

· 基础研究 ·

血管紧张素 II 诱导肾小球 IQGAP1 表达改变及细胞凋亡

刘以鹏 梁伟 杨倩 陈斌 杨红霞 丁国华

【摘要】 目的 研究血管紧张素 II (Ang II) 输注对大鼠肾小球 ras GTP 酶活化蛋白 (IQGAP1) 表达及细胞凋亡的影响, 探讨 IQGAP1 在 Ang II 诱导肾小球细胞凋亡中的作用。方法 36 只雄性 Wistar 大鼠按随机数字法分为正常对照组、生理盐水输注组和 Ang II 输注组, 每隔 7 d 测量大鼠血压及尿蛋白量。分别于实验第 14 天、第 28 天处死动物取肾, PAS 染色观察肾组织病理学改变; 免疫组化、免疫荧光法观察 IQGAP1 在肾小球的表达及分布; Western 印迹法检测肾组织 IQGAP1、半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 及细胞外调节蛋白激酶 1/2 (ERK1/2) 蛋白表达; TUNEL 法检测肾小球细胞凋亡。结果 Ang II 输注组大鼠血压升高, 实验第 14 天达峰值并维持在较高水平; 第 7 天出现蛋白尿, 且随着时间的延长尿蛋白量持续增加, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Ang II 输注组出现轻度系膜细胞增殖和系膜基质增加, 生理盐水输注组和正常对照组均未见明显病理改变。TUNEL 检测结果显示, Ang II 输注后肾小球细胞凋亡显著增加; Western 印迹发现, Ang II 输注组大鼠肾小球 caspase-3 活化明显增加, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。正常对照组 IQGAP1 呈低水平表达并沿毛细血管祥线性分布, Ang II 输注后 IQGAP1 表达量显著增加 ($P < 0.05$), 且其蛋白表达量与 caspase-3 活化量呈正相关 ($r = 0.689, P < 0.05$)。与对照组比较, Ang II 输注组磷酸化的 ERK1/2 (p-ERK1/2) 表达量显著增加 ($P < 0.05$), 且与 IQGAP1 蛋白表达呈正相关 ($r = 0.658, P < 0.05$)。结论 IQGAP1 表达上调可能通过激活 ERK1/2 信号通路参与 Ang II 诱导肾小球细胞凋亡的病理过程。

【关键词】 ras GTP 酶激活蛋白质类; 血管紧张素 II; 肾小球; 细胞凋亡; 细胞外调节蛋白激酶 1/2

Angiotensin II promotes the expression of glomerular IQGAP1 and apoptosis of glomerular cells

LIU Yi-peng, LIANG Wei, YANG Qian, CHEN Cheng, YANG Hong-xia, DING Guo-hua. Division of Nephrology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: DING Guo-hua, Email: ghxding@gmail.com

【Abstract】 **Objective** To evaluate the effects of Ang II on the expression of IQ domain GTPase-activating protein1 (IQGAP1) and apoptosis of glomerular cells, and to explore the role of IQGAP1 in Ang II-induced apoptosis of glomerular cells. **Methods** Thirty-six male Wistar rats were randomly assigned to receive either saline or Ang II by osmotic mini-pump, or be used as normal control. The systolic blood pressure and proteinuria were measured at day 7, 14, 21, 28. After the animals were sacrificed at day 14, 28 respectively, the kidneys were collected. Renal pathological change, glomerular cell apoptosis were observed. The expression of glomerular IQGAP1 was assessed by immunohistochemistry, immunofluorescence and Western blotting. The activation of caspase-3 and

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2013.01.006

基金项目: 国家自然科学基金 (81100478, 30871167, 30900688); 中央高校基本科研业务费专项资金 (111031)

