

· 论 著 ·

富含半胱氨酸酸性分泌型糖蛋白 2.1 肽段对体外培养人系膜细胞超微结构及其分泌细胞外基质的影响

张黎明¹, 邬碧波¹, 梅长林^{2*}, 付莉莉², 王文靖²

(1. 第二军医大学长征医院闸北分院肾内科, 上海 200070; 2. 长征医院肾内科, 解放军肾脏病研究所, 上海 200003)

[摘要] **目的:** 观察富含半胱氨酸酸性分泌型糖蛋白(SPARC)2.1 肽段对体外培养人肾小球系膜细胞(HMC)超微结构及其分泌细胞外基质的影响。**方法:** 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SPARC2.1 肽段作用 48 h、96 h 后, 倒置显微镜下观察 HMC 形态变化, 透射电镜观察其超微结构, 以正常培养的 HMC 作空白对照组。荧光定量 RT-PCR 法检测空白对照组和 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SPARC2.1 肽段作用 96 h 后 HMC 分泌细胞外基质[I 型和 IV 型胶原(Col I、Col IV)、层粘连蛋白(LN)、纤维连接蛋白(FN)]相关基因 mRNA 表达的变化; ELISA 法比较两组 HMC 培养上清中细胞外基质(Col I、Col IV、LN、FN)的蛋白含量。**结果:** 空白对照组 HMC 无明显变化; 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SPARC2.1 肽段作用 48 h 电镜可见少数 HMC 发生凋亡早期改变; 96 h 可见较多细胞发生典型凋亡改变, 电镜下可见典型的凋亡小体。与空白对照组相比, SPARC2.1 肽段作用 96 h 后, HMC 的 Col I、Col IV、FN mRNA 和蛋白含量显著下调($P < 0.01$, $P < 0.05$), LN mRNA 及其蛋白含量无明显变化。**结论:** SPARC2.1 肽段可在体外诱导 HMC 细胞的凋亡, 超微结构可见典型凋亡小体, 并抑制其分泌细胞外基质。

[关键词] 富含半胱氨酸的酸性分泌糖蛋白 2.1 肽段; 系膜细胞; 细胞凋亡; 细胞外基质

[中图分类号] R 692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)01-0036-04

Effects of secreted protein acidic and rich in cysteine peptide on change of ultramicrostructure and extracellular matrix secretion of human mesangial cells cultured *in vitro*

ZHANG Li-ming¹, WU Bi-bo¹, MEI Chang-lin^{2*}, FU Li-li², WANG Wen-jing² (1. Department of Nephrology, Zhabei Branch of Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200070, China; 2. Department of Nephrology, Changzheng Hospital, Nephrology Institute of PLA, Second Military Medical University, Shanghai 200003)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effects of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) peptide on ultramicrostructure and extracellular matrix secretion of human mesangial cells cultured *in vitro*. **Methods:** Human mesangial cells (HMC) were incubated at the presence of SPARC peptide (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 48 h and 96 h separately; HMC cultured without SPARC peptide was taken as control. The cell ultramicrostructure was observed by transmission electron microscope. Real-time fluorescent quantitative PCR (RT-PCR) was used to detect mRNA levels of collagen type I (Col I), collagen type IV (Col IV), fibronectin (FN), and laminin (LN) 96 hours after culture, and the results were compared between the 2 groups. The secreted levels of Col I, Col IV, FN, and LN protein were measured and compared by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the 2 groups. **Results:** There was no obvious change in HMC in the control group. After cultured for 48 hours, a few HMC in experimental group showed initial appearance of apoptosis; after cultured for 96 h, a great number of HMC had a typical apoptotic appearance and there were typical apoptotic bodies under electron microscope. RT-PCR showed that, compared with the control group, the experimental group had significantly decreased levels of Col I, Col IV and FN mRNA ($P < 0.05$, $P < 0.01$); ELISA results showed that the secretions of Col I, Col IV, and FN protein in the experimental group were greatly lower than those in the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** SPARC peptide can effectively induce apoptosis of human mesangial cells and down regulate the secretion of extracellular matrix *in vitro*.

