



· 论 著 ·

抑制 MST1 对糖尿病肾组织表达核因子 κ -B 及 Nephlin 的影响及其意义研究

吴蔚桦¹, 张帆¹, 薛玲², 欧三桃¹, 李莹¹, 刘建¹ (1 西南医科大学附属医院肾内科, 四川泸州 646000; 2 西南医科大学附属医院泌尿外科, 四川泸州 646000)

摘要: **目的** 研究抑制 MST1 抑制对大鼠肾组织核因子 κ -B 及 Nephlin 表达的影响, 为糖尿病肾病治疗寻找新的靶点; **方法** 54 只健康 SD 大鼠随机分为 3 组: A 组 (正常对照组; n=18); B 组 (糖尿病组; n=18); C 组 (糖尿病 +MST1 抑制组, n=18), B、C 组通过单次注射链脲佐菌素 (50mg/kg) 制作 1 型糖尿病肾病模型, C 组通过注射含 MST1 的 ShRNA 的慢病毒质粒抑制 MST1 表达, 以造模后 4、8、12 周为观察时间点, 各时间点血、尿标本检测血肌酐、24 小时尿蛋白及血糖。Western blotting 检测肾组织 Nephlin 表达, 电泳迁移率检测肾组织核因子 κ -B 表达。**结果** (1) 造模后 4 周起, B、C 组血糖, 24 小时尿蛋白显著增高 ($P<0.05$); B、C 组之间比较, 相同时间点 24 小时尿蛋白 B 组显著高于 C 组 ($P<0.05$), 两组间血糖无显著差异 ($P>0.05$); (2) 造模后 4 周起, 各时间点血肌酐水平无显著性差异; (3) PAS 染色显示 B、C 组不同程度出现系膜增生, 计算系膜增生系数 (Mesangial expand index, MEI) 显示相同时间点, B 组 MEI 显著高于 C 组 ($P<0.05$); (4) 造模后 4 周起, Western blot 检测显示 B、C 组 Nephlin 表达较 A 组显著降低, 相同时间点比较 C 组高于 B 组; 电泳迁移率显示 B、C 组 κ -B 表达上升 ($P<0.05$), 相同时间点比较, B 组 κ -B 表达高于 C 组。**结论** 抑制 MST1 通路可能改善糖尿病肾病临床指标, 其机制可能与参与调控 κ -B, 保护足细胞有关。

关键词: 糖尿病 MST1 核因子 κ -B Nephlin

中图分类号: R587.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-5187 (2016) 10-006-03

The effect of MST1 inhibition on nuclear factor κ -B and Nephlin in kidney tissue of diabetic rats

Wu Weihua¹; Zhang Fan¹; Xue Ling²; Ou Santao¹; Li Ying¹; Liu Jian¹ (1 Nephrology Department, affiliated hospital of Southwest medical university, Luzhou, Sichuan, 646000; 2 Urology Department, affiliated hospital of Southwest medical university, Luzhou, Sichuan, 646000)

Abstract: **Objective** To study the effect of MST1 inhibition on the expression of nuclear factor κ -B and Nephlin in renal tissue of diabetic rats, and to find a new target for diabetic nephropathy. **Method** 54 healthy SD rats were randomly divided into three groups including group A (normal control group; n = 18); group B (diabetic group, n = 18) and group C (diabetes +MST1 inhibition group, n = 18). Diabetes was induced by a single injection of streptozotocin (STZ) (50mg / kg) in group B and C. MST1 expression was inhibited by lentiviral vector containing MST1 ShRNA in group C. At the end of 4th, 8th and 12th week after modeling were considered as time points in this study. At each time point, 24-hour urine protein (24h-UP), serum creatinine and glucose were examined with serum and urine sample. The expressions of Nephlin in diabetic renal tissue were detected with western blot. The levels of κ -B were examined with electrophoretic mobility method. **Results** (1) Since the end of 4th week after modeling, the levels of glucose and 24h-UP in group B and group C were significantly higher than group A and each time point ($P<0.05$). Between group B and group C, the level of group B was higher than group C at each time point ($P<0.05$), there was no significant difference for glucose between group B and group C for each time points; (2) there was no significant difference for creatinine among three groups; (3) It was shown by PAS stain that the pathological change of mesangial proliferation could be found in group B and group C, the level of Mesangial expand index (MEI) in group B was significant higher than the one in group C since the end of 4th week after modeling ($P<0.05$); (4) Since the end of 4th week after modeling, it was shown by western blot that the levels of Nephlin in group B and C were significant lower than the one in group A ($P<0.05$). Meanwhile, the level of Nephlin in group C was higher than the one in group B ($P<0.05$). It was shown by electrophoretic mobility that the levels of κ -B in group B and C were higher than one in group A for each time point. The levels of κ -B in group B was higher than the one in group C. **Conclusion** Inhibition of MST1 pathway may improve the clinical parameters of diabetic nephropathy, and its mechanism may be related to the regulation of κ -B pathway.

