

· 论 著 ·

## MG132 对高糖刺激的肾系膜细胞中 Smad7 表达的作用\*

马红艳<sup>1</sup>, 杨军<sup>1</sup>, 肖斌<sup>2</sup>, 徐玲<sup>1</sup>, 万沁<sup>1</sup>, 徐勇<sup>1△</sup>

(泸州医学院:1. 附属医院内分泌科; 2 生化教研室, 四川泸州 646000)

**摘要:**目的 观察不同浓度高糖刺激后大鼠肾系膜细胞胞内 Smad7 的表达,并以蛋白酶体特异性抑制剂 MG132 作为阻断剂,探讨泛素化降解在 Smad 信号中的作用。**方法** 将体外培养的大鼠肾小球系膜细胞分别设正常对照组(葡萄糖浓度 5.6 mmol/L)、20 mmol/L 高糖组、30 mmol/L 高糖组、30 mmol/L 高糖+MG132 组、甘露醇组、正常对照组+MG132、30 mmol/L 高糖+溶剂组等。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 Smad7 的 mRNA 和蛋白的表达。**结果** (1)与正常对照组比较,高糖作用后,各组 Smad7 mRNA 的表达差异无统计学意义;(2)而正常对照组细胞 Smad7 蛋白表达较强;高糖组较正常对照组表达减弱( $P < 0.05$ ),呈浓度依赖性,30 mmol/L 高糖组加入 MG132 后,Smad7 蛋白表达增强。**结论** (1)高糖可诱导肾系膜细胞 Smad7 蛋白降解增加;(2)MG132 可阻止高糖所导致的上述变化。提示泛素-蛋白酶体途径参与了糖尿病肾病 Smad 通路的信号调节。

**关键词:**高糖;肾小球系膜细胞;Smad7;泛素-蛋白酶体途径;MG132**中图分类号:**R365.587**文献标识码:**A**文章编号:**1671-8348(2010)09-1030-03**Effect of MG132 on expression of Smad7 in cultured glomerular mesangial cells induced by high concentration of glucose\***MA Hong-yan<sup>1</sup>, YANG Jun<sup>1</sup>, XIAO Bin<sup>2</sup>, et al.

(1. Department of Endocrinology, Affiliated Hospital; 2. Department of Biochemistry, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**Abstract: Objective** To observe the expression of Smad7 in rat glomerular mesangial cells(GMC) stimulated by the high glucose of different concentration, and to investigate the effect of the ubiquitination in this smad signal by adding MG132 as a proteasome differential inhibitor. **Methods** Cultured rat GMC were divided into normal group(the concentration of glucose: 5.6 mmol/L), high glucose group(20 mmol/L, 30 mmol/L respectively), therapy group(30 mmol/L high glucose with MG132), mannitol group, normal glucose+MG132 group, 30 mmol/L glucose+solvent group. The expression of Smad7 mRNA of each group was measured by quantitative PT-PCR and protein was measured by indirect immunofluorescence and laser scanning confocal microscope respectively. **Results** (1)Compared with normal control group, the expression of Smad7 mRNA had no significant change. (2)The expression of Smad7 protein was decreased significantly in a dose dependent manner in high glucose ( $P < 0.05$ ); in therapy group, the expression of Smad7 protein was enhanced. **Conclusion** (1)High glucose can increase the ubiquitinated degradation of Smad7 protein in glomerular mesangial cells. (2)Compared with 30 mmol/L glucose group, the degradation of Smad7 protein could be reverted mostly by MG132( $P < 0.05$ ). Ubiquitination-proteasome pathway(UPP) is related with the regulation of Smad signal transduction pathways in diabetic nephropathy(DN).

**Key words:**high glucose;glomerular mesangial cells;Smad7;UPP;MG132

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<sup>[1-2]</sup>。DN 的发病机制仍未完全清楚。近年来,研究证实了转化生长因子-β(TGF-β)/信号蛋白分子(Smad)信号转导通路参与了细胞外基质沉积, DN 肾脏纤维化形成的过程。Smad7 是 TGF-β 下游内源性抑制信号蛋白,对 TGF-β 信号转导通路起负反馈抑制作用,在 DN 时 Smad7 的改变及机制尚不清楚。

而泛素-蛋白酶体途径(ubiquitination-proteasome pathway, UPP)是新近发现的一种胞内蛋白降解途径,参与调控细胞众多重要的生理进程。目前的基础研究显示,UPP 通过对 Smad 的调节,而对 TGF-β 信号转导起调节作用<sup>[3]</sup>。而 DN 时 UPP 是否活化、Smad 蛋白是否受 UPP 的调节,尚未见报道。

MG132 是一种特异性 26S 蛋白酶抑制剂,是一种有效、可逆的蛋白酶体水解酶活性的底物类似物,是人工合成的具有细胞穿透性的醛基肽类蛋白酶抑制剂,在动植物系统中都得到

