

TGF- β /Smad 阻遏子 c-Ski 与糖尿病肾病的相关性研究

田雪 张捷 于倩 刘德敏

基金项目:天津市卫生局科技基金资助课题(09KY24)

作者单位:243000 安徽省,安徽省马鞍山市临床检验中心(田雪)

300070 天津市,天津医科大学代谢病医院卫生部激素与发育重点实验室(张捷 于倩 刘德敏)

通讯作者:刘德敏, E-mail: tjmldm@126.com

【摘要】 目的 探讨阻遏子 c-Ski 对 TGF- β /Smad 信号途径的抑制作用与糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)的关系。方法 将所有大鼠随机分为正常对照组(NC组)、糖尿病(diabetes mellitus, DM)模型组(DM组)和吡格列酮干预组(PT组)。尾静脉小剂量注射链脲佐菌素建立 DM 大鼠模型。在实验期间连续监测血糖,8 w 末处死动物并采集血尿标本用于相关的生化指标测定,采用 real-time PCR 方法检测 TGF- β 1 和 c-Ski 的 mRNA 水平,免疫组化法检测 TGF- β 1 和 c-Ski 蛋白表达情况,并进行统计学分析。结果 与 NC 组相比,DM 组血糖和血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、24 h 尿微量白蛋白(24 hours urinary microalbumin, 24 hUMA)水平明显升高,经 PT 干预后大鼠血糖、BUN、24 hUMA 水平较 DM 组均显著下降,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。PCR 结果显示,DM 组的 TGF- β 1 mRNA 水平较 NC 组显著升高,经 PT 干预后,其表达量显著降低,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05),而 c-Ski mRNA 水平三组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 NC 组比较,DM 组肾组织病理形态呈阳性表达,而 PT 组与 NC 组相近。免疫组化结果显示 TGF- β 1 表达量在 DM 组较 NC 组显著增加,但 c-Ski 蛋白表达低于 NC 组,经 PT 干预后 TGF- β 1 表达较 DM 组下降,而 c-Ski 表达显著增加,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。结论 DN 中阻遏子 c-Ski 表达的下调减少了对 TGF- β /Smad 途径的阻断作用,而 PPAR- γ 可减少这种下调,为 DN 治疗机制的研究提供新的实验依据。

【关键词】 糖尿病;转化生长因子- β 1;糖尿病肾病;c-Ski;PPAR- γ

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2013.02.004

The correlation research of TGF- β /Smad signal pathway repressor c-Ski and diabetic nephropathy

TIAN Xue¹, ZHANG Jie², YU Qian², et al. ¹Maanshan Center For Clinical Laboratory, Anhui Province 243000, China ²Key Laboratory of Hormones and Development, Ministry of Health, Metabolic Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

【Abstract】 Objective To investigate the negative regulatory mechanism of c-Ski to TGF- β /Smad signal pathway in patients with diabetic nephropathy (DN). **Methods** Rats were randomized into normal control group (NC group), diabetes group (DM group) and pioglitazone group (PT group). Murine diabetic models were induced with streptozotocin. All the indicators related to renal function such as blood urea nitrogen (BUN) and 24 hours urinary microalbumin (24 hUMA) were detected in rats sacrificed after 8 weeks of experiment. The mRNA expression levels of c-Ski and TGF- β 1 were detected by real-time PCR, and the protein expression of TGF- β 1 and c-Ski were determined by immunohistochemistry and statistically analyzed. **Results** Compared with NC group, the levels of BUN, 24 hUMA and blood sugar were higher in DM group, and the levels were decreased after treated by PT, and the differences all had statistical significance ($P < 0.05$). The results of PCR showed that the level of TGF- β 1 mRNA in DM group was higher than in NC group, after treated by PT, the level of TGF- β 1 mRNA decreased significantly than in DM group, and the differences all had statistical significance ($P < 0.05$). There were no statistical significance in c-Ski mRNA levels among three groups ($P > 0.05$). Compared with NC group, the modality of kidney tissue shown positive expression in DM group, but little change in PT group. The results of immunohistochemistry showed that the levels of TGF- β 1 in DM group were higher, but c-Ski were lower than in NC group, while after treated by PT, the levels of TGF- β 1 expressed lower, but c-Ski expressed higher than in DM group, and the differences all had statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** PPAR- γ can significantly up-regulate protein level of c-Ski to inhibit TGF- β /Smad pathway in kidney tissue of diabetic rats, which may provide new evidence for DN therapeutic mechanism research.