Key words: diabetes MST1 Nuclear factor- κ B Nephlin

哺乳动物不育 20 样蛋白激酶 1 (mammalian sterile 20-like kinase 1, Mst1) 是果蝇 Hippo 基因在哺乳动物中的同源基因, 编码丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶, 主要参与细胞凋亡, 组织体积调控及生长发育等众多生物学事件。新近发现, MST1 可能参与多种代谢性疾病发生。如 Ardestani A 等^[1] 研究发现 MST1 通路活化可能是糖尿病胰腺 beta 细胞凋亡及功能异常的主要原因, Del Re DP^[2] 等发现 MST1 通路活化是缺血性心脏病中心肌细胞凋亡的主要原因之一。在我们前期研究中也发现抑制 MST1 可以减少链脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ) 诱导的 1 型糖尿病大鼠模型尿蛋白水平, 其机制可能与干预 FAS/FasL 通路相关^[3]。目前, MST1 通路在糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 中的机制还不清楚, 本研究着重探讨 MST1 对于足细胞的保护及对炎症核心因子——核因子 κ -B (Nuclear factor- κ B, NF- κ B) 表达的影响, 希望进一步为全面了解 MST1 通路在 DN 发病机制中的作用提供实验依据。

1 材料与方法

· 6 ·

1.1 实验动物及分组

健康雄性 SD 大鼠 54 只, 购自西南医科大学动物中心, 体重 150-200g, 6-8 周龄, 24 小时昼夜周期饲养, 自由进食、进水, 适应性饲养 1 周后随机分为 A 组 (正常对照组, n=18), B 组 (糖尿病 + 空质粒转染, n=18), C 组 (糖尿病 +MST1 ShRNA 转染组, n=18)。以造模后 4、8、12 周为观察时间点。

1.2 实验试剂

链脲佐菌素 (购自美国 Sigma 公司); 单克隆兔抗大鼠 MST1 抗体 (购自 Abcam 公司); 多克隆兔抗大鼠磷酸化 MST1/MST2 抗体 (购自 Abcam 公司); 单克隆兔抗大鼠 Caspase-3 抗体 (购自 Abcam 公司); 单克隆兔抗大鼠 Nephlin 抗体 (购自 Abcam 公司); 非放射性 EMSA 试剂盒 (购自美国 Viagene Biotech 公司); PVDF 膜 (购自 Sigma-Aldrich 公司); 羊抗兔 IgG 二抗 (购自南京金思特公司)。其它用品均为国内优等品。

1.3 MST1 抑制方法



参考目的基因 Mst1 序列, 设计 PCR 引物扩增相应的干扰序列 (详见表 1), 慢病毒 LV3 质粒用酶切及纯化后连接 MST1shRNA, 共转染及感受态细胞制备病毒液。病毒液通过流式细胞仪计算纯度。转染方法采用开腹经肾动脉注射, 详细步骤同前述^[3], C 组注射含 MST1shRNA 的病毒液抑制 MST1 表达, B 组注射含空质粒的病毒液。各时间点检测 MST1 的 mRNA 表达评估 MST1 抑制效率。

表 1: MST1shRNA 干扰信息

正义链	5' -GATCC-(GN ₁₈)-(TTCAAGAGA)-(N ₁₈ C)-TTTTT-3'
反义链	3' -G(CN ₁₈)-(AAGTTCTCT)-(N ₁₈ G)-AAAAAACTTAA-5'
靶序列	GCCGAGCCTTCCACTACAATA

1.4 糖尿病造模方法

糖尿病造模参考本实验前期研究^[3], 链脲佐菌素溶于柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (PH: 4.2-4.5), B、C 组大鼠一次性腹腔注射链脲佐菌素 (50mg/kg) 造模。以注射后 72 小时血糖大于 16.7mmol/L 为成模型标准。A 组大鼠注射等体积空白缓冲液。

1.5 实时荧光定量 PCR 分析

各时间点大鼠肾组织行实时荧光定量 PCR 检测 MST1 表达, 以 beta-actin 为内参。查阅 MST1 及 beta-actin 序列设计扩增引物 (详见表 2)。采用 2^{-ΔΔCt} 法进行数据统计分析代表基因相对表达量。

