

## 血管紧张素 II 及氯沙坦对大鼠肾系膜细胞 SUMO 蛋白表达的影响\*

黄 炜,周雪琴,徐 玲,徐 勇<sup>△</sup>,杨茂君

(泸州医学院附属医院内分泌科,四川泸州 646000)

**摘要:**目的 探讨血管紧张素 II (Ang II) 及氯沙坦对大鼠肾系膜细胞 SUMO 蛋白表达的影响。方法 将体外培养的大鼠肾系膜细胞分别设正常对照组(NC 组)、不同浓度的 Ang II 干预组(A1、A2、A3 组)、氯沙坦预处理组(MT 组);用 Western blot 和 RT-PCR 法检测培养不同时间后各组细胞 SUMO1、SUMO2/3 蛋白和 mRNA 表达。结果 与 NC 组比较,Ang II 干预组和 MT 组 SUMO1、SUMO2/3 蛋白和 mRNA 表达增强( $P < 0.01$ );与 Ang II 干预组比较,MT 组 SUMO1、SUMO2/3 蛋白和 mRNA 表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 Ang II 呈一定浓度依赖性地上调大鼠肾系膜细胞 SUMO 蛋白表达,该效应不被氯沙坦所阻断,可能参与糖尿病肾病的发病。

**关键词:**小泛素相关修饰蛋白类;血管紧张素 II;氯沙坦;糖尿病肾病

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.03.006

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)03-0273-03

## Effects of angiotensin II and losartan on expression of SUMO in rat glomerular mesangial cells

Huang Wei, Zhou Xueqin, Xu Ling, Xu Yong<sup>△</sup>, Yang Maojun

(Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of angiotensin II (Ang II) and losartan on the expression of small ubiquitin-related modifier(SUMO) protein (SUMO1, SUMO2/3) in cultured rat glomerular mesangial cells(GMCs). **Methods** In vitro cultured HBZY-1 rat GMCs were divided into 5 groups:normal control group(NC group), different concentrations of Ang II intervention groups(A1, A2, A3 groups) and losartan treatment group(MT group). The expression of SUMO1 and SUMO2/3 protein and mRNA of each group was measured by Western blot and RT-PCR. **Results** Compared with the NC group, the expression of SUMO1 and SUMO2/3 protein and mRNA in the Ang II intervention groups and the losartan treatment group was increased significantly ( $P < 0.01$ );Compared with the Ang II intervention groups, the expression of SUMO1 and SUMO2/3 protein and mRNA in the losartan treatment group had no statistically significant difference. **Conclusion** Ang II up-regulates the expression of SUMO protein in rGMCs by a dose-dependent manner in certain range, this effect is not blocked by losartan, Ang II may be involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy.

**Key words:** small ubiquitin-related modifier proteins;angiotensin II;losartan;diabetic nephropathies

糖尿病肾病(DN)是糖尿病特有而严重的微血管并发症,其发病机制尚不清楚,是终末期肾病和肾功能衰竭的主要原因之一。血管紧张素 II (Ang II) 是目前公认的参与 DN 发病的重要致病因子,其受体拮抗剂(ARB)在临床上也被广泛应用,但严格的血糖、血压等控制并不能完全阻止 DN 的发生、发展,因此,进一步研究 DN 发病机制具有重要意义。小泛素相关修饰物(small ubiquitin related modifier, SUMO)修饰是与泛素化修饰类似的蛋白质翻译后修饰,在细胞信号转导、核质运输与转录调控等方面发挥重要作用,参与多条信号通路(包括 TGF- $\beta$ 、NF- $\kappa$ B、MAPK 信号通路)的调控。最新的研究发现, SUMO 化修饰在多种炎症性疾病和器官纤维化进程中发挥着重要的作用,并且参与了糖尿病的发病,但 SUMO 蛋白与 DN 的关系鲜见文献报道。为明确 SUMO 蛋白与 DN 的关系,本研究观察 Ang II 及氯沙坦刺激的大鼠肾系膜细胞不同亚型 SUMO 蛋白(SUMO1、SUMO2/3)的表达,进一步研究 DN 发生机制并为其防治提供理论和实验依据。

