可诱导肾小管上皮细胞凋亡^[4], 其机制可能与低氧诱导肾小管细胞内线粒体功能缺陷有关。

自噬是细胞在能量缺乏或缺氧的代谢压力下出现的一种通过溶酶体水解酶降解细胞内细胞器、蛋白质及其他大分子物质, 维持细胞内稳态的生理过程。在病理条件下, 一系列的应激如饥饿、低氧、营养及生长因子不足、氧化损伤、基因毒性药物以及其他一些损伤都能诱导自噬的发生^[5-7]。事实上,

这些能诱导自噬发生的应激因素亦是急性肾损伤的发病机制,因此自噬在肾损伤中可能具有重要作用。既往很多研究表明,自噬在肾脏疾病中起保护作用^[9-11],自噬可保护缺血性肾损伤中肾小管损伤,维持肾小管细胞的稳态^[11],可能作为急性肾损伤的一个潜在治疗靶点^[8]。但自噬是否可以抑制缺血性急性肾损伤中肾小管上皮细胞凋亡尚不清楚。本文拟通过研究低氧诱导人肾小管上皮细胞株(HK-2)细胞,探讨自噬与凋亡之间的关系,以进一步阐明自噬在缺血性肾小管上皮细胞损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验试剂 DMEM-F12、胎牛血清(美国 PAN)和二甲基亚砷(DMSO),Beclin1 单克隆抗体(美国 CST),LC3A/B 单克隆抗体(美国 CST),P62 单克隆抗体(英国 Abcam),cleaved-caspase3 抗体(美国 CST), β -actin 单克隆抗体(中国三箭),二脒基苯基吡啶(DAPI,美国 Invitrogen),雷帕霉素(rapamycin, RP, 美国 Sigma),巴弗洛霉素(BafilomycinA1, BafA1, 美国 Sigma)。

1.1.2 细胞培养 HK-2 细胞及稳定表达 GFP-LC3 的 HK-2 细胞株由本课题组保存。细胞用含 10% 的胎牛血清、80 U/mL 青霉素和 0.08 mg/mL 链霉素的 DMEM-F12 培养基在 37℃、5%CO₂ 培养箱中传代培养。根据培养环境氧浓度不同分为对照组和低氧组:对照组细胞在含 21%O₂、5%CO₂ 常氧培养箱中培养;低氧组细胞在含 1%O₂、5%CO₂ 低氧培养箱中培养。根据低氧培养时间不同,低氧处理细胞进一步分为:低氧 6 h 亚组、低氧 12 h 亚组、低氧 18 h 亚组和低氧 24 h 亚组。为观察自噬对低氧诱导的细胞凋亡的影响,细胞同时予以自噬诱导剂雷帕霉素(200 nmol/L)或自噬抑制剂巴弗洛霉素(10 nmol/L)处理,细胞分为常氧对照组、常氧+雷帕霉素/或巴弗洛霉素组、低氧对照组、低氧+雷帕霉素/或巴弗洛霉素组。

1.2 实验方法

1.2.1 荧光显微镜观察 GFP-LC3 分布 将爬片放入 12 孔板中,胶原蛋白包被爬片,紫外灯下照 30 min。将稳定表达 GFP-LC3 的 HK-2 细胞株接种于 12 孔板中,待细胞贴壁且长至 70%~80%后,分别放入 21%O₂(对照组)或 1%O₂(低氧组)培养箱培养细胞 18 h,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗爬片 3 次,每次 5 min。DAPI 染核 3 min,用抗荧光淬灭剂进行封片,荧光显微镜下采集图像。

1.2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡 细胞处理结束后,胰酶消化, PBS 清洗 3 次,加入 400 μ L PBS 将细胞重悬于 EP 管中,送至重庆医科大学生科院,采用 FITC-Annexin V/PI 双染色

法,加入 5 μ L 的 Annexin V-FITC 于 EP 管中混匀后,避光,室温孵育 15 min;上机前 5 min 再加入 5 μ L 的 PI 染色混匀,通过流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.3 Western blot 检测蛋白质表达 细胞处理结束后,预冷 PBS 清洗细胞,加入 RIPA 裂解液,裂解 10 min,4℃、14 000 $\times$ g 离心 15 min,吸取上清,BCA 试剂测蛋白浓度,30~50 μ g 总蛋白 SDS-PAGE 电泳,转膜 0.5~1 h,5%脱脂奶粉封闭 2 h。一抗工作浓度分别为 Beclin1 (1:1 000),LC3A/B (1:1 000),P62 (1:1 000),cleaved-caspase3 (1:1 000), β -actin (1:5 000),4℃孵育过夜。TBST 洗膜 6 次,每次 5 min,加入相应的二抗室温孵育 1 h。TBST 洗膜 6 次,每次 5 min,ECL 化学发光试剂盒(美国 Advanta)显色,曝光,保存图片。Fusion 软件进行定量分析,实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。每组实验均重复 3 次,正态分布计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐者两组间比较采用独立样本 *t* 检验;多组间比较采用方差分析,组内两两比较采用 LSD-*t* 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 低氧诱导人肾小管上皮细胞凋亡