表 2: 实时荧光定量 PCR 探针信息

MST1	5' -CACTCGACCCCTTCCACC-3' (F)
	5' -CGACT CCCTCTTG TGA-3' (R)
Beta-actin	5' -CCCATCTATGAGGGTTACGC-3' (F)
	5' -TTTAATGTCACGCACGATTTC-3' (R)

1.6 一般临床指标检测

各时间点大鼠收集 24 小时尿液标本, 静脉血标本。24 小时尿尿

本检测 24 小时尿蛋白, 血肌酐及血糖及水平。

1.7 病理检测

大鼠取肾后右肾下极行 10% 多聚甲醛固定, 常规石蜡固定行 HE、PAS 染色。采用系膜增生系数 (Mesangial expand index, MEI)^[4] 评价小球增生情况。由 2 位不清楚本研究细节的病理医生评估切片并做出病理诊断, HE 染色重点观察肾组织大体结构, PAS 切片随机选取 30 个 400 倍视野, 计算视野中肾小球增生情况: 0 分: 未见小球增生, 1 分: 见肾小球轻度增生; 2 分: 见肾小球中度增生; 3 分: 肾小球重度增生。

1.8 Western blot

各时间点大鼠肾组织检测磷酸化 -MST1、MST1、Nephrin、Caspase-3 表达。行灰度扫描并进行数据统计。

1.9 电泳迁移率

电泳迁移率检测 Nf-Kappa B 与 DNA 结合情况, 设计 Nf-kappa B 检测 DNA 探针为 5' -AGT TGA GGG GAC T TT CCC AGG C-3' ; 3' -TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5'。以灰度扫描数值进行统计分析。

2 统计学方法

数据采用 SPSS17.0 行统计分析, 数据采用均数 ± 标准差表示, 计量资料统计采用单因素方差分析, 两组间比较采用 q 检验, 以 P<0.05 认为有统计学意义。

3 结果

3.1 一般数据分析

各组大鼠入组前体重、摄水无差异。造模后 72 小时 B、C 组大鼠血糖升高。随着造模时间延长, B、C 组大鼠体重消瘦明显, 摄水增多, 尿量增加。B、C 组比较, 各时间点 24 小时尿蛋白 C 组显著低于 B 组 (P<0.05)。实时荧光定量 PCR 检测显示 B、C 组大鼠在造模后 MST1mRNA 表达上升。详见图 1

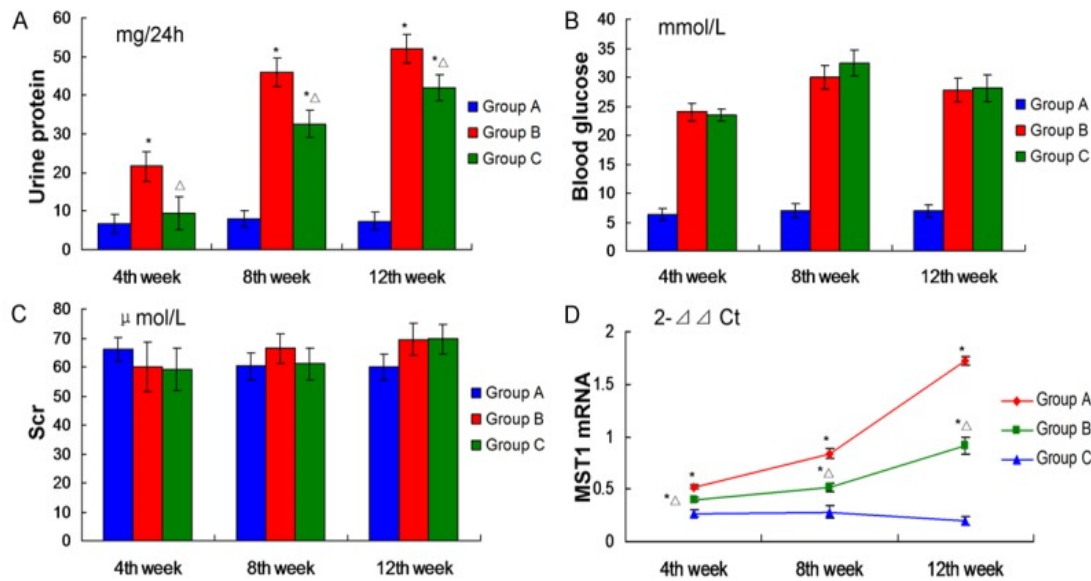


图 1: 一般指标检测

A: 24 小时尿蛋白比较; B: 血糖比较; C: 肌酐比较; D: 各组 MST1mRNA 比较。* 与 A 组比较, p<0.05; ^Δ 与 B 组比较, p<0.05

