

· 论 著 ·

高糖对肾小球系膜细胞 Smurf2 表达的影响*

马红艳¹, 肖斌², 钟海花¹, 顾峻林³, 徐玲¹, 徐勇^{1△}

(泸州医学院; 1. 附属医院内分泌科; 2. 生物化学教研室, 四川泸州 646000;

3. 重庆市第七人民医院 400054)

摘要:目的 观察不同浓度高糖刺激后大鼠肾小球系膜细胞胞内 Smad 泛素调节因子 2(Smurf2) 的表达, 探讨泛素化降解在糖尿病肾病中的作用。方法 将体外培养的大鼠肾系膜细胞分别设正常对照组(葡萄糖浓度 5.6mmol/L)、20mmol/L 高糖组、30mmol/L 高糖组、甘露醇组。分别用 real time quantitative PCR 法和细胞免疫荧光染色法及激光共聚焦显微镜检测各组细胞 Smurf2 的 mRNA 和蛋白的表达。结果 (1) 正常对照组系膜细胞 Smurf2 的 mRNA 和蛋白表达较弱。(2) 高糖组 Smurf2 的 mRNA 和蛋白表达较正常对照组增强 ($P < 0.05$), 呈浓度依赖性。结论 高糖可诱导肾系膜细胞 Smurf2 表达增强。提示泛素-蛋白酶体途径可能参与了糖尿病肾病的病理进程。

关键词: 高糖; 肾小球系膜细胞; Smad 的泛素化调节因子; 泛素-蛋白酶体途径

中图分类号: R365.587

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)01-0010-03

Effect of high glucose on expression of Smurf2 in cultured glomerular mesangial cells*

MA Hong-yan¹, XIAO Bin², ZHONG Hai-hua¹, et al.

(1. Department of Endocrinology, Affiliated Hospital, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China;

2. Department of Biochemistry, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China;

3. Seventh People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400054, China)

Abstract: Objective To observe the expression of smad ubiquitination regulatory factor2(Smurf2) in rat glomerular mesangial cells (GMC) stimulated by high glucose of different concentration, and to investigate the effect of the ubiquitination in diabetic nephropathy. **Methods** Cultured rat GMC were divided into normal group (the concentration of glucose: 5.6mmol/L), high glucose group (20mmol/L, 30mmol/L respectively) and mannitol group. The expression of Smurf2 mRNA of each group was measured by quantitative RT-PCR and protein was measured by indirect immunofluorescence and laser scanning confocal microscope respectively. **Results** (1) The expression of smurf2 of GMC in normal group was weak. (2) The expression of Smurf2 in high glucose group was stronger than that in normal group ($P < 0.05$), demonstrating concentration-dependent manner. **Conclusion** (1) High glucose can increase the expression of Smurf2 in glomerular mesangial cells. (2) Ubiquitination-proteasome pathway (UPP) is related with the diabetic nephropathy.

Key words: high concentration glucose; glomerular mesangial cell; Smurf2; ubiquitin-proteasome pathway

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 又称糖尿病肾小球硬化症, 是糖尿病特有而常见的微血管并发症^[1-2]。DN 的发病机制仍未完全清楚, 目前的基础研究显示泛素-蛋白酶体途径 (ubiquitination-proteasome pathway, UPP) 参与了肾脏纤维化多条信号通路中的重要信号蛋白分子 (如转化生长因子- β 、丝裂原活化蛋白激酶、核因子- κ B) 的降解调节, 引起信号通路的过度持久活化, 促进肾脏纤维化。UPP 是新近发现的一种依赖 ATP 胞浆内非溶酶体高度选择性蛋白质降解的主要途径, 参与调控细胞众多重要的生理进程。发现蛋白质泛素降解原理的 3 位科学家因此获得 2004 年诺贝尔化学奖。阐明 UPP 在各种疾病状态下的病理生理作用, 将为开发治疗疾病的新的药物靶点提供理论和实用依据。目前有关 DN 泛素蛋白酶体的研究尚甚少报道。

为此, 本研究将 UPP 与高糖刺激的肾小球系膜细胞 (glomerular mesangial cell, GMC) 相联系, 对高糖刺激后大鼠 GMC 胞内 Smad 泛素调节因子 2 (Smad ubiquitination regulatory factor 2, Smurf2) 的 mRNA 和蛋白表达进行研究, 旨在探讨 UPP 在高糖诱导的 GMC 中是否活化, 为阐明糖尿病肾小球硬

