

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.2014.01.013

Gremlin 基因转染对高糖环境中系膜细胞增殖的影响

黄海霞¹, 黄海英²

(1. 武警河北总队医院内二科, 石家庄 050081; 2. 石家庄市白求恩医学院药理学教研室, 石家庄 050081)

【摘要】目的:观察体外转染 Gremlin 质粒或 Gremlin siRNA 质粒对小鼠肾小球系膜细胞(mouse glomerular mesangial cells, MMCs)溴脱氧尿苷(bromodeoxyuridine, BrdU)及Ⅳ型胶原表达的影响。**方法:**将 MMCs 分为 7 组:正常对照组(NG, 5.5 mmol/L)、正常糖+甘露醇组(NG+M, 24.5 mmol/L 甘露醇)、正常糖+空质粒组(NG+V)、正常糖+Gremlin 质粒组(NG+P)/正常糖+Gremlin siRNA 质粒组(NG+gremlin si)、高糖组(HG, 30 mmol/L)、高糖+空质粒组(HG+V)以及高糖+Gremlin 质粒组(HG+P)/高糖+Gremlin siRNA 质粒组(HG+gremlin si)。在高糖刺激 24 h 后,应用 ELISA 法测定 BrdU 表达,放免法测定Ⅳ型胶原浓度。**结果:**与 NG 组相比,NG+P 组和 HG 组 BrdU 表达增强及Ⅳ型胶原浓度增加(均 $P=0.000$);与 HG 组相比,HG+P 组 BrdU 表达进一步增强及Ⅳ型胶原浓度进一步上调(均 $P=0.000$);然而,Gremlin siRNA 质粒转染可抑制高糖诱导的 BrdU 表达增强及Ⅳ型胶原浓度增加(均 $P=0.000$)。**结论:**Gremlin 基因促进 MMCs 增殖和Ⅳ型胶原聚集;Gremlin 基因可能在糖尿病肾病发病中起到重要作用。

【关键词】Gremlin;转染;细胞增殖;葡萄糖;肾小球系膜细胞

【中图分类号】R587.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-12-04

Effect of Gremlin gene transfection on mesangial cell proliferation under high concentration of glucose

Huang Haixia¹, Huang Haiying²

(1. Department of Internal Medicine, Hebei Provincial Hospital of Armed Police;

2. Teaching and Research Section of Pharmacy, Bethune Military Medical College of PLA)

【Abstract】Objective: To observe the effects of transfection of Gremlin plasmid and Gremlin siRNA plasmid in vitro on expression of mouse mesangial cells (MMCs), bromodeoxyuridine (BrdU) and collagen IV. **Methods:** Cultured MMCs were divided into 7 groups: normal glucose group (NG, 5.5 mmol/L), normal glucose plus mannitol group (NG+M, 24.5 mmol/L mannitol), normal glucose plus empty vector group (NG+V), normal glucose plus Gremlin expression plasmid group (NG+P)/normal glucose plus Gremlin siRNA plasmid group (NG+Gremlin si), high glucose group (HG, 30 mmol/L), high glucose plus empty vector group (HG+V) and high glucose plus Gremlin expression plasmid group (HG+P)/high glucose plus Gremlin siRNA plasmid group (HG+Gremlin si). Cell proliferation was examined using BrdU ELISA and accumulation of collagen IV was measured using radioimmunoassay at 24 h after high glucose stimulation. **Results:** Expression of BrdU and collagen IV in the supernatant was increased in NG+P and HG group compared with that in NG group (all $P=0.000$). Expression of BrdU and collagen IV was up-regulated in HG+P group than in HG group (all $P=0.000$). Inhibition of Gremlin with Gremlin siRNA plasmid reversed HG-induced abnormalities (increase in BrdU expression and collagen IV concentration) (all $P=0.000$). **Conclusions:** Gremlin induces cell proliferation and accumulation of collagen IV in MMCs. Gremlin plays an important role in the development of diabetic nephropathy.

【Key words】Gremlin; transfection; cell proliferation; glucose; glomerular mesangial cells

Gremlin 是半胱氨酸结超家族的成员之一,是骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)2/4/7 内源性拮抗剂,对胚胎发育、生长和细胞分化具有重要的调节作用。近年研究发现 Gremlin 与糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)的发生发展可能

有密切关系。在正常情况下, Gremlin 在成年人肾脏低表达^[1]。然而,在进展性 DN 患者肾活检标本中 Gremlin mRNA 和蛋白表达明显上调,尤其是小管间质纤维化区域,并同转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)分布相同^[1]。Zhang 等研究结果^[2]表明,抑制 Gremlin 能够通过保持 BMP-7 的活性,发挥肾脏保护作用。以上实验数据表明 Gremlin