3.2 病理学检测

HE、PAS 染色显示大鼠肾组织不同程度出现肾小球增生, 但未见典型 K-W 结节表现, 肾小管细胞部分空泡变性。造模后 B、C 组 EMI 显著升高, 各时间点 C 组 EMI 显著低于 B 组 (P<0.05)。详见图 2

3.3 Nf-kappa B 表达

电泳迁移率检测显示 B、C 组 Nf-kappa B 表达上升, B、C 组之间比较。从造模后 4 周起, 各时间点 C 组显著低于 B 组 (P<0.05)。详见图 3

3.4 Western blot 检测

造模后 4 周起, 与 A 组相比, B、C 组 MST1、磷酸化 -MST1、Caspase-3 表达显著升高 (P<0.05); B、C 组 Nephrin 表达显著降低 (P<0.05)。B、C 组之间比较, 各时间点 C 组 MST1 表达无差异, 磷

酸化 -MST1 及 Caspase-3 显著低于 B 组。C 组 Nephrin 显著高于 B 组 (P<0.05)。详见图 4。

4 讨论

本研究结果发现: (1) 在高糖环境下存在 MST1 表达上升; (2) 在注射含有 MST1shRNA 的病毒质粒后, MST1 的 mRNA 表达下降, MST1 磷酸化程度降低, 提示 MST1 通路抑制有效; (3) 抑制 MST1 通路可以减少糖尿病大鼠尿蛋白水平, 保护大鼠肾功能。

MST1 是哺乳动物 Hippo 通路的主要组分之一, 经典的 Hippo 通路传导方式为 MST1 与 MST2 形成同源二聚体, 最终使磷酸化 YAP 分子启动下游信号传导^[5]。新近发现 MST1 可以通过与 Caspase-3 结合, 使自身磷酸化而活化, 导致组蛋白磷酸化修饰、MAPK、JNK 等通路活化, 并以这种方式参与多种代谢性疾病的发生^[5, 2]。本研究发现在高



糖环境下, 存在 MST1、Caspase-3 的表达增加, 提示 DN 过程存在 MST 通路的过度活化, 这与我们前期研究一致^[3]。

Nephrin 是肾小球足细胞的特征性蛋白^[6]。Nephrin 表达减少往往提示足细胞死亡及功能丢失的重要特征, 是 DN 重要的发病机制之一^[7]。在 MST1 抑制后我们发现 Nephrin 丢失程度有所减缓, 提示抑制 MST1 可能对高糖环境下足细胞损伤有保护作用, 我们推测抑制 MST1 可能减轻足细胞凋亡, 当然这需要 Tunnel 染色等直接检测凋亡的实验予以明确。本研究中发现的 MST1 抑制对 Nf-kappa B 表达的影响可以用 MST1 与 JNK、MAPK 等通路的联系解释。MST1 抑制后改善了 DN 过程中相关通路功能异常, 最终表现为 Nf-kappa B 表达下降。

DN 患者往往具有更高的心血管事件发生风险, 其机制以往研究并不清楚。而结合 MST1 在糖尿病及代谢性疾病相关研究中的发现^[1,2]以及我们的研究结果, 我们推测这可能与 MST1 在高糖环境下广泛活化相关。以抑制 MST1 过度活化为靶点, 可能为筛选新的 DN 治疗药物带来新的思路。

当然本研究也存在一定局限性: (1) 本实验中应用的动物模型更类似 1 型糖尿病, 这与人类以 2 型糖尿病为主的疾病谱存在差异; (2) 本实验中 MST1 抑制程度尚有限, 使用基因敲除动物可能有助于更好解释 MST1 在 DN 发病机制中的作用。

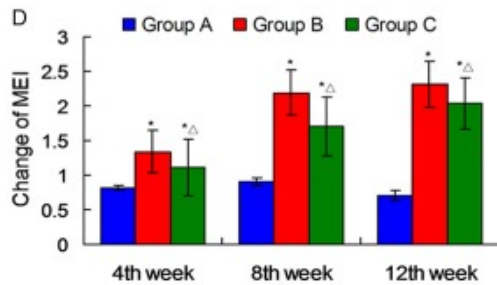


图 2: 系膜增生系数变化

* 与 A 组比较, $p < 0.05$; Δ 与 B 组比较, $p < 0.05$

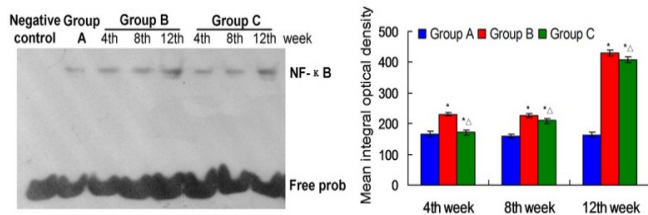


图 3: Nf-kappa B 检测

* 与 A 组比较, $p < 0.05$; Δ 与 B 组比较, $p < 0.05$

参考文献

[1]Ardestani A, Paroni F, Azizi Z, et al. MST1 is a key regulator of beta cell apoptosis and dysfunction in diabetes. *Nat Med.* 2014, 20(4):385-97.