作者单位: 430060 武汉大学人民医院肾内科

通信作者: 丁国华, Email: ghxding@gmail.com

phosphorylation of extracellular regulated protein kinases 1 and 2 (ERK1/2) were determined by Western blotting. **Results** Ang II-infused rats developed significant hypertension and marked proteinuria. Mild glomerular mesangial cell proliferation and mesangial matrix increase were also observed in Ang II-infused rats. The number of apoptotic glomerular cells in Ang II-infused rats was significantly more than that in normal control ($P < 0.05$). The expression of IQGAP1 in glomeruli distributed linearly along the capillary loops. Ang II infusion up-regulated the expression of glomerular IQGAP1, which had a significantly positive correlation with activation of caspase-3 ($r = 0.689$, $P < 0.05$) and phosphorylation of ERK1/2 ($r = 0.658$, $P < 0.05$). **Conclusion** The enhanced expression of IQGAP1 may be involved in Ang II-induced glomerular cells apoptosis via activation of ERK1/2 signaling pathway.

【Key words】 Ras GTPase-activating proteins; Angiotensin II; Glomerulus; Apoptosis; ERK1/2

肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)的激活参与多种肾脏病的发生与发展^[1],而血管紧张素 II (Ang II) 作为其主要的效应分子,可通过多种途径导致肾小球的损害^[2]。有研究发现,Ang II 可诱导肾小球细胞凋亡继而影响其正常的结构和功能^[3-4]。我们的前期研究也证实了上述结果,但其具体的作用机制尚未完全清楚^[5]。ras GTP 酶活化蛋白(IQGAP1)是一种含有多个蛋白结合域的支架蛋白,近期研究发现 IQGAP1 在调节细胞凋亡、细胞黏附、迁移及维持细胞形态等诸多过程中发挥重要作用^[6-8]; Sato 等^[9]发现其可以通过自身磷酸化水平的改变介导 HT1080 细胞凋亡; Hong 等^[9]发现 IQGAP1 参与了地塞米松诱导的 MC3T3-E1 细胞凋亡。IQGAP1 是否参与 Ang II 诱导的肾小球细胞凋亡尚未见报道,我们通过建立 Ang II 输注大鼠模型,观察 IQGAP1 在肾小球内的表达及分布,初步探讨 IQGAP1 在 Ang II 诱导的肾小球细胞凋亡中的作用。

材料与方法

1. 动物模型的制备及分组: 36 只 SPF 级雄性 Wistar 大鼠, 体质量 (150 ± 10) g, 购自湖北省疾病预防控制中心。动物按随机数字法分为 3 组: (1) Ang II 输注组 12 只, 皮下植入含 Ang II 的渗透性微量泵(美国 Sigma-Aldrich), Ang II 输注速度为 $400 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。(2) 生理盐水输注组 12 只, 等量生理盐水代替 Ang II, 余与 Ang II 输注组相同。(3) 正常对照组 12 只, 不行置泵手术。分别于造模后第 7、14、21、28 天, 测量各组大鼠的尾动脉压及 24 h 尿蛋白量; 分别于实验第 14、28 天处死各组大鼠, 取右肾, 行 PAS、免疫组化、免疫荧光及 TUNEL 等检

查, 同时取左肾并分离肾小球行 Western 印迹检测。

2. 尾动脉压及尿蛋白的检测: 采用 RBP-1 型尾套式大鼠血压计(中日友好医院)测量大鼠清醒状态下尾动脉收缩压, 测量 3 次取均值; 采用磺基水杨酸法测定 24 h 尿蛋白量。

3. 肾组织病理学检查: 肾组织经 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋、切片, 行 PAS 染色, 显微镜下观察并照相。

4. TUNEL 法检测肾小球细胞凋亡: 石蜡切片脱蜡水化, 经蛋白酶 K 37°C 作用 30 min, 3% 过氧化氢溶液室温孵育 10 min 后, 加入末端核苷酸转移酶(TdT)和生物素标记的脱氧三磷酸鸟苷(dUTP)(美国 R & D) 37°C 孵育 1 h, 辣根过氧化物酶标记链霉亲和素室温孵育 30 min, DAB 显色, 苏木素复染, 封片后显微镜下观察并摄片。每个肾脏观察 30 个肾小球切面, 胞核呈棕褐色染色为 TUNEL 阳性细胞, 统计阳性细胞数, 取其均值。