本研究发现,采用低氧诱导法培养 HK-2 细胞后,方差分析显示,不同氧浓度($F=187.085, P=0.000$)、低氧时间($F=16.819, P=0.000$)对 HK-2 细胞 cleaved-caspase3 蛋白表达作用存在统计学差异,不同氧浓度与低氧时间对 HK-2 细胞 cleaved-caspase3 蛋白表达存在交互作用($F=17.431, P=0.000$)。进一步两两比较发现,低氧组 cleaved-caspase3 蛋白表达呈时间依赖性增加,尤其以低氧培养 24 h 时表达最高,低氧 12 h (0.315 ± 0.060)、18 h (0.586 ± 0.063)、24 h 亚组 (0.698 ± 0.085) 较对照组 (0.161 ± 0.043) 明显升高,差异有统计学意义($P=0.019, P=0.000, P=0.000$);低氧 18 h、24 h 亚组与低氧 12 h 亚组比较,差异有统计学意义($P=0.001, P=0.000$);而低氧 18 h 亚组与低氧 24 h 亚组比较,差异无统计学意义($P=0.066$),如图 1A 所示。进一步通过流式细胞术检测细胞凋亡,方差分析显示,不同氧浓度($F=64.082, P=0.000$);低氧时间($F=4.202, P=0.041$)对 HK-2 细胞凋亡作用存在统计学差异,浓度与低氧时间对 HK-2 细胞凋亡存在交互作用($F=4.133, P=0.043$)。进一步两两比较发现,随着低氧培养时间(12、18、24 h)的延长, HK-2 细胞凋亡逐渐增多,尤其是以 24 h 时间点细胞凋亡最为明显,低氧 12 h ($23.633 \pm 5.346\%$)、18 h ($25.200 \pm 4.782\%$)、24 h 亚组 ($38.567 \pm 8.046\%$) 与对照组 ($11.800 \pm 3.966\%$) 比较,差异均有统计学意义($P=0.036, P=0.021, P=0.000$);低氧 24 h 亚组与低氧 12 h、18 h 亚组比较,差异有统计学意义($P=0.013, P=0.021$);而低氧 12 h 亚组与低氧 18 h 亚组比较,差异无统计学意义($P=0.747$),如图 1B 所示。

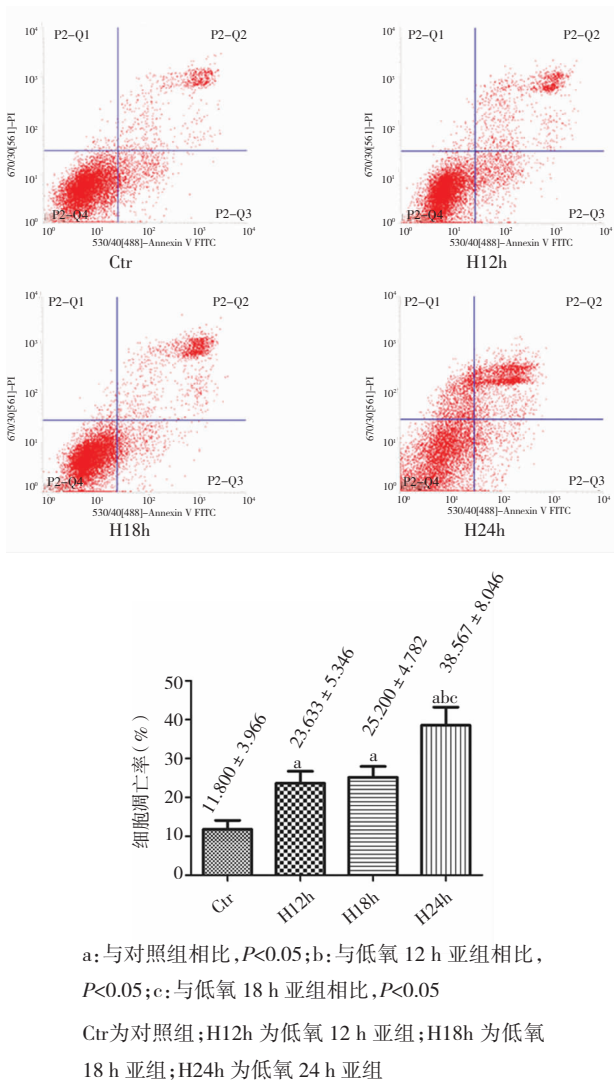
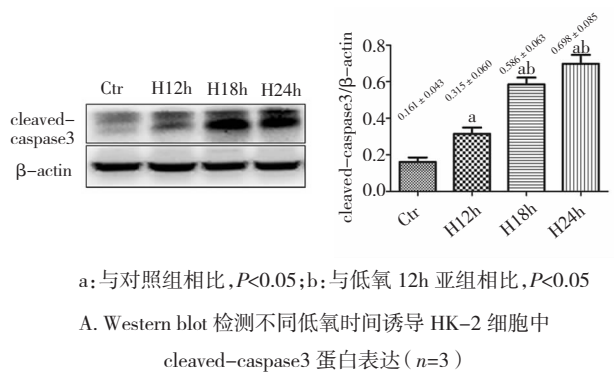


