

· 论 著 ·

## SphK1-S1P 信号通路的激活参与糖尿病大鼠肾损伤的研究\*

兰 天<sup>1</sup>, 常秀亭<sup>2</sup>, 勾红菊<sup>1</sup>, 吴 腾<sup>1</sup>, 王丽京<sup>1△</sup>, 黄河清<sup>2▲</sup>

(1. 广东药学院血管生物学研究所, 广州 510006; 2. 中山大学药学院, 广州 510006)

**摘要:**目的 观察鞘氨醇激酶 1-1-磷酸鞘氨醇(SphK1-S1P)信号通路在链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病大鼠肾脏中的激活情况。方法 观察 STZ 诱导的糖尿病大鼠肾脏中 SphK1-S1P 信号通路的激活情况。分别检测大鼠肾脏功能及病理指标。采用液质联用分析 SphK1 活性及 S1P 含量。并采用免疫组织化学、Real-time PCR 和 Western blot 法检测了 SphK1 的表达。结果 STZ 诱导的糖尿病大鼠血糖、肾重体质量比、24 h 尿蛋白显著升高, 糖尿病大鼠肾脏系膜区肥大, 细胞外基质扩展。同时, 糖尿病大鼠肾脏中 SphK1-S1P 信号通路被激活, 表现为 SphK1 表达和活性增加, 以及 S1P 生成增加。结论 糖尿病大鼠肾脏中存在 SphK1-S1P 信号通路的激活, 可能参与了糖尿病大鼠肾损伤过程。

**关键词:** SphK1-S1P 信号通路; 纤维连接蛋白; 糖尿病肾病; STZ

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.22.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)22-2571-03

## Activation of SphK1-S1P signaling pathway is involved in diabetic rat renal injury\*

Lan Tian<sup>1</sup>, Chang Xiuting<sup>2</sup>, Gou Hongju<sup>1</sup>, Wu Teng<sup>1</sup>, Wang Lijing<sup>1△</sup>, Huang Heqing<sup>2▲</sup>

(1. Vascular Biology Research Institute, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract: Objective** We aimed to investigate whether SphK1-S1P signaling pathway is activated in diabetic nephropathy. **Methods** SphK1 activity and S1P levels were measured by LC-MS/MS analysis. The expression of SphK1 were examined by immunohistochemistry, real-time PCR and Western blot. **Results** Fasting blood glucose, kidney/body weight ratio and 24-h albuminuria were significantly increased in diabetic mice. Furthermore, mesangial hypertrophy was found in diabetic kidney. Strikingly, the staining, activity and levels of mRNA and protein of SphK1, and S1P production in diabetic kidney were also markedly increased in diabetic mouse kidney. **Conclusion** These results demonstrate that the SphK1-S1P signaling pathway is activated in diabetic kidney, suggesting that SphK1-S1P signaling pathway is implicated in the pathogenesis of diabetic nephropathy.

**Key words:** SphK1-S1P signaling pathway; fibronectin; diabetic nephropathy; STZ

肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cells, GMC)的增生、肥大及其功能改变如分泌细胞外基质是糖尿病肾病肾小球硬化的主要病理基础<sup>[1-2]</sup>。磷酸鞘氨醇(sphingosine 1-phosphate, S1P)是细胞膜组成成分磷脂的代谢产物, 鞘氨醇激酶 1(sphingosine kinase 1, SphK1)催化 S1P 生成, 促进细胞存活和保护细胞免受凋亡损伤<sup>[3-5]</sup>。研究发现, 用糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)处理 GMC 后, 发现 SphK1 活性与 S1P 增高<sup>[6]</sup>。鉴于此, 本研究采用链脲佐菌素(streptozocin, STZ)诱导的糖尿病肾损伤大鼠模型观察其肾组织 SphK1-S1P 信号通路的变化, 为探寻将 SphK1-S1P 信号通路作为抗糖尿病肾病的可能作用靶点奠定基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物** 雄性 SD 大鼠(175~200 g)购自中山大学实验动物中心, 在 SPF 级环境下饲养, 自由摄食、饮水。采用新鲜配制的链脲佐菌素(STZ)60 mg/kg 体质量溶于 10 mmol/L 枸橼酸缓冲液, pH 4.5(Sigma 公司), 大鼠尾静脉注射复制糖尿病模型。正常对照组注射等体积的枸橼酸缓冲液。采用 One-Touch Ultra 血糖仪(Johnson & Johnson Co., Milpitas, California, USA)检测血糖。造模后 72 h 测量空腹血糖, 大鼠血糖浓度大于 16.7 mmol/L 纳入糖尿病模型标准。糖尿病模

