

Smad3 促进肾小管上皮细胞转分化在高糖诱导肾脏纤维化中的作用*

毛彦稳, 张小欢, 刘玲玲, 刘慧铭, 梁露群, 张会芳, 向珈谊, 王圆圆**

(贵州医科大学 基础医学院 病理生理教研室, 贵州省常见慢性疾病发病机制及药物研究重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

[摘要] 目的: 观察高糖条件下 Smad3 对肾小管上皮细胞转分化的影响, 探讨 Smad3 在高糖诱导肾脏纤维化中的作用。方法: 将体外培养的肾小管上皮细胞分为正常糖组(NG 组)、高糖组(HG 组), Western blot 鉴定细胞表型(E-cadherin 及 Desmin 蛋白)及对高糖刺激后表型蛋白的变化; Western blot 和 Real-time PCR 验证敲低 Smad3 质粒(Smad3-sh)、过表达 Smad3 质粒(OE-Smad3) 转染肾小管上皮细胞细胞后 Smad3 蛋白及 mRNA 表达水平; 分别在 NG 和 HG 条件下敲低或过表达肾小管上皮细胞 Smad3 蛋白, 采用 Western blot 检测 Smad3、p-Smad3、E-cadherin 及 Desmin 蛋白表达水平。结果: NG 组 E-cadherin 蛋白高表达, 而 Desmin 表达较少; 与 NG 组比较, HG 刺激后 E-cadherin 蛋白表达显著减少($P < 0.05$), Desmin 蛋白表达显著增加($P < 0.05$); 敲低肾小管上皮细胞中 Smad3 后, E-cadherin 蛋白表达显著增加($P < 0.05$), Desmin 蛋白表达显著减少($P < 0.05$); 过表达肾小管上皮细胞中 Smad3 后, E-cadherin 蛋白表达显著减少($P < 0.05$), Desmin 蛋白表达显著增加($P < 0.05$)。结论: Smad3 能促进 HG 诱导肾小管上皮细胞转分化过程, 从而促进高糖介导的纤维化发生。

[关键词] 糖尿病肾病; 高糖; Smad3; 肾小管上皮细胞; 上皮细胞转分化; 肾脏纤维化

[中图分类号] R363.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)12-1395-06

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.12.006

The Effect of Smad3 Expression in High Glucose-induced Transdifferentiation of Renal Tubular Epithelial Cells in Renal Fibrosis

MAO Yanwen, ZHANG Xiaohuan, LIU Lingling, LIU Huiming, LIANG Luqun,
ZHANG Huifang, XIANG Jiayi, WANG Yuanyuan

(Department of Pathophysiology, Guizhou Medical University, School of Basic Medical; Laboratory of Pathogenesis Research, Drug Prevention and Treatment of Major Diseases, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of high glucose (HG)-mediated Smad3 expression on renal tubular epithelial cell transdifferentiation and explore the role of Smad3 expression in high glucose-induced renal fibrosis. **Methods:** Renal tubular epithelial cells were grown in media supplemented with normal glucose (NG group) and HG (HG group), respectively. Western blot was used to assess the protein expression levels. The mRNA expression levels of genes was assessed by real-time PCR. Smad3-shRNA (Smad3-sh) plasmid and Smad3-expressing plasmid were transfected to inhibit and overexpress Smad3 in renal tubular epithelial cells, respectively. **Results:** Relative to NG group, HG treatment remarkably downregulated E-cadherin expression ($P < 0.05$), but upregulated Desmin ($P < 0.05$). Knockdown of Smad3 increased E-cadherin expression level ($P < 0.05$) and

*[基金项目] 国家自然科学基金(81760131)

** 通信作者 E-mail: yuan.yuan.wang@outlook.com

网络出版时间: 2019-12-12 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20191212.2002.006.html>

decreased Desmin expression level ($P < 0.05$), while overexpressing Smad3 reversed Smad3 knockdown-mediated effect on E-cadherin and Desmin. **Conclusion:** Smad3 can promote the HG-mediated transdifferentiation of renal tubular epithelial cells, which leads to fibrosis.