图 1 低氧诱导人肾小管上皮细胞凋亡

Fig.1 The apoptosis of human proximal tubular epithelial (HK-2) cells induced by hypoxia

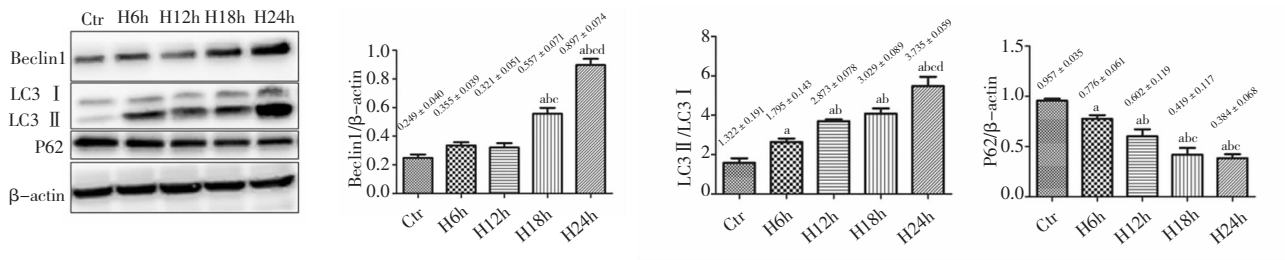
2.2 低氧诱导人肾小管上皮细胞自噬增加

本研究发现,采用不同时间点(6、12、18、24 h)低氧诱导培养 HK-2 细胞后,Beclin1 蛋白表达从低氧培养 18 h 时开

始明显增加(不同氧浓度: $F=190.698$, $P=0.000$; 低氧时间: $F=9.350$, $P=0.000$; 不同氧浓度×低氧时间: $F=42.333$, $P=0.000$), 低氧 18 h 亚组(0.557 ± 0.071)明显高于对照组(0.249 ± 0.04)以及低氧 6 h (0.355 ± 0.039)、12 h 亚组 (0.321 ± 0.051) ($P=0.000$, $P=0.001$, $P=0.000$); 低氧 24 h 亚组(0.897 ± 0.074)明显高于对照组以及低氧 6 h、12 h、18 h 亚组($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$)。LC3 蛋白表达从低氧 6 h 开始呈时间依赖性增加(不同氧浓度: $F=175.672$, $P=0.000$; 低氧时间: $F=16.819$, $P=0.001$; 不同氧浓度×低氧时间: $F=10.641$, $P=0.000$), 尤其以低氧培养 24 h 时表达最高,低氧 6 h (1.795 ± 0.143)、12 h (2.873 ± 0.078)、18 h (3.029 ± 0.089)、24 h (3.735 ± 0.059)亚组明显高于对照组(1.322 ± 0.191) ($P=0.001$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$), 低氧 12 h、18 h、24 h 亚组明显高于低氧 6 h 亚组($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$), 低氧 24 h 亚组明显高于 12 h、18 h 亚组($P=0.000$, $P=0.000$)。P62 蛋白表达从低氧 6 h 开始呈时间依赖性减少(不同氧浓度: $F=190.308$, $P=0.000$; 低氧时间: $F=10.041$, $P=0.001$; 不同氧浓度×低氧时间: $F=9.130$, $P=0.001$), P62 蛋白在低氧 6 h (0.776 ± 0.061)、12 h (0.602 ± 0.119)、18 h (0.419 ± 0.117)、24 h (0.384 ± 0.068)亚组明显低于对照组(0.957 ± 0.035) ($P=0.028$, $P=0.001$, $P=0.000$, $P=0.000$), 低氧 12 h、18 h、24 h 亚组明显低于低氧 6 h 亚组($P=0.034$, $P=0.000$, $P=0.000$), 低氧 18 h、24 h 亚组明显低于 12 h 亚组($P=0.026$, $P=0.011$) (图 2A)。后续实验均采用低氧 18 h 处理细胞。采用低氧诱导培养稳定表达 GFP-LC3 的 HK-2 细胞 18 h,以观察细胞内自噬小体形成情况,荧光显微镜检查发现,低氧组 GFP-LC3 斑点(40.667 ± 6.028)较对照组(18.667 ± 5.508)明显增多($t=4.667$, $P=0.010$) (图 2B)。