作者介绍: 黄海霞, Email: huanghaixia6@163.com,

研究方向: 泌尿内科。

参与了 DN 发病。

系膜细胞属于肾小球的固有细胞,具有双向作用,在生理情况下,系膜细胞具有收缩、吞噬和清除异物、维持细胞外基质(extracellular matrix,ECM)正常代谢等作用;在病理情况下,系膜细胞可释放多种细胞因子,通过自分泌或旁分泌形式,引起系膜细胞增殖以及 ECM 大量积聚,造成肾小球的损害。IV型胶原是 ECM 的主要成分之一。研究证实,高糖环境促进系膜细胞增殖和 ECM 聚集,进而加速 DN 发展^[3]。但是,高糖环境下肾小球系膜细胞 Gremlin 基因对系膜细胞的影响经检索尚未有报道。本研究观察 Gremlin 质粒或 Gremlin siRNA 质粒转染肾小球系膜细胞(mouse glomerular mesangial cells,MM-Cs)对其 BrdU 及 IV 型胶原表达的影响,探讨 Gremlin 基因对系膜细胞增殖及 IV 型胶原聚集的影响,为进一步揭示 DN 发病的分子学机制及寻找早期防治方法提供实验性理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠 MMCs 株购自美国模式菌种收集中心。DMEM-F12 培养基(美国 Gibco Brl),胎牛血清(杭州四季青),兔抗 Gremlin 一抗(美国 Abcam),兔抗 β -actin 一抗(美国 Santa Cruz),Lipofectamine™ 2000(美国 Invitrogen),实时定量 PCR 试剂盒(大连 Takara)。

1.2 方法

1.2.1 质粒的构建 Gremlin 质粒(pEGFP-N1-Grem1)及其空质粒(pEGFP-N1)由上海英为信公司设计构建。Grem1 基因扩增的 PCR 引物序列如下:Grem1-F:5'-ATGAATCG-CACCGCATACACTG-3',Grem1-R:5'-ATCCAAGTCGATG-GATATGCAA-3'。Gremlin siRNA 质粒(pGenesil1.1-shGrem1)及其空质粒(pGenesil1.1)由武汉晶赛公司设计构建。其 DNA 模板引物如下:Grem1:544 GCACATCCGAAAGGAGGAA;Grem1-F:5'-CACCGCACATCCGAAAGGAGGAATTCAAGAC-GTTCCTCCTTTTCGGATGTGCTTTTTTG-3',Grem1-R:3'-AG-CTCAAAAAAGCACATCCGAAAGGAGGAACGTCTTGAATTCTCCTTTTCGGATGTGC-5'。引物结构:Eco31 I +Sense+Loop+Antisense+终止信号+Sac I +Eco31 I。Gremlin 质粒、Gremlin siRNA 质粒及其空质粒分别经体外转染系膜细胞,转染后 48 h 收集细胞总 RNA 和蛋白,采用实时定量 PCR 法检测 Gremlin mRNA 及 Western blot 法检测 Gremlin 蛋白,证实构建的 Gremlin 质粒、Gremlin siRNA 质粒及其空质粒均为有效质粒可用于实验。

1.2.2 质粒的提取 应用 Wizard Plus SV 质粒小量纯化系统(美国 Promega)按照实验操作步骤进行质粒的提取,将提取到的 Gremlin 质粒(pEGFP-N1-Grem1)及其空质粒(pEGFP-

N1)分装,应用美国 Nanodrop ND-2000 紫外分光光度计测定相应质粒 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 比值为 1.60~1.80,表明 DNA 纯度较高,记录测得的质粒浓度,-20℃冻存备用。