广泛应用。第一个泛素蛋白酶体抑制剂-bortezomib 用于治疗肿瘤已通过美国 FDA 进入临床,取得了很好效果。

为此,本研究将泛素蛋白酶体对蛋白质的降解机制应用到 DN 信号通路的研究中,观察高糖刺激后以及蛋白酶体抑制剂 MG132 干预后大鼠肾系膜细胞 Smad7 的 mRNA 和蛋白表达,旨在探讨 UPP 在高糖诱导系膜细胞 Smad 通路中的作用,为阐明糖尿病肾小球硬化发生机制提供新理论,并研究蛋白酶体抑制剂治疗 DN 的有效性及其可能性。

**1 材料与方法****1.1 材料**

**1.1.1 细胞株** 大鼠 HBZY-1 系膜细胞株购自武汉大学保藏中心。

**1.1.2 试剂** Trizol(美国 MRC 公司), Taq DNA 聚合酶(北京 BioDev 公司), dNTP(美国 Promega 公司), 兔抗大鼠 Smad7 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司), 蛋白酶体抑制剂 MG132

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30670980)。 △ 通讯作者,电话:13980255895;E-mail:xywyll@yahoo.com.cn。

表 1 各组大鼠肾系膜细胞 Smad7 mRNA 表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	$\beta$ -ACTIN(CT Value)	Smad7(CT Value)	$\Delta$ CT	$2-\Delta\Delta$ CT
A: 正常对照组	3	16.00 $\pm$ 0.00	21.50 $\pm$ 0.00	5.50 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
B: 20 mmol/L 葡萄糖组	3	16.50 $\pm$ 0.00	21.91 $\pm$ 0.00	5.41 $\pm$ 0.00	1.06 $\pm$ 0.00
C: 30 mmol/L 葡萄糖组	3	16.17 $\pm$ 0.29	21.84 $\pm$ 0.33	5.67 $\pm$ 0.12	0.89 $\pm$ 0.01
E: 甘露醇组	3	16.00 $\pm$ 0.00	21.42 $\pm$ 0.00	5.42 $\pm$ 0.00	1.06 $\pm$ 0.00

各组与正常对照组比较, 均  $P > 0.05$ 。

(美国 Moker 公司), 异硫氰荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记山羊抗兔 IgG 荧光抗体(北京中山公司), 低糖 DMEM 培养基(美国 GIBCO 公司), 新生小牛血清(成都哈里公司), 胰蛋白酶(美国 Sigma 公司), TritonX-100(美国 Promega 公司)。葡萄糖注射液 20 mL : 10 g(太极集团西南药业公司), 甘露醇 250 mL : 50 g(重庆迪康长江制药公司)。MG132 溶于二甲亚砜溶剂中, 制成 1  $\mu$ mol/L 的 MG132 工作液, 为不造成对培养细胞的毒性, 二甲亚砜的最终浓度控制在 0.05% 以下。

**1.1.3 仪器** TC2323 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(上海力申科学仪器厂), HFsafe 生物安全柜(上海力申科学仪器厂), LDZ5-2 离心机(北京医用离心机厂), 电子天平(德国 Sartorius 公司), 涡轮震荡器(北京六一仪器厂), -70 °C 超低温冰箱(美国 Biorad 公司), 倒置相差显微镜(重庆光学仪器厂), DMIRE2 型激光共聚焦倒置显微镜(德国 Leica 公司)。

**1.2 方法**

**1.2.1 细胞培养和分组** 肾小球系膜细胞 (glomerular mesangial cell, GMC) 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实验。将细胞分为 7 组: 正常对照组(A), 培养液含 5.6 mmol/L 的葡萄糖; 20 mmol/L 高糖组(B); 30 mmol/L 高糖组(C), 作为不同浓度的高糖刺激因子; 治疗组(D), 30 mmol/L 高糖 + 1  $\mu$ mol/L MG132; 甘露醇组(E), 5.6 mmol/L 葡萄糖 + 24.4 mmol/L 甘露醇, 作为渗透压对照; 正常对照组 + MG132(F), 了解 MG132 对正常细胞的作用; 30 mmol/L 高糖组 + 二甲亚砜溶剂(G), 培养液含 1  $\mu$ mol/L 二甲亚砜, 以排除溶剂对结果的影响。