[2]Del Re DP, Matsuda T, Zhai P, et al. Mst1 promotes cardiac myocyte apoptosis through phosphorylation and inhibition of Bcl-xL. *Mol Cell.* 2014, 54(4):639-50.

[3] 吴蔚桦; 薛玲; 欧三桃 等. 抑制 MST1 通路对糖尿病大鼠肾脏组织的保护作用及其机制研究. *中华肾脏病杂志*, 2015, 31 (11): 835-841.

[4]Wu WH, Zhang MP, Yang SJ, et al. Zhi-Long-Huo-Xue-Tong-Yu modulates mitochondrial fission through the ROCK1 pathway in mitochondrial dysfunction caused by streptozotocin-induced diabetic kidney injury. *Genet Mol Res.* 2015, 14(2):4593-606.

[5]Gomez M, Gomez V, Hergovich A. The Hippo pathway in

disease and therapy: cancer and beyond. *Clin Transl Med.* 2014, 10;3:22.

[6]Tsuchida J, Matsusaka T, Ohtsuka M, et al. Establishment of Nephrin Reporter Mice and Use for Chemical Screening. *PLoS One.* 2016, 11(6):e0157497.

[7]Chen S, Chen H, Liu Q, et al. Effect of simvastatin on the expression of nephrin, podocin, and vascular endothelial growth factor (VEGF) in podocytes of diabetic rat. *Int J Clin Exp Med.* 2015, 8(10):18225-34.

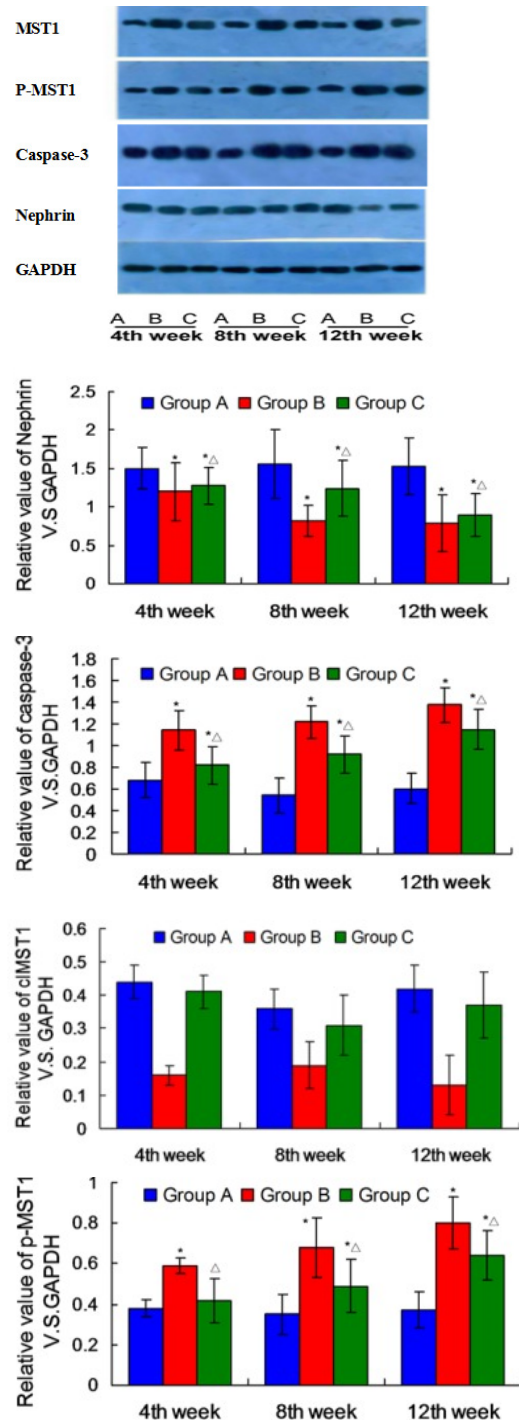


图 4: Western blot 检测结果

* 与 A 组比较, $p < 0.05$; Δ 与 B 组比较, $p < 0.05$