[KEY WORDS] secreted protein acidic and rich in cysteine peptide; mesangial cell; apoptosis; extracellular matrix

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(1): 36-39]

系膜细胞增殖是多种肾小球疾病共同的病理改变, 系膜细胞的过度增殖以及由此引起的各种细胞因子的分泌及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的表达在肾小球硬化的发生、发展中起着重要作用。富含半胱氨酸酸性分泌型糖蛋白(secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC)可与细

胞因子、细胞膜表面蛋白及一些 ECM 蛋白相互作用而体现出抗增殖活性^[1-2]。前期研究^[3]发现

[作者简介] 张黎明, 硕士, 副主任医师。

E-mail: zhangliming@medmail.com.cn

* Corresponding author. E-mail: chlmei@publicl.sta.net.cn

SPARC 蛋白及其 2.1 肽段体外可能通过抑制人肾小球系膜细胞 (human mesangial cell, HMC) CyclinD1 表达、上调 p21^{Waf1} 蛋白, 使细胞阻滞于 G₀/G₁ 期, 从而剂量依赖性地抑制 HMC 增殖, 诱导其凋亡。但前期研究缺乏 SPARC2.1 肽段诱导体外培养 HMC 凋亡的形态学证据, 而且对 SPARC 2.1 肽段诱导后 HMC 分泌 ECM 的能力也未作深入的观察。因此, 本研究进一步观察了 SPARC2.1 肽段对体外培养 HMC 超微结构及 ECM 表达的影响, 探讨 SPARC2.1 肽段抗肾小球硬化的可能机制。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器 人系膜细胞株(东南大学附属中大医院肾内科刘必成教授惠赠), 人源性 SPARC2.1 (CQNHCKHGKVCELDENNT) 肽段(美国 Mayo Clinic, Qi Qian 教授惠赠)。DMEM/F12 (1 : 1) 培养液(美国 Gibco 公司), 新生小牛血清(杭州四季青公司), TRIzol、RNasin 及实时荧光定量 PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司), SYBR Green I 和 Calibration(美国 BioRad 公司), 逆转录酶 SS II (美国 Stratagem 公司), DEPC(上海实生细胞生物技术有限公司, 为进口分装分析纯), ELISA 试剂盒由上海森雄科技实业有限公司提供, I 型和 IV 型胶原 (Col I、Col IV)、层粘连蛋白 (LN)、纤维连接蛋白 (FN)、内参照 GAPDH 的引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 其他试剂均为 Sigma 公司产品及进口分析纯。仪器有 CO₂ 细胞培养箱 (Thermo Forma371)、超净工作台 (Class II Type A/B3 Baker Company)、倒置显微镜 (Olympus CK2)、透射电镜 (H800, Hitachi), 荧光定量 PCR 仪 (美国 BioRad iCycler), 以及电泳系统、凝胶成像系统 (上海复日科技公司), 计算机生物图像分析系统 (美国 LabWorks 软件)。

1.2 透射电镜观察细胞形态 取对数生长期的 HMC 接种于 6 孔板 (3 × 10⁵/孔), 用含 10% 小牛血清的 DMEM/F12 培养液孵育 24 h (37°C, 5% CO₂) 后, 换无血清 DMEM 培养液同步 24 h。弃上清, 加入含 50 μg/ml SPARC2.1 肽段的无血清 DMEM/F12 培养液分别作用 48 h 和 96 h, 倒置显微镜下观察细胞形态, PBS 洗涤细胞 2 次, 0.25% 胰酶消化后用 PBS 收集细胞, 加入 2% 戊二醛固定, 包埋、制片, 电镜观察并照片。以不加 SPARC2.1 肽段处理的

正常培养细胞作为空白对照组, 同样应用倒置显微镜和透射电镜观察细胞形态。

1.3 荧光定量 RT-PCR 检测 HMC 细胞外基质分泌相关基因的表达

1.3.1 引物设计 根据 GenBank 上的序列设计本研究中 ECM 分泌相关基因引物序列, 交由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 具体序列见表 1。