## 1 材料与方

**1.1 材料** 大鼠肾系膜细胞(HBZY-1,中国典型培养物保藏中心),兔抗大鼠 SUMO1 单克隆抗体(英国 Abcam),兔抗大鼠

SUMO2/3 多克隆抗体(美国 Millipore),小鼠抗大鼠 GAPDH 抗体(碧云天公司),Ang II (美国 sigma),氯沙坦钾(中国食品药品检定研究所),总蛋白抽提试剂盒(美国 Chemieon), $5 \times$  Western 上样缓冲液(碧云天公司),总 RNA 提取试剂盒(北京天根生化),RT-PCR 试剂盒(大连宝生物),BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Pierce),FTC2000 型 PCR 仪,ECL 化学发光试剂盒(美国 Millipore)。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** HBZY-1 常规培养于含 10% 小牛血清的低糖(5.6 mmol/L 葡萄糖)DMEM 培养基中,培养条件 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$ ,对数生长期细胞用于实验。

**1.2.2 实验分组** 在大鼠肾系膜细胞的 DMEM 培养液中加入以下处理因素,将细胞分为 5 组:(1)正常对照组(NC 组),不加处理因素;(2) $10^{-9}$  mol/L Ang II 组(A1 组);(3) $10^{-7}$  mol/L Ang II 组(A2 组);(4) $10^{-5}$  mol/L Ang II 组(A3 组);(5)氯沙坦预处理组(MT 组): $10^{-5}$  mol/L 氯沙坦预处理 0.5 h 后再加入  $10^{-5}$  mol/L Ang II。分别作用 24、48、72 h 后,收获细胞。

**1.2.3 Western blot 检测** SUMO1、SUMO2/3 蛋白表达 取

\* 基金项目:四川省教育厅科研项目资助(11ZB223)。 作者简介:黄炜(1986—),住院医师,硕士,主要从事糖尿病肾病研究。 <sup>△</sup> 通讯

作者, Tel: (0830) 3161546, E-mail: xywyll@aliyun.com。

细胞加蛋白抽提液,吹打,4 ℃离心后取上清液。BCA 法测蛋白浓度,加 5×Western 上样缓冲液混匀,沸水煮 5 min 致蛋白变性。加样品电泳,转膜,封闭,分别加兔抗大鼠 SUMO1 单克隆抗体(1:800),兔抗大鼠 SUMO2/3 多克隆抗体(1:600),小鼠抗大鼠 GAPDH 单克隆内参抗体(1:2000)4 ℃过夜,然后加 HRP 标记的羊抗兔 IgG 孵育(SUMO1、SUMO2/3)、HRP 标记的羊抗小鼠 IgG(内参),化学发光显影,LAS-3000 紫外凝胶成像系统成像,Quantity One 软件测蛋白条带光密度值。实验重复 3 次。SUMO1、SUMO2/3 蛋白浓度以 SUMO1、SUMO2/3 与 GAPDH 蛋白条带平均光密度值之比表示。

**1.2.4 RT-PCR 法测定 SUMO1、SUMO2/3 mRNA** 总 RNA 提取试剂盒提取各组肾系膜细胞总 RNA,取总 RNA 4 μL 为模板反转录成 cDNA 于 PCR 反应管中扩增,SUMO1 上游引物:5'-TAT GGA CAG GAC AGC AG-3',下游引物:5'-CCA TTC CCA GTT CTT TTG-3',扩增产物为 170 bp;SUMO2/3 上游引物:5'-GAC GAG AAA CCC AAG GA-3',下游引物:5'-CTG CCG TTC ACA ATA GG-3',扩增产物为 141 bp;内参 GAPDH 上游引物:5'-CCT CAA GAT TGT CAG CAA T-3',下游引物:5'-CCA TCC ACA GTC TTC TGA GT-3' 扩增产物为 141 bp。反应条件:预变性 94 ℃ 2 min,变性 94 ℃ 30 s,退火(退火温度为 SUMO1:50.8 ℃,SUMO2/3:51.6 ℃)30 s,延伸 72 ℃ 1 min;扩增 30 个循环后上样 2% 琼脂糖凝胶电泳,采用紫外凝胶成像系统成像,以 SUMO1、SUMO2/3 的灰度值除以 GAPDH 的灰度值分别得到各检测指标相对灰度值,该相对灰度值代表各指标 mRNA 的相对表达量。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS17.0 统计软件分析数据,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间比较用单因素方差分析,两两比较采用 *q* 检验,检验水准  $\alpha=0.05$ , $P<0.05$  表示有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 A3 组作用不同时间对系膜细胞 SUMO 蛋白表达的影响** 与 NC 组比较,作用 24 h A3 组 SUMO1、SUMO2/3 蛋白表达均明显增强( $P<0.01$ );随作用时间延长(48、72 h),SUMO1 和 SUMO2/3 蛋白表达量均逐步减弱,作用 72 h 后 SUMO1、SUMO2/3 表达量与 NC 组相比,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 1、图 1。