5. 免疫组化观察肾小球内 IQGAP1 的表达及分布: 肾组织石蜡切片, 常规脱蜡、水化, 0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液高压修复 8 min, 正常山羊血清封闭 20 min, IQGAP1 兔多克隆抗体(1:100, 美国 Santa Cruz) 4°C 过夜, 生物素标记山羊抗兔 IgG 37°C 孵育 30 min, 经辣根酶标记链霉卵白素工作液处理后, DAB 显色, 苏木素复染, 封片后显微镜下观察并摄片。

6. 免疫荧光观察肾小球内 IQGAP1 的表达及分布: $5 \mu\text{m}$ 厚的肾组织冰冻切片经 5% 牛血清白蛋白 37°C 封闭 30 min, IQGAP1 兔多克隆抗体(1:50, 美国 Santa Cruz) 4°C 过夜, FITC 标记的山羊抗兔 IgG (1:100, 美国 Thermo Scientific) 37°C 避光孵育 90 min, 封片后荧光显微镜下观察、照相。

7. 肾小球的分离：过筛法分离肾小球。取部分左肾组织分离肾皮质，依次通过孔径分别为 80 目、120 目、200 目的 3 层不锈钢筛网，Hank 液洗涤 1 次，收集网上肾小球，提取蛋白质，用于后续 Western 印迹。

8. Western 印迹：用含有 Cocktail (美国 Sigma-Aldrich) 的细胞裂解液 (0.1% SDS, 0.5% 脱氧胆酸钠, 1% Triton X-100, 150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris, pH 7.5, 5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF) 裂解后低温离心取上清，BCA 法测定蛋白浓度。取 50 μ g 蛋白，10% SDS-PAGE 电泳，湿转至硝酸纤维素膜。一抗分别为 IQGAP1 兔多克隆抗体 (1:200, 美国 Santa Cruz)、ERK1/2 兔单克隆抗体、磷酸化 (p) ERK1/2 兔单克隆抗体 (1:500, 美国 CST)、caspase-3 兔单克隆抗体 (1:1000, 美国 CST)、 β -actin 鼠单克隆抗体 (1:1000, 美国 Santa Cruz)，辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:10 000, 美国 CST)，ECL 反应，X 线胶片曝光，ZF-258 全自动凝胶成像分析系统进行积分吸光度 (A) 分析。

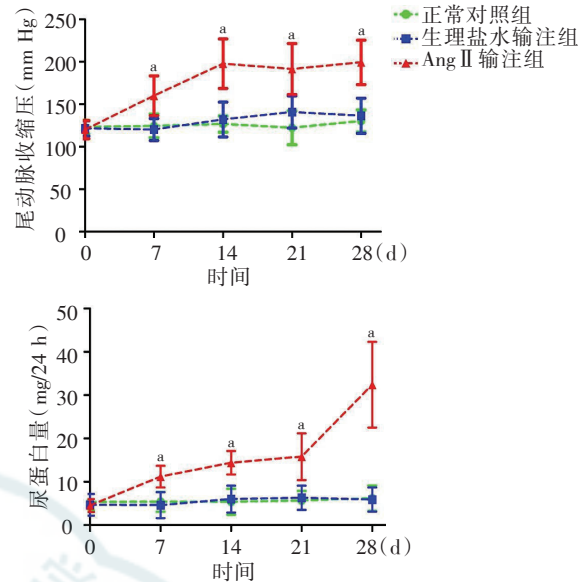
9. 统计学分析：采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，参数资料采用单因素方差分析，组间比较采用 LSD 法，两变量之间的相关性采用偏相关分析。

结 果

1. 各组大鼠血压、24 h 尿蛋白的变化：术后第 7 天起，Ang II 输注组血压高于正常对照组，差异有统计学意义 [(160.1 \pm 23.3) mm Hg 比 (124.5 \pm 14) mm Hg, $P < 0.05$]；第 14 天达高峰并维持在较高水平；术后第 7 天，Ang II 输注组 24 h 尿蛋白量高于正常对照组，差异有统计学意义 [(11.2 \pm 2.5) mg 比 (5.4 \pm 2.3) mg, $P < 0.05$]，并持续增加。生理盐水输注组与正常对照组之间血压、尿蛋白量间差异无统计学意义。见图 1。