**1.2.2 实时荧光聚合酶链反应 (RT-PCR) 测定 Smad7 mRNA** 将按分组加入各处理因素后培养了 24 h 的细胞, Trizol 提取总 RNA, 取总 RNA 5  $\mu$ L 为模板反转录成 cDNA。将反转录的 cDNA 进行 PCR 扩增, 管家基因  $\beta$ -Actin 做内参。引物由 TaKaRa 公司合成。Smad7: 上游引物 5'-CTGCAACCCCATCACCTTA-3', 下游引物 5'-CCAGAAGAAGTTGGGAATCTGA-3', 扩增产物大小为 185 bp;  $\beta$ -actin: 上游引物 5'-GCCAACACAGTGCTGTCT-3', 下游引物 5'-AGGAGCAATGATCTTGATCTT-3', 扩增产物大小为 114 bp。将反转录成 cDNA 行荧光定量 PCR。反应条件: 94 °C 2 min, 预变性; 94 °C 20 s, 变性; 60 °C 40 s, 扩增 45 个循环后收集数据绘制动力学曲线, 读取 CT 值。将各组目基因的 CT 值与管家基因的 CT 值相减得  $\Delta$ CT, 再将各组的  $\Delta$ CT 与正常对照组的  $\Delta$ 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成像检测 Smad7 蛋白表达** 将按分组加入各处理因素后培养了 24 h 的细胞爬片固定打孔后加入一抗: 将兔抗大鼠 Smad7 多克隆抗

体 200  $\mu$ L 滴加于细胞爬片, 抗体工作浓度均为 1 : 50, 湿盒 37 °C 水浴作用 60 min, 将湿盒放入 4 °C 冰箱过夜(至少 16 h)。用磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗作为阴性对照。加入二抗: 将 FITC 标记的羊抗兔抗体 200  $\mu$ L 滴加于细胞爬片, 抗体工作浓度为 1 : 50, 37 °C 水浴作用 60 min。

使用激光扫描共聚焦显微镜系统, 在数值孔径 1.32 IMM 倒置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 488 nm, 发射波长 520 nm, 扫描速度 4 000 Hz, 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 Smad7 蛋白在 GMC 中的表达水平。

**1.3 统计学方法** 计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 SPSS13.0 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 Smad7 mRNA 的表达** 与正常对照组比较, 高糖各组组和甘露醇组 Smad7 mRNA 表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

**2.2 高糖对系膜细胞 Smad7 蛋白表达的影响及 MG132 的作用** 免疫荧光图像见封 2 图 1, 正常对照组细胞中 Smad7 蛋白在胞浆、胞核均有表达(封 2 图 1A), 高糖刺激后 Smad7 表达减弱, 特别胞浆荧光强度减弱明显(封 2 图 1B、C), MG132 作用后, 高糖组 Smad7 蛋白表达又增强(封 2 图 1D)。

表 2 各组肾系膜细胞 Smad7 蛋白的平均灰度值 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	样本量	平均灰度值	P
A	15	64.09 $\pm$ 7.43	
B	15	45.33 $\pm$ 6.67*	0.007
C	15	30.20 $\pm$ 4.41*	0.000
D	15	62.82 $\pm$ 7.29 <sup>#</sup>	0.937
E	15	63.76 $\pm$ 7.43	0.908
F	15	65.27 $\pm$ 7.96	0.706
G	15	30.60 $\pm$ 4.76*▲	0.000

\* : 与正常对照组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>#</sup> : 与 C 组比较,  $P = 0.003$ ; ▲ : 与 C 组比较,  $P = 0.945$ 。

荧光灰度值定量分析显示, 与正常对照组比较, 高糖各组以及溶剂对照组 Smad7 蛋白表达均减弱, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且有浓度依赖性。但甘露醇组与正常对照组比较, Smad7 表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 说明渗透压对 Smad7 表达无影响。与 30 mmol/L 高糖组比较, 30 mmol/L 高糖组加入 MG132 后, Smad7 蛋白表达增强 ( $P < 0.05$ ), 且与

正常对照组相比,差异无统计学意义。正常对照组+MG132与正常对照组比较,Smad7 表达差异无统计学意义,说明 MG132(1  $\mu$ mol/L)对正常系膜细胞 Smad7 蛋白表达无影响。溶剂对照组与 30 mmol/L 高糖组比较,Smad7 表达差异无统计学意义,说明溶剂对实验结果无影响,见表 2。

### 3 讨 论

TGF- $\beta$  通路作为 DN 多种致病因素的交汇点,导致了肾脏进行性纤维化。Smad 蛋白家族是主要的 TGF- $\beta$  受体细胞内激活底物,Smad7 对 TGF- $\beta$  信号转导通路起负反馈抑制作用<sup>[4]</sup>。Fukasswa 等<sup>[5]</sup>在与糖尿病肾脏纤维化发病有关的梗阻性肾病大鼠模型(UUO)中证实,病变肾脏 Smad7 mRNA 表达不降低,而 Smad7 蛋白表达明显减少,Smad7 减少是由于泛素化降解增加所致,提示泛素化降解 Smad7 增加是导致肾纤维化的重要原因。对 Smad7 表达的调控可能成为阻断肾脏 TGF- $\beta$  效应的具有生理学基础的诱人策略。