化发生机制提供新的理论依据。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂 大鼠 HBZY-1 系膜细胞株购自武汉大学保藏中心。Trizol 购于美国 MRC 公司, Taq DNA 聚合酶购于北京 Bio Dev 公司, dNTP 购于美国 Promega 公司, 兔抗大鼠 Smurf2 多克隆抗体购于 Santa Cruz 公司, FITC 标记的羊抗兔 IgG 荧光抗体购于北京中山公司, 低糖 DMEM 培养基购于 GIBCO 公司, 新生小牛血清购于成都哈里公司, 胰蛋白酶购于 Sigma 公司, TritonX-100 购于 Promega 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养和分组 肾小球系膜细胞用含 10% 小牛血清的低糖 DMEM 培养液培养。取对数生长期细胞用于试验。将细胞分为 4 个组: (A) 正常对照组, 培养液含 5.6mmol/L 的葡萄糖; (B) 20mmol/L 高糖组; (C) 30mmol/L 高糖组, 作为不同浓度的高糖刺激因子; (D) 甘露醇组, 5.6mmol/L 葡萄糖 + 24.4mmol/L 甘露醇, 作为渗透压对照。

1.2.2 Real time Quantitative PCR 测定 Smurf2 mRNA 将按分组加入各处理因素后培养 24h 的细胞, Trizol 提取总 RNA,

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30670980)。△ 通讯作者, 电话: 13980255895; E-mail: xbwin@163.com。

表 1 各组大鼠肾系膜细胞 Smurf2 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	β -actin	Smurf2	Δ CT	$2^{-\Delta\Delta CT}$
正常对照组	3	16.00 \pm 0.00	20.50 \pm 0.00	4.50 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
20mmol/L 葡萄糖组	3	16.50 \pm 0.00	24.60 \pm 0.00	8.10 \pm 0.00	0.08 \pm 0.00
30mmol/L 葡萄糖组	3	16.17 \pm 0.29	25.47 \pm 0.33	9.30 \pm 0.12	0.04 \pm 0.53
甘露醇组	3	16.00 \pm 0.00	20.46 \pm 0.00	4.46 \pm 0.00	1.03 \pm 0.00

取总 RNA 5 μ L 为模板反转录成 cDNA。将反转录的 cDNA 进行 PCR 扩增,管家基因 β -actin 做内参。引物与 TaqMan 探针由 TaKaRa 公司合成。Smurf2:上游引物 5'-GGG AAC GCC CAA CAA GAC -3',下游引物 5'-ATT GCG GAT CTC CCA CCC -3',扩增产物大小为 136bp; β -actin 上游引物 5'-GCC AAC ACA GTG CTG TCT-3',下游引物 5'-AGG AGC AAT GAT CTT GAT CTT-3',扩增产物大小为 114bp。将反转录成 cDNA 加入探针后行荧光定量 PCR。反应条件:94 $^{\circ}$ C、2min,预变性;94 $^{\circ}$ C 20s,变性;60 $^{\circ}$ C 40s,扩增 45 个循环后收集数据绘制动力学曲线,读取 CT 值。将各组目的基因的 CT 值与管家基因的 CT 值相减得 Δ CT,再将各组的 Δ CT 与正常对照组的 Δ CT 相减得 $\Delta\Delta$ CT,计算出 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 即可得到各组模板的起始拷贝数之间的相对倍数,扩增重复 3 次,从而计算出各组间 mRNA 的差别。

1.2.3 细胞免疫荧光染色及激光共聚焦显微镜检测 Smurf2 蛋白表达

1.2.3.1 细胞免疫荧光染色 将按分组加入各处理因素后培养了 24h 的细胞爬片固定打孔后加入一抗:将兔抗大鼠 Smurf2 多克隆抗体 200 μ L 滴加于细胞爬片,所有抗体工作浓度均为 1:50,湿盒 37 $^{\circ}$ C 水浴作用 60min,将湿盒放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜(至少 16h)。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。加入二抗:将 FITC 标记的羊抗兔 IgG 荧光抗体 200 μ L 滴加于细胞爬片,抗体工作浓度为 1:50,37 $^{\circ}$ C 水浴作用 60min。

1.2.3.2 激光共聚焦显微镜成像及数据分析 使用德国 Leica 公司 DMIRE2 型激光扫描共聚焦显微镜系统,在数值孔径 1.32IMM 的倒置甘油镜下对细胞的荧光分布及强度进行观察。测定时选用激发波长 488nm,发射波长 520nm,扫描速度 4 000Hz,检测 FITC 标记的荧光染色阳性(绿色)的系膜细胞区域,整个检测中测量参数维持不变。

采用德国 Leica 公司图像分析系统对荧光强度进行定量分析,每张片子随机选择 5 个细胞的阳性信号,图像分析系统自动测其荧光平均灰度值,实验重复 3 次,再取其均值作为平均灰度值,以定量分析 Smurf2 蛋白在 GMC 中的表达水平。