[**Key words**] diabetic nephropathy; high glucose; Smad3; renal tubular epithelial cells; epithelial cell transdifferentiation; renal fibrosis

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)最常见的严重微血管并发症之一^[1]。在 DN 过程中,上皮细胞表型标志物(例如 E-cadherin、N-cadherin 等)表达减少,并逐渐表达间质细胞表面标志物(Desmin、 α -Smooth muscle actin 等),发生向成纤维细胞转分化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),从而加重加快 DN 肾脏纤维化的进程^[2-4]。课题组前期研究发现,肾小管上皮细胞 EMT 在肾纤维化中发挥重要作用,抑制上皮细胞转分化将抑制或延缓 DM 肾脏纤维化以及高糖诱导的肾小管上皮细胞纤维化进程^[5-8]。转化生长因子- β 1 (Transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)可以诱导 EMT 的发生,是公认的致纤维化因子^[9-11]。Smad3 作为 TGF- β 1 受体激酶底物之一,被认为是介导 TGF- β 1 诱导纤维化的关键分子^[12-13],而 Smad3 在高糖诱导肾小管上皮细胞纤维化过程中的作用尚不明确,因此本研究通过观察 Smad3 对高糖条件下肾小管上皮细胞转分化的影响,探讨 Smad3 在高糖诱导肾脏纤维化中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

1.1.1 主要试剂 肾小管上皮细胞株(吉妮欧,中国),DMEM 细胞培养基(Hyclone,美国),Smad3 抗体、P-Smad3 (Ser423/425) 抗体(CST,美国),E-cadherin 抗体、Desmin 抗体(Santa Cruz 公司,美国), β -actin 单克隆抗体(普美,中国),胎牛血清、胰酶(Gibco,美国),一抗稀释液、ECL 显色剂、质粒提取试剂盒(碧云天,中国),real-time PCR 试剂(天根,中国),Lipofectamine 3000(赛默飞,美国)。

1.1.2 主要仪器 电泳系统及电转移装置(北京六一,中国),凝胶成像系统、荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad,美国),DP72 显微镜(OLYMPUS,日本)。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建 敲低 Smad3 质粒(Smad3-sh)

和过表达 Smad3 质粒(OE-Smad3)均由上海毅乐公司设计合成,序列见表 1。

表 1 敲低 Smad3 质粒、空载质粒及过表达 Smad3 质粒序列

Tab. 1 Sequence of Smad3 knock down plasmid, vector of the plasmid and Smad3 overexpression plasmid

质粒	序列
敲低 Smad3 质粒(Smad3-sh)	TCTTCAACAACCAGGAATTTG
空载质粒(vector)	CAACAAGATGAAGAGCACCAA
过表达 Smad3 质粒(OE-Smad3)	
上游	5'-TAATACGACTCACTATAGG-3'
下游	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'

1.2.2 细胞培养与分组 细胞生长融合度达 80% 时,弃去培养瓶中的培养液,用无菌 PBS 洗涤 3 次,弃上清液、吸干,加入胰蛋白酶(浓度为 0.25%,37℃ 预热)1 mL 进行消化,细胞悬液均匀铺于 6 孔板或相应培养皿中。随机将细胞分为正常对照组(NC 组)、正常糖组(NG 组)、高糖组(HG 组、空载组(vector 组)、敲低 Smad3 质粒干预组(Smad3-sh 组)及过表达 Smad3 质粒干预组(OE-Smad3 组),正常糖为 5.5 mmol/L 葡萄糖,高糖为 30 mmol/L 葡萄糖;各组于培养箱(37℃,5% CO₂)中孵育过夜。

1.2.3 细胞转染 待细胞融合至 50%~60% 时,进行转染。配制转染液:DMEM 培养液(不含血清及双抗)、Lipofectamine 3000、质粒,瞬离、混匀,于无菌环境静置 30 min;弃去培养皿中的培养液,并且加入已经混匀好的转染液,轻晃混匀,于培养箱(37℃,5% CO₂)中孵育 48 h。