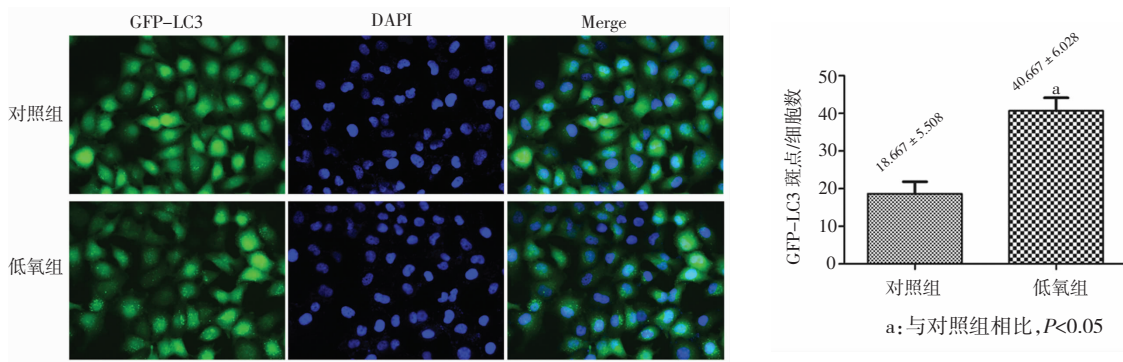
2.3 增强自噬对低氧诱导人肾小管上皮细胞凋亡的影响

为了观察自噬对低氧诱导细胞凋亡的影响,本课题组在低氧培养 HK-2 细胞 18 h 的同时,加入雷帕霉素以增加细胞自噬。常氧对照组、常氧+雷帕霉素组、低氧对照组、低氧+雷帕霉素组 Beclin1 蛋白相对表达量分别为(0.368 ± 0.158)、(0.800 ± 0.213)、(0.852 ± 0.226)、(1.262 ± 0.260); LC3 蛋白相对表达量分别为(0.975 ± 0.219)、(1.692 ± 0.251)、(2.180 ± 0.291)、(2.694 ± 0.295); cleaved-caspase3 蛋白相对表达量分别为(0.358 ± 0.060)、(0.204 ± 0.073)、(0.545 ± 0.023)、(0.265 ± 0.066); 方差分析显示,Beclin1(不同氧浓度: $F=14.223$, $P=0.005$, 雷帕霉素: $F=11.265$, $P=0.010$, 不同氧浓度×雷帕霉素: $F=0.008$, $P=0.932$); LC3(不同氧浓度: $F=51.697$, $P=0.000$; 雷帕霉素: $F=16.064$, $P=0.004$; 不同氧浓度×雷帕霉素: $F=0.437$, $P=0.527$); cleaved-caspase3(不同氧浓度: $F=13.395$, $P=0.006$; 雷帕霉素: $F=40.961$, $P=0.000$; 不同氧浓度×雷帕霉素: $F=3.432$, $P=0.101$), 不同氧浓度及雷帕霉素处理对 HK-2 细胞表达 Beclin1、LC3、cleaved-caspase3 蛋白存在影响,差异有统计学意义,进一步两组间比较发现,常氧+雷帕霉素组 Beclin1、LC3



a: 与对照组相比, $P < 0.05$; b: 与低氧 6 h 亚组相比, $P < 0.05$; c: 与低氧 12 h 亚组相比, $P < 0.05$; d: 与低氧 18 h 亚组相比, $P < 0.05$

A. Western blot 检测不同低氧时间诱导 HK-2 细胞中 Beclin1, LC3 和 P62 蛋白表达情况 ($n=3$)



Ctr 为对照组; H12h 为低氧 12 h 亚组; H18h 为低氧 18 h 亚组; H24h 为低氧 24 h 亚组

B. 荧光显微镜分析低氧诱导 HK-2 细胞中 GFP-LC3 斑点 ($400\times, n=3$)

图 2 低氧诱导人肾小管上皮细胞自噬

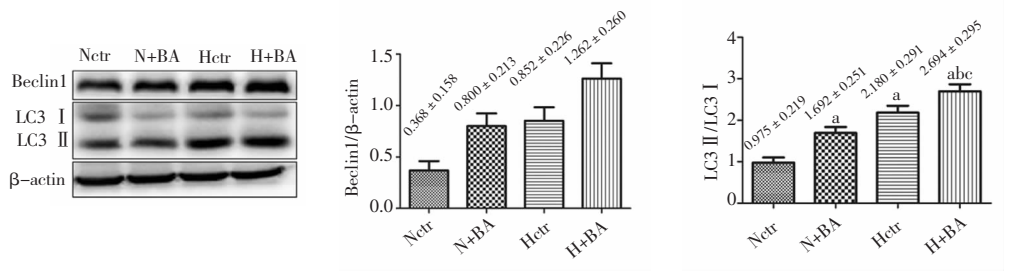
Fig.2 The autophagy of human proximal tubular epithelial(HK-2) cells induced by hypoxia

蛋白表达较常氧对照组明显增加 ($P=0.041, P=0.011$), 低氧+雷帕霉素组 Beclin1、LC3 蛋白表达较低氧对照组明显增加 ($P=0.050, P=0.045$), 提示自噬诱导剂雷帕霉素明显增强了低氧诱导的肾小管上皮细胞自噬; 而常氧+雷帕霉素组比常氧对照组的 cleaved-caspase3 蛋白表达明显降低 ($P=0.012$), 低氧+雷帕霉素组比低氧对照组的 cleaved-caspase3 蛋白表达明显降低 ($P=0.000$), 如图 3A、B 所示; 同时, 流式细胞术检测显示常氧对照组、常氧+雷帕霉素组、低氧对照组、低氧+雷帕霉素组凋亡率分别为 $(16.600 \pm 2.606)\%$ 、 $(9.400 \pm 0.854)\%$ 、 $(36.133 \pm 5.856)\%$ 、 $(26.433 \pm 3.402)\%$, 方差分析显示, 凋亡细胞 (不同氧浓度: $F=75.138, P=0.000$; 雷帕霉素: $F=16.050, P=0.004$; 不同氧浓度×雷帕霉素: $F=0.351, P=0.570$), 提示加入自噬诱导剂雷帕霉素增强细胞自噬后, 低氧诱导细胞凋亡较低氧对照组明显减少 ($P=0.012$), 如图 3C 所示。