2. 肾组织病理学改变：实验第 14 天，Ang II 输注组大鼠肾小球出现轻度系膜增生；第 28 天出现系膜细胞增殖、系膜基质增加等病理改变。生理盐水输注组、正常对照组肾组织均未见明显病理改变。见图 2。

3. TUNEL 检测肾小球细胞凋亡：实验第 14 天，Ang II 输注组大鼠肾小球即可见明显的细胞凋亡，与正常对照组差异有统计学意义 [(14.89 \pm



注：与同一时间点正常对照组比较，^a $P < 0.05$

图 1 各组大鼠不同时间点血压、蛋白尿量的变化

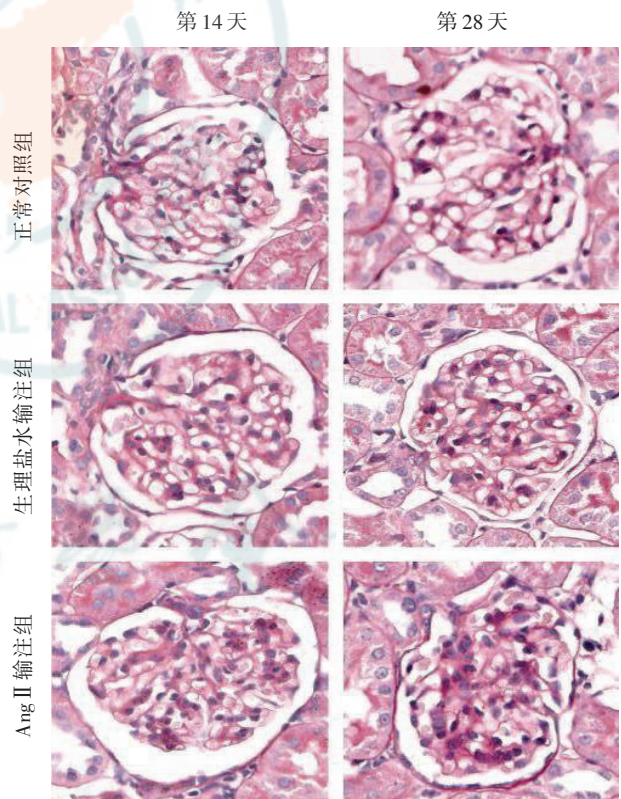
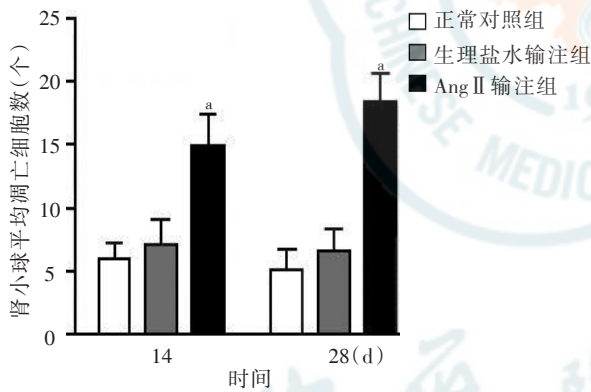
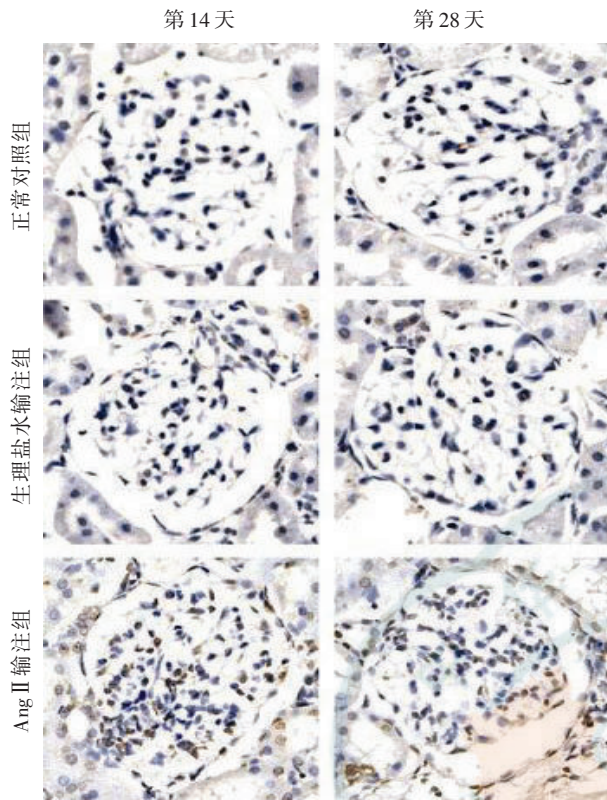