1.2.4 质粒效应检测 (1)Real-time PCR 实验检测 Smad3 mRNA 表达水平,按天根公司试剂盒说明书,用 Trizol 法提取各组大鼠肾组织的总 RNA;以 20 μ L 反应体系反转录-聚合酶链反应合成 cDNA,内参照 β -actin 及 Smad3 的引物由生物工程有限公司合成,内参照 β -actin 上游引物序列 5'-ACCACCATGTACCCAGGCAT-3',下游引物序列 5'-

CCGGACTCATCGTACTCCTG-3');Smad3 上游引物序列 5'-GCCGAGGGAACATCCTGTCT-3',下游引物序列 5'-CCACGTCACTGCGGAGACA-3';采用 Bio-Rad CFX 96TM 荧光定量 PCR 分析系统进行 RT-qPCR。(2)采用 Western blot Smad3 蛋白表达水平,提取各组细胞蛋白,用 BCA 试剂盒(碧云天)测定各组蛋白质浓度,按所测得浓度计算每泳道所需体积,加入加样缓冲液煮沸 10 min,经 8% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,再转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别加入抗 β -actin、Smad3 及抗体,4℃孵育过夜;次日,TBST 洗膜后,加入相应二抗(浓度均为 1:7 000)室温孵育 1 h,加 ECL 荧光显色液,凝胶成像仪曝光,Image Lab 软件分析各条带调整体积值,结果用目标蛋白/ β -actin 值表示。

1.2.5 敲低和过表达 Smad3 对 EMT 的影响 选取正常对照组(NC)、空载组(vector)、敲低 Smad3 质粒干预组(Smad3-sh)及过表达 Smad3 质粒干预组(OE-Smad3)细胞,分别给予正常糖浓度及高糖浓度处理,于培养箱(37℃,5% CO₂)中孵育过夜。提取各组细胞蛋白,采用 Western blot 法检测 Smad3、p-Smad3 (Ser423/425)、E-cadherin 及 Desmin 蛋白表达水平;提取各组细胞蛋白,用 BCA 试剂盒(碧云天)测定各组蛋白质浓度,按所测得浓度计算每泳道所需体积,加入加样缓冲液煮沸 10 min,经 8% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,再转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别加入抗 β -actin、Smad3、p-Smad3 (Ser423/425)、E-cadherin 及 Desmin 抗体,4℃孵育过夜;次日,TBST 洗膜后,加入相应二抗(浓度均为 1:7 000)室温孵育 1 h,加 ECL 荧光显色液,凝胶成像仪曝光,Image Lab 软件分析各条带调整体积值,结果用目标蛋白/ β -actin 值表示。

1.3 统计学处理

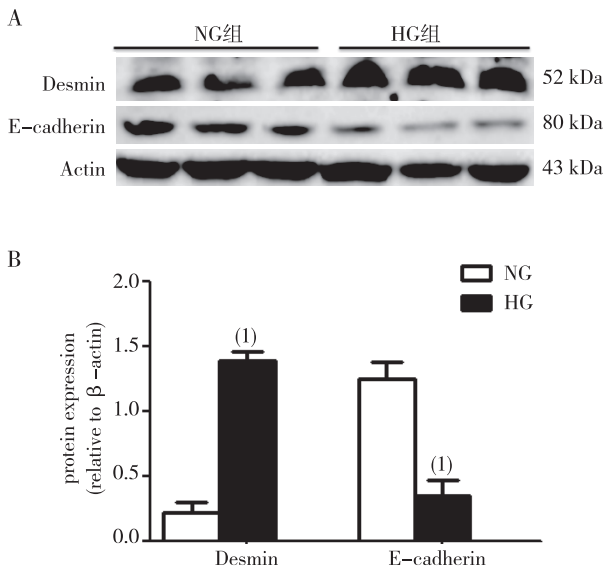
采用 SPSS 17.0 软件进行数据处理及统计分析。实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较方差齐时采用 SNK-q 检验,方差不齐时采用 Games-Howell 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 E-cadherin 及 Desmin 蛋白表达