2.4 抑制自噬对低氧诱导人肾小管上皮细胞凋亡的影响

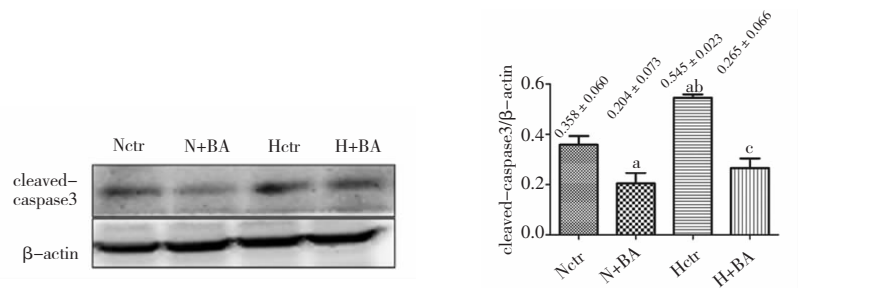
进一步在低氧培养 HK-2 细胞的同时, 加入自噬晚期抑制剂巴弗洛霉素。常氧对照组、常氧+巴弗洛霉素组、低氧对照组、低氧+巴弗洛霉素组 P62 蛋白相对表达量分别为 (0.785 ± 0.147) 、 (1.106 ± 0.163) 、 (0.464 ± 0.103) 、 (1.245 ± 0.222) ; LC3 蛋白相对表达量分别为 (0.167 ± 0.058) 、 (1.071 ± 0.374) 、 (0.710 ± 0.065) 、 (1.385 ± 0.412) ; cleaved-caspase3 蛋

白相对表达量分别为 (0.422 ± 0.118) 、 (0.981 ± 0.182) 、 (0.659 ± 0.060) 、 (1.242 ± 0.110) 。方差分析显示, P62 (不同氧浓度: $F=5.532, P=0.047$; 巴弗洛霉素: $F=54.293, P=0.000$; 不同氧浓度×巴弗洛霉素: $F=12.601, P=0.008$); LC3 (不同氧浓度: $F=6.953, P=0.030$; 巴弗洛霉素: $F=23.611, P=0.001$; 不同氧浓度×巴弗洛霉素: $F=0.500, P=0.499$); cleaved-caspase3 (不同氧浓度: $F=11.780, P=0.009$; 巴弗洛霉素: $F=62.371, P=0.000$; 不同氧浓度×巴弗洛霉素: $F=0.028, P=0.872$), 不同氧浓度及巴弗洛霉素处理对 HK-2 细胞表达 P62、LC3、cleaved-caspase3 蛋白存在影响, 差异有统计学意义; 进一步两组间比较发现, 使用巴弗洛霉素后, HK-2 细胞 P62、LC3 蛋白水平较低氧对照组明显增加 ($P=0.000, P=0.019$); 同时, 凋亡相关蛋白 cleaved-caspase3 表达也较低氧对照组明显增加 ($P=0.000$), 如图 4A、B 所示。进一步采用流式细胞术检测显示, 常氧对照组、常氧+巴弗洛霉素组、低氧对照组、低氧+巴弗洛霉素组凋亡率分别为 $(9.367 \pm 3.331)\%$ 、 $(34.733 \pm 4.637)\%$ 、 $(25.933 \pm 3.650)\%$ 、 $(49.233 \pm 3.412)\%$, 方差分析显示, 凋亡细胞 (不同氧浓度: $F=50.300, P=0.000$; 巴弗洛霉素: $F=123.435, P=0.000$; 不同氧浓度×巴弗洛霉素: $F=0.223, P=0.650$), 提示加入自噬抑制剂巴弗洛霉素后, 低氧诱导的 HK-2 细胞凋亡较低氧对照组明显增多 ($P=0.000$), 如图 4C 所示。



