

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

张勉之¹, 赵松², 段建召², 陈炼¹, 赵姜¹, 左春霞¹, 程项阳¹

(1. 天津市公安医院, 天津 300050; 2. 河北医科大学病理教研室)

【摘要】 目的: 观察 Janus 酪氨酸蛋白激酶/信号转导子和转录激活子(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。方法: 将体外培养的人肾近曲小管上皮细胞株(HKC)随机分为高糖组(30 mmol/L)、低糖组(5.5 mmol/L)和低糖+甘露醇组(糖 5.5 mmol/L+甘露醇 24.5 mmol/L)。采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定 HKC 细胞上清液中转化生长因子- β 1(TGF- β 1)和 I 型胶原的分泌; 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、E-钙黏素(E-cadherin)及信号蛋白 STAT1、STAT3、磷酸化-STAT1(p-STAT1)和 p-STAT3 的表达; 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 TGF- β 1 mRNA 表达。结果: 与低糖组比较, 高糖组不同时间点细胞培养上清液中 TGF- β 1、I 型胶原分泌明显增加(P 均 <0.01); HKC 中 p-STAT1 和 p-STAT3 的蛋白及 TGF- β 1 mRNA 表达自 6 h 起明显增加, 至 48 h 达最高, 72 h 有所回落, 而 STAT1 和 STAT3 在各时间点差异无显著性; HKC 中 α -SMA 表达随刺激时间延长明显升高, E-cadherin 表达明显下调(P 均 <0.01)。结论: JAK 参与高糖诱导的 HKC 转分化, 并刺激 TGF- β 1 和细胞外基质的分泌。

【关键词】 糖尿病肾病; 肾小管上皮细胞; 转分化; 转化生长因子- β 1

中图分类号: R256.5; Q257 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2007)05-0309-04

Expression of JAK/STAT pathway in proximal tubular epithelial cells in hyperglycemia induced nephropathy
ZHANG Mian-zhi¹, ZHAO Song², DUAN Jian-zhao², CHEN Lian¹, ZHAO Jiang¹, ZUO Chun-xia¹,
CHENG Xiang-yang¹. 1. Gongan Hospital, Tianjin 300050, China; 2. Department of Pathology, Hebei
Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei, China

【Abstract】 Objective: To investigate the role of Janus kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway activation in hyperglycemia induced transdifferentiation in renal proximal tubular epithelial cells. **Methods:** Cultured human kidney cells (HKC) were randomly divided into three groups: low glucose group (LG, 5.5 mmol/L), high glucose group (HG, 30 mmol/L), and low glucose + mannitol group (LG, 5.5 mmol/L + M, 24.5 mmol/L). Immunoprecipitation and Western blotting analysis were used to determine the expression of tyrosine phosphorylated JAK 2 (p-JAK2). The protein expression of STAT1, STAT3, phospho-STAT1 (p-STAT1) and p-STAT3 and expression of α -smooth muscle actin (α -SMA), E-cadherin were assessed with Western blotting. The contents of transforming growth factors, transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), fibronectin and type I collagen in the supernatants of the cultured HKC were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). TGF- β 1 mRNA was assayed by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results:** Compared with LG control group, the expression of JAK2, p-STAT1, p-STAT3 and TGF- β 1 mRNA was significantly increased in HG group at 6 hours, reaching its peak value at 48 hours, and it began to fall at 72 hours. Meanwhile, the contents of TGF- β 1 and collagen I in the supernatants and the expression of α -SMA were increased (both $P < 0.01$), the expression of E-cadherin was decreased ($P < 0.01$). The expression of JAK2, p-STAT1, p-STAT3 and TGF- β 1 mRNA and the levels of TGF- β 1 were significantly increased (all $P < 0.01$). **Conclusion:** Activation of JAK/STAT signaling pathway may be involved in the hyperglycemia induced transdifferentiation of HKC and overproduction of TGF- β 1 and extracellular matrix proteins in HKCs.

