

高糖环境肾小管上皮细胞Smad1的表达

陈梅莲,付文金*,谢岭平,王杜娟,李柳燕,邓任堂

广东医学院附属厚街医院检验科,广东 东莞 523945

摘要: **目的** 模拟糖尿病条件,观察人肾小管上皮细胞(HK-2)生长情况和Smad1表达的变化,探讨高糖对肾小管上皮细胞的损伤机制。**方法** 用DMEM/F12细胞液培养HK-2细胞,分为对照组,中糖组(12.5mmol/L葡萄糖),高糖组(25mmol/L葡萄糖),分别培养24h、48h、72h后倒置显微镜下观察HK-2的形态和数量变化,采用蛋白印迹技术检测Smad1的蛋白表达。**结果** 高糖组刺激72h后,与对照组相比HK-2细胞数为 $(105.333\pm6.429)\times10^5/\text{mL}$,而对照组HK-2细胞数为 $(50.333\pm2.51)\times10^5/\text{mL}$,差异有统计学意义($P<0.01$);高糖组HK-2细胞形态改变,Smad1蛋白表达明显增加。**结论** 高糖能够诱导肾小管上皮细胞数量及形态发生改变,并且这一作用可能与Smad1表达增加有关。

关键词: 高糖;肾小管上皮细胞;Smad1;糖尿病肾病

中图分类号: R587 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2015)01-8-03

Expression of Smad1 in renal tubular epithelial cells in high glucose condition

CHEN Mei-lian, FU Wen-jin, XIE Ling-ping, WANG Du-juan, LI Liu-yan, DENG Ren-tang

The Affiliated Houjie Hospital, Guangdong Medical College, Dongguan 523945, Guangdong, P.R. China

Corresponding author: FU Wen-jin, E-mail: dffwj@sina.com

Abstract: **Objective** To observe the growth and expression of Smad1 in human renal tubular epithelial (HK-2) cells under high glucose condition, and to evaluate the possible injured mechanisms of high glucose in HK-2. **Methods** HK-2 cells were cultured in DMEM/F12 medium, and divided into control group, medial glucose group (12.5 mmol/L D-glucose) and high glucose group (25 mmol/L D-glucose), and then each was cultured for 24h, 48h and 72h respectively. Cell numbers and morphological changes were traced with inverted microscope. Western blot was applied to detect the protein expression levels of Smad1. **Results** Compared to the cells in control group the shape of HK-2 cells in high glucose group 72 hours after induced by high glucose changed and the numbers of HK-2 cells increased markedly $(105.333\pm6.429)\times10^5/\text{mL}$, exhibiting statistically significant difference ($P<0.01$), also the protein expression of Smad1 in high glucose group was up-regulated significantly (0.430 ± 0.05) compared with that of the control group (0.123 ± 0.008) , showing significant difference ($P<0.01$). **Conclusion** High glucose can induce morphological and number changes of HK-2 cells and this function might be associated with the increased expression of Smad1.

Key words: High glucose; HK-2 cells; Smad1; Diabetic nephropathy

糖尿病肾病(DN)是糖尿病的主要微血管并发症,是终末期肾病的最常见病因,也是一类以进行性肾脏纤维化为特征的疾病。肾小管上皮细胞转分化(EMT)是肾间质纤维化的早期且可逆阶段。研究表明高糖可导致肾小管上皮细胞发生EMT,而TGF- β (转化生长因子- β)在这一过程中起关键作用。Smad1是TGF- β /Smads信号途径中的调节因子之一,近年来,Smad1蛋白在肾脏纤维化方面的作用受到国内外学者的关注。本文通过体外实验,以高糖模拟糖尿病条件,建立单因素肾小管上皮细胞损伤模型,观察Smad1表达与人肾小管上皮细胞变化的关系,探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 人肾小管上皮细胞购自康众康民生

物医药技术公司。细胞液DMEM/F12、胎牛血清及胰酶均购自Gibco公司。小鼠抗人Smad1单克隆抗体购自Abcam公司, β -Actin单克隆抗体购自Abbkine公司,山羊抗小鼠IgG购自北京博奥森公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 用含10%胎牛血清,1%双抗(100U/mL青霉素和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素)的DMEM/F12培养液培养。细胞先解冻,置37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱(5%CO₂)培养,2~3d换液一次。将成熟的细胞以 $5\times10^5/\text{mL}$ 的密度接种于六孔培养板中,待细胞长至70%~80%融合时,于无血清的培养液中饥饿24h使细胞处于同步化。根据实验目的分为3个实验组:采用不同糖浓度刺激,分别加入D-葡萄糖浓度12.5mmol/L(中糖组),25mmol/L(高糖组),另设一组对照组。每组均设3复

基金项目: 东莞市重点课题项目(No.2012105102013)