**2.2 不同浓度 Ang II 和氯沙坦对肾系膜细胞 SUMO 蛋白表达的影响** 作用 24 h 后,A1、A2、A3 组与 NC 组比较,SUMO1 蛋白表达分别增加 30%、40% 和 50%,SUMO2/3 蛋白表达分别增加 30%、70% 和 14%,Ang II 呈浓度依赖性影响 SUMO1 蛋白表达( $P<0.01$ )。MT 组与 NC 组比较,SUMO1 和 SUMO2/3 表达均增加( $P<0.01$ )。见表 2、图 2。

**2.3 不同浓度 Ang II 和氯沙坦对肾系膜细胞 SUMO mRNA 表达的影响** 与 NC 组比较,A1、A2、A3、MT 组 24 h SUMO1、SUMO2/3 mRNA 的表达增加( $P<0.01$ )。见表 3、图 3。

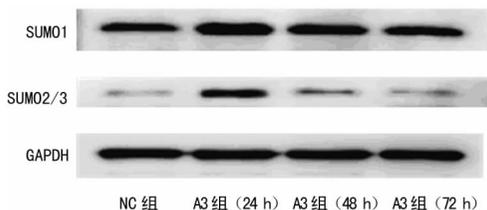


图 1 NC 组与 A3 组不同时间点 SUMO 蛋白表达(Western blot)

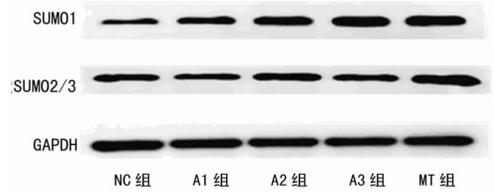


图 2 各组 24 h 后 SUMO 蛋白表达(Western blot)

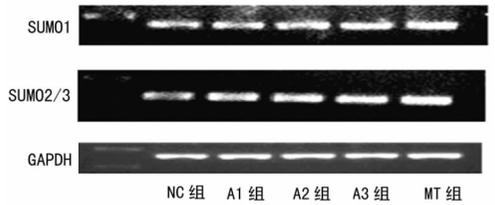


图 3 各组作用 24 h 后 SUMO mRNA 表达(RT-PCR)

表 1 NC 组与 A3 组不同时间点 SUMO1、SUMO2/3 蛋白表达( $\bar{x} \pm s$ )

组别	SUMO1	SUMO2/3
NC 组	0.341±0.001	0.112±0.011
A3 组 24 h	1.224±0.078	0.440±0.032
A3 组 48 h	0.842±0.020	0.184±0.006
A3 组 72 h	0.522±0.030	0.145±0.032

表 2 Western blot 检测各组 24 h SUMO1、SUMO2/3 蛋白的表达( $\bar{x} \pm s$ )

组别	SUMO1	SUMO2/3
NC 组	0.118±0.037	0.548±0.001
A1 组	0.333±0.034	0.721±0.010
A2 组	0.488±0.083	0.940±0.042
A3 组	0.500±0.009	0.627±0.051
MT 组	0.541±0.011	0.950±0.100

表 3 RT-PCR 检测各组 24 h SUMO1、SUMO2/3 mRNA 表达( $\bar{x} \pm s$ )