型组与正常对照组各 8 只大鼠, 大鼠每周称量体质量, 每月测量血糖。实验周期为 12 周。

**1.2 生化分析** 在实验结束时, 称大鼠体质量, 置于代谢笼收集 24 h 的尿液。血肌酐和 24 h 尿蛋白经中山大学第一附属医院病理科分析。大鼠处死后, 分离肾脏, 称重并一部分固定在 4% 的多聚甲醛溶液; 另一部分液氮速冻后置于 -80 ℃ 冻存。肾脏肥大指数用肾重体质量比表示。

**1.3 肾脏形态学研究** 在实验结束, 收取完尿液、血液与标本, 大鼠处死后、用 PBS 全身灌流, 分离肾脏, 然后在 4% 的多聚甲醛中固定过夜, 石蜡包埋。切片 4 μm 厚度进行 PAS 染色。采用光镜分析肾小球硬化程度和系膜区扩展程度。用苏木精染核后, 每个切片观察 50 个肾小球。通过计算肾小球横切面来评价肾小球肥大。切片采用 Olympus 数字光学显微镜进行拍照并转换成数字图片格式。肾小球横切面采用图像分析软件 Image Pro. Plus(Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD, USA)进行分析。每个动物分析 50 个肾小球, 计算均值并进行统计分析。

**1.4 定量 Real-time PCR 检测 mRNA 水平** 按照 TRIzol™(Invitrogen)说明书提取组织或细胞的总 RNA。总 RNA 逆转录后, 采用 Bio-Rad iCycler Iq system 进行定量 real-time PCR。

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81170676; 81200308; 31271455)。 作者简介: 兰天(1983~), 助理研究员, 博士, 主要从事心血管及糖尿病药理学研究。 △ 通讯作者, Tel: (020)39943028; E-mail: huangheqing@mail.sysu.edu.cn。 ▲ 通讯作者, Tel: (020)39352126; E-mail: wanglijing62@163.com。

用于扩增的引物序列如下: SphK1 (forward primer, 5'-GGC AGC GAA CCC CAC CAC TC-3'; reverse primer, 5'-GCG GGT GTC TGG TGA CTG GC-3'); SphK2 (forward primer, 5'-CAC CTG TGC TGG GTG CGG AG-3'; reverse primer, 5'-GGC AGC CCA GGC TGA AGT GG-3') and GAPDH (forward primer, 5'-AGG AGT AAG AAA CCC TGG AC-3'; reverse primer, 5'-CTG GGA TGG AAT TGT GAG-3')。mRNA 水平采用 GAPDH 校正。荧光强度的平均阈值用于分析其 mRNA 水平。mRNA 的相对量采用  $\Delta\Delta Ct$  进行计算。

**1.5 Western blot 检测蛋白表达** 肾脏组织匀浆经裂解提取蛋白后,经 SDS-PAGE 电泳分离后,转膜至 PVDF。采用 5% 的脱脂牛奶室温封闭 1 h,将一抗、二抗孵育后,采用增强型的化学发光液检测条带信号。膜重孵鼠单抗  $\alpha$ -tubulin 作为内参对照。采用 Quantity-One 软件进行灰度分析。