1.2.3 体外系膜细胞培养与分组 复苏小鼠 MMCs 后,在 5%CO₂,37℃ CO₂ 培养箱中以 DMEM-F12 培养基(培养基中含有 10%胎牛血清,100 U/ml 青霉素,100 μ g/ml 链霉素)培养细胞使其增殖,2~3 d 更换培养液 1 次,相差显微镜观察细胞生长状态,待其长满培养瓶瓶底的 80%左右,以 4×10^5 个/ml 的密度接种于 6 孔培养板中,5%CO₂,37℃ CO₂ 培养箱中培养 24 h,使细胞融合到 75%~85%。换无血清 DMEM-F12 培养基孵育 24 h,使细胞同步化。(1)为观察高糖刺激对 Gremlin 表达的影响:给予细胞高糖刺激(HG,D-葡萄糖 30 mmol/L)0、6、12、24 h 和 48 h。于各时间点末,提取细胞总 RNA 和蛋白检测 Gremlin mRNA、Gremlin 蛋白表达。实验重复 3 次。(2)为观察质粒转染对系膜细胞 BrdU 及 IV 型胶原表达的作用:将系膜细胞分为 7 组:正常对照组(NG,D-葡萄糖 5.5 mmol/L)、正常糖+甘露醇组(NG+M,24.5 mmol/L 甘露醇)、正常糖+空质粒组(NG+V,D-葡萄糖 5.5 mmol/L+pEGFP-N1/pGenesil1.1 质粒 4 μ g/孔)、正常糖+Gremlin 质粒组/正常糖+Gremlin siRNA 质粒组(NG+P/NG+gremlin si,D-葡萄糖 5.5 mmol/L+pEGFP-N1-Grem1/pGenesil1.1-shGrem1 质粒 4 μ g/孔)、高糖组(HG,D-葡萄糖 30 mmol/L)、高糖+空质粒组(HG+V,D-葡萄糖 30 mmol/L+pEGFP-N1/pGenesil1.1 质粒 4 μ g/孔)以及高糖+Gremlin 质粒组/高糖+Gremlin siRNA 质粒组(HG+P/HG+gremlin si,D-葡萄糖 30 mmol/L+pEGFP-N1-Grem1/pGenesil1.1-shGrem1 质粒 4 μ g/孔)。取每孔 4 μ g 质粒加入无血清培养基稀释,总体积 250 μ l,轻轻混匀;Lipofectamine™ 2000 轻轻混匀,取每孔 10 μ l,加入 240 μ l 无血清培养基稀释,室温孵育 5 min;将两者混合,轻轻摇匀,室温孵育 20 min;吸去细胞培养基,用不含血清的 DMEM-F12 培养基洗 3 次,加入 1.5 ml 无血清培养基,将 500 μ l 混合物加入细胞中,轻晃并混匀,使混合物于细胞表面均匀分布,置于 5%CO₂,37℃ CO₂ 培养箱培养 6 h 后,吸去培养物,加入 2 ml 含 10%胎牛血清的 DMEM-F12 培养基继续培养 24 h。根据实验分组分别给予正常糖或高糖培养基,于高糖刺激 24 h 末,收集标本,应用实时定量 PCR 法检测系膜细胞 Gremlin mRNA 表达,Western blot 法检测系膜细胞 Gremlin 蛋白表达,ELISA 法测定系膜细胞 BrdU 表达,放免法测定细胞上清 IV 型胶原浓度。实验重复 3 次。

1.2.4 实时定量 PCR 法测定 Gremlin mRNA 的表达 应用 Trizol(美国 Invitrogen)按照产品说明从系膜细胞中提取总 RNA,后用 Nanodrop ND-2000 紫外分光光度计测定并记录 RNA 浓度。取总 RNA(500 ng)应用反转录试剂盒 Prime-Script® RT reagent Kit(DRR037S,Takara,大连)按照其说明书合成 cDNA。反转录体系共 20 μ l,反转录条件:37℃ 15 min,85℃ 5 s。其后,应用实时定量 PCR 扩增试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™(DRR041A,Takara,大连)按照其说明书,在 Mx3005P 实时定量 PCR 仪(Agilent 美国)上进行实时定量 PCR 扩增反应。PCR 体系共 20 μ l,PCR 条件:预变性:95℃

30 s, 循环 40 个 (变性: 95 °C 5 s, 退火: 60 °C 30 s, 延伸: 72 °C 20 s)。应用 $\Delta\Delta Ct$ 方法计算 mRNA 浓度并得出倍数变化 (fold change)。PCR 引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成。引物序列如下: Gremlin (上游: 5'-AGCAAAAGGGTTT-CCTGAT-3', 下游: 5'-AATGGTCAGCATTCACCT-3', 扩增片断为 200 bp), 18S: (上游: 5'-ACACGGACAGGATTGACA-GA-3', 下游: 5'-GGACATCTAAGGGCATCACAG-3', 扩增片断为 238 bp)。18S 作为对照标准化相对 mRNA 的量。

1.2.5 Western blot 检测各组系膜细胞中 Gremlin 蛋白表达 每个样品取 50 μ g 总蛋白, 加 6 $\times$ SDS 加样缓冲液, 在沸水中变性 4 min, 经 10% SDS-PAGE 电泳后电转移至 PVDF 膜; 5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 PVDF 膜 2 h, 滴加一抗 (Gremlin 和 β -actin 一抗工作浓度均为 1:1 000), 4 °C 过夜。TBST 洗膜后, 加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (1:10 000), 37 °C 孵育 2 h。TBST 洗膜, 滴加 ECL 试剂, 在暗室中压片、显影、定影。检测总蛋白 Gremlin 表达以 β -actin 做为内参, 用美国 UVP 公司 LabWorks 4.5 软件对条带进行半定量分析, 读取积分光密度 (information on demand, IOD) 值, 目的蛋白条带的 IOD 值除以内参条带的 IOD 值作为最终结果进行统计分析。