结果显示,NG 组 E-cadherin 蛋白高表达,而

Desmin 表达较少;与 NG 组相比,HG 组细胞 E-cadherin 蛋白表达减少,而 Desmin 蛋白表达增高,差异具有统计学意义, $P < 0.05$ 。见如图 1。



注:A 为 Western blot 条带,B 为灰度值定量条图;
(¹) 与 NG 组比较, $P < 0.05$ 。

图 1 肾小管上皮细胞中 E-cadherin 和 Desmin 蛋白表达(Western blot)

Fig. 1 The effect of HG on the protein expression levels of E-cadherin, Desmin in NRK-52E cells
NG:normal glucose group;HG: high glucose group

2.2 质粒效应检测

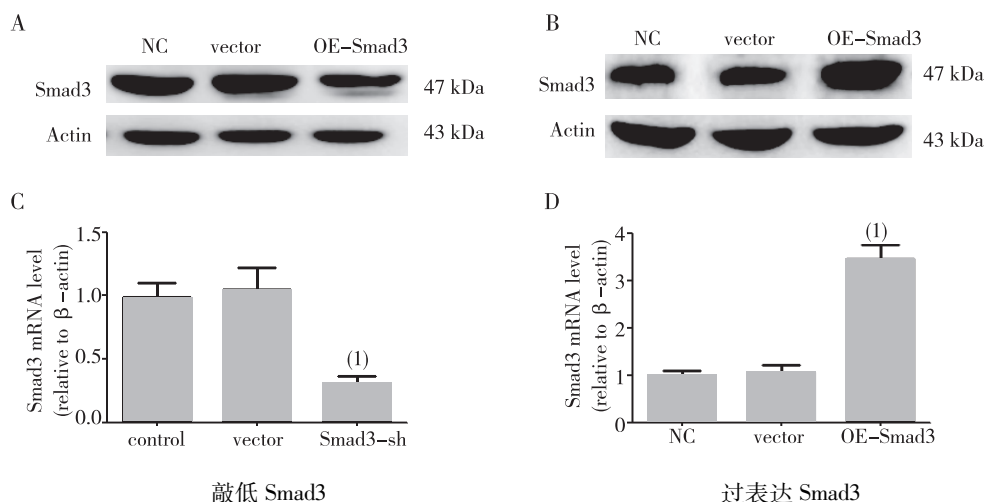
结果显示,与 NC 组相比,vector 组 Smad3 蛋白及 mRNA 水平表达均无显著变化,而 Smad3-sh 组 Smad3 蛋白及 mRNA 表达均显著减少($P < 0.05$),蛋白敲低效率约为 60%;OE-Smad3 组 Smad3 蛋白及 mRNA 表达均显著增加($P < 0.05$),蛋白过表达约为 3.5 倍。见图 2。

2.3 敲低和过表达 Smad3 对 EMT 的影响

结果显示,与 NG 组比较,HG 刺激肾小管上皮细胞细胞后,p-Smad3/Smad3 蛋白比值、Desmin 蛋白表达水平均显著增加,E-cadherin 蛋白表达水平显著减少,差异具有统计学意义($P < 0.05$);在 NG 情况下敲低 Smad3 后,p-Smad3/Smad3 蛋白比值减少,Desmin 蛋白表达水平略有减少,E-cadherin 蛋白表达水平略有增加,差异无统计学意义($P > 0.05$);而在 HG 情况下敲低 Smad3,Desmin 蛋白表达水平显著减少,E-cadherin 蛋白表达水平显著增

加,差异有统计学意义($P < 0.05$);在 NG 情况下过表达 Smad3, p -Smad3/Smad3 蛋白比值增加, Desmin 蛋白表达水平略有增加, E-cadherin 蛋白表达水平略有减少,但差异无统计学意义