表 1 荧光定量 RT-PCR 引物序列

Tab 1 Primer's sequence and condition of PCR

Gene	Sequence	PCR product (bp)
Col I	F: 5'-GCC TAG CAA CAT GCC AAT C-3' R: 5'-GCA AAG TTC CCA CCG AGA C-3'	181
Col IV	F: 5'-GTG GCG GAG TTT GTG GAT-3' R: 5'-CTT GTT GGC GTA GTA GTG GC-3'	169
FN	F: 5'-CCA TCA CCC TCA CCA ACC T-3' R: 5'-CCT CCT GTC TCT CCG TAA GTG-3'	226
LN	F: 5'-CTT TGG AAG CAC CTA CTC ACC-3' R: 5'-ACG ACC GTT TAT CAA GGA CAC-3'	184
GAPDH	F: 5'-AAG GTC GGA GTC AAC GGA TT-3' R: 5'-CTG GAA GAT GGT GAT GGG ATT-3'	222

Col I: Collagen type I; Col IV: Collagen type IV; FN: Fibronectin; LN: Laminin; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

1.3.2 荧光定量 RT-PCR 检测 取对数生长期的 HMC 接种于 6 孔板 (5 × 10⁵/孔), 用含 10% 小牛血清 DMEM/F12 培养液孵育 24 h (37°C, 5% CO₂) 后, 换无血清 DMEM 培养液同步 24 h。弃上清, 分别用含 0、50 μg/ml SPARC 肽段的无血清 DMEM/F12 培养液 (空白对照组和实验组) 作用 96 h, 0.25% 胰酶消化后收集细胞。加入 1 ml TRIzol 裂解, 氯仿/异戊醇抽提细胞 RNA, 并进行 RNA 定量及纯度测定。去除基因组 DNA, 逆转录体系 50 μl, 内含总 RNA 10 μg, 40 U RNasin 1 μl, 5 U DNase I 1 μl, 在上述体系中加入 100 mmol/L dNTP 2 μl, 50 U/μl 逆转录酶 1 μl, 25°C 10 min, 42°C 1 h, 90°C 5 min。荧光定量 PCR 为 25 μl 反应体系, 内含上下游引物各 10 μmol/L, Mg²⁺ 250 mmol/L, dNTP 25 mmol/L, Taq 酶 5 U/μl, 25 × SYBR Green I, cDNA 模板、双蒸水、10⁻³ × 调校液。反应程序为 95°C 预变性 90 s, 95°C 变性 5 s, 55°C 退火 15 s, 72°C 延伸 20 s, 5 个循环后。95°C 变性 5 s, 58°C 退火 30 s, 40 个循环后达到荧光信号监测点, 95°C 变性 1 min, 58°C 退火 1 min, 之后每 10 s

增加 0.5℃ 共 70 个循环。以 GAPDH 作为内参照,用同样体系实时检测荧光强度的变化,定量扩增后得到各样本的拷贝值。

1.4 ELISA 法测定 HMC 细胞培养上清中细胞外基质蛋白含量 取对数生长期的 HMC 接种于 6 孔板(5×10⁵/孔),用含 10% 小牛血清 DMEM/F12 培养液孵育 24 h(37℃,5%CO₂)后,换无血清 DMEM 培养液同步 24 h,弃上清,分别用含 0、50 μg/ml SPARC2.1 肽段的无血清 DMEM/F12 培养液作用 96 h 后,取细胞上清液检测细胞外基质的含量(按试剂盒要求操作)。

1.5 统计学处理 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据分析采用 *t* 检验及单因素方差分析。

2 结果

2.1 HMC 透射电镜观察结果 HMC 经 50 μg/ml SPARC2.1 肽段作用 48 h、96 h 后,倒置显微镜下可见部分细胞收缩、变圆,部分由贴壁细胞变为悬浮细胞,但细胞膜完整。透射电镜观察发现,空白对照组 HMC 形态无显著变化,胞核完整,胞质饱满,富有纤毛结构(图 1A),50 μg/ml SPARC2.1 肽段作用细胞 48 h 时可见少数细胞发生染色质聚集(图 1B);96 h 则表现非常明显,电镜下可见典型的凋亡改变:细胞核边聚、染色质浓缩、核碎裂、胞质内出现沟裂和空泡、胞质脱落等(图 1C),部分细胞可见典型的凋亡小体(图 1D)。