图 2 各组大鼠肾组织病理改变 (PAS $\times 400$)

2.52) 个/肾小球切面 比 (6.07 \pm 1.23) 个/肾小球切面, $P < 0.05$]；实验第 28 天，相对于正常对照组，Ang II 输注组凋亡更加明显 [(18.35 \pm 2.34) 个/肾小球切面 比 (5.14 \pm 1.62) 个/肾小球切面, $P < 0.05$]。生理盐水输注组、正常对照组均未见明显的细胞



注:与同一时间点正常对照组比较,^a $P < 0.05$

图 3 各组大鼠肾小球细胞凋亡情况(TUNEL ×400)

凋亡。见图 3。

4. 免疫组化观察肾小球内 IQGAP1 的表达及分布: 正常对照组、生理盐水输注组肾小球均可见少量 IQGAP1 表达; Ang II 输注第 14 天, 肾小球 IQGAP1 表达明显增强, 第 28 天 IQGAP1 表达进一步增强。见图 4。

5. 免疫荧光观察肾小球内 IQGAP1 的表达及分布: 免疫荧光结果可见 IQGAP1 在肾小球沿毛细血管祥线性分布, 正常对照组、生理盐水输注组均有少量表达, Ang II 输注后 IQGAP1 表达增强, 且随时间的延续 IQGAP1 表达逐渐增高。见

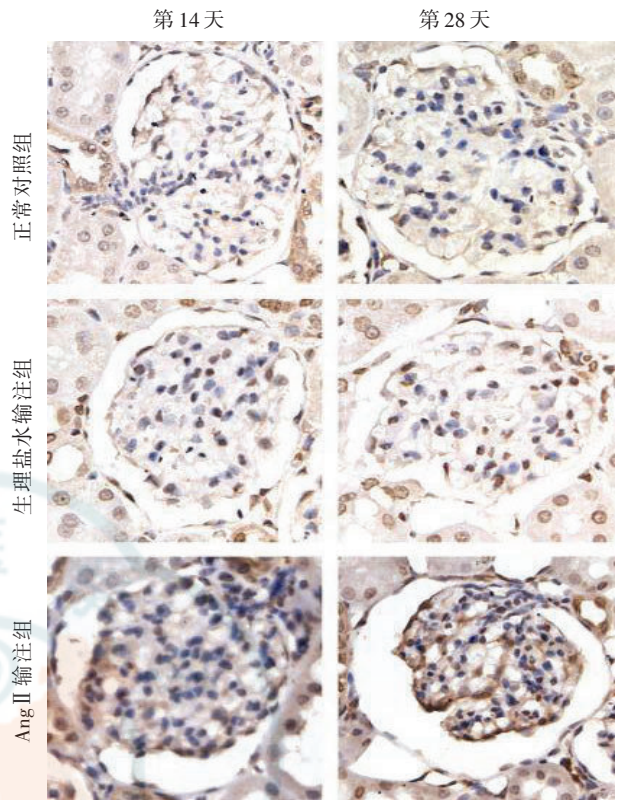


图 4 各组大鼠肾小球 IQGAP1 的表达及分布(免疫组化 ×400)