【Key words】 diabetic nephropathy; renal tubular epithelial cell; transdifferentiation; transforming growth factor- β 1

作者简介: 张勉之(1973-), 男(汉族), 天津市人, 医学博士, 硕士生导师, 副教授, 副主任医师, 主要从事肾内科的临床与基础研究, 曾获得部级科技进步二等奖 3 项, 在国内外发表论文 30 余篇。

糖尿病肾病(DN)是糖尿病的常见并发症之一, 也是导致终末期肾功能衰竭的主要原因之一, 以往对 DN 的研究大多集中在肾小球病变, 而对肾小管

间质病变的发生发展及其机制研究较少。越来越多的证据表明,糖尿病状态下肾小管间质病变的严重程度与蛋白尿排泄量和肾功能进行性下降密切相关,而在 DN 的发生发展过程中,高血糖对肾小管上皮细胞的损伤及间充质细胞的转分化起重要作用^[1,2]。Janus 酪氨酸蛋白激酶/信号转导子和转录激活子(JAK/STAT)信号转导途径能介导多种细胞因子和生长因子的细胞内信号转导过程,此信号途径在肺纤维化过程中也起着重要的作用^[3]。亦有研究揭示高糖和血管紧张素 II(Ang II)可激活系膜细胞内 STAT1 和 STAT3,使其磷酸化增强^[4],但在肾小管上皮细胞-间质转分化过程中作用如何尚少见报道。本研究拟通过体外细胞培养的方法,观察 JAK/STAT 信号转导途径在高糖刺激状态下肾小管上皮细胞中的表达及其与肾纤维化间的关系。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养:人肾近曲小管上皮细胞株(HKC)由解放军总医院陈香美教授惠赠。采用含体积分数为 10%胎牛血清的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)-F12 培养液培养,同时加入 100 U 青霉素、100 mg 链霉素。培养条件为 37 ℃、体积分数为 5%的 CO₂。HKC 传代采用胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)消化法。当细胞达 80%融合后,用 37 ℃的 D-Hanks 液洗涤 2 次,加入质量分数为 0.25%的胰酶和体积分数为 0.02%的 EDTA 混合(1:1)消化液,置 37 ℃下 3~5 min,消化适度后加入完全培养液终止消化。用手轻轻拍打瓶底,使细胞脱离瓶壁形成细胞悬液。1 500 r/min 离心 2 min,弃上清,按 1:4 规律传代。实验前换无血清 DMEM-F12 培养液孵育 12 h,使细胞同步化,然后换成含体积分数为 10%血清的 DMEM-F12 培养液培养,并加入实验药物。

1.2 主要试剂:胎牛血清购自美国 Hyclone 公司;I 型胶原酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)ELISA 试剂盒均购自美国 R&D 公司;兔抗 STAT1 和 STAT3 多克隆抗体、小鼠抗磷酸化-STAT1(p-STAT1)单克隆抗体、小鼠抗 p-STAT3 单克隆抗体、增强化学发光(ECL)试剂盒均购自美国 Santa Cruz 公司;兔抗平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、兔抗 E-钙黏素(E-cadherin)单克隆抗体购自中山公司;逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂为 Promega 公司产品;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔、羊抗鼠抗体购自中山公司进口分装;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜为美国

Milipore 公司产品。

1.3 实验分组:将实验细胞分成 3 组:高糖组(30 mmol/L)、低糖组(5.5 mmol/L)、低糖+甘露醇组(5.5 mmol/L 糖+24.5 mmol/L 甘露醇),分别在刺激后 6、12、24、48 和 72 h 收集细胞上清液及细胞裂解蛋白,-70 ℃保存待检。

1.4 方 法

1.4.1 HKC 细胞上清液中 TGF- β 1、I 型胶原的测定:取各组细胞培养上清液 100 μ l,采用双抗体夹心 ABC-ELISA 检测其中 TGF- β 1、I 型胶原,具体步骤严格按试剂盒使用说明书进行操作。用芬兰 Labsystem 公司的 Multiskan Ascent V1.24 型酶标仪,在波长 492 nm 处测吸光度(A)值,通过绘制标准曲线得出样品中 TGF- β 1、I 型胶原的含量。

