

• 论著 •

高糖诱导下肾小管上皮细胞中细胞因子信号转导抑制因子-1/3 的表达及意义

王晨 史永红 任福卓 郝军 戎赞华 段惠军

【摘要】 目的 观察高糖诱导下肾小管上皮细胞形态学改变及细胞因子信号转导抑制因子(SOCS-1/3)在肾小管上皮细胞中的表达及意义。**方法** 体外培养人肾近曲小管上皮细胞株(HKCs),并分为空白对照组、高糖组、Janus 激酶 2 抑制剂 AG490 组。空白对照组以无血清培养基(5.5 mmol/L 葡萄糖)培养细胞 8 h;高糖组在含 1%胎牛血清培养基中加高糖(300.0 mmol/L 葡萄糖)培养;AG490 组在高糖组基础上加 10 μ mol/L AG490 培养。后两组再按培养时间分为 2、4、6、12、24、48 h 6 个亚组,每组 6 孔。倒置显微镜和电镜下观察细胞形态学及超微结构改变,采用免疫细胞化学和蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 SOCS-1/3 蛋白表达,用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 SOCS-1/3 mRNA 表达。**结果** 与空白对照组比较,高糖组 12 h 后细胞呈梭形改变,有不规则突起,随时间延长细胞界限不清,胞质内颗粒增多;电镜下细胞表面微绒毛及细胞内线粒体明显减少,粗面内质网明显增加。AG490 组细胞变化不明显。免疫细胞化学显示,SOCS-1/3 蛋白表达以胞质为主,散在胞核表达。SOCS-1/3 在正常 HKC 中有基础表达($0.218 \pm 0.023, 0.337 \pm 0.009$);高糖组 4~24 h SOCS-1/3 蛋白表达均高于空白对照组,其中 SOCS-1 以 4 h 表达最高(1.022 ± 0.072),SOCS-3 以 6 h 表达最高(1.256 ± 0.105 ,均 $P < 0.01$);AG490 组 SOCS-1/3 蛋白表达较高糖组明显下降(4 h SOCS-1: 0.589 ± 0.167 ,6 h SOCS-3: 0.656 ± 0.075 ,均 $P < 0.05$)。高糖组 2~12 h SOCS-1/3 mRNA 表达高于空白对照组,其中 SOCS-1 以 4 h 表达最高(1.716 ± 0.098 比 $0.475 \pm 0.045, P < 0.05$),SOCS-3 以 6 h 表达最高(2.848 ± 0.116 比 $0.749 \pm 0.086, P < 0.01$);AG490 组则低于高糖组(4 h SOCS-1: 0.865 ± 0.075 ,6 h SOCS-3: 0.923 ± 0.116 ,均 $P < 0.05$)。**结论** 高糖可诱导肾小管上皮细胞发生形态学及超微结构改变,在早期即有 SOCS-1/3 表达上调,可能与 Janus 激酶(JAK)/信号转导和转录激活因子(STAT)/SOCS 信号转导通路的负反馈调节途径有关。