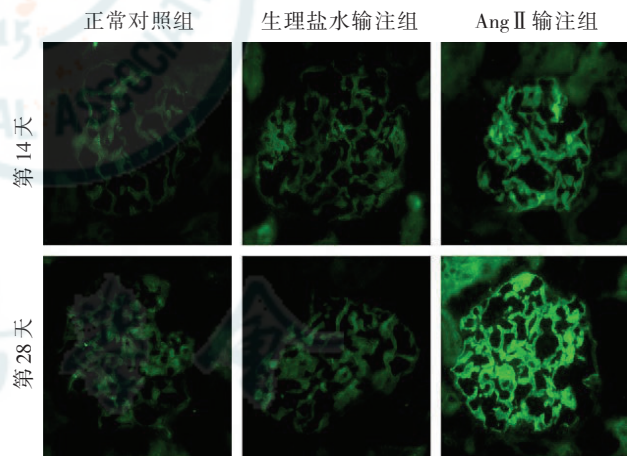


图 5 各组大鼠肾小球 IQGAP1 的表达与分布(免疫荧光 ×400)

图 5。

6. Western 印迹检测肾小球 IQGAP1、caspase-3 蛋白表达: Ang II 输注第 14 天, IQGAP1 以及活化的 caspase-3 (cleaved caspase-3, 17/19 亚基) 均高于正常对照组, 差异有统计学意义 (0.55 ± 0.14 比 0.25 ± 0.05 , $P < 0.05$; 0.29 ± 0.05 比 0.04 ± 0.01 , $P < 0.05$); 输注第 28 天, 其表达相对于正常对照组进一步增加, 差异有统计学意义 (0.77 ± 0.19 比 0.35 ± 0.08 , $P < 0.05$; 0.39 ± 0.06 比 0.08 ± 0.02 , $P < 0.05$)。

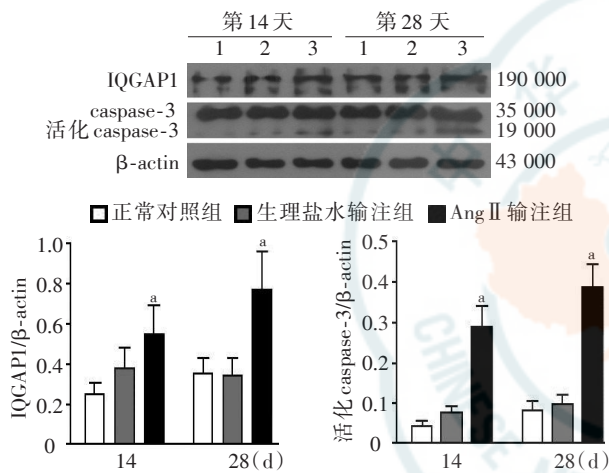
生理盐水输注组两种蛋白表达量在实验第 14 天、第 28 天均未见明显变化。相关性分析显示, IQGAP1 与活化的 caspase-3 表达量呈正相关($r = 0.689, P < 0.05$)。见图 6。

7. Western 印迹观察肾小球 p-ERK1/2 蛋白量的变化: Ang II 输注第 14 天和第 28 天 p-ERK1/2 蛋白表达量均高于正常对照组, 差异有统计学意义 (1.11 ± 0.16 比 $0.82 \pm 0.12, P < 0.05$; 1.16 ± 0.17 比 $0.86 \pm 0.12, P < 0.05$), 生理盐水输注组未见明显变化。相关性分析显示, p-ERK1/2 与 IQGAP1 蛋白表达量之间呈正相关($r = 0.658, P < 0.05$)。见图 7。