组别	SUMO1	SUMO2/3
NC 组	0.295±0.060	0.615±0.061
A1 组	0.545±0.030	1.330±0.101
A2 组	0.740±0.050	1.860±0.118
A3 组	0.811±0.064	1.541±0.139
MT 组	0.842±0.050	1.520±0.168

## 3 讨论

SUMO 蛋白是广泛存在于真核生物的高度保守的小蛋白家族(相对分子质量约为  $11 \times 10^3$ ),在细胞信号转导、核质运输与转录调控等方面发挥重要作用<sup>[1]</sup>。目前已发现有 4 个亚型:SUMO1、SUMO2、SUMO3 和 SUMO4, SUMO2 与 SUMO3 氨基酸序列非常接近,常合写成 SUMO2/3。因各亚型 SUMO 蛋白在组织和细胞结构中的分布与动态变化不同,其功能也不尽相同。SUMO1 和 SUMO2/3 在各种组织中均有表达,SUMO1 主要修饰生理蛋白;SUMO2/3 主要修饰应激蛋

白,参与渗透压、热休克、氧化应激和 DNA 损伤等过程<sup>[2]</sup>。SUMO 化参与了 NF- $\kappa$ B、PPAR $\gamma$ 、TGF- $\beta$  和 MAPK 等多信号通路的调控<sup>[3-4]</sup>。

已有研究表明,SUMO 化修饰参与了糖尿病发病。有学者发现,SUMO4 通过与 I- $\kappa$ B 作用,负性调节 NF- $\kappa$ B 的转录活性,与 1 型糖尿病相关<sup>[5-6]</sup>。此外,与糖尿病发病相关的葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) 也受到 SUMO 化调节<sup>[7]</sup>。Woo 等<sup>[8]</sup>证实 AGEs 可通过 SUMO 化修饰介导糖尿病血管内皮功能障碍,参与了糖尿病大血管并发症的发生。

Ang II 是目前公认的参与 DN 发病的重要致病因子,糖尿病患者肾脏局部 Ang II 活性增高,促进肾小球硬化<sup>[9]</sup>。研究证实 Ang II 能维持并增强肾脏的微炎症反应,激活 NF- $\kappa$ B、TGF- $\beta$  等信号,参与肾小球损伤<sup>[10]</sup>。Ang II 与血管紧张素受体(AT 受体)结合后发挥作用,目前 AT 受体按其作用、结构差异等主要分为 AT1 和 AT2 受体。查阅相关文献并结合临床实践后发现,严格的血糖、血压控制(ACEI、ARB、CCB 等),并不能完全阻止 DN 的发生、发展,因此,进一步研究 Ang II 在 DN 发病中的作用具有重要意义<sup>[11]</sup>。

本研究将 DN 发病的重要致病因子 Ang II 与 SUMO 化结合起来,探讨 Ang II 及氯沙坦对大鼠肾系膜细胞 SUMO 表达的影响。研究结果提示,Ang II 可刺激肾系膜细胞 SUMO1、SUMO2/3 表达增加,并具有一定的浓度依赖性,提示 SUMO 化修饰可能参与了 DN 发病的相关信号通路(如 NF- $\kappa$ B)中重要信号蛋白的翻译后修饰,激活其靶基因的转录和翻译。相关研究表明:大鼠肝纤维化模型 SUMO1 表达增加,大鼠低氧性肺动脉高压(HPH)形成过程中 SUMO1 表达增强<sup>[12]</sup>;以及 SUMO1 siRNA 沉默肝癌细胞(SMMC-7721)SUMO1 基因表达后,肝癌细胞生长明显受到抑制<sup>[13]</sup>。提示 SUMO 作为应激诱导蛋白,广泛参与上述组织器官病变。本研究发现,Ang II 介导的 SUMO 表达增强不能被氯沙坦所逆转,据此作者推测,氯沙坦是非肽类的选择性 AT1 受体拮抗剂,竞争性的拮抗 Ang II 的生物学效应。本实验中,Ang II 可能通过作用于 AT2 受体或其他旁路途径激活 SUMO 化相关特异性修饰酶,上调 SUMO 基因和蛋白的表达。研究中作者还发现,对 Ang II 的刺激,SUMO 蛋白的表达表现出很强的时效性,各刺激组 SUMO 蛋白表达在 24 h 达在高峰后随之递减,作用 72 h 后 SUMO2/3 表达量与 NC 组相当;并且不同亚型的 SUMO 蛋白反应并不一致,如肾系膜细胞 SUMO2/3 在  $10^{-7}$  mol/L Ang II 干预组表达最强,未发现  $10^{-5}$  mol/L 的 Ang II 进一步促进 SUMO2/3 的表达,分析原因,一方面各亚型 SUMO 蛋白在细胞中动态变化和状态不尽相同,SUMO2/3 主要修饰应激蛋白,其合成与降解有较强的时效性<sup>[14]</sup>;另一方面可能与受体数量下降和受体饱和度有关<sup>[15]</sup>。