泛素介导的蛋白酶体降解涉及细胞周期的调控、细胞凋亡、抗原提呈、炎症演进和基因转录及表达等多方面,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<sup>[6]</sup>。它是调节 TGF- $\beta$ /smad 信号通路的重要机制之一,能特异地降解 Smad7<sup>[3]</sup>。

目前有关糖尿病并发症时泛素蛋白酶体的研究尚少。Adachi Uehara 等<sup>[7]</sup>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。

本研究显示,在大鼠正常肾系膜细胞内有一定量的 Smad7 mRNA 和蛋白表达,可能是它具有维持 Smad 通路在非激活状态,维护正常肾脏生理的作用;在高糖条件下 Smad7 蛋白的表达呈浓度依赖性下降,而高糖对 Smad7 mRNA 表达无影响,提示 Smad7 蛋白降解增多。高糖时 Smad7 蛋白的低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 Smad7 的表达,这与既往研究发现高渗对 TGF- $\beta$  或 Smad 家族的表达均无影响的研究结果一致。本结果还表明, MG132 可明显抑制高糖导致的系膜细胞 Smad7 蛋白低表达,提示高糖可通过 UPP 促进 Smad7 蛋白的降解。

DN 时 TGF- $\beta$ /Smad 通路的活化已得到公认。由于泛素存在的广泛性,泛素对细胞内蛋白质降解的重要性,结合本研究结果推测:糖尿病时高糖激活肾脏 UPP,使泛素化降解 Smad7 蛋白增加,对 TGF- $\beta$  的抑制减弱,致 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路的活化,导致细胞外基质在肾小球、肾小管间质大量沉积,肾脏发生纤维化,发生 DN。这是肾脏内细胞因子 TGF- $\beta$  增多引起 DN 肾纤维化进展的机制之一<sup>[8]</sup>。

UPP 对特定的蛋白降解异常,将导致疾病的发生。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。蛋白酶体抑制剂是研究 UPP 生物学功能的一个非常有用的工具。Meiners 等<sup>[9]</sup>使用 MG132 注射治疗自发性高血压模型大鼠,发现可通过抑制 NF- $\kappa$ B 活化,减轻心肌纤维化近 40%。治疗 12 周没有大鼠死亡,未发现肝肾等细胞毒性、不良反应。Tashiro 等<sup>[10]</sup>在 UUO 中使用蛋白酶体抑制剂也显示可减轻肾

间质纤维化。Marfella 等<sup>[11]</sup>发现糖尿病中氧化应激上调蛋白酶体通路,激活 NF- $\kappa$ B,用蛋白酶体抑制剂处理的糖尿病单核细胞中 NF- $\kappa$ B 表达下调。

本实验将泛素蛋白酶体对蛋白质的降解机制应用到 DN 信号通路的研究中,探讨蛋白酶体抑制剂治疗 DN 的有效性及其可能性,是一个重要的尝试。将可能为 DN 治疗寻找到有效方法。目前少见蛋白酶体抑制剂治疗 DN 动物模型的实验,蛋白酶体抑制剂治疗 DN 的作用及体内实验有待进一步深入研究。

### 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] Zhang F, Laiho M. On and off; proteasome and TGF- $\beta$  signaling[J]. Exp Cell Res,2003,291(2):275.
- [4] Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, et al. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF- $\beta$  receptor for degradation[J]. Mol Cell,2000,6(6):1365.
- [5] Fukasawa H, Yamamoto T, Togawa A, et al. Down-regulation of Smad7 expression by ubiquitin dependent degradation contributes to renal fibrosis in obstructive nephropathy in mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2004,101(23):8687.
- [6] Murata T, Shimotohno K. Ubiquitination and proteasome-dependent degradation of human eukaryotic translation initiation factor 4E[J]. J Biol Chem,2006,281(29):20788.
- [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] Bottinger EP, Bitzer M. TGF- $\beta$ 1 signaling in renal disease[J]. J Am Soc Nephrol,2002,13(10):2600.
- [9] Meiners S, Hofer B, Weller A, et al. Downregulation of matrix metalloproteinases and collagens and suppression of cardiac fibrosis by inhibition of the proteasome[J]. Hypertension,2004,44(4):471.
- [10] Tashiro K, Tamada S, Kuwabara N, et al. Attenuation of renal fibrosis by proteasome inhibition in rat obstructive nephropathy: possible role of nuclear factor kappaB[J]. Int J Mol Med,2003,12(4):587.
- [11] Marfella R, D'Amico M, Esposito K, et al. The Ubiquitin-Proteasome system and inflammatory activity in diabetic atherosclerotic plaques[J]. Diabetes,2006,55(3):622.

(收稿日期:2009-09-06 修回日期:2009-10-20)