讨 论

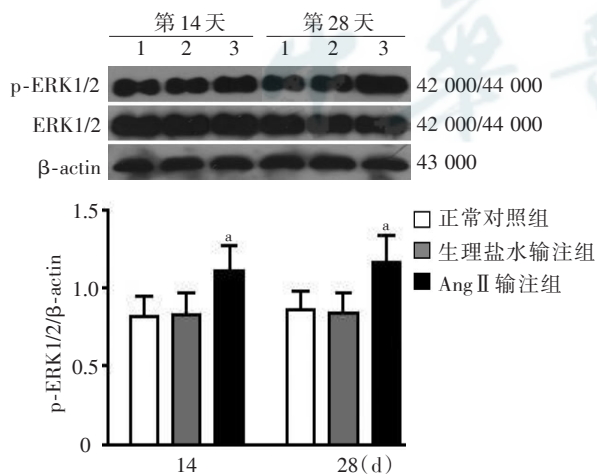
Ang II 输注动物模型是肾脏病实验常用的模型之一, 通过 Ang II 的缓慢释放, 可以模拟病理状态下 Ang II 升高所致的组织器官结构和功能的改变^[10]。Ang II 导致肾脏损害的机制极为复杂, 目前还未完全清楚。近期有研究发现, Ang II 可通过诱导肾小球细胞凋亡而发挥其对肾脏的损伤作用^[3-4], 但 Ang II 引起凋亡的机制仍有待进一步研究。本实验结果显示 Ang II 输注后大鼠不但有血压、蛋白尿以及肾脏病理学的改变, 且 TUNEL 结果显示, Ang II 输注可致肾小球内固有细胞凋亡(主要为足细胞, 同时可见内皮细胞凋亡), 肾小球分离后 Western 印迹也表明, 作为凋亡关键执行分子和指示分子的 caspase-3 的活化也明显增加, 并随刺激时间的延长, 增加更为明显^[11]。我们的前期研究已证实 Ang II 输注可以时间和浓度依赖的方式导致足细胞凋亡^[5, 12], 而内皮细胞作为肾小球滤过屏障的重要组成部分, 也是 Ang II 致肾脏损伤的靶细胞之一^[13]。

IQGAP 是一个含有多个蛋白结合域的支架蛋白家族, 因其含有类似于 RasGAP 催化域序列和 4 个可与钙调蛋白相互作用的 IQ 基序而得名。IQGAP 在哺乳动物中现已发现 3 个亚型 IQGAP1-3, 其中 IQGAP1 是分布最为广泛和研究最为深入的亚型。其内含有多个特殊蛋白结合域, 能与众多靶分子结合, 包括 Rac1/Cdc42、ERK1/2、E-cadherin、CLIP-170 等, 并通过与其相互作用, 在细胞黏附、极化、迁移、肿瘤转移、增殖、凋亡、分化等众多生理病理过程中发挥重要作用^[14]。既往研究发现, 在 RNA 聚合酶 I 抑制剂 Ecyd 诱导人类肿瘤细胞系 HT1080 凋亡中, IQGAP1 可以通过自身磷酸化水平的增高活化 c-Jun 氨基末端激酶信号通路进而介导凋亡的发生^[8]。Hong 等^[9]的研究表明, 在地塞米松诱导 MC3T3-E1 细胞凋亡过程中, 伴随有 IQGAP1 蛋白表达水平的增高, 并推测其可能在凋亡的发生中发挥重要作用。我们发现 Ang II 可诱导肾小球 IQGAP1 蛋白表达增加, IQGAP1 的表达量与 caspase-3 活化量呈正相关, 提示 IQGAP1 可能通过自身蛋白表达水平的增高参与 Ang II 诱导肾小球细胞凋亡的病理过程, 但其分子机制仍需进一步研究。



注: 1: 正常对照组; 2: 生理盐水输注组; 3: Ang II 输注组; 与同一时间点正常对照组比较, ^a $P < 0.05$

图 6 各组大鼠肾小球 IQGAP1、活化 caspase-3 蛋白表达量的变化 (Western 印迹)



注: 1: 正常对照组; 2: 生理盐水输注组; 3: Ang II 输注组; 与同一时间点正常对照组比较, ^a $P < 0.05$

图 7 各组大鼠肾小球 p-ERK1/2 蛋白表达量的变化 (Western 印迹)

ERK1/2 是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)超家族的成员,磷酸化后可以在多种机制诱导细胞凋亡中发挥重要作用^[15-18]。Zhang 等^[19]研究表明 ERK1/2 磷酸化后可以介导 Ang II 诱导的足细胞凋亡,但其磷酸化需要支架蛋白的参与。既往研究证明,IQGAP1 是 ERK1/2 及其通路其他多种信号蛋白的支架蛋白,并调节其活化^[20-22]。本研究发现在 IQGAP1 表达增加的同时伴随有 p-ERK1/2 的上调,且 p-ERK1/2 与 IQGAP1 蛋白表达量之间具有正相关性关系,IQGAP1 表达上调可能是通过激活 ERK1/2 信号通路参与 Ang II 诱导的肾小球细胞凋亡,但仍需体外实验进一步证实。