1.2.6 ELISA 法测定各组系膜细胞 BrdU 表达 系膜细胞的分组及细胞刺激同前所述, 操作步骤完全按照 BrdU ELISA 试剂盒 (德国, Roche) 说明书进行。酶标仪 (美国, Bio-Rad i-Mark) 设置波长 450 nm 测定吸光值。

1.2.7 应用放免法测定各组细胞上清液 IV 型胶原浓度 系膜细胞的分组及细胞刺激同前所述, 在基本时间点, 收集各组细胞上清液, 操作步骤完全按照放射免疫试剂盒说明书进行, 应用放免法测定各组细胞的上清液中的 IV 型胶原浓度, IV 型胶原浓度用细胞总蛋白浓度进行校正。

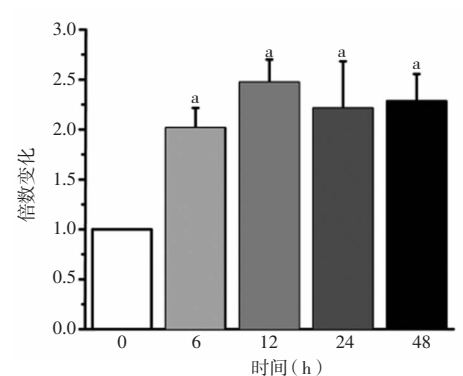
1.3 统计学处理

应用 SPSS 16.0 软件包对所有数据进行统计学处理。计量数据均用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 方差齐性检验用 Levene 法, 计量资料多样本均数间比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 SNK- q 或 LSD- t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

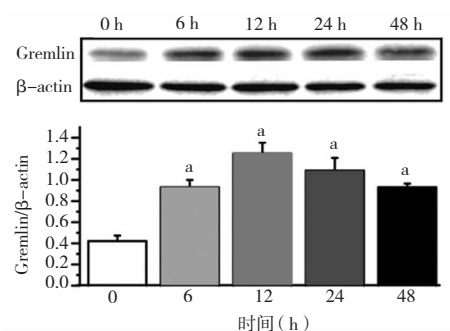
2.1 高糖促进小鼠系膜细胞 Gremlin mRNA 和蛋白的表达

高糖促进小鼠系膜细胞 Gremlin mRNA 的表达 ($F=428.758, P=0.000$, 与 NG 组比较), 从 6 h 开始, HG 组小鼠系膜细胞 Gremlin mRNA 表达水平开始升高, 达 NG 组的 (2.01 ± 0.20) 倍 ($P=0.000$), 12 h 达到高峰, 达 NG 组的 (2.47 ± 0.23) 倍 ($P=0.000$)。与实时定量 PCR 结果相一致, Western blot 结果显示高糖促进小鼠系膜细胞 Gremlin 蛋白的表达 ($F=14.199, P=0.000$, 与 NG 组比较), HG 组小鼠系膜细胞 Gremlin 蛋白表达水平从 6 h 开始升高, 12 h 达到高峰 ($P=0.000$) (图 1、图 2)。



a: 与 NG 组比较 (0 h), $P<0.05$

图 1 高糖刺激 0~48 h 系膜细胞 Gremlin mRNA 的表达
Fig.1 mRNA expression of Gremlin after high concentration of glucose stimulation for 0~48 h



a: 与 NG 组比较 (0 h), $P<0.05$

图 2 高糖刺激 0~48 h 系膜细胞 Gremlin 蛋白的表达
Fig.2 Protein expression of Gremlin after high concentration of glucose stimulation for 0~48 h

2.2 Gremlin 质粒转染系膜细胞对其 GFP、Gremlin mRNA、Gremlin 蛋白表达的影响

Gremlin 质粒 (pEGFP-N1-Grem1) 或 Gremlin siRNA 质粒 (pGenesil1.1-shGreml) 转染系膜细胞成功可诱导系膜细胞绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 表达, 通过比较分析光镜图像 (bright field image) 及相应的荧光图像 (fluorescent image) 结果显示, 质粒转染后 12 h, 系膜细胞 GFP 表达开始增加, 质粒转染后 48 h, GFP 表达达到高峰, 分别为 60% (Gremlin 质粒) 和 65% (Gremlin siRNA 质粒) 细胞转染成功。质粒转染后 48 h, NG+P 组小鼠系膜细胞 Gremlin mRNA 表达达到 NG 组的 (1.60 ± 0.09) 倍 ($P=0.000$), 而 NG+V 组小鼠系膜细胞 Gremlin mRNA 表达较 NG 组无明显变化 ($P=0.477$), Gremlin 质粒转染系膜细胞促进其 Gremlin mRNA 表达 ($F=360.457, P=0.000$, 与 NG 组比较)。与实时定量 PCR 结果相一致, Western blot 结果显示 Gremlin 质粒转染促进小鼠系膜细胞 Gremlin 蛋白的表达 ($F=6.277, P=0.034$, 与 NG 组比较)。与 NG 组相比, NG+P 组小鼠系膜细胞 Gremlin 蛋白表达明显增加 ($P=0.025$), 而 NG+V 组小鼠系膜细胞 Gremlin 蛋白表达较 NG 组无明显变化 ($P=0.865$)。质粒转染后 48 h, NG+gremlin si 组小鼠系膜细胞 Gremlin mRNA 表达降至 NG