【Key words】 DM; TGF- β 1; Diabetic nephropathy; c-Ski; PPAR- γ

TGF- β /Smad 信号途径是肾脏纤维化的关键通路之一,可以促进肾小管上皮细胞向间充质细胞转化,促进细胞外基质(extracellular matrix, ECM)堆积并最终导致肾脏纤维化^[1]。c-Ski 是鸟类癌基因 v-Ski 在人组织中的细胞内同源物,主要的生物学功能是通过与 Smad2/3 及 Smad4 结合,阻遏 Smad 复合物激活 TGF- β 1 下游靶基因的转录,从而起到对 TGF- β /Smad 信号通路的负性调节作用^[2]。但这些研究主要集中在肿瘤发生上,关于其在糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)发病过程中是否也存在相似的机制目前尚不明确。吡格列酮(pioglitazone, PT)作为过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR- γ)最重要的外源性激活剂,可提高胰岛素敏感性、促进脂肪细胞生成及分化、调节细胞周期。最近有研究^[3]发现,该类药物能抑制多种器官的纤维化疾病进程,但具体作用机制尚未阐明。本文研究通过观察糖尿病(diabetes mellitus, DM)大鼠模型肾组织中 c-Ski 和 TGF- β 1 的表达变化,探讨 PPAR- γ 与 TGF- β 1、c-Ski 之间的相互联系和对 DN 的影响,也为 PPAR- γ 对 DN 治疗机制的研究提供新的实验依据,开阔新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级 Sprague-Dawley 大鼠 40 只,8 w 龄,体质量 250~300 g,购自天津实验动物中心。实验期间标准饲料喂养,保持良好通风,温湿度适宜。

1.1.2 药物与试剂 链脲佐菌素[streptozotocin (STZ),Sigma 公司];PT(日本武田公司);Trizol(invitrogen);逆转录试剂盒(美国 Fermentas 公司);小鼠抗 TGF- β 1 单克隆抗体、兔抗 c-Ski 多克隆抗体(Santa Cruz biotechnology);SABC 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒(武汉博士德公司)。

1.1.3 仪器与设备 日立 CF-15D 冷冻离心机,德国 BIOSEN 血糖分析仪,芬兰 Quik read 快速分析仪,罗氏 Modular P 模块全自动生化分析仪。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立与分组 适应性喂养 1 w 后,所有 SD 大鼠按体质量随机分为两组,Ⅰ组为正常对照组(NC, n=10),Ⅱ组为模型组(n=30)。模型组按 40 mg/kg 体质量尾静脉注射 2%STZ,同时给予正常对照组等剂量枸橼酸钠缓冲液。造模成功的判定标准为 72 h 和第 7 天尾静脉取血测随机血糖均 ≥ 16.7

mmol/L,共有 28 只造模成功。所有 DM 大鼠随机分为 DM 组(n=14)和 PT 干预组(n=14)。对 PT 组大鼠用去离子水溶解 PT,给予 15 mg/(kg·d)灌胃,每日 1 次,同时对 NC 组和 DM 组给予等量生理盐水灌胃。

1.2.2 体征观察 实验期间,注意观察大鼠的各项状态,包括饮食、体重、毛发和运动状况等,定期监测血糖。

1.2.3 动物标本的采集与检测 自成模之日起,每 2 w 测血糖并记录;8 w 末处死各组动物,留取尿液离心(离心半径 18.5 cm,3000 r/min,5 min),用免疫透射比浊法测定 24 h 尿微量白蛋白(24 hours urinary microalbumin, 24 hUMA);股动脉穿刺取血,离心(离心半径 18.5 cm,3000 r/min,5 min)后取血清于 -20 °C 冻存,用酶法测定血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN);开腹腔取肾,左肾称重后迅速放入 10%福尔马林固定,用于切片制作,右肾去除包膜后留取肾皮质部分于冻存管中,在 -80 °C 冰箱中冻存,用于 real-time PCR 测定。