【关键词】 高糖; 肾小管上皮细胞; 细胞因子信号转导抑制因子

The expression of suppressor of cytokine signaling-1/3 in renal tubular epithelial cells induced by high glucose WANG Chen*, SHI Yong-hong, REN Yun-zhuo, HAO Jun, RONG Zan-hua, DUAN Hui-jun. * Department of Pathology of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei, China
Corresponding author: DUAN Hui-jun, Email: duanhj@hebmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To observe the morphologic changes and the expression of suppressor of cytokine signaling-1/3 (SOCS-1/3) in renal tubular epithelial cells induced by high glucose (HG) and to investigate their significance. **Methods** The renal tubular epithelial cell line (HKCs) cultured in vitro were divided into blank control group, HG group, and Janus kinase 2 inhibitor AG490 group. HKC of blank control group was cultured for 8 hours in 5.5 mmol/L glucose, and the other two groups were cultured in 300.0 mmol/L glucose or 300.0 mmol/L glucose+10 μ mol/L AG490 for 2, 4, 6, 12, 24, 48 hours ($n=6$). The morphology and ultrastructure were observed with inversion microscope and electron microscope at different time points. Protein expression of SOCS-1/3 was assayed by immunocytochemistry and Western blotting; SOCS-1/3 mRNA was assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Under inversion microscope it was showed that 12 hours after being cultured with HG, the cells assumed a spindle-shape, with irregular protrusions, and cellular membrane became indistinguishable with prolongation of time, with increase of intracellular granules. Under the electron microscope, it was seen that there was distinct decrease in microvilli on the cell membrane and mitochondria, with an increase in rough endoplasmic reticulum. The cellular changes were not obvious in AG490 group. Furthermore, immunocytochemistry and Western blotting showed that the immunoreactivity was localized in the cytoplasm as well as in the nuclei, and there was basic expression of SOCS-1/3 protein in normal HKC ($0.218 \pm 0.023, 0.337 \pm 0.009$). HG was shown to induce up-regulation of the expression of SOCS-1/3 protein at 4, 6, 12, 24 hours compared with blank control group. The expression of SOCS-1 was highest at 4 hours (1.022 ± 0.072), and that of SOCS-3 was highest at 6 hours (1.256 ± 0.105 , both $P < 0.01$), while the expression of SOCS-1/3 protein in AG490 group was lower than that in HG group (4 hours SOCS-1: 0.589 ± 0.167 , 6 hours SOCS-3: 0.656 ± 0.075 , both $P < 0.05$). However, HG induced a higher expression of SOCS-1/3 mRNA at 2, 4, 6, 12 hours compared with blank control group. The expression of SOCS-1 was highest at 4 hours (1.716 ± 0.098 vs. $0.475 \pm 0.045, P < 0.05$), and that of SOCS-3 was highest at 6 hours (2.848 ± 0.116 vs.

0.749±0.086, $P<0.01$), while the expression of SOCS-1/3 mRNA in AG490 group was lower (4 hours SOCS-1: 0.865±0.075, 6 hours SOCS-3: 0.923±0.116, both $P<0.05$). **Conclusion** HG could produce morphology and ultrastructure changes in renal tubular epithelial cell, and it induces up-regulation of SOCS-1/3 expression. These changes might be related with negative regulation of Janus kinase (JAK)/signal transducers and activators of transcription (STAT)/SOCS pathway.

【Key words】 High glucose; Renal tubular epithelial cell; Suppressor of cytokine signaling

已知细胞因子信号转导抑制因子(SOCS)对细胞因子信号通路具有负反馈调节作用,可参与多种细胞因子、生长因子和激素的信号调节过程,其蛋白能调节不同生理状态下细胞对细胞因子或生长激素的反应活性,从而使机体内环境保持稳定^[1]。Janus 激酶/信号转导和转录激活因子(JAK/STAT)通路是细胞因子发挥其生物效应最重要的细胞内信号转导通路,SOCS 在细胞因子诱导下依赖 JAK/STAT 通路的激活而产生,继而抑制细胞因子的信号转导,在许多体外及基因敲除动物研究中,SOCS-1/3 可以通过抑制 JAK2 活性从而抑制 JAK/STAT 通路的信号转导^[2-3]。本研究中通过观察高糖诱导下肾小管上皮细胞的形态学变化以及 SOCS-1/3 基因的表达定位,以期从细胞、蛋白、分子水平观察高糖诱导下 SOCS 基因在肾小管上皮细胞中的表达,进一步明确细胞形态学改变与信号转导分子的关系,为进一步揭示 SOCS 基因与糖尿病肾病(DN)的关系及信号转导分子机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂:人肾近曲小管上皮细胞株(HKCs,由解放军总医院陈香美教授惠赠),抗 SOCS-1、抗 SOCS-3 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, JAK2 抑制剂 AG490 购自美国 Calbiochem 公司; 二步法免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥公司,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒、GoTaq 试剂购自美国 Promega 公司, TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 细胞培养及分组:用含 10%胎牛血清 DMEM 培养基常规培养 HKCs,待细胞贴壁 60%~80%、无血清培养基同步培养 8 h 后,将细胞分为高糖组和 AG490 组,分别在培养基中加入 300.0 mmol/L 葡萄糖或 300.0 mmol/L 葡萄糖+10 μmol/L AG490,再按培养时间分为 2、4、6、12、24、48 h 6 个亚组;以无血清培养基(5.5 mmol/L 葡萄糖)同步