**1.6 鞘氨醇激酶活性测定** 参考作者报道的方法进行 SphK1 活性的液质联用(LC-MS/MS)法检测<sup>[7]</sup>。30  $\mu$ g 总蛋白液用于酶活性测定,反应采用 2.5  $\mu$ L 200  $\mu$ M C17-Sph(溶于 5% Triton X-100)和 2.5  $\mu$ L 20 mM ATP 含 MgCl<sub>2</sub> (200 mM),总体积 50  $\mu$ L。37  $^{\circ}$ C 水浴反应 20 min 后,用 5  $\mu$ L 1 M HCl 和 200  $\mu$ L 氯仿:甲醇:浓盐酸(100:200:1,v/v)终止反应。然后加入 10 ng S1P 作为内标。剧烈涡旋后,加入 60  $\mu$ L 氯仿和 60  $\mu$ L 2 M KCl,4  $^{\circ}$ C,12 000 g 离心 5 min。下层的氯仿相转移到新的 1.5 mL 离心管,室温真空干燥 60 min。挥干的残渣用 100  $\mu$ L 流动相(methanol:0.1% formic acid=95:5,v/v)重悬,然后剧烈涡旋 1 min。终溶液进样 10  $\mu$ L 进行液质联用(LC-MS/MS)(ThermoFinnigan)分析。

**1.7 S1P 含量测定** 参照作者前期报道的方法<sup>[8]</sup>,用 LC-MS/MS 法进行 S1P 定量分析。称量冰冻的肾脏组织样本 20 mg,用 400  $\mu$ L 的蒸馏水进行电动匀浆。细胞则用 PBS 刮取下来,离心,并用 100  $\mu$ L 的 PBS 重悬,采用 BCA 法进行蛋白定量。S1P 及相应的化合物采用甲醇沉淀抽提。混合液涡旋 10 min 后,4  $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 5 min,然后上清液转移至一干净的玻璃自动上样瓶中。每次进样 10  $\mu$ L 进行 LC-MS/MS 分析。

**1.8 统计学处理** 数值采用  $\bar{x} \pm s$  表示。采用非配对 *t* 检验分析两组间的统计差异;采用 Graphpad Prism5.0 统计软件分析比较。单因素方差分析结合 Bonferroni 校正分析多组间的统计差异。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 STZ 诱导的糖尿病大鼠肾损伤** 如表 1 所示,实验 12 周结束时,与正常对照组比较,糖尿病组大鼠的空腹血糖值显著升高( $P < 0.01$ ),糖尿病大鼠的肾重/体质量比与正常对照组比较显著增加( $P < 0.05$ )。实验结束时糖尿病大鼠的 24 h 尿蛋白明显增高( $P < 0.05$ )。糖尿病大鼠的肾小球损伤表现为

肾小球肥大和肾小球系膜细胞外基质积聚。与正常对照组相比,STZ 诱导的糖尿病大鼠 12 周后出现明显的肾小球面积和系膜基质面积增大;肾小球内膜与肾小球囊发生粘连;并且 PAS 病理染色发现肾组织基质成分明显增多(图 1),提示糖尿病大鼠 12 周后出现明显的肾脏肥大,肾小球硬化和肾功能受损。

**2.2 糖尿病大鼠肾脏 SphK1-S1P 信号通路被激活** 为了观察糖尿病状态下大鼠肾组织 SphK1-S1P 信号通路的变化,检测了正常对照组和糖尿病模型组大鼠肾组织的 SphK1 的表达及活性和 S1P 水平。采用 Real-time PCR 检测发现,糖尿病组大鼠肾脏 SphK1 mRNA 水平是对照组的 3 倍,而 SphK2 mRNA 水平没有变化(图 2)。此外,免疫组织化学和 Western blot 检测发现糖尿病大鼠肾脏 SphK1 蛋白表达也有显著升高(图 3)。LC-MS/MS 实验结果表明,糖尿病大鼠肾脏 SphK1 活性显著增加(图 4A);并且 S1P 水平显著增加(图 4B)。结果显示糖尿病状态下大鼠肾组织 SphK1-S1P 信号通路处于激活状态,与作者已报道的糖尿病小鼠模型实验结果一致<sup>[9]</sup>。糖尿病大小鼠模型实验结果均提示 SphK1-S1P 信号通路的激活可能参与了糖尿病肾损害的病理进程。