综上所述,Ang II 可呈一定的浓度依赖性地刺激大鼠肾系膜细胞 SUMO 蛋白表达,SUMO1、SUMO2/3 对 Ang II 刺激的反应不尽相同,这种改变不能被氯沙坦所阻断,可能参与 DN 的发病,其确切机制有待进一步研究。

#### 参考文献:

[1] Lomeli H, Vázquez M. Emerging roles of the SUMO pathway in development[J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68 (24):4045-4064.

- [2] Ulrich HD. Ubiquitin, SUMO, and Phosphate; How a trio of posttranslational modifiers governs protein fate[J]. Mol Cell, 2012, 47(3):335-337.
- [3] Wang YE, Pernet O, Lee B. Regulation of the nucleocytoplasmic trafficking of viral and cellular proteins by ubiquitin and small ubiquitin-related modifiers[J]. Biol Cell, 2012, 104(3):121-138.
- [4] Hannoun Z, Greenhough S, Jaffray E, et al. Post-translational modification by SUMO[J]. Toxicology, 2010, 278 (3):288-293.
- [5] Sarge KD, Park-Sarge OK. SUMO and its role in human diseases[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2011, 288(2):167-183.
- [6] Wang CY, Yang P, Li M, et al. Characterization of a negative feedback network between SUMO4 expression and NF- $\kappa$ B transcriptional activity[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 381(4):477-481.
- [7] Liu L, Omata W, Kojima I, et al. The SUMO Conjugating Enzyme Ubc9 is a Regulator of GLUT4 Turnover and Targeting to the Insulin-Responsive Storage Compartment in 3T3-L Adipocytes[J]. Diabetes, 2007, 56(20):1977-1985.
- [8] Woo CH, Shishido T, McClain C, et al. Extracellular signal-regulated kinase 5 SUMOylation antagonizes shear stress-induced anti-inflammatory response and endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells[J]. Circ Res, 2008, 102(5):538-545.
- [9] Lai KN, Leung JC, Tang SC. The renin-angiotensin system[J]. Contrib Nephrol, 2011, 170(2):135-144.
- [10] Kim JM, Uehara Y, Choi YJ, et al. Mechanism of attenuation of pro-inflammatory Ang II-induced NF- $\kappa$ B activation by genistein in the kidneys of male rats during aging[J]. Biogerontology, 2011, 12(6):537-550.
- [11] Doi T, Mima A, Matsubara T, et al. The current clinical problems for early phase of diabetic nephropathy and approach for pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2008, 13(8):82-90.
- [12] 肖志华, 郭武华, 张吉翔. SUMO-1 在实验性大鼠肝纤维化形成过程中的作用[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(14):1422-1427.
- [13] 郭武华, 袁丽华, 肖志华, 等. SUMO-1 基因 siRNA 抑制肝癌细胞 SMMC-7721 生长的研究[J]. 天津医药, 2010, 38(1):4-6.
- [14] Galanty Y, Belotserkovskaya R, Coates J, et al. RNF4, a SUMO-targeted ubiquitin E3 ligase, promotes DNA double-strand break repair[J]. Genes Dev, 2012, 26(11):1179-1195.
- [15] 樊志荣, 卢义侠, 李长龄. 肾病综合征大鼠肾小球血管紧张素 II 受体功能变化及其机制[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2003, 12(2):122-125.