培养 8 h 的细胞作为空白对照组。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 细胞形态学观察:分别于 4、6、12、24、48 h 在倒置显微镜下观察细胞形态学改变;并于 12 h、24 h 分别收集细胞,醋酸铀和柠檬酸铅双染,透射电镜下观察。

1.3.2 免疫细胞化学法检测 SOCS-1/3 蛋白表达:采用二步法检测 SOCS-1/3 表达,每张切片取 10 个高倍视野,每个视野约 20 个细胞,采用图像分析软件分析积分吸光度(A)值,取均值。

1.3.3 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 SOCS-1/3 蛋白表达:用冰裂解液冰浴细胞 1 h,离心取上清液,采用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。每孔加 50 μg 总蛋白,经 15%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后电转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜;5%脱脂奶粉封闭,加一抗过夜,用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 室温孵育,滴加免疫化学发光(ECL)试剂,显影、定影,用 LabWorks 4.5 软件对条带进行半定量分析,以目的蛋白条带与内参照条带的积分 A 值比值作为最终结果。

1.3.4 RT-PCR 检测 SOCS-1/3 mRNA 表达:按照 TRIzol 试剂盒说明书提取总 RNA, cDNA 的合成参照逆转录扩增试剂盒操作程序进行。利用 Primer 5 软件设计 SOCS-1/3 和三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)的正、反义链基因引物,由北京赛百盛公司合成。反应体系 25 μl,反应条件:94 ℃预变性 5 min, 94 ℃变性 45 s, 58 ℃退火 45 s, 72 ℃延伸 45 s, 经 36 个循环后充分延伸 10 min。PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳和凝胶成像系统分析后,计算待测指标与内参照 GAPDH A 值比值。

1.4 统计学处理:采用 SPSS 11.0 统计软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖诱导下 HKC 形态学改变:倒置显微镜下观察,空白对照组细胞紧贴瓶底,呈多角形,细胞透亮,胞质饱满,细胞间紧密连接,融合成片;高糖组随

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.12.016

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(C2008001029)

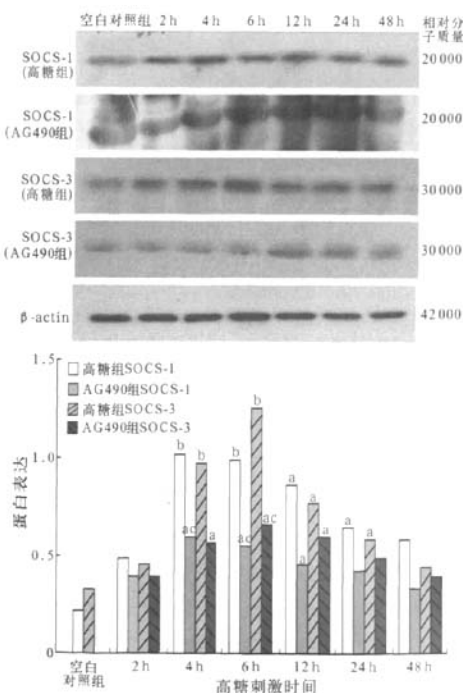
作者单位:050017 石家庄,河北医科大学病理学教研室(王晨、史永红、任福卓、郝军、戎赞华、段惠军);山西医科大学第二医院(王晨)