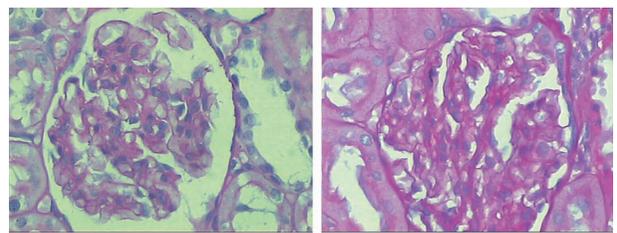
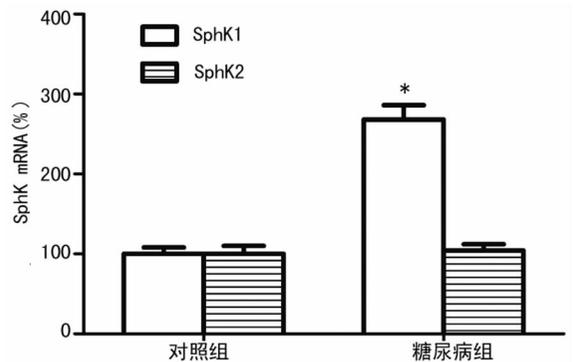
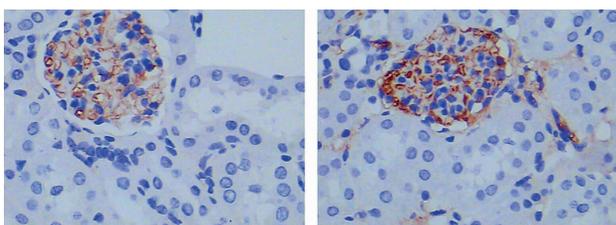


图 1 STZ 诱导的糖尿病大鼠肾脏系膜区基质分泌情况(PAS,  $\times 200$ )



\*:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

图 2 Real-time PCR 检测糖尿病大鼠肾脏 SphK1 和 SphK2 mRNA 水平



对照组:免疫组织化学技术;糖尿病组:Western blot 法。

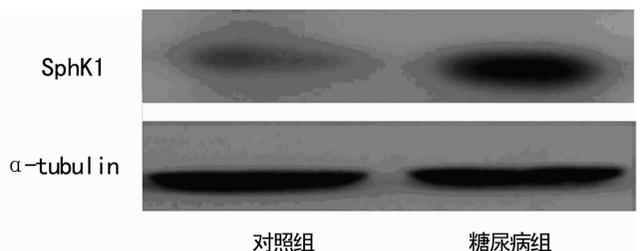
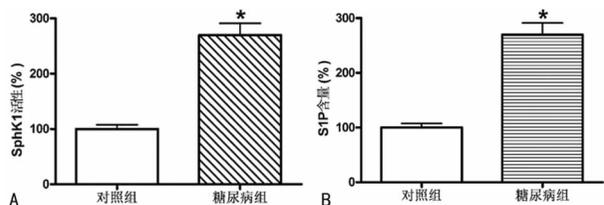


图 3 SphK1 在糖尿病肾脏组织中的表达

表 1 血糖及肾功能指标检测( $\bar{x} \pm s$ )

组别	血糖(mmol/L)	肾重/体质量(mg/g)	尿蛋白(mg/24 h)
对照组	5.30±0.16	6.17±0.21	2.09±0.15
糖尿病组	23.56±2.27 <sup>b</sup>	18.23±0.72 <sup>a</sup>	13.15±1.12 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。



\*:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

图 4 液质联用(LC-MS/MS)分别检测 SphK1 活性和 S1P 含量

### 3 讨论

研究表明长期高血糖、糖基化终产物、氧化应激等可激活 SphK1, 进而导致 S1P 的生成增加<sup>[10]</sup>, 促进肾小球系膜细胞增殖<sup>[11]</sup>等。肾脏纤维化是糖尿病肾病的主要病理特征之一, GMC 是肾小球的主要功能细胞, 无论在肾脏的生理功能还是病理变化中均发挥着重要的作用; 现已认为 GMC 参与了糖尿病肾病、肾小球硬化的损伤过程<sup>[12]</sup>。糖尿病状态下, 肾小球系膜细胞中细胞外基质的积聚, 促进了肾脏纤维化的病理进程<sup>[13]</sup>。