作者简介: 陈梅莲(1980~),女,本科,主管检验师,研究方向:生化和免疫技术。

***通讯作者:** 付文金, E-mail: dffwj@sina.com

孔。

1.2.2 细胞观察 各组细胞分别培养24h、48h、72h后使用倒置显微镜进行细胞形态观察及计算。

1.2.3 Western blot检测 Smad1、 β -Actin蛋白的表达 提取各组细胞蛋白于95℃变性5min,各组蛋白和Marker分别上样后行SDS-PAGE电泳,后电转移至PVDF膜上,用含5%牛血清白蛋白的TBS液封闭1h后,与小鼠抗人Smad1、 β -Actin抗体(稀释度分别为1:200、1:500)结合,孵育过夜,洗膜后与山羊抗小鼠IgG(1:5 000)杂交1.5h,洗膜后用ECL显影,X线片记录实验结果。以上实验均重复3次。

1.3 统计学方法 计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用SPSS 17.0统计包进行数据统计处理,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 q 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HK-2细胞数量变化 第1、2d三组细胞数量增长基本持平,差异无统计学意义;第3d细胞数量随葡萄糖浓度升高而增加,高糖组与对照组相比,差异有统计学意义($F=136.8, P<0.01$)。见表1。

表1 不同葡萄糖浓度对HK-2细胞增殖的影响

Table 1 Effect of different concentration of GLU on the proliferation of HK-2 cells

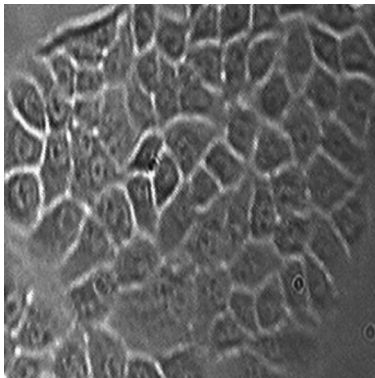
组别 Groups	细胞数 Cell numbers($\times 10^5$ /mL)		
	24h	48h	72h
对照组 Control group	22.667 \pm 2.517	43.000 \pm 2.646	50.333 \pm 2.517
中糖组 Medial glucose group	27.333 \pm 3.055	46.667 \pm 1.528	65.000 \pm 2.646
高糖组 High glucose group	28.667 \pm 3.055	51.000 \pm 2.000	105.333 \pm 6.429*

注: *与对照组比较, $P<0.01$ 。

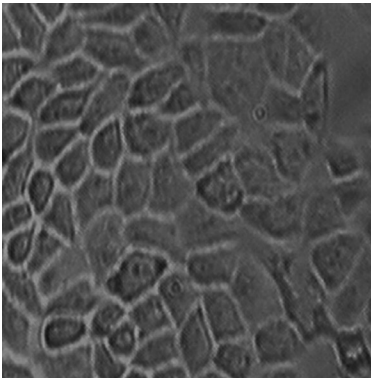
Note: compared with control group, $P<0.01$.

2.2 HK-2细胞形态变化 在倒置显微镜下,对照组HK-2细胞呈多边形铺路石状生长,细胞间隙小。不同糖浓度刺激72h后,可见细胞形态上逐渐拉长成梭状形,细胞间隙增宽,具有纤维细胞特征。见图1。

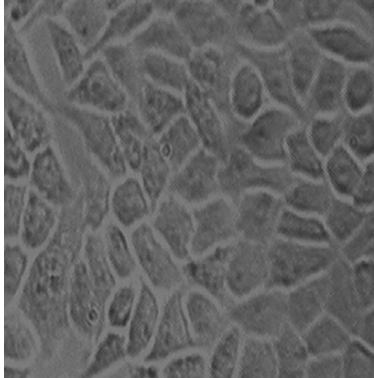
2.3 Western blot测定各组Smad1、 β -Actin蛋白表达 经不同糖浓度作用72h后, HK-2细胞表达Smad1蛋白随糖浓度升高呈上升趋势,高糖组与对照组、中糖组比较差异均有统计学意义($F=1711.6, P<0.01$)。见表2,图2。



对照 Control



中糖 Medial glucose



高糖 High glucose

图1 不同葡萄糖浓度刺激72h后对HK-2细胞形态的影响

Fig.1 The effect of different concentrations of GLU on morphological changes in HK-2 cells

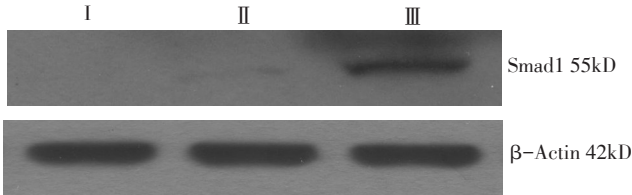
表2 各组Smad1的蛋白表达水平

Table 2 Protein expression levels of Smad1 in different groups

组别 Groups	Smad1/ β -Actin
对照组 Control group	0.123 \pm 0.008
中糖组 Medial glucose group	0.165 \pm 0.012
高糖组 High glucose group	0.430 \pm 0.005*