组的(0.27 ± 0.12)倍($P=0.000$),而 NG+V 组小鼠系膜细胞 Gremlin mRNA 表达较 NG 组无明显变化($P=0.353$),Gremlin siRNA 质粒转染系膜细胞抑制其 Gremlin mRNA 表达($F=428.025$, $P=0.000$,与 NG 组比较)。与实时定量 PCR 结果相一致,Western blot 结果显示 NG+gremlin si 组抑制小鼠系膜细胞 Gremlin 蛋白的表达($F=7.284$, $P=0.025$,与 NG 组比较)。与 NG 组相比,NG+gremlin si 组小鼠系膜细胞 Gremlin 蛋白表达明显降低($P=0.016$),而 NG+V 组小鼠系膜细胞 Gremlin 蛋白表达较 NG 组无明显变化($P=0.991$)(图 3~图 8)。

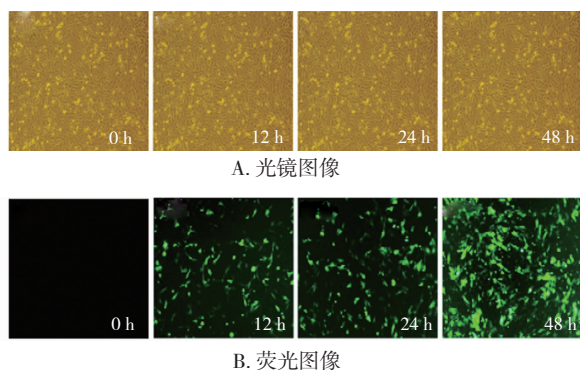
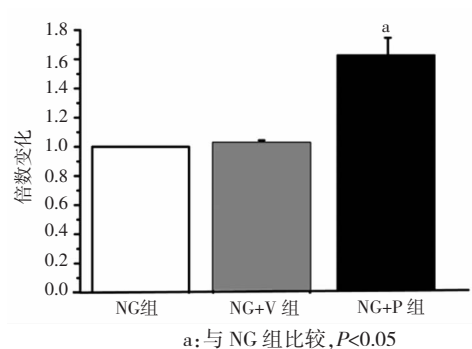


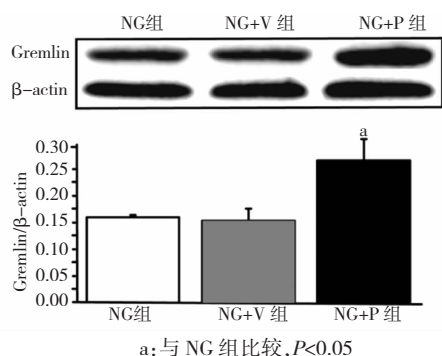
图 3 Gremlin 质粒转染 0、12、24 h 及 48 h 系膜细胞 GFP 的表达 (200 ×)

Fig.3 GFP expression at 0, 12, 24, 48 h after Gremlin plasmid transfection in MMCs (200 ×)



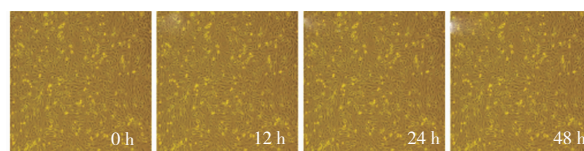
a: 与 NG 组比较, $P<0.05$

图 4 Gremlin 质粒转染后 48 h 系膜细胞 Gremlin mRNA 的表达
Fig.4 mRNA expression of Gremlin at 48 h after Gremlin plasmid transfection in MMCs

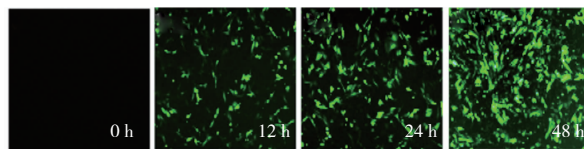


a: 与 NG 组比较, $P<0.05$

图 5 Gremlin 质粒转染后 48 h 系膜细胞 Gremlin 蛋白的表达
Fig.5 Protein expression of Gremlin at 48 h after Gremlin plasmid transfection in MMCs