1.3 TGF- β 1 和 c-Ski mRNA 表达测定 利用 real-time PCR 检测各组大鼠肾皮质中目的基因 TGF- β 1 和 c-Ski mRNA 表达水平的变化。在 real-time PCR 中,选用 β -actin 作为内参。反应体系为:2 \times SYBR Premix Ex Taq 12.5 μ l, cDNA 2 μ l, 10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ l, ddH₂O 8.5 μ l, 终体积 25 μ l。 β -actin 上游引物:5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3', β -actin 下游引物:5'-TTTAATGTCACGCACGATTTTC-3';TGF- β 1 的上游引物:5'-CAACAACGCAATC-TATGACA-3', TGF- β 1 的下游引物:5'-CAAG-GTAACGCCAGGAAT-3';c-Ski 的上游引物:5'-TCAACTCGGTGTGCGATG-3', c-Ski 的下游引物:5'-CGTCCGTCTTGCTGATGAC-3'。real-time PCR 扩增条件:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火及延伸 30 s, 共 40 个循环。目的基因与内参基因扩增阈值的差值,即 Δ Ct 值,根据公式 $2^{-\Delta Ct}$ 计算出样品初始模板量进行分析。

1.4 肾组织病理形态学观察 取福尔马林中固定的肾组织制作石蜡包埋切片(4 μ m),经 HE 染色,观察肾组织形态学改变。

1.5 肾组织免疫组化检测 用免疫组化 SABC 法检测肾组织中 TGF- β 1 和 c-Ski 蛋白表达。使用的 TGF- β 1 一抗浓度为 1:200, c-Ski 一抗浓度为 1:25。用 PBS 代替一抗作为阴性对照,4 °C 孵育过夜, DAB 显色,苏木素复染。图像分析采用的 Image-Pro Plus

6.0 图像分析系统, 每张切片随机读取 10 个不重叠的视野, 计算其积分光密度 (IOD), 取均值进行统计学分析, 具体参考文献^[3]。

1.6 统计学处理 用 SPSS19.0 软件进行统计学处理, 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间均数比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体征观察 与 NC 组相比, DM 组大鼠表现出明显多饮、多食、多尿, 精神状态萎靡不振, 体型消瘦, 毛发枯黄, 部分有气喘、白内障和溃疡等症状; PT 治疗后, 这些状况均有改善。

2.2 动态监测血糖水平 在实验期间, NC 组大鼠血糖与体重正常且稳定, DM 组大鼠血糖始终维持在较高水平, 与 NC 组相比差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01); PT 组较 DM 组血糖有明显降低, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。见表 1。

表 1 各组大鼠不同时间血糖变化比较 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	2 w	4 w	6 w	8 w
NC 组	6.06±1.17	6.23±0.73	6.07±0.48	6.33±0.49
DM 组	26.71±6.25*	30.49±4.92*	28.23±1.28*	32.62±2.82*
PT 组	19.82±9.74 [△]	23.60±4.79 [△]	23.70±1.85 [△]	23.97±0.97 [△]
F 值	113.44	136.25	804.59	475.20
P 值	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

注: *与 NC 组比较, $P < 0.01$; [△]与 DM 组比较, $P < 0.01$

2.3 肾功能相关指标检测水平比较 与 NC 组相比, DM 组大鼠的 BUN 和 24 hUMA 显著增加, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01); PT 干预后均有下降, 与 DM 组比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。见表 2。

2.4 各组大鼠肾皮质 TGF- β 1 和 c-Ski 的 mRNA 表达水平比较 与 NC 组相比, DM 组 TGF- β 1 mRNA 表达水平明显升高, 经 PT 干预后, 其表达水平较 DM 组有显著下降, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05); c-Ski mRNA 各组间表达水平差异无统计学

意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 2 各组大鼠肾功能相关指标检测水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	BUN (mmol/L)	24 hUMA (μ g)
NC 组	10	2.64±0.21	91.08±33.03
DM 组	14	4.09±0.32*	743.21±513.66*
PT 组	14	3.41±0.40 ^{△△}	417.76±350.39 [△]
F 值	-	56.23	8.71
P 值	-	< 0.05	< 0.05

注: *与 NC 组比较, $P < 0.01$; [△]与 DM 组比较, $P < 0.05$; ^{△△}与 DM 组比较, $P < 0.01$

表 3 大鼠肾皮质 c-Ski、TGF- β 1 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	c-Ski mRNA (10^{-3})	TGF- β 1 mRNA (10^{-3})
NC 组	10	0.79±0.87	19.16±5.64
DM 组	14	0.58±0.43	53.70±11.57*
PT 组	14	0.70±0.33	33.06±12.23 [△]
F 值	-	0.24	23.39
P 值	-	> 0.05	< 0.05