本研究观察到糖尿病大鼠肾脏在 SphK1-S1P 信号通路的激活。本实验采用 STZ 诱导的糖尿病大鼠模型观察到 SphK1-S1P 信号通路与糖尿病肾病存在密切相关性。研究报告, 在 STZ 诱导的大鼠 4~5 h 后, 其肾小球系膜细胞发生增殖, 与此同时, SphK-S1P 信号通路被激活<sup>[14-15]</sup>。并且, 作者前期研究发现, 在四氧嘧啶诱导 12 周的糖尿病小鼠, 肾实质与肾功能明显受损, 肾脏存在 SphK-S1P 信号通路的激活<sup>[9]</sup>。在本研究中, 采用 STZ 诱导的 12 周糖尿病大鼠, 肾脏亦明显损害, 肾脏 SphK1-S1P 信号通路被激活。研究结果进一步提示, SphK1-S1P 信号通路被体内高血糖激活后, 可能参与了糖尿病肾损伤的病理进程。

综上所述, 作者通过体内实验证实 SphK1-S1P 信号通路的激活可能参与了糖尿病肾损伤的病理进程。SphK1-S1P 信号通路如何影响糖尿病肾病的进程有待进一步研究证明。本研究为进一步探明糖尿病肾病的病变机制、探索将 SphK1-S1P 信号通路作为抗糖尿病肾病的新的作用靶点提供了一定客观依据。

### 参考文献:

[1] Satirapoj B. Nephropathy in diabetes[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 771:107-122.  
 [2] Jiang Q, Liu P, Wu X, et al. Berberine attenuates lipopolysaccharide-induced extracellular matrix accumulation and inflammation in rat mesangial cells; involvement of NF-kappaB signaling pathway[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, 331(1):34-40.  
 [3] Heffernan-Stroud LA, Obeid LM. Sphingosine kinase 1 in

cancer[J]. *Adv Cancer Res*, 2013, 117:201-235.  
 [4] Li D, Zhang N, Cao Y, et al. Emodin ameliorates lipopolysaccharide-induced mastitis in mice by inhibiting activation of NF-kappaB and MAPKs signal pathways[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 705(1-3):79-85.  
 [5] Rosa R, Marciano R, Malapelle U, et al. Sphingosine kinase 1 overexpression contributes to cetuximab resistance in human colorectal cancer models[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(1):138-147.  
 [6] Meyer ZU, Heringdorf D, Jakobs KH. Renal mesangial cells: moving on sphingosine kinase-1[J]. *Br J Pharmacol*, 2007, 150(3):255-257.  
 [7] Lan T, Bi H, Xu S, et al. Determination of sphingosine kinase activity in biological samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24(10):1075-1083.  
 [8] Lan T, Bi H, Liu W, et al. Simultaneous determination of sphingosine and sphingosine 1-phosphate in biological samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2011, 879(7-8):520-526.  
 [9] Lan T, Shen X, Liu P, et al. Berberine ameliorates renal injury in diabetic C57BL/6 mice: Involvement of suppression of SphK-S1P signaling pathway[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2010, 502(2):112-120.  
 [10] You B, Ren A, Yan G, et al. Activation of sphingosine kinase-1 mediates inhibition of vascular smooth muscle cell apoptosis by hyperglycemia[J]. *Diabetes*, 2007, 56(5):1445-1453.  
 [11] Klawitter S, Hofmann LP, Pfeilschifter J, et al. Extracellular nucleotides induce migration of renal mesangial cells by upregulating sphingosine kinase-1 expression and activity[J]. *Br J Pharmacol*, 2007, 150(3):271-280.  
 [12] Kolset SO, Reinholt FP, Jenssen T. Diabetic nephropathy and extracellular matrix[J]. *J Histochem Cytochem*, 2012, 60(12):976-986.  
 [13] Thrailkill KM, Clay Bunn R, Fowlkes JL. Matrix metalloproteinases: their potential role in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. *Endocrine*, 2009, 35(1):1-10.  
 [14] Geoffroy K, Troncy L, Wiernsperger N, et al. Glomerular proliferation during early stages of diabetic nephropathy is associated with local increase of sphingosine-1-phosphate levels[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(5):1249-1254.  
 [15] Liu W, Lan T, Xie X, et al. S1P2 receptor mediates sphingosine-1-phosphate-induced fibronectin expression via MAPK signaling pathway in mesangial cells under high glucose condition[J]. *Exp Cell Res*, 2012, 318(8):936-943.

(收稿日期:2013-01-18 修回日期:2013-04-21)