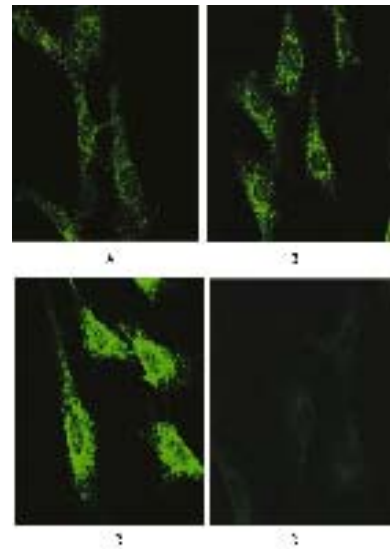
1.3 统计学方法 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 13.0 统计软件分析。各组均数经方差齐性检验后,多个样本均数间的两两比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 real time quantitative PCR 测定 Smurf2 mRNA 的表达与正常对照组比较,高糖各组 Smurf2 mRNA 表达均增强,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),30mmol/L 高糖组表达强于 20mmol/L 高糖组。但甘露醇组与正常对照组比较,Smurf2 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

2.2 细胞免疫荧光染色及激光共聚焦显微镜检测系膜细胞 Smurf2 蛋白表达 各组镜下免疫荧光图像(图 1)可见,Smurf2 蛋白在正常对照组系膜细胞胞浆中有散在弱表达(图

1-A),高糖刺激后表达增强,呈星芒状(图 1-B、图 1-C)。



1-A:正常对照组肾小球系膜细胞 Smurf2 在胞浆中有散在弱表达;1-B:20mmol/L 高糖组系膜细胞 Smurf2 表达比正常对照组增强;1-C:30mmol/L 高糖组 Smurf2 表达比 20mmol/L 高糖组更强,呈星芒状;1-D:甘露醇组 Smurf2 表达接近正常对照组。

图 1 各组系膜细胞 Smurf2 蛋白的表达(FITC 标记的免疫荧光染色, $\times 600$)

荧光灰度值定量分析显示,与正常组比较,高糖各组 Smurf2 蛋白表达均增强,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),30mmol/L 高糖组表达强于 20mmol/L 高糖组。但甘露醇组与正常对照组比较,Smurf2 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$),说明渗透压对 Smurf2 表达无影响,见表 2。

表 2 各组系膜细胞 Smurf2 蛋白的平均灰度值比较($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	平均灰度值
正常对照组	25.93 \pm 3.35
20mmol/L 高糖组	56.99 \pm 7.00
30mmol/L 高糖组	96.36 \pm 9.19
甘露醇组	26.53 \pm 3.45

3 讨 论

生物体内存在着两类蛋白质降解过程,一种为溶酶体途径,对于蛋白降解无选择性,不需要能量;另一种为 UPP,对胞内蛋白发生能量依赖性、高度选择性的特异性降解。泛素-蛋白酶体系统广泛存在于真核生物中,它由泛素、泛素连接酶、26S 蛋白酶体和泛素再循环酶组成。E1(泛素激活酶)、E2(泛素结合酶)、E3(泛素-蛋白连接酶)统称为泛素连接酶。其中在 UPP 中行使调控降解功能的核心成员 E3 对靶蛋白的识别和

降解起关键作用。Smurf2 是具有 HECT 结构域的 E3,是本实验研究的主要内容。UPP 参与细胞生长、分化与凋亡、信号转导、转录调控、免疫应答及抗原呈递等多种生命活动过程,尤其是通过降解细胞内各信号通路的抑制因子或(和)激活因子发挥着上调或下调作用^[3]。该途径成分的改变可致蛋白质降解发生异常,细胞功能受到破坏,发生疾病。针对泛素蛋白酶体进行干预是疾病治疗的新手段,前景喜人。

有关糖尿病并发症时泛素蛋白酶体的研究尚少。国内王晓等^[4]发现高糖可使培养的血管内皮细胞泛素表达增加,其参与了凋亡的发生。Mastrocola 等^[5]和 Cai 等^[6]研究发现糖尿病肌肉萎缩是肌肉蛋白泛素降解增加的结果,糖尿病时心肌蛋白的泛素降解亦增加。Adachi Uehara 等^[7]研究发现糖尿病大鼠和 2 型糖尿病视网膜病变患者泛素蛋白酶体途径中泛素表达增加,提示糖尿病视网膜病变时存在蛋白转录后的调节异常与其发病相关。综上所述,UPP 在糖尿病并发症的发生、发展过程中起了重要作用,因此深入研究泛素蛋白酶体与糖尿病并发症之间的相互关系,有助于了解糖尿病并发症的发病机制。