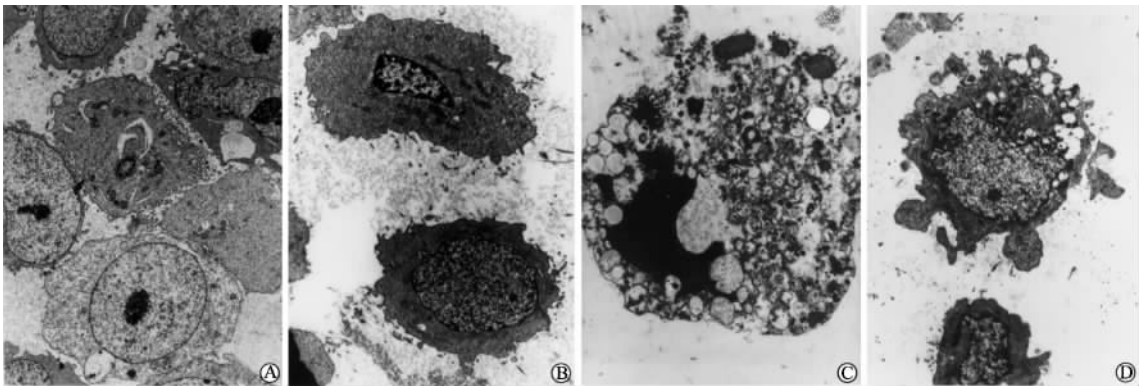


图 1 SPARC2.1 肽段作用后及空白对照组 HMC 超微结构的比较

Fig 1 Ultrastructural changes of HMC after 50 μg/ml SPARC peptide treatment (EM, ×1 000)

A:Control (96 h);B:50 μg/ml SPARC peptide (48 h);C,D:Cell nuclear concentration,chromatin aggregation(C) and typical apoptotic body(D) after treated with 50 μg/ml SPARC peptide for 96 h

2.2 SPARC2.1 肽段对 HMC ECM 分泌相关基因表达的影响 与空白对照组相比,50 μg/ml SPARC2.1 肽段作用 96 h 后,HMC Col I、Col IV、

FN mRNA 的表达明显下调($P < 0.01, P < 0.05$); LN mRNA 无明显变化(表 2)。

表 2 SPARC 2.1 肽段处理 HMC 96 h 后 ECM 相关基因和分泌蛋白表达结果

Tab 2 Effects of SPARC peptide on expression of extracellular matrix mRNA and secretion of HMC protein after treatment for 96 h

($n=3, \bar{x} \pm s$)

ECM	mRNA(copies/million GAPDH)		Protein($\rho_B/pg \cdot ml^{-1}$)	
	Control	50 μg/ml SPARC peptide	Control	50 μg/ml SPARC peptide
Col I	$(1.57 \pm 0.08) \times 10^2$	$(8.59 \pm 0.13) \times 10^{**}$	67.62 ± 8.18	45.13 ± 7.19**
Col IV	$(6.26 \pm 0.39) \times 10^5$	$(3.11 \pm 0.31) \times 10^{5*}$	58.16 ± 7.81	42.56 ± 6.92*
FN	$(1.16 \pm 0.04) \times 10^4$	$(5.79 \pm 0.22) \times 10^{3**}$	49.98 ± 6.39	33.36 ± 5.84**
LN	$(2.68 \pm 0.40) \times 10^3$	$(2.33 \pm 0.37) \times 10^3$	35.76 ± 4.48	32.92 ± 4.39

ECM; Extracellular matrix; Col I: Collagen type I; Col IV: Collagen type IV; FN; Fibronectin; LN; Laminin. * $P < 0.05, ** P < 0.01$ vs control group

2.3 SPARC2.1肽段对HMC分泌ECM蛋白的影响 与空白对照组相比,经50 $\mu\text{g/ml}$ SPARC2.1肽段作用96 h后,HMC培养上清中Col I、Col IV、FN蛋白的含量明显下降($P<0.01$, $P<0.05$),LN无显著变化(表2)。

3 讨论

系膜增生性肾小球肾炎是我国原发性肾小球疾病中最常见的病理类型^[4],肾小球系膜增殖及细胞外基质产生增加是导致肾小球硬化的主要原因,如何有效防治系膜增殖及ECM的积聚,对延缓肾小球硬化的发生、发展起到关键性作用^[5]。SPARC又名骨结合素或BM-40,该蛋白可由多种细胞分泌,尤其是增殖明显的细胞,通过与ECM的相互作用表现出多种生物学活性,其中最主要的是抑制增殖和抗黏附作用^[6-8]。近年来研究^[9-10]表明,SPARC与系膜增生性肾小球肾炎和糖尿病肾病等多种肾脏疾病有关。一些研究^[11]表明SPARC能够抑制原代大鼠系膜细胞的增殖,并呈剂量依赖性,最高抑制率可达50%。