注: *与 NC 组比较, $P < 0.01$; [△]与 DM 组比较, $P < 0.05$

2.5 肾组织病理形态学结果 镜下可见 NC 组肾小球大小正常, 内部呈丝网状结构, 肾小球血管祥薄而清晰, 内部充满红细胞, 系膜区无明显增生, 周围肾小管正常; DM 组肾小球体积增大, 肾小球内部丝网状结构模糊, 系膜基质增宽, 肾小球毛细血管基底膜增厚, 部分肾小球出现分叶; PT 组肾脏形态结构接近 NC 组, 有轻度基底膜增厚。见图 1。

2.6 肾组织免疫组化检测结果 TGF- β 1 在各组中均呈现明显的黄色颗粒沉着, DM 组表达强阳性, 显著高于 NC 组, PT 组 TGF- β 1 表达较 DM 组显著下降, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05); c-Ski 在 NC 组可见阳性表达, 部位和 TGF- β 1 基本一致, DM 组中 c-Ski 表达明显减少, PT 组明显增加, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。见表 4, 图 2、3。

3 讨论

本实验采用尾静脉小剂量注射 STZ 的方法, 成

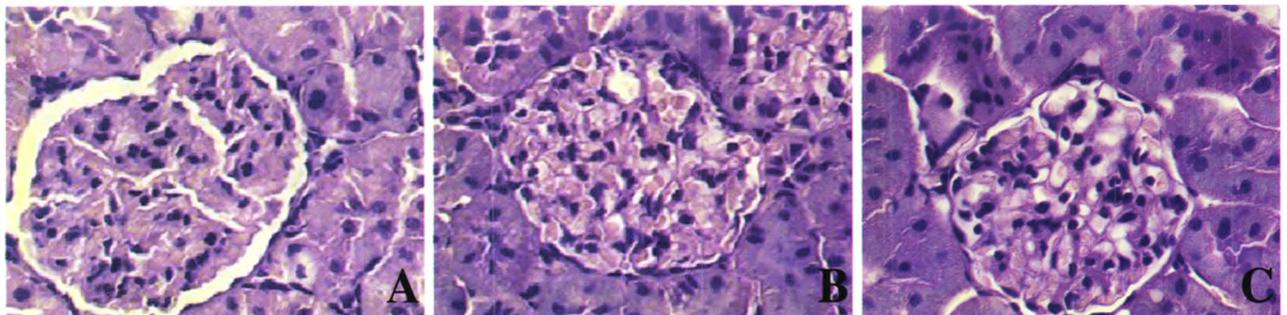


图 1 各组大鼠肾组织 HE 染色 ($\times 400$)

注: A: DM 组; B: NC 组; C: PT 组

表 4 大鼠肾皮质 TGF-β1、c-Ski 蛋白表达水平比较(x±s)

组别	只数	TGF-β1 (IOD, ×10 ³)	c-Ski (IOD, ×10 ³)
NC 组	10	6.06±0.93	6.33±0.61
DM 组	14	9.99±1.05*	1.83±0.11*
PT 组	14	8.23±0.33 ^Δ	3.50±0.34 ^{ΔΔ}
F 值	-	17.72	175.49
P 值	-	< 0.05	< 0.05

注: *与 NC 组比较, P<0.01; ^Δ与 DM 组比较, P<0.05; ^{ΔΔ}与 DM 组比较, P<0.01

功建立 DM 大鼠模型。小剂量 STZ 可以使胰岛素分泌轻度受损,具有 2 型 DM 后期的特征^[4]。DN 早期病理生理改变主要是肾小球高滤过和微量蛋白尿,尿蛋白可通过肾小管上皮细胞募集的巨噬细胞诱导转分化的发生和细胞外基质的产生,引起间质纤维化^[5]。观察 UMA 可以提示肾功能的损害程度,对于诊断 DN 进程有较高灵敏度。本文研究在整个实验期间,造模成功的大鼠血糖维持在高水平,肾脏肥大明显,各项肾功能相关指标包括 BUN、24 hUMA 均呈现明显升高,表明 DM 大鼠肾脏组织发生了病变,并发 DN。