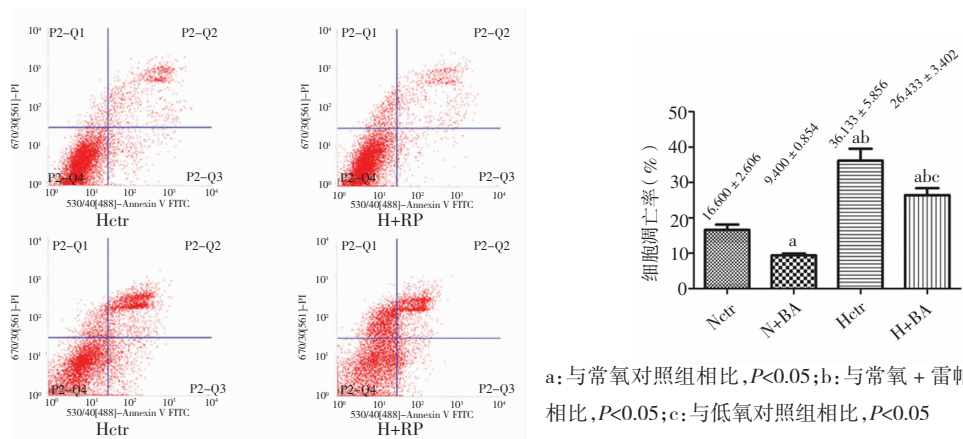
a: 与常氧对照组相比, $P < 0.05$; b: 与常氧 + 雷帕霉素组相比, $P < 0.05$; c: 与低氧对照组相比, $P < 0.05$

A. Western blot 检测低氧联合雷帕霉素诱导 HK-2 细胞中 Beclin1 和 LC3 蛋白表达情况($n=3$)



a: 与常氧对照组相比, $P < 0.05$; b: 与常氧 + 雷帕霉素组相比, $P < 0.05$; c: 与低氧对照组相比, $P < 0.05$

B. Western blot 检测低氧联合雷帕霉素诱导 HK-2 细胞中 cleaved-caspase3 蛋白表达情况($n=3$)



a: 与常氧对照组相比, $P < 0.05$; b: 与常氧 + 雷帕霉素组相比, $P < 0.05$; c: 与低氧对照组相比, $P < 0.05$

Nctr表示常氧对照组;N+RP 表示常氧 + 雷帕霉素组;Hctr 表示低氧对照组;H+RP 表示低氧 + 雷帕霉素组

C. 流式细胞仪检测低氧联合雷帕霉素诱导 HK-2 细胞凋亡的变化($n=3$)

图 3 激活自噬减少低氧诱导人肾小管上皮细胞凋亡

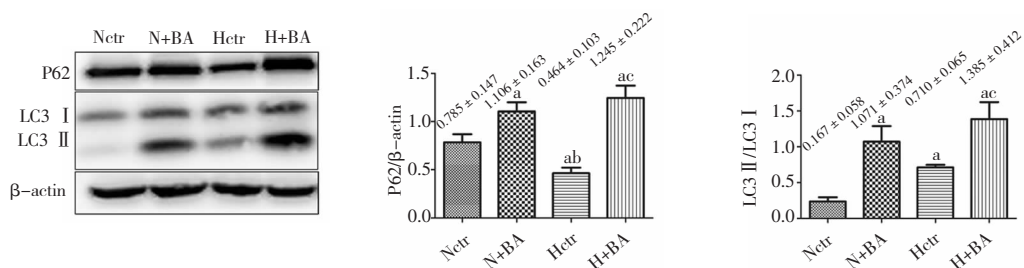
Fig.3 Activated autophagy reduced the hypoxia-induced apoptosis in human proximal tubular epithelial (HK-2) cells

3 讨论

细胞凋亡又叫程序性细胞死亡,是由于外来因素触发了细胞内预存的死亡程序而引发的细胞自杀过程,是生命的基本现象,与细胞增殖共同维持体内细胞数量平衡及维持机体正常生长发育。细胞凋亡在急性肾损伤中可能发挥重要作用。Nogae 等^[12]发现,通过 Fas 系统介导肾小管上皮细胞凋亡在小鼠缺血再灌注导致的 AKI 中发挥了重要作用。Kong 等^[13]在顺铂诱导的 AKI 兔模型中研究发现,促红细

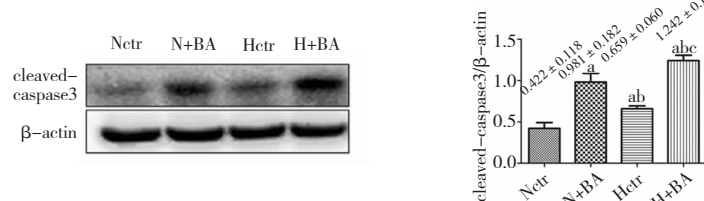
胞生成素(erythropoietin, EPO)减轻顺铂诱导的肾小管上皮细胞内质网应激而发挥抗凋亡作用,从而促进肾损伤恢复;本研究进一步在体外实验中,采用低氧诱导 HK-2 细胞模拟缺血缺氧环境,结果也发现,与常氧组比较,低氧培养诱导 HK-2 细胞cleaved-caspase3 蛋白表达水平及细胞凋亡明显增加,表明低氧下 HK-2 细胞凋亡增加,这可能是缺血性 AKI 的重要机制,但其凋亡发生的具体机制仍有待于进一步研究。