通信作者:段惠军, Email:duanhj@hebm. edu. cn

刺激时间延长,细胞逐渐变梭,有的单个细胞变圆,细胞突起变短、减少,并出现不规则突起,胞质内出现较多颗粒及空泡,且随着作用时间延长细胞界限不清,胞质内颗粒增多;AG490 组细胞形态仅有轻微变化,随刺激时间延长细胞变梭,出现细小的突起和胞质内的小颗粒。透射电镜下观察,空白对照组细胞表面可见微绒毛,细胞内线粒体较多,线粒体嵴完整;高糖组随刺激时间延长,细胞表面微绒毛及细胞内线粒体明显减少,部分嵴消失,粗面内质网明显增加,并出现脱颗粒,细胞内有大小不等的溶酶体及空泡;AG490 组细胞表面微绒毛及细胞内线粒体轻微减少,细胞内出现少量的溶酶体及空泡。

2.2 SOCS-1/3 蛋白在 HKC 中的表达及定位:免疫细胞化学显示,空白对照组 SOCS-1/3 蛋白在 HKC 中有基础弱表达,SOCS-1 表达较弱,SOCS-3 以胞质表达为主,伴有不同程度的胞核表达;高糖组 SOCS-1/3 胞质阳性表达增强,并出现不同程度的胞核阳性表达;AG490 组 SOCS-1/3 胞质阳性表达轻微增强。

2.3 高糖诱导下 HKC 中 SOCS-1/3 的蛋白表达



SOCS-1/3; 细胞因子信号转导抑制因子-1/3, AG490; Janus 激酶 2 抑制剂; β -actin; β -肌动蛋白, 与空白对照组比较, $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$; 与高糖组比较, $^cP < 0.05$

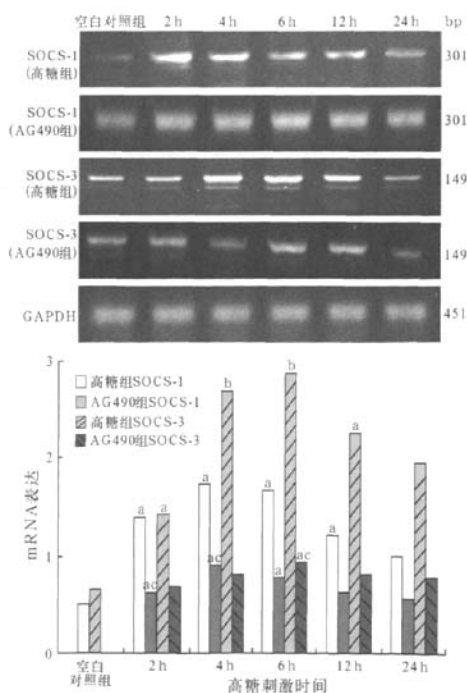
图 1 蛋白质免疫印迹法检测肾小管上皮细胞在高糖刺激后不同时间点 SOCS-1/3 蛋白表达

(图 1): 与空白对照组比较, 高糖刺激 4、6、12、24 h 后 HKC 内 SOCS-1/3 蛋白表达均显著升高, 其中 SOCS-1 在 4 h 表达最高 (1.022 ± 0.072 比 0.218 ± 0.023), SOCS-3 在 6 h 表达最高 (1.256 ± 0.105 比 0.337 ± 0.009 , 均 $P < 0.01$)。AG490 组 SOCS-1/3 蛋白表达较高糖组明显减弱 (4 h SOCS-1: 0.589 ± 0.167 , 6 h SOCS-3: 0.656 ± 0.075 , 均 $P < 0.05$)。