DN 的主要发病机制之一就是 ECM 的过度堆积。而 TGF-β1 作为 ECM 调节剂,其过度表达可导致 ECM 增生,而肾小球硬化和肾间质纤维化正是 TGF-β/Smad 信号通路调节 ECM 堆积的结果。一般

情况下, TGF-β1 在肾脏中表达的量是很低的;而在 DM 状态下, TGF-β1 的表达显著增加^[6]。可能正是 TGF-β1 的这种扩大化效应,不断促进肾脏组织纤维化进程,加速 DN 发展。阻遏子 c-Ski 可以通过阻止 Smad2、Smad3 吸引 Smad4 形成三聚体复合物,抑制 TGF-β1 下游靶基因的转录,控制这种扩大效应的产生。在正常肾脏组织中,存在有一定量的 c-Ski,其通过与 Smad 蛋白相互作用,有效地限制 Smad 介导的基因转录,保护肾组织免受不需要的 TGF-β1 反应的影响^[7]。本文研究免疫组化结果也显示, DM 组中 TGF-β1 表达较 NC 组显著升高,而 c-Ski 在 NC 组中表达高于 DM 组。由此推测, DN 中可能是 c-Ski 的表达下调减少了对 TGF-β/Smad 途径的阻断作用,为 TGF-β1 创造了一个理想的促纤维化环境,使 TGF-β1 可以不受控制的转导信号。尤其值得注意的是, c-Ski 对 TGF-β 转录活性的抑制是唯一发生于核内的,且在各物种中具有高度保守性,这对于下调 TGF-β1 的促纤维化效应,控制肾脏纤维化,延缓 DN 进程有重要意义。

进一步观察 c-Ski mRNA 的表达,发现各组之间差异均无统计学意义,提示其蛋白的表达变化可能不是由基因转录的改变引起的。Fukasawa 等^[8]的研究中提出,在单侧输尿管闭塞模型小鼠中 c-Ski 蛋白表达减少不是因为其 mRNA 表达的降低,而是 Smurf2 等介导的蛋白水平的降解。Le Scolan 等^[9]研

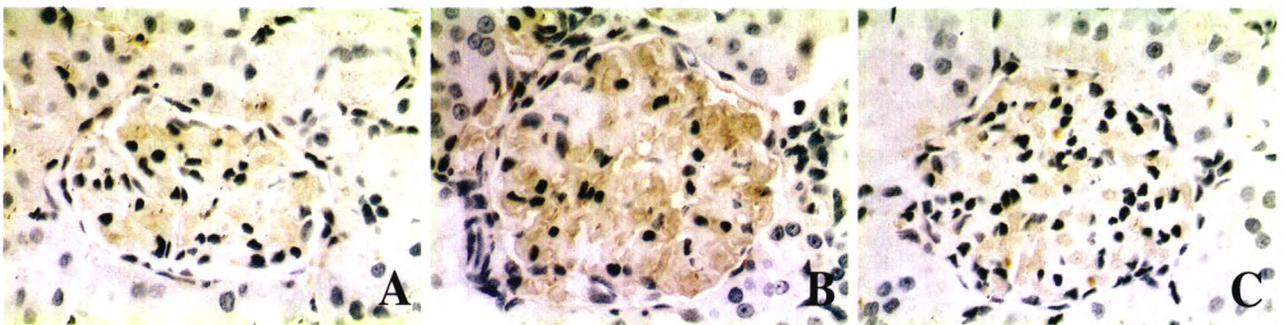


图 2 肾组织 TGF-β1 免疫组化结果(SABC 法, ×400)