自噬是细胞在能量缺乏或缺乏氧气的代谢压力下出现的一种生理过程,是细胞清除废物、维持



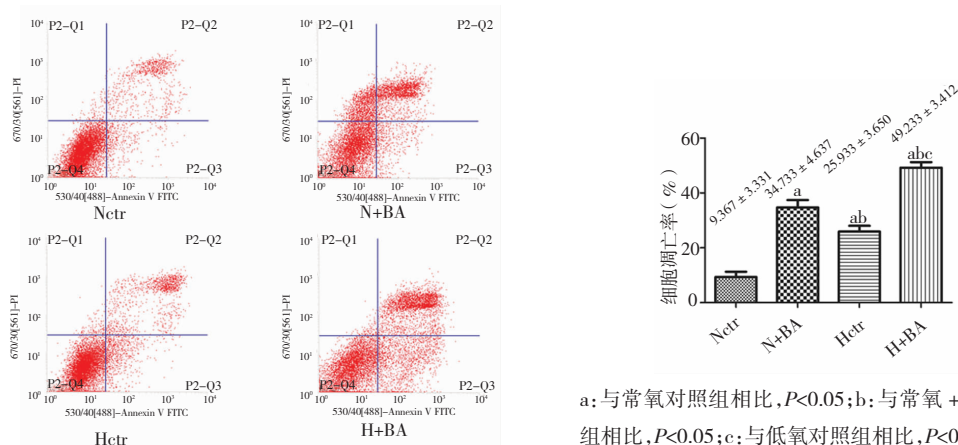
a: 与常氧对照组相比, $P < 0.05$; b: 与常氧 + 巴弗洛霉素组相比, $P < 0.05$; c: 与低氧对照组相比, $P < 0.05$

A. Western blot 检测低氧联合巴弗洛霉素诱导 HK-2 细胞中 P62 和 LC3 蛋白表达情况 ($n=3$)



a: 与常氧对照组相比, $P < 0.05$; b: 与常氧 + 巴弗洛霉素组相比, $P < 0.05$; c: 与低氧对照组相比, $P < 0.05$

B. Western blot 检测低氧联合巴弗洛霉素诱导 HK-2 细胞中 cleaved-caspase3 蛋白表达情况 ($n=3$)



a: 与常氧对照组相比, $P < 0.05$; b: 与常氧 + 巴弗洛霉素组相比, $P < 0.05$; c: 与低氧对照组相比, $P < 0.05$

Nctr 表示常氧对照组; N+BA 表示常氧 + 巴弗洛霉素组; Hctr 表示低氧对照组; H+BA 表示低氧 + 巴弗洛霉素组

C. 流式细胞仪检测低氧联合巴弗洛霉素诱导 HK-2 细胞凋亡的变化 ($n=3$)

图 4 抑制自噬增加低氧诱导人肾小管上皮细胞凋亡

Fig.4 Inhibited autophagy increased the hypoxia-induced apoptosis in human proximal tubular epithelial (HK-2) cells

自身稳态的重要方式。很多证据表明自噬在多种疾病中是一种保护机制,但是过度的自噬也可以导致细胞损伤,因而自噬犹如一把“双刃剑”,掌握自噬的调控机制对于维持细胞正常稳态和机体正常功能,减轻损伤具有重要意义^[14-15]。研究显示,自噬保护了缺血性急性肾损伤导致的近端小管的退化及损伤^[1],但自噬在缺血性急性肾损伤中的作用机制尚不完全清楚。本研究通过低氧诱导 HK-2 细胞发现,低氧组 HK-2 细胞 GFP-LC3 斑点较对照组明显增多,表明低氧条件下诱导人肾小管上皮细胞自噬小体形成增多;进一步研究自噬相关蛋白发现,低氧组 Beclin1 及 LC3 蛋白表达较对照组明显增加, P62 蛋白表达较对照组明显减少。Beclin1、LC3 是自

噬体经典的标志物蛋白, P62 是链接 LC3 与待降解泛素化底物的桥梁。研究发现在饥饿、缺氧等应激条件下, Beclin1 可启动自噬的发生; LC3 在自噬体膜的延伸和成熟中发挥着关键的作用; P62 作为选择性自噬受体, 将待降解底物转运到自噬体中降解。因此, 上述结果提示低氧可诱导人肾小管上皮细胞自噬增加。

近年来, 细胞自噬与凋亡关系的研究逐渐增多, 研究显示自噬与凋亡可能同时或者先后发生, 自噬与凋亡可以相互促进或者拮抗; 调控细胞自噬与凋亡的信号分子也有相互交叉, 这些信号分子在自噬与凋亡中发挥促进或抑制作用^[16-18]。为了深入探讨低氧条件下, HK-2 细胞自噬与凋亡之间的关系, 本