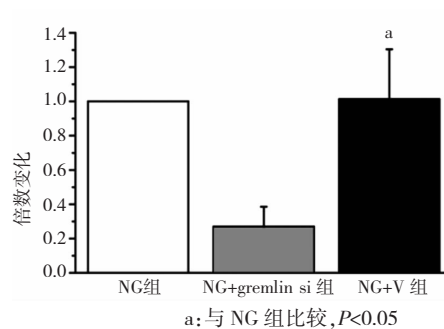
A. 光镜图像



B. 荧光图像

图 6 Gremlin siRNA 质粒转染 0、12、24 h 及 48 h 系膜细胞 GFP 的表达 (200 ×)

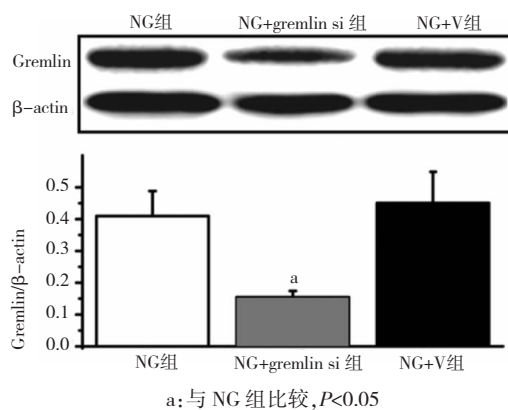
Fig.6 GFP expression at 0, 12, 24, 48 h after Gremlin siRNA plasmid transfection in MMCs (200 ×)



a: 与 NG 组比较, $P<0.05$

图 7 Gremlin siRNA 质粒转染后 48 h 系膜细胞 Gremlin mRNA 的表达

Fig.7 mRNA expression of Gremlin at 48 h after Gremlin siRNA plasmid transfection in MMCs



a: 与 NG 组比较, $P<0.05$

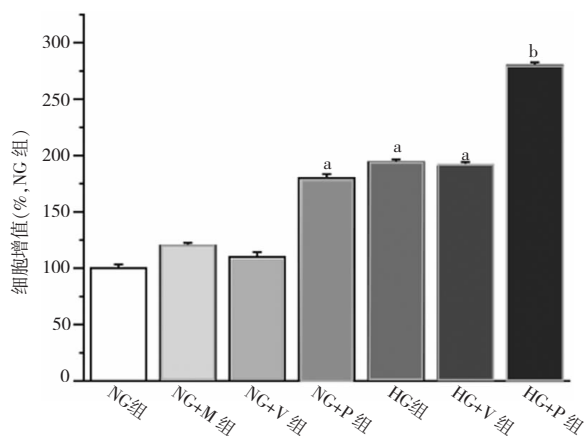
图 8 Gremlin siRNA 质粒转染后 48 h 系膜细胞 Gremlin 蛋白的表达

Fig.8 Protein expression of Gremlin at 48 h after Gremlin siRNA plasmid transfection in MMCs

2.3 Gremlin 质粒转染系膜细胞促进其 BrdU 及 IV 型胶原表达

ELISA 法结果显示, Gremlin 质粒转染系膜细胞促进其 BrdU 表达($F=1.164E3$, $P=0.000$, 与 NG 组比较), 与 NG 组相比, NG+P 组、HG 组及 HG+V 组小鼠系膜细胞 BrdU 表达明显增加(均 $P=0.000$); HG+P 组小鼠系膜细胞 BrdU 表达较 HG 组明显增加($P=0.000$), 而 HG+V 组小鼠系膜细胞 BrdU 表达

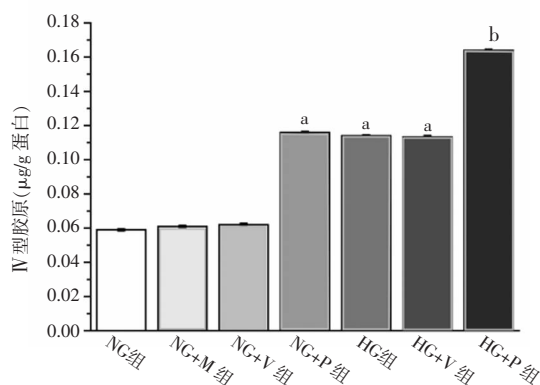
较HG组无明显变化($P=0.842$)。放免法结果显示,Gremlin 质粒转染系膜细胞促进其IV型胶原表达($F=3.464E3$, $P=0.000$,与NG组比较),NG+P组、HG组及HG+V组细胞上清液IV型胶原浓度较NG组明显增高(均 $P=0.000$);与HG组相比,HG+P组细胞上清液IV型胶原浓度明显增高($P=0.000$);而HG+V组细胞上清液IV型胶原浓度较HG组无明显变化($P=0.499$) (图9、10)。