注: A: DM 组; B: NC 组; C: PT 组

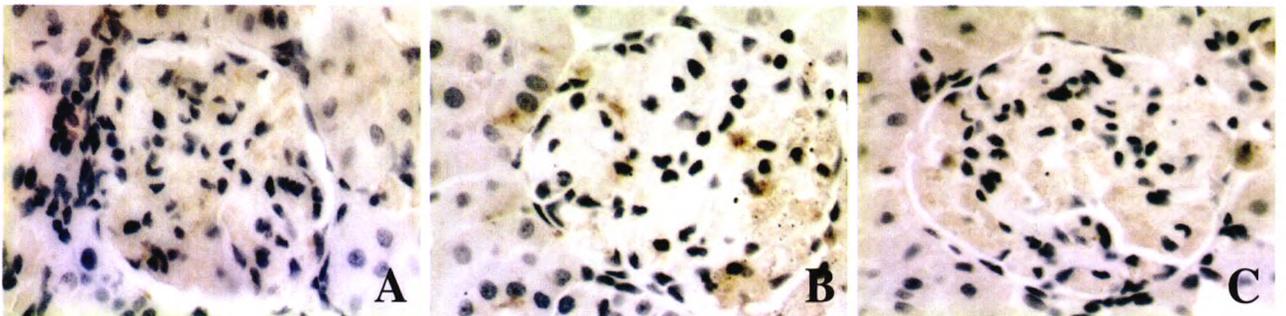


图 3 肾组织 c-Ski 免疫组化结果(SABC 法, ×400)

注: A: DM 组; B: NC 组; C: PT 组

究认为, TGF- β 可以通过泛素化途径或蛋白酶体途径参与诱导 Ski 蛋白家族成员的降解, 促进 Smad 蛋白降解, 从而对 c-Ski 进行负反馈调节。本文研究中 PT 干预后发现, TGF- β 1 的蛋白表达较 DM 组显著下降, 而 c-Ski 蛋白表达显著增加。因此推论, PT 可能通过上调 c-Ski 的表达, 提高 TGF- β 1 反应的阈值, 抑制 TGF- β 1 过表达, 抑制无限制的促纤维化效应, 从而对 DN 达到有限制的调控。另一方面, TGF- β 1 因为同时兼有抗炎特性^[10], 直接抑制其本身活性可能对某些炎症反应产生无法预测的影响, 而 PPAR- γ 可以上调 c-Ski 的表达, 通过迂回的方式限制 TGF- β 1 的反应, 从而避免上述影响。这为阐明 PPAR- γ 治疗 DN 的作用机理提供了新的思路, 也为研究治疗 DN 的机制提供了新的可行方案。

4 参考文献

- 1 Liu Y. Renal fibrosis: New insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int*, 2006, 69:213-217.
- 2 Jahchan NS, Luo K. SnoN in mammalian development, function and diseases. *Curr Opin Pharmacol*, 2010, 10:670-675.
- 3 Shinzato T, Ohya Y, Nakamoto M, et al. Beneficial effects of pioglitazone on left ventricular hypertrophy in genetically hypertensive rats. *Hypertens Res*, 2007, 30:863-873.
- 4 Franconi F, Seghieri G, Canu S, et al. Are the available experimental models of type 2 diabetes appropriate for a gender perspective. *Pharmacol Res*, 2008, 57:6-18.
- 5 Abbate M, Zoja C, Remuzzi G. How does proteinuria cause progressive renal damage. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17:2974-2984.
- 6 乌格敦其其格, 赵宗江, 蒋玉凤, 等. 糖肾平胶囊对 STZ 诱导糖尿病肾病大鼠肾脏保护及其对 TGF- β 1/p38MAPK 信号转导通路的影响. *中华中医药杂志*, 2012, 27:1902-1907.
- 7 Deheuninck J, Luo K. Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF- β signaling. *Cell Res*, 2009, 19:47-57.
- 8 Fukasawa H, Yamamoto T, Toqawa A, et al. Ubiquitin-dependent degradation of SnoN and Ski is increased in renal fibrosis induced by obstructive injury. *J. Kidney Int*, 2006, 69:1733-1740.
- 9 Le Scolan E, Zhu Q, Wang L, et al. Transforming growth factor- β suppresses the ability of Ski to inhibit tumor metastasis by inducing its degradation. *Cancer Res*, 2008, 68:3277-3285.
- 10 Lan HY. Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci*, 2011, 7:1056-1067.

(收稿日期: 2013-04-23)

(本文编辑: 杨军)

消 息

致谢

《实用检验医师杂志》编辑部全体工作人员衷心感谢以下编委/专家对本刊出版的大力支持! (姓名以拼音为序)

白 洁 陈 端 陈 伟 胡成进 胡晓波 贾克刚 姜 恺
焦连亭 敬 华 刘德敏 刘树业 穆 红 欧启水 任建平
陶庆春 汪德清 王昌富 王 琪 王 毅 肖创清 徐笑红
詹思延 张贺平 张军力 张 曼 张时民 赵克斌 赵玲莉
郑 磊 邹 雄