2.4 高糖诱导下 HKC 中 SOCS-1/3 的 mRNA 表达(图 2): 在正常 HKC 中有少量 SOCS-1/3 mRNA 表达 (0.475 ± 0.045 , 0.749 ± 0.086); 高糖诱导下, 随刺激时间延长 SOCS-1/3 mRNA 表达上调, 2、4、6、12 h 差异有统计学意义, SOCS-1 mRNA 在 4 h、SOCS-3 mRNA 6 h 表达达高峰 (1.716 ± 0.098 , 2.848 ± 0.116 , $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$); AG490 组 SOCS-1/3 mRNA 表达较高糖组明显下调 (4 h SOCS-1: 0.865 ± 0.075 , 6 h SOCS-3: 0.923 ± 0.116 , 均 $P < 0.05$)。

3 讨论

SOCS 可被多种细胞因子诱导产生, 同时又可抑制细胞因子的信号转导, 成为细胞因子信号转导



SOCS-1/3; 细胞因子信号转导抑制因子-1/3, AG490; Janus 激酶 2 抑制剂; GAPDH; 三磷酸甘油醛脱氢酶, 与空白对照组比较, $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$; 与高糖组比较, $^cP < 0.05$

图 2 逆转录-聚合酶链反应检测肾小管上皮细胞在高糖刺激后不同时间点 SOCS-1/3 mRNA 表达

负反馈调控环的一部分。因此,本研究中观察 SOCS 家族的两个重要成员 SOCS-1/3 参与高糖对肾脏细胞的影响,以及在信号转导途径中的作用。

外界刺激因子对细胞的调节主要与细胞内多种信号转导通路的活化密切相关,其中 JAK/STAT 途径近年来倍受关注。JAK/STAT 信号途径是细胞因子信号转导的重要通路之一。高血糖是导致糖尿病微血管病变的独立危险因素,在 DN 发病机制中起重要作用。研究发现,高糖能够激活体外培养血管内皮细胞及系膜细胞的 JAK/STAT 信号途径,使 JAK2 磷酸化以及 STAT-1/3 酪氨酸或丝氨酸磷酸化,同时促进血管内皮细胞增殖和系膜细胞增生^[4]。

高糖对 JAK2 激活可能与其通过多种信号转导途径产生的反应性氧代谢产物(ROS)有关^[5]。近年来,国内外学者多集中在肾小管上皮细胞转分化及对高糖和缺氧损伤研究上^[6-8]。张勉之等^[9]研究结果显示,经高糖刺激后肾小管上皮细胞中 p-STAT1 和 p-STAT3 明显增强,说明 JAK/STAT 信号转导途径在高糖刺激肾小管上皮细胞转分化中起了一定作用,高糖刺激使肾小管上皮细胞中 STAT1 和 STAT3 活性明显增强;史永红等^[10-11]研究结果显示,血管紧张素Ⅱ型受体拮抗剂氯沙坦可明显下调糖尿病 2 周和 4 周时 p-JAK2 和 p-STAT3 的蛋白表达,从而改善肾功能。本研究中运用光镜及电镜观察肾小管上皮细胞在高糖刺激下发生的一系列形态学改变,即高糖作为一种刺激因子使细胞受损的表现,并且发现,细胞形态学改变从刺激 12 h 开始逐渐明显,而接下来的实验也证明信号转导蛋白的表达变化明显早于细胞形态学改变。

本研究中从体外观察 SOCS 蛋白在肾小管上皮细胞中的表达,发现 SOCS-1/3 蛋白在肾小管上皮细胞中有基础表达,SOCS-1 表达较弱,SOCS-3 免疫阳性产物主要分布在胞质内,但其在胞核内的广泛表达说明 SOCS 蛋白作为即早基因表达产物可能本身就是一种核蛋白,并具有自身功能,只有少量 SOCS 蛋白存在于胞质中,并可受细胞因子诱导而发挥其对 JAK/STAT 信号途径的抑制作用;而在高糖诱导下 SOCS-1/3 在胞质表达量增多,可能是胞核内 SOCS 蛋白转位胞质而发挥其对细胞因子引起的信号途径的抑制作用。文献提示 SOCS 分子在细胞因子刺激后迅速升高而且持续时间短^[12];而本研究发现 SOCS-1/3 在高糖刺激后各时间点表达增高,4 h SOCS-1 达高峰,6 h SOCS-3 达高峰,提示 SOCS-1 较 SOCS-3 作用快。SOCS 作为细胞因子信