a: 与 NG 组比较, $P<0.05$; b: 与 HG 组比较, $P<0.05$

图 9 Gremlin 质粒对系膜细胞 BrdU 表达的影响

Fig.9 Effects of Gremlin plasmid on BrdU expression in MMCs



a: 与 NG 组相比, $P<0.05$; b: 与 HG 组相比, $P<0.05$

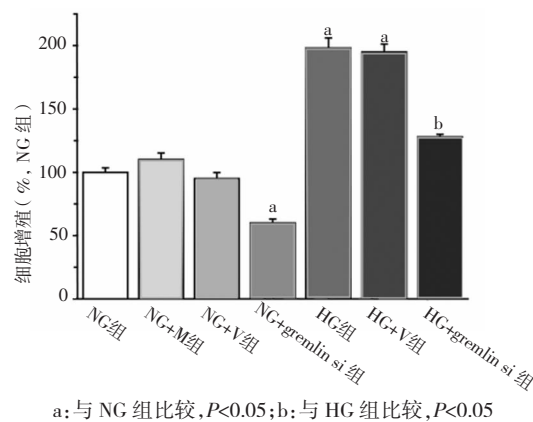
图 10 Gremlin 质粒对细胞上清液IV型胶原表达的影响

Fig.10 Effects of Gremlin plasmid on collagen IV expression in cell supernatant fluid

2.4 Gremlin siRNA 质粒转染系膜细胞抑制其 BrdU 及IV型胶原表达

ELISA 法结果显示,Gremlin siRNA 质粒转染系膜细胞抑制其 BrdU 表达($F=637.783$, $P=0.000$,与NG组比较),与NG组相比,HG组及HG+V组小鼠系膜细胞 BrdU 表达明显增加(均 $P=0.000$);HG+gremlin si组小鼠系膜细胞 BrdU 表达较HG组明显降低($P=0.000$),而HG+V组小鼠系膜细胞BrdU表达较HG组无明显变化($P=0.452$)。放免法结果显示,Gremlin siRNA 质粒转染系膜细胞抑制其IV型胶原表达($F=1.933E3$,

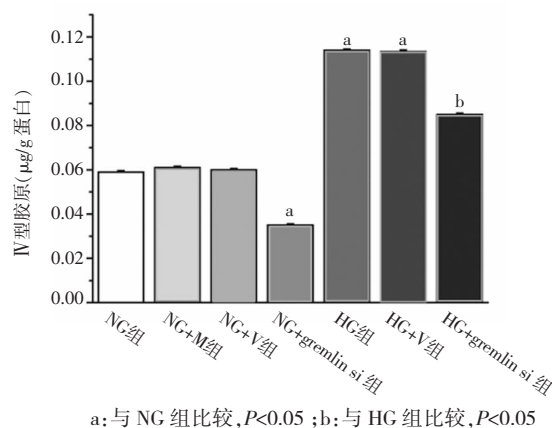
$P=0.000$,与NG组比较),HG组及HG+V组细胞上清液IV型胶原浓度较NG组明显增高(均 $P=0.000$);与HG组相比,HG+gremlin si组细胞上清液IV型胶原浓度明显降低($P=0.000$);而HG+V组细胞上清液IV型胶原浓度较HG组无明显变化($P=0.499$) (图11、12)。



a: 与 NG 组比较, $P<0.05$; b: 与 HG 组比较, $P<0.05$

图 11 Gremlin siRNA 质粒对系膜细胞 BrdU 表达的影响

Fig.11 Effects of Gremlin siRNA plasmid on BrdU expression in MMCs



a: 与 NG 组比较, $P<0.05$; b: 与 HG 组比较, $P<0.05$

图 12 Gremlin siRNA 质粒对细胞上清液IV型胶原表达的影响

Fig.12 Effects of Gremlin siRNA plasmid on collagen IV expression in cell supernatant fluid

3 讨论

DN 的主要病理改变包括系膜细胞增生及 ECM 聚集。大量实验结果证实系膜增生及 ECM 聚集是系膜细胞活化的标志,参与 DN 发病,导致肾小管间质纤维化^[4-5]。系膜细胞增生是早期肾小球肥大的主要原因,也是其后出现肾小球硬化及肾小管间质纤维化等不可逆结构改变的起点。肾脏 EMC 具有 2 方面作用,一方面,在正常情况下,它是构成肾脏组织结构框架的重要物质,参与组织生长和受损后修复;另一方面,在 DN 时,EMC 的合成可大量增加,