1.4.2 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测细胞中 α -SMA、E-cadherin、STAT1、STAT3、p-STAT1、p-STAT3 的蛋白含量:在刺激后 6、12、24、48 和 72 h 收集细胞,加入裂解缓冲液[20 mmol/L Tris·HCl,2.5 mmol/L EDTA,体积分数为 10%的甘油,质量分数为 0.1%的十二烷基硫酸钠(SDS),体积分数为 1%的 Triton X-100,质量分数为 1%的去氧胆酸钠,10 mmol/L 焦磷酸钠,50 mmol/L 氟化钠,1 mmol/L 正钒酸钠,1 mmol/L 苯甲基磺酰氟],冰浴静置 1 h,然后于 4 ℃下 14 000 r/min 离心 25 min,上清液即为所提取的蛋白溶液。采用考马斯亮蓝法,在紫外-可见分光光度计波长 595 nm 处测定蛋白质浓度,-80 ℃保存。每个样品取 50 μ g 总蛋白,在灌制的 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)上电转移至前处理的 PVDF 膜,90 V、低温条件下电转移 2 h,用质量分数为 5%的脱脂奶粉于 37 ℃封闭 2 h,加入用 5%脱脂奶粉稀释的兔抗 α -SMA、E-cadherin 单克隆抗体,小鼠抗 p-STAT1、p-STAT3 单克隆抗体以及兔抗 STAT1、STAT3 多克隆抗体,所有抗体均以 1:200 稀释,4 ℃过夜。TTBS 洗膜将 ECL 试剂盒中的 A 液和 B 液等量混合,滴加于膜上,反应 1 min 后,在暗室中压片,显影,定影。底片经扫描仪透扫,用美国 UVP 公司 LabWorks4.5 软件对 Western 条带进行定量分析,确定杂交条带的相对 A 值(以 β -actin 为对照蛋白每次对照组蛋白印迹条带的 A 值为相对值 1)。

1.4.3 半定量 RT-PCR 检测肾小管上皮细胞中 TGF- β 1 mRNA 表达:在各组收集的细胞中加入 Trizol 试剂提取肾小管上皮细胞总 mRNA,用紫

外-可见分光光度计测定 RNA 纯度和浓度。在病毒逆转录酶 (MLV) 催化下合成 cDNA, 以适量 cDNA 为模板在 TaqDNA 聚合酶催化下进行 PCR 扩增。TGF-β1 上下游引物为: 5'-AAG TTA AAA GCG GAG CAG-3' 和 5'-AGT GAC ATG ATC TTG ATC TT-3', 扩增片段为 296 bp; 三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 上下游引物为: 5'-TAT CGG ACG CCT GGT TAC-3' 和 5'-CTG TGC CGT TGA ACT TGC-3', 扩增片段为 140 bp。所用引物均由上海生工生物公司合成。TGF-β1 的扩增条件为: 预变性 94 °C 3 min, 进入循环, 94 °C 55 s, 56 °C 50 s, 72 °C 90 s, 30 个循环后 72 °C 8 min。将 PCR 产物在质量分数为 2% 的琼脂糖凝胶中进行电泳, 置于凝胶图像分析系统 (UVP 公司, 美国) 进行吸光度扫描, 以管家基因 GAPDH 作为内参照校正, 以目的基因的 A 值与 GAPDH 的 A 值的比值代表目的基因的相对表达含量。

1.5 统计学处理: 检测结果用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ELISA 测定细胞上清液中 TGF-β1 和 I 型胶原的含量 (表 1): 低糖组细胞上清液中 TGF-β1、I 型胶原的分泌随培养时间的延长而轻度增加; 与低糖组比较, 低糖+甘露醇组 TGF-β1、I 型胶原分泌未见明显变化; 高糖组 TGF-β1、I 型胶原分泌量较低糖组明显增加 (*P* 均 < 0.01)。

2.2 Western blotting 检测细胞中 STAT1、STAT3、p-STAT1 和 p-STAT3 的蛋白表达: 图 1 结果显示, 高糖组刺激后 6 h, p-STAT1 和 p-STAT3 蛋白水平表达开始增加, 并且随时间延长增高明显; p-STAT1、p-STAT3 在 48 h 时表达最高, 72 h 时表达开始下降, 而非磷酸化 STAT1、STAT3 在各时间点表达差异无显著性。表 2 结果显示, 与低糖组比较, 高糖组细胞刺激 48 h 时 p-STAT1、p-STAT3