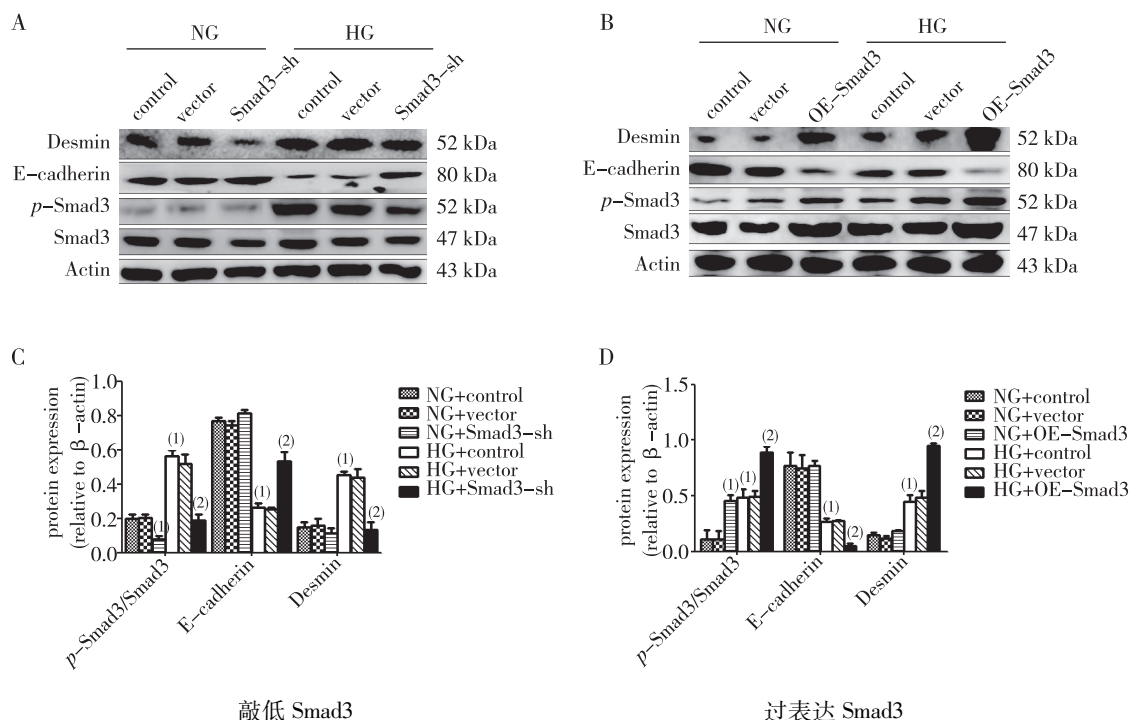
($P > 0.05$);而在 HG 情况下过表达 Smad3, Desmin 蛋白表达水平显著增加, E-cadherin 蛋白表达水平显著减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。



注: A、B 为 Western blot 条带, C、D 为灰度值定量条图; ⁽¹⁾ 与 NC 组比较, $P < 0.05$ 。

图 2 各组肾小管上皮细胞中 Smad3 蛋白及 mRNA 表达

Fig. 2 The protein expression levels and mRNA expression levels of Smad3 in Smad3-sh and OE-Smad3 NRK-52E cells



注: A、B 为 Western blot 条带, C、D 为灰度值定量条图; ⁽¹⁾ 与 NG + control 组比较, $P < 0.05$;

⁽²⁾ 与 HG + control 组比较, $P < 0.05$ 。

图 3 敲低和过表达 Smad3 对 EMT 的影响 (Western blot)

Fig. 3 The effect of Smad3 expression on HG-mediated E-cadherin and Desmin expression levels

3 讨论

肾脏纤维化是慢性肾脏疾病 (chronic kidney disease, CKD) 的共有特征之一,以大量肌纤维母细胞的活化和细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的过度沉积为主要特征,常导致肾功能的持续恶化,最终可能进展为终末期肾脏疾病 (end-stage renal disease, ESRD)^[14]。目前,对于肾脏纤维化的发病机制还不明确,且临床上缺乏有效治疗措施^[15]。肌成纤维细胞是分泌肾间质细胞外基质的主要细胞,在疾病状态下,上皮细胞表达成纤维细胞表面标志物并发生向 DM,从而分泌大量细胞外基质,最终将加重加快 DN 肾脏纤维化的进程^[2-4]。本研究发现,正常糖培养的肾小管上皮细胞成纤维细胞标志物表达较少,向间充质细胞转分化较少,而在高糖刺激之后,上皮细胞发生大量转分化,成纤维细胞标志物表达显著增加。课题组前期发现,肾小管上皮细胞 EMT 在肾纤维化中发挥重要作用,抑制上皮细胞转分化将抑制或延缓 DM 肾脏纤维化以及 HG 诱导的肾小管上皮细胞纤维化进程^[5-8],提示寻找抑制 EMT 过程的有效靶点将为临床上治疗肾脏纤维化提供理论依据。