综上所述,本研究通过成功建立 Ang II 输注大鼠模型,首次发现 Ang II 可诱导肾小球 IQGAP1 表达增加,IQGAP1 可能通过激活 ERK1/2 信号通路参与 Ang II 输注导致肾小球细胞凋亡的过程,为临床肾小球疾病的防治提供了新的思路和借鉴。

参 考 文 献

- [1] Remuzzi G, Perico N, Macia M, et al. The role of renin - angiotensin - aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*, 2005; S57-S65.
- [2] Campbell KN, Raij L, Mundel P. Role of angiotensin II in the development of nephropathy and podocytopathy of diabetes. *Curr Diabetes Rev*, 2011, 7: 3-7.
- [3] Hsu HH, Hoffmann S, Di Marco GS, et al. Downregulation of the antioxidant protein peroxiredoxin 2 contributes to angiotensin II-mediated podocyte apoptosis. *Kidney Int*, 2011, 80: 959-969.
- [4] Lv J, Jia R, Yang D, et al. Candesartan attenuates angiotensin II-induced mesangial cell apoptosis via TLR4/MyD88 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 380: 81-86.
- [5] 贾俊亚,朱吉莉,丁国华,等.血管紧张素 II 灌注诱导 nephrin 表达改变与足细胞凋亡. *中华肾脏病杂志*, 2007, 23: 33-38.
- [6] Noritake J, Watanabe T, Sato K, et al. IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration. *J Cell Sci*, 2005, 118: 2085-2092.
- [7] Meyer RD, Sacks DB, Rahimi N. IQGAP1-dependent signaling pathway regulates endothelial cell proliferation and angiogenesis. *PLoS One*, 2008, 3: e3848.
- [8] Sato A, Naito T, Hiramoto A, et al. Association of RNase L with a Ras GTPase - activating - like protein IQGAP1 in mediating the apoptosis of a human cancer cell-line. *FEBS J*, 2010, 277: 4464-4473.
- [9] Hong D, Chen HX, Yu HQ, et al. Quantitative proteomic analysis of dexamethasone - induced effects on osteoblast differentiation, proliferation, and apoptosis in MC3T3-E1 cells using SILAC. *Osteoporos Int*, 2011, 22: 2175-2186.
- [10] Kitayama H, Maeshima Y, Takazawa Y, et al. Regulation of angiogenic factors in angiotensin II infusion model in association with tubulointerstitial injuries. *Am J Hypertens*, 2006,19: 718-727.
- [11] Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress - induced apoptosis. *Methods Mol Biol*, 2008, 414: 13-21.
- [12] Ding G, Reddy K, Kapasi AA, et al. Angiotensin II induces apoptosis in rat glomerular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, 283: F173- F180.
- [13] Ferrari R, Guardigli G, Ceconi C. Secondary prevention of CAD with ACE inhibitors: a struggle between life and death of the endothelium. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2010, 24: 331-339.
- [14] Brown MD, Sacks DB. IQGAP1 in cellular signaling: bridging the GAP. *Trends Cell Biol*, 2006, 16: 242-249.
- [15] Kim YK, Kim HJ, Kwon CH, et al. Role of ERK activation in cisplatin - induced apoptosis in OK renal epithelial cells. *J Appl Toxicol*, 2005, 25: 374-382.
- [16] Mebratu YA, Dickey BF, Evans C, et al. The BH3 - only protein Bik/Bik/Nbk inhibits nuclear translocation of activated ERK1/2 to mediate IFNgamma-induced cell death. *J Cell Biol*, 2008, 183: 429-439.
- [17] Chen CH, Wang WJ, Kuo JC, et al. Bidirectional signals transduced by DAPK