课题设计采用自噬激活剂雷帕霉素及自噬抑制剂巴弗洛霉素 A1 进行研究。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是磷酸酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt)信号途径的关键蛋白, mTOR 通路在细胞生长、增殖、凋亡和自噬等相关调控中起着重要作用, 雷帕霉素可通过抑制 mTOR 通路, 诱导和促进细胞自噬的发生。本研究中, 使用雷帕霉素干预后, 低氧组较常氧组自噬相关蛋白 Beclin1 及 LC3 表达增加。而且, 加用雷帕霉素干预后, 低氧组 HK-2 细胞 cleaved-caspase3 表达及细胞凋亡均较低氧对照组减少, 表明雷帕霉素可增强低氧诱导的 HK-2 细胞自噬并减少其凋亡。此结果与本实验组在另外的研究中发现雷帕霉素可通过激活自噬从而抑制棕榈酸诱导的足细胞凋亡作用类似^[19]。巴弗洛霉素 A1 是一种囊泡性 H⁺-ATP 酶质子泵抑制剂, 主要通过抑制自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体而抑制降解, 导致自噬体堆积, 与氯喹作用机制类似, 是自噬晚期抑制剂。本研究显示, 使用巴弗洛霉素 A1 处理后, 低氧诱导的肾小管上皮细胞自噬降解途径受到抑制, LC3 及 P62 蛋白降解受阻, 表达明显增多; 同时, 自噬流受阻后, 低氧组 cleaved-caspase3 蛋白表达较常氧对照组明显增多, 流式细胞仪检测也显示 HK-2 细胞凋亡较常氧对照组明显增加。Jiang 等^[20]研究也显示, 使用自噬溶酶体抑制剂氯喹处理后, 加重了顺铂诱导小鼠的急性肾损伤, 肾小管自噬溶酶体降解受阻, 肾组织损伤加重。因此, 本研究显示雷帕霉素激活自噬可以减少低氧诱导的 HK-2 细胞凋亡, 相反, 巴弗洛霉素 A1 抑制自噬流, 导致自噬小体不能被降解, 则反过来促进了低氧诱导的 HK-2 细胞凋亡, 表明自噬在低氧诱导 HK-2 细胞凋亡中很可能起到一种保护作用。

综上所述, 本文研究了低氧环境下肾小管上皮细胞自噬和凋亡的关系, 结果发现, 低氧条件可以诱导肾小管上皮细胞同时发生凋亡和自噬, 增强细胞自噬可减少低氧诱导的 HK-2 细胞凋亡, 而抑制自噬流则可促进低氧诱导的 HK-2 细胞凋亡, 表明低氧条件下细胞自噬在某种程度上对防治肾小管上皮细胞凋亡有一定的保护作用。然而, 其具体机制还有待更深入的研究。

参 考 文 献

[1] Mehta RL, Cerdá J, Burdmann EA, et al. International society of

nephrology's oby25 initiative for acute kidney injury (zero preventable deaths by 2025): a human rights case for nephrology[J]. Lancet, 2015, 385(9987): 2616-2643.

[2] Zuk A, Bonventre JV. Acute kidney injury[J]. Annu Rev Med, 2016, 67: 293-307.

[3] Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(6): 1503-1520.

[4] 胡红林, 王共先. 肾缺血再灌注损伤中细胞凋亡和氧化应激[J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(15): 2279-2283.

[5] Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response[J]. Mol Cell, 2010, 40(2): 280-293.

[6] Kundu M, Thompson CB. Autophagy: basic principles and relevance to disease[J]. Annu Rev Pathol, 2008, 3: 427-455.

[7] Rubinshtein DC, Codogno P, Levine B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(9): 709-730.

[8] Kaushal GP, Shah SV. Autophagy in acute kidney injury[J]. Kidney Int, 2016, 89(4): 779-791.

[9] Huber TB, Edelstein CL, Hartleben B, et al. Emerging role of autophagy in kidney function, diseases and aging[J]. Autophagy, 2012, 8(7): 1009-1031.

[10] Jiang M, Liu K, Luo J, et al. Autophagy is a renoprotective mechanism during in vitro hypoxia and in vivo ischemia-reperfusion injury[J]. Am J Pathol, 2010, 176(3): 1181-1192.

[11] Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, et al. Autophagy protects the proximal tubule from degeneration and acute ischemic injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(5): 902-913.

[12] Nogae S, Miyazaki M, Kobayashi N, et al. Induction of apoptosis in ischemia-reperfusion model of mouse kidney: possible involvement of Fas[J]. J Am Soc Nephrol, 1998, 9(4): 620-631.

[13] Kong D, Zhuo L, Gao C, et al. Erythropoietin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis[J]. J Nephrol, 2013, 26(1): 219-227.

[14] Martinet W, Agostinis P, Vanhooeck B, et al. Autophagy in disease: a double-edged sword with therapeutic potential[J]. Clin Sci (Lond), 2009, 116(9): 697-712.

[15] Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, et al. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains[J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(10): 2570-2581.

[16] Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(12): 2405-2419.

[17] Kim SY, Song X, Zhang L, et al. Role of Bcl-xL/Beclin-1 in interplay between apoptosis and autophagy in oxaliplatin and bortezomib-induced cell death[J]. Biochem Pharmacol, 2014, 88(2): 178-188.

[18] Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, et al. Autophagy and apoptosis: where do they meet?[J]. Apoptosis, 2014, 19(4): 555-566.

[19] Jiang X, Chen X, Wan J, et al. Autophagy protects against palmitic acid-induced apoptosis in podocytes in vitro[J]. Sci Rep, 2017, 7: 42764.

[20] Jiang M, Wei Q, Dong G, et al. Autophagy in proximal tubules protects against acute kidney injury[J]. Kidney Int, 2012, 82(12): 1271-1283.

(责任编辑: 冉明会)