TGF- β 1 是公认的致纤维化因子,肾脏肾脏纤维化过程中发挥至关重要作用^[14-15]。Smads 作为主要的 TGF- β 1 受体激酶底物,承担着转导通路中介分子的作用,将 TGF- β 1 信号从细胞外传递到细胞核。根据结构和功能,Smad 蛋白可分为 3 种亚型:(1)受体调控型 Smad (R-Smad),包括 Smad1、2、3、5、8;(2)共用型 Smad (co-Smad) 只有 Smad4;(3)拮抗型 Smad (I-Smad)有 Smad 6、7^[12-15]。激活的 TGF- β 1 通过跨膜的 II 型 (T β R II) 和 I 型 (T β R I) 丝氨酸/苏氨酸激酶受体激活其下游的 Smad2/3,Smad2/3 随后与 Smad4 形成复合物转移入细胞核中,在核中 Smad2/3/Smad4 复合物可与转录辅激活剂 p300/CBP 相互作用,参与 TGF- β 1 目的基因的转录活化,发挥其致纤维化效应诱导肾小管上皮细胞向间充质细胞转分化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT),促使细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 合成增加并抑制其降解而过度沉积,从而造成广泛的肾组织纤维化^[14-15]。Smad3 被认为是介导 TGF- β 1 诱导纤维化的关键分子,敲除 Smad3 能抑制 ECM 沉积和 EMT 的发生,从而改善单侧输尿管梗阻所致的肾脏纤维化以

及 TGF- β 1 所诱导的体外肾小管上皮细胞纤维化^[14,16];并且 TGF- β 1 激活 Smad3 可上调多种促纤维化的微小 RNA (micoRNA) 表达,包括 miR-21、miR-129 及 miR-145^[17-18]。本研究中,在高糖条件下培养的肾小管上皮细胞中,敲低 Smad3 抑制高糖诱导的肾小管上皮细胞转分化过程,并且过表达 Smad3 之后可以促进高糖诱导的肾小管上皮细胞转分化,表明 Smad3 在高糖诱导的肾小管纤维化模型的作用与其他学者在其他肾脏纤维化模型中的作用一致^[14,16]。肿瘤方面的研究发现,Smad3 可以单独与 Smad4 结合成 Smad3/4 复合物,并且结合在核转录共抑制因子 (Ski-related novel protein N, SnoN) 基因的 SIE (Smad-inhibitory element) 从而抑制 SnoN 基因转录,从而减少 SnoN 蛋白表达^[19]。而 SnoN 蛋白是 TGF- β 1 的负调控因子,它可以分别在细胞质和在细胞核中抑制 TGF- β 1 信号通路的活化^[20-21]。提示 Smad3 可能通过削弱 SnoN 对 TGF- β 1 信号通路的负调控作用,从而促进 HG 诱导肾小管上皮细胞纤维化的发生,但具体机制还有待进一步研究。