在肾脏方面,UPP 是调节肾脏纤维化 TGF- β /smad 信号通路的重要机制之一,其中 Smurf2 能特异地降解 Smads 和 Smad 通路某些调节蛋白^[8],活化 TGF- β /smad 通路。kavsak 等^[9]在与糖尿病肾脏纤维化发病有关的 UUO 小鼠模型中证实,肾脏纤维化时 Smad7 减少是由于 Smurf2 泛素化降解增加所致,提示泛素化降解 Smad7 增加是导致肾小管间质纤维化的重要原因。对 Smurf2 表达的调控可能成为阻断肾脏 TGF- β 效应的具有生理学基础的诱人策略。而 DN 时,TGF- β /smad 通路作为多种致病因素的交汇点,同样导致了肾脏纤维化,UPP 是否亦在 DN 的病理进程中也发挥了重要作用?

本研究结果显示在正常 GMC 内只有少量的 Smurf2 mRNA 和蛋白表达,高糖可诱导 GMC 中泛素连接酶 Smurf2 的 mRNA 和蛋白增多,且具有浓度依赖性,提示高糖致泛素化降解增加,表明 UPP 参与 DN 的发病机制。高糖时 Smurf2 的高表达与渗透压不相关,表明高糖不是通过渗透压途径,而是通过其他途径影响 Smurf2 的表达。

DN 时 TGF- β /Smad 通路的活化已得到公认。由于泛素存在的广泛性,泛素对于细胞内蛋白质降解的重要性,以及 Smurf2 对于 Smad 降解的特异性,结合本研究结果,作者推测:

糖尿病时高糖激活肾脏 Smurf2,致 TGF- β /Smad 信号通路的活化。这是肾脏内细胞因子 TGF- β 增多引起 DN 肾纤维化进展的机制之一。

参考文献:

- [1] 黄晓燕,陈积雄,姚辉,等. 2 型糖尿病大鼠肾组织 nephrin 蛋白的表达及影响[J]. 重庆医学,2009,38(3):305.
- [2] 王午喜. 替米沙坦治疗早期 2 型糖尿病肾病患者临床观察[J]. 重庆医学,2008,37(21):2455.
- [3] Murata T, Shimotohno K. Ubiquitination and proteasome-dependent degradation of human eukaryotic translation initiation factor 4E[J]. J Biol Chem, 2006, 281(29):20788.
- [4] 王晓,李果,李纪平. 泛素在高糖诱导的血管内皮细胞凋亡中的表达[J]. 上海第二医科大学学报, 2005, 25(1): 36.
- [5] Mastrocola R, Reffo P, Penna F, et al. Muscle wasting in diabetic and in tumor-bearing rats: role of oxidative stress [J]. Free Radic Biol Med, 2008, 44(4): 584.
- [6] Cai D, Frantz JD, Tawa NE Jr, et al. IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice[J]. Cell, 2004, 119(2): 285.
- [7] Adachi Uehara N, Kato M, Nimura Y, et al. Up-regulation of genes for oxidative phosphorylation and protein turnover in diabetic mouse retina[J]. Exp Eye Res, 2006, 83(4): 849.
- [8] Lin X, Liang M, Feng X. Smurf2 is an ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling [J]. J Biol Chem, 2000, 275(47): 36818.
- [9] Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, et al. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF- β receptor for degradation[J]. Mol Cell, 2000, 6(6): 1365.

(收稿日期:2009-06-05 修回日期:2009-08-07)

(上接第 9 页)

- [3] Juranka PF, Zastawny RL, Ling V. P-glycoprotein; multi-drug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins[J]. FASEB J, 1989, 3: 2583.
- [4] Huls M, Russel FG, Masereeuw R. The role of ATP binding cassette transporters in tissue defense and organ regeneration[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2009, 328(1): 3.
- [5] Soh Y, Goto S, Kitajima M, et al. Nuclear localisation of glutathione S-transferase pi is an evaluation factor for drug resistance in gynaecological cancers[J]. Clin Oncol, 2005, 17(4): 264.

- [6] Mattern J. Drug resistance in cancer: a multifactorial problem[J]. Anticancer Res, 2003, 23(2C): 1769.
- [7] Nishio K, Nakamura T. Conquering drug resistance in lung cancer[J]. Nippon Rinsho, 2000, 58(5): 1041.
- [8] Fan K, Fan D, Cheng LF, et al. Expression of multidrug resistance-related markers in gastric cancer[J]. Anticancer Res, 2000, 20(6C): 4809.
- [9] Jeha S. New therapeutic strategies in acute lymphoblastic leukemia[J]. Semin Hematol, 2009, 46(1): 76.

(收稿日期:2009-07-10)