注: *,与对照组比较, $P<0.01$; #,与中糖组比较, $P<0.01$

Note: *,compared with control group, $P<0.01$; #, compared with medial glucose group $P<0.01$



I: 对照, Control group; II: 中糖 Medial glucose group; III: 高糖 High glucose group

图2 不同糖刺激对HK-2细胞表达Smad1蛋白的影响

Fig. 2 The effect of different concentrations of GLU on expression of Smad1 in HK-2 cells

3 讨论

DN是糖尿病严重并发症之一,也是尿毒症的主要原因之一。高血糖能够造成糖尿病患者肾小管和肾小球的严重损伤,其中肾小管-间质纤维化对DN患者肾功能衰竭的进展有着非常重要的意义^[1]。肾间质纤维化的过程中,主要效应细胞是成纤维细胞,而有36%的新增纤维细胞来源于肾小管上皮细胞的转分化^[2],因此,肾小管上皮细胞对其发生、发展具有重要作用。

研究发现高糖环境、晚期糖基化终末产物等可诱导大鼠近曲小管上皮细胞转分化的发生,并且呈剂量及时间依赖关系^[3]。本文实验也证明了高糖条件下肾小管上皮细胞形态发生改变,具有纤维细胞的特征;细胞数量随葡萄糖浓度的升高而增加。

目前认为TGF- β 是诱导糖尿病肾病肾小管上皮转分化及细胞外基质沉积的关键因子^[4-5],大量研究证实TGF- β 不仅能促进细胞的增殖,而且还能刺激细胞外基质的分泌,TGF- β 持续表达最终导致肾小球硬化和肾间质纤维化^[6-7]。Smads信号转导是TGF- β 主要的细胞内传导途径。Smad1是TGF- β /Smads信号通路的调节分子之一,属于受体激活型。Takeshi等人^[8]通过在体外试验发现糖基化终末产物刺激后系膜细胞中Smad1的表达增加,且与IV型胶原表达的上调相平行,提示肾脏Smad1的表达与系膜基质积聚密切相关。有研究发现尿Smad1的升高可以作为糖尿病肾病诊断和疾病评估的有效分子标记物^[9-10]。在本实验中不同葡萄糖刺激72h后,高糖组Smad1表达量较对照组明显增加,推测肾小管上皮细胞Smad1的表达上调可能是高糖诱导肾小管上皮细胞发生EMT的启动因素,随后TGF- β /Smads途径因其受到激活而活化。

综上所述,高糖环境可以导致肾小管上皮细胞发

生形态改变,失去正常功能,Smad1表达增加可能是糖尿病肾病肾小管上皮细胞发生EMT的因素之一,如何抑制Smad1的表达可能是寻找治疗DN的药物及基因治疗的方法之一。

参考文献

- [1] Nangaku M. Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common Pathways to end-stage renal failure [J]. Intern Med, 2004, 43(1):9-17.
- [2] Masszi A, Fan L, Rosivall L, et al. Integrity of cell-cell contacts is a critical regulator of TGF- β 1-induced epithelial-to-myofibroblast transition: role for β -catenin [J]. Am J Pathol, 2004, 165(6): 1955.
- [3] Myint KM, Yamamoto Y, Doi T, et al. RAGE control of diabetic nephropathy in a mouse model: effects of RAGE gene disruption and administration of low-molecular weight heparin [J]. Diabetes, 2006, 55(9): 2510.
- [4] Kalluri R, Neilson EC. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis [J]. J Clin Invest, 2003, 112: 1776-1784.
- [5] Yang JW, Liu YH. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis [J]. Am J Pathol, 2001, 159: 1465-1475.
- [6] Li J, Zhang Z, Wang D, et al. TGF- β 1/Smads signaling stimulates renal interstitial fibrosis in experimental diabetes [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2009, 29: 280-285.
- [7] August P, Sharma V, Ding R, Schwartz JE, et al. Transforming growth factor β and excess burden of renal disease [J]. Trans Am Clin Climatol Assoc, 2009, 120: 61-72.
- [8] Matsubara T, Abe H, Arai H, et al. Expression of Smad1 is directly associated with mesangial matrix expansion in rat diabetic nephropathy [J]. Lab Invest. 2006, 86(4): 357-68.
- [9] Li Q, Feng L, Li J, et al. Urinary Smad1 is a new biomarker for diagnosis and evaluating the severity of diabetic nephropathy [J]. Endocrine, 2014, 46(1): 83-89.
- [10] 付文金, 王少波, 邓任堂, 等. 尿液 Smad1 在 2 型糖尿病患者改变及其糖尿病肾病的关系 [J]. 中国糖尿病杂志, 2013, (2): 126-128.

收稿日期: 2014-06-26 编辑: 崔宜庆