号转导抑制因子,在高糖诱导下表达增高,而 JAK2 抑制剂 AG490 能够显著抑制高糖环境下 JAK2 的活性,同时抑制 JAK/STAT 信号途径,此时 SOCS 表达降低说明高糖通过 JAK/STAT/SOCS 信号转导途径发挥刺激作用,并呈负反馈调节机制。

新近研究表明,SOCS 蛋白表达的改变与人类多种疾病相关,控制 SOCS 蛋白的表达量可能产生新的治疗方法,SOCS 逐渐被人们认为可能是新的药物治疗免疫反应、超敏反应的新靶点^[8]。

总之,本研究结果提示,SOCS 蛋白在高糖诱导肾小管上皮细胞信号转导途径中起重要调控作用,也暗示了 SOCS 蛋白对高糖引起肾脏损害的可能作用。SOCS 蛋白对高糖诱导肾小管上皮细胞的负性调控是否能有效阻止高糖对肾小管上皮细胞的损伤机制,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Calegari VC, Bezerra RM, Torsoni MA, et al. Suppressors of cytokine signaling 3 is induced by angiotensin I in heart and isolated cardiomyocytes, and participates in desensitization. *Endocrinology*, 2003, 144: 4586-4596.
- [2] Diamond P, Doran P, Brady HR, et al. Suppressors of cytokine signalling (SOCS): putative modulators of cytokine bioactivity in health and disease. *J Nephrol*, 2000, 13: 9-14.
- [3] Banerjee A, Banks AS, Nawijn MC, et al. Cutting edge: suppressors of cytokine signaling 3 inhibits activation of NFATp. *J Immunol*, 2002, 168: 4277-4281.
- [4] Simon AR, Rai U, Fanburg BL, et al. Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. *Am J Physiol*, 1998, 275: C1640-1652.
- [5] Ha H, Lee HB. Reactive oxygen species as glucose signaling molecules in mesangial cells cultured under high glucose. *Kidney Int Suppl*, 2000, 77: S19-25.
- [6] Fan JM, Huang XR, Ng YY, et al. Interleukin-1 induces tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation through a transforming growth factorbeta1-dependent mechanism in vitro. *Am J Kidney Dis*, 2001, 37: 820-831.
- [7] 杜逸亭,董文斌,王明勇,等.人近曲肾小管上皮细胞缺氧/复氧损伤模型的建立. *中国危重病急救医学*, 2005, 17: 619-622.
- [8] 刘青娟,何宁,刘淑霞,等.糖尿病大鼠肾小管上皮细胞转化与肝细胞生长因子和 Smad7 蛋白的表达. *中国危重病急救医学*, 2005, 17: 675-678.
- [9] 张勉之,赵松,段建召,等. JAK/STAT 信号转导途径在糖尿病肾病肾小管上皮细胞中的表达. *中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14: 309-312.
- [10] 史永红,赵松,任耀卓,等. 氯伐他汀对高糖状态下肾小球系膜细胞 JAK/STAT 信号蛋白表达的影响. *中国危重病急救医学*, 2008, 20: 422-425.
- [11] 史永红,段惠军,何宁,等. 氯沙坦对糖尿病大鼠肾小球信号蛋白 JAK2 和 STAT3 表达的影响. *中国危重病急救医学*, 2005, 17: 662-666.

(收稿日期:2010-07-03)

(本文编辑:李银平)