蛋白表达明显上调 (*P* 均 < 0.01); 各组非磷酸化 STAT1、STAT3 蛋白表达差异无显著性。

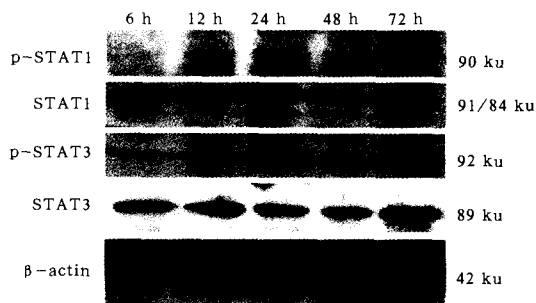


图 1 Western blotting 检测高糖组不同时间点 STAT1、STAT3、p-STAT1 和 p-STAT3 的蛋白表达

Figure 1 Expression of STATs in HKC of HG group by Western blotting analysis at different stimulated time
表 2 各组细胞刺激 48 h 时 STAT1、STAT3 和 p-STAT1、p-STAT3 的蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of expression of STATs in cultured HKC cell at 48 hours in each group ($\bar{x} \pm s$) A 值

组别	p-STAT1	STAT1	p-STAT3	STAT3
高糖组	2 565.6±217.8*	4 523.8±369.5	2 856.3±521.4*	3 106.7±403.8
低糖组	617.7± 76.2	4 278.3±223.9	946.7±141.2	3 078.1±254.3
低糖+甘露醇组	690.7±113.1	4 316.5±410.3	1 121.4±156.7	2 986.5±364.7

注: 与低糖组比较: **P* < 0.01

2.3 Western blotting 检测 E-cadherin、α-SMA 蛋白表达 (图 2): 高糖组细胞中 E-cadherin 表达随刺激时间延长明显降低, α-SMA 表达明显升高。

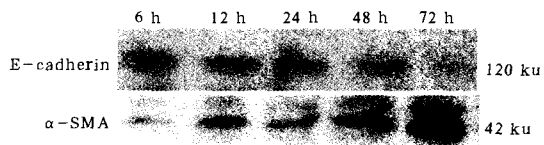


图 2 Western blotting 检测高糖组 E-cadherin 和 α-SMA 蛋白表达
Figure 2 Expression of E-cadherin and α-SMA in HKC of HG group by Western blotting analysis at different stimulated time

2.4 半定量 RT-PCR 测定 TGF-β1 mRNA 表达 (图 3): TGF-β1 mRNA 在低糖组细胞有微量基础表达, 不同时间点表达差异无显著性。低糖+甘露醇

表 1 各组不同时间点细胞上清液中 TGF-β1 和 I 型胶原含量的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Concentrs of TGF-β1 and collagen type I in cultured HKC at different stimulated time in each group ($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
TGF-β1	高糖组	60.86± 7.34*	99.33±22.21*	198.95±29.57*	301.37±32.46*	458.32±44.56*
	低糖组	30.91±11.08	40.57± 9.15	76.29± 9.47	81.87±11.97	101.29±17.47
	低糖+甘露醇组	28.67± 8.25	42.35± 6.34	80.12± 6.87	89.24± 9.43	103.56±12.34
I 型胶原	高糖组	5.51± 1.48*	7.52± 1.38*	22.25± 3.76*	42.08± 5.43*	52.88± 6.69*
	低糖组	2.86± 1.12	3.51± 0.93	5.97± 1.20	8.67± 1.35	12.16± 2.50
	低糖+甘露醇组	2.98± 1.23	4.06± 1.07	6.34± 1.34	8.35± 1.33	13.02± 2.10

注: 与低糖组比较: **P* < 0.01

组细胞中 TGF- β 1 mRNA 表达与低糖组表达差异无显著性。高糖组 6 h 起 TGF- β 1 mRNA 表达就开始增加,随着时间延长,其表达也逐渐增加,于 48 h 表达最高,72 h 出现回落,但仍明显高于低糖组。

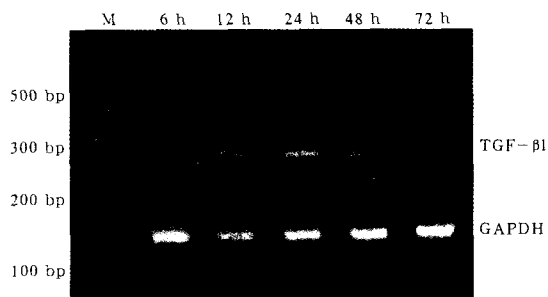


图 3 RT-PCR 测定高糖组 TGF- β 1 mRNA 表达
Figure 3 Expression of TGF- β 1 mRNA in HKC of HG group at different stimulated time by RT-PCR