降解明显减少,从而导致 EMC 大量积聚并沉积在肾小球、肾小管间质等部位,造成肾脏的各级血管堵塞,引起不可逆的肾单位硬化,最终造成肾功能的衰竭。因此,系膜细胞生物学功能异常在 DN 发生发展中具有重要的作用,从分子水平上充分认识系膜细胞对于进一步探索 DN 发病机制具有重要的意义。Liu 等^[6]研究表明,megsin siRNA 通过抑制高糖环境下 MMCs 增殖及 IV 型胶原聚集,起到肾保护作用。以上实验结果证实系膜增生及 ECM 聚集参与 DN 发病,但高糖环境下 Gremlin 基因对系膜细胞的影响及作用机制尚不明确,仍需进一步实验证实。

近来体内及体外研究证实 Gremlin 在 DN 模型中上调,提示其可能参与 DN 发病。Gremlin 是 BMPs 拮抗剂家族成员之一,该家族还包括肿瘤抑制因子 DNA,头部诱导因子 cerberus 等多个成员^[7]。它们都是分泌性蛋白质,能和特定的 BMPs 成员结合,形成异二聚体,抑制 BMPs 配体与其受体结合,产生拮抗作用^[7]。体外试验高糖环境下培养人系膜细胞表达高糖(induced by high glucose,IHG)-2 基因,实验证实 IHG-2 即为人 Gremlin 基因,TGF- β 1 和周期机械压力刺激系膜细胞表达 Gremlin^[8]。McKnight 等^[9]研究发现 Gremlin 基因与 DN 之间存在遗传关系,其 T 等位基因 rs1129456 单核苷酸多态性是 DN 的一个重要的风险等位基因,推测 Gremlin 表达增多与 DN 关系密切。以上实验结果均证实,Gremlin 参与 DN 发病,但其具体机制尚不明确,仍需进一步实验证实。

本研究发现,高糖刺激上调小鼠系膜细胞 Gremlin RNA 及蛋白表达,促进系膜细胞增生及 IV 型胶原表达。刘洁等^[3]研究证实,高糖环境促进系膜细胞增殖和 ECM 聚集,与本实验研究结果一致。本课题组成功构建了 Gremlin 质粒和 Gremlin siRNA 质粒,并体外转染小鼠 MMCs,使其过表达或抑制表达 Gremlin,Gremlin RNA 过表达进一步促进高糖诱导的系膜细胞增生及 IV 型胶原表达,然而,Gremlin siRNA 质粒转染可抑制高糖诱导的系膜细胞增生及

IV 型胶原聚集。实验结果提示高糖刺激上调 Gremlin 表达。McMahon 等^[8]研究发现高糖环境下人系膜细胞 Gremlin 基因表达上调,与本实验研究结果一致。实验结果还首次提示 Gremlin 促进系膜细胞增殖及 IV 型胶原聚集。

综上所述,高糖刺激上调 Gremlin 表达,Gremlin 基因促进小鼠系膜细胞增殖及 IV 型胶原聚集,参与 DN 的病理生理过程。

参 考 文 献

- [1] Wang SN,Lapage J,Hirschberg R.Loss of tubular bone morphogenetic protein-7 in diabetic nephropathy[J].Am Soc Nephrol,2001,12(11):2392-2399.
- [2] Zhang Q,Shi Y,Wada J,et al.In vivo delivery of Gremlin siRNA plasmid reveals therapeutic potential against diabetic nephropathy by recovering bone morphogenetic protein-7[J].PLoS One,2010,5(7):e11709.
- [3] 刘洁,李英,刘茂东,等.megsin 基因转染对高糖环境中肾小球系膜细胞增殖和基质金属蛋白酶 2 及其抑制因子表达的影响[J].中华肾脏病杂志,2009,25(10):788-792.
- [4] Du J,Wang L,Liu L,et al.IFN- γ suppresses the high glucose-induced increase in TGF- β 1 and CTGF synthesis in mesangial cells[J].Pharmacol Rep,2011,63(5):1137-1144.
- [5] Mariappan MM.Signaling mechanisms in the regulation of renal matrix metabolism in diabetes[J].Exp Diabetes Res,2012(2012):749812.
- [6] Liu M,Zhang Y,Chi Y,et al.Delivery of megin siRNA plasmid reveals therapeutic potential against diabetic nephropathy by down-regulating p27(kip1) level[J].J Nephrol,2012,25(3):418-425.
- [7] Costello CM,Cahill E,Martin F,et al.Role of gremlin in the lung: development and disease[J].Am J Respir Cell Mol Biol,2010,42(5):517-523.
- [8] McMahon R,Murphy M,Clarkson M,et al.IHG-2,a mesangial cell gene induced by high glucose,is human gremlin.Regulation by extracellular glucose concentration,cyclic mechanical strain,and transforming growth factor- β 1[J].J Biol Chem,2000,275(14):9901-9904.
- [9] McKnight AJ,Patterson CC,Pettigrew KA,et al.A GREM1 gene variant associates with diabetic nephropathy[J].J Am Soc Nephrol,2010,21(5):773-781.

(责任编辑:冉明会)