综上所述,Smad3 促进 HG 诱导肾小管上皮细胞转分化过程,从而促进高糖诱导的肾小管上皮细胞纤维化的发生。

4 参考文献

- [1] DU M R, JU G X, LI N S, et al. Role of asymmetrical dimethylarginine in diabetic microvascular complications[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2016, 68(4): 322-326.
- [2] HUANG K H, GUAN S S, LIN W H, et al. Role of Calbindin-D28k in diabetes-associated advanced glycation End-products-induced renal proximal tubule cell injury[J]. Cells, 2019, 30(7): 660-676.
- [3] RAVINDRA N S, PASHAM, AGOUNIA, et al. Microparticles as potential mediators of high glucose-induced renal cell injury[J]. Biomolecules, 2019, 9(8): 348-362.
- [4] KATO M, NATARAJAN R. Diabetic nephropathy--emerging epigenetic mechanism[J]. Nat Rev Nephrol, 2014, 10(9): 517-530.
- [5] WANG Y, LIU L, PENG W, et al. Ski-related novel protein suppresses the development of diabetic nephropathy by modulating transforming growth factor- β signaling and microRNA-21 expression[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(10): 17925-17936.
- [6] 曾令萍, 肖瑛, 张莹莹, 等. BMP-7 对高糖环境下肾小管上皮细胞 Id2 和 E2A 蛋白表达的影响[J]. 中国病理

- 生理杂志, 2016, 2:321-326.
- [7] LIU L, WANG Y, YAN R, et al. BMP-7 inhibits renal fibrosis in diabetic nephropathy via miR-21 downregulation [J]. Life Sci, 2019, 238:116957-116968.
- [8] 毛彦稳, 张小欢, 刘慧铭, 等. 硫辛酰胺对高糖条件下肾小管上皮细胞氧化应激及转化生长因子 β 激活酶 1 和核转录共抑制因子蛋白表达的影响 [J]. 实用医学杂志, 2019, 35(19):2993-3003.
- [9] HU H H, CHEN D Q, WANG Y N, et al. New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis [J]. Chem Biol Interact, 2018, 292:76-83.
- [10] ZHOU Y, HUANG F, LIU Y, et al. TGF- β 1 relieves epithelial-mesenchymal transition reduction in hypospadias induced by DEHP in rats [J]. Pediatr Res, 2019, 19: 622-629.
- [11] CHANG A S, HATHAWAY C K, SMITHIES O, et al. Transforming growth factor- β 1 and diabetic nephropathy [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2016, 310(8):689-696.
- [12] ZHANG L, LIU C, MENG X M, et al. Smad2 protects against TGF- β 1/Smad3-mediated Collagen synthesis in human hepatic stellate cells during hepatic fibrosis [J]. Mol Cell Biochem, 2015, 400(1-2):17-28.
- [13] MENG X M, HUANG X R, CHUNG A C, et al. Smad2 protects against TGF- β 1/Smad3-mediated renal fibrosis [J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(9):1477-1487.
- [14] MENG X M, NIKOLIC-PATERSON D J, LAN H Y. TGF- β 1: the master regulator of fibrosis [J]. Nat Rev Nephrol, 2016, 12(6):325-338.
- [15] HUYNH P, CHAI Z. Transforming growth factor β (TGF β) and related molecules in chronic kidney disease (CKD) [J]. Clin Sci, 2019, 133(2):287-313.
- [16] LAN H Y. Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation [J]. Int J Biol Sci, 2011, 7(7): 1056-1067.
- [17] WU C, CHEN W, FANG M, et al. Compound astragalus and salvia miltiorrhiza extract inhibits hepatocellular carcinoma progression via miR-145/miR-21 mediated smad3 phosphorylation [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 231: 98-112.
- [18] HUANG X, YUE Z, WU J, et al. MicroRNA-21 knockout exacerbates angiotensin II-induced thoracic aortic aneurysm and dissection in mice with abnormal transforming growth factor- β -SMAD3 signaling [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018, 38:1086-1101.
- [19] ZHU Q, PEARSONWHITE S, LUO K. Requirement for the SnoN oncoprotein in transforming growth factor beta-induced oncogenic transformation of fibroblast cells [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(24):10731-10744.
- [20] ZHANG X, EGAWA K, XIE Y, et al. The expression of SnoN in normal human skin and cutaneous keratinous neoplasms [J]. Int J Dermatol, 2009, 48:579-583.
- [21] WANG Y, MAO Y, ZHANG X, et al. TAK1 may promote the development of diabetic nephropathy by reducing the stability of SnoN protein [J]. Life Sci, 2019, 228:1-10.

(2019-09-10 收稿, 2019-11-28 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 张启芳