SPARC2.1肽段为55~74位氨基酸残基,位于位区II。前期研究^[3]发现SPARC2.1肽段剂量依赖性抑制HMC的增殖;明显影响细胞周期,使G₀/G₁期细胞增多,S期细胞减少;抑制CyclinD1蛋白表达,上调p21^{Waf1}蛋白表达。这提示SPARC2.1肽段可能通过抑制CyclinD1,上调p21^{Waf1},阻止细胞通过G₁/S调控点,从而抑制HMC增殖,诱导细胞凋亡。本研究进一步应用电镜观察SPARC2.1肽段作用后HMC形态的变化,结果发现SPARC2.1肽段作用96 h,HMC细胞出现典型凋亡表现,证实SPARC2.1肽段可诱导HMC凋亡。

ECM的大量积聚是肾小球硬化的重要因素,系膜细胞是肾小球内产生细胞外基质的重要来源。正常生理情况下,ECM的合成与降解保持在一种动态平衡之中;但系膜细胞增殖后会打破平衡,导致ECM大量积聚^[5]。本研究结果表明,HMC经50 $\mu\text{g/ml}$ SPARC2.1肽段作用96 h后,HMC分泌的基质蛋白Col I、Col IV、FN明显减少,相关基因的表达明显低于空白对照组。这提示SPARC2.1肽段对ECM的产生具有抑制作用。

本研究在以往研究^[3]的基础上再次证实

SPARC2.1肽段体外能抑制HMC增殖,促进细胞凋亡。此外,本研究还发现其能抑制HMC分泌ECM,在系膜增生性肾小球肾炎及肾小球硬化的研究及治疗中有潜在的应用价值,但仍有待体内研究进一步证实。

[参考文献]

- [1] Yan Q, Sage E H. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions[J]. *J Histochem Cytochem*, 1999,47: 1495-1506.
- [2] Bradshaw A D, Sage E H. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury[J]. *J Clin Invest*, 2001,107: 1049-1054.
- [3] 郭碧波, 张黎明, 付莉莉, 等. 富含半胱氨酸酸性分泌糖蛋白及其肽段对人系膜细胞增殖和凋亡的作用[J]. *中华肾脏病杂志*, 2006,22:215-220.
- [4] Li L S, Liu Z H. Epidemiologic data of renal diseases from a single unit in China; analysis based on 13 519 renal biopsies[J]. *Kidney Int*, 2004,66: 920-923.
- [5] Johnson R J, Hurtado A, Merszei J, et al. Hypothesis: dysregulation of immunologic balance resulting from hygiene and socio-economic factors may influence the epidemiology and cause of glomerulonephritis worldwide[J]. *Am J Kidney Dis*, 2003,42: 575-581.
- [6] Kupprion C, Motamed K, Sage E H. SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells[J]. *J Biol Chem*, 1998,273: 29635-29640.
- [7] Yiu G K, Chan W Y, Ng S W, et al. SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells[J]. *Am J Pathol*, 2001,159: 609-622.
- [8] Puolakkainen P A, Brekken R A, Muneer S, et al. Enhanced growth of pancreatic tumors in SPARC-null mice is associated with decreased deposition of extracellular matrix and reduced tumor cell apoptosis[J]. *Mol Cancer Res*, 2004,2: 215-224.
- [9] Francki A, Sage E H. SPARC and the kidney glomerulus: matricellular proteins exhibit diverse functions under normal and pathological conditions[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2001,11: 32-37.
- [10] 王文靖, 梅长林. SPARC的研究进展[J]. *中华临床医药杂志(北京)*, 2004,5: 65-68.
- [11] Bradshaw A D, Francki A, Motamed K, et al. Primary mesenchymal cells isolated from SPARC-null mice exhibit altered morphology and rates of proliferation[J]. *Mol Biol Cell*, 1999,10: 1569-1579.

[收稿日期] 2006-10-19

[修回日期] 2006-12-18

[本文编辑] 贾泽军