3 讨论

各种细胞外因素对细胞行为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 途径近年来备受关注^[5]。JAK/STAT 信号转导途径是细胞因子信号转导的重要通路之一,对细胞的生理和病理反应发挥着重要调控作用。JAKs 家族是一种非受体酪氨酸蛋白激酶(PTK),其分子质量为 120~130 ku,有 JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2 4 个成员。STATs 是 JAKs 激酶的底物,哺乳动物细胞 STAT 家族成员主要包括 STAT1、STAT2、STAT3($\alpha/\beta/\gamma$)、STAT4、STAT5(A/B)和 STAT6。STATs 家族是一种能与 DNA 结合的蛋白家族,与酪氨酸磷酸化信号通路耦联,发挥转录调控作用,能把细胞外信号与基因表达调控直接联系起来。非磷酸化的 STATs 蛋白是以单体形式存在,而其磷酸化以后则以二聚体形式存在。

JAKs 作为上游介导 STATs 信号转导通路活化的机制是:JAKs 活化后募集在胞浆中以单体形式存在的 STATs 分子上,使其发生磷酸化,形成异源性或同源二聚体,STATs 二聚体与其受体的亲和力降低并随之解离,转移到核内,结合于启动子区的相关序列,从而调控基因表达^[6]。有研究发现,高糖和 Ang II 能激活体外培养的血管内皮细胞 JAK/STAT 信号途径,使 JAK2 磷酸化以及 STAT1 和 STAT3 酪氨酸和(或)丝氨酸磷酸化,同时促进血管内皮细胞增殖^[6]。史永红等^[7]研究结果显示,Ang II 1 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,考虑氯沙坦对肾脏的保护作用可能部分

是通过影响 JAK/STAT 信号转导途径的激活而实现的。JAK/STAT 信号转导途径还参与糖基化终产物刺激细胞分泌细胞外基质蛋白过程^[8]。

高糖对 JAK2 激酶激活可能与高糖通过多种途径产生的反应性氧代谢产物(ROS)有关。高糖能够刺激肾小球系膜细胞产生 ROS 明显增多,同时,肾小球系膜细胞在高糖刺激下产生 Ang II 增多,而 Ang II 能够激活 JAK2,并且二者具有协同作用^[3]。本实验表明,经高糖刺激后 HKC 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 HKC 转分化中起了一定作用,高糖刺激使 HKC 中 STAT1 和 STAT3 活性明显增强,TGF- β 1、I 型胶原分泌明显增多,同时使 TGF- β 1 mRNA 表达上调。

高血糖诱导的 TGF- β 1 和细胞外基质蛋白增加可能是 HKC 转分化发病机制和重要表现之一。在本研究中也观察到,高糖引起 HKC 中 TGF- β 1 mRNA 表达升高的同时,也伴有上清液 TGF- β 1、I 型胶原蛋白含量的增加。以上结果提示,抑制 JAK/STAT 信号转导途径能够有效降低 TGF- β 1 的高表达,而对 HKC 的转分化产生影响,为临床防治 HKC 转分化及肾纤维化提供了新思路。

参考文献:

- [1] Gilbert R E, Cooper M E. The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease; more than an aftermath of glomerular injury[J]. *Kidney Int*, 1999, 56(5): 1627-1637.
- [2] Ziyadeh F N. Significance of tubulointerstitial changes in diabetic renal disease[J]. *Kidney Int*, 1996, 54: S10-13.
- [3] 张向峰, 丁少芳, 高元明, 等. 多种基质金属蛋白酶在高氧所致急性肺损伤中的表达[J]. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(8): 449-451.
- [4] Amiri F, Shaw S, Wang X, et al. Angiotensin II activation of the JAK/STAT pathway in mesangial cells is altered by high glucose[J]. *Kidney Int*, 2002, 61(5): 1605-1616.
- [5] 姚咏明, 盛志勇. 脓毒症信号转导机制的现代认识[J]. *中国危重病急救医学*, 2003, 15(1): 3-6.
- [6] Levy D E, Darnell J E Jr. Stats: transcriptional control and biological impact[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(9): 651-662.
- [7] 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[J]. *中国危重病急救医学*, 2005, 17(11): 662-666.
- [8] Huang J S, Guh J Y, Hung W C, et al. Role of the Janus (JAK)/signal transducers and activators of transcription (STAT) cascade in advanced glycation end-product-induced cellular mitogenesis in NRK-49F cells[J]. *Biochem J*, 1999, 342(Pt 1): 231-238.

(收稿日期: 2007-02-09 修回日期: 2007-08-20)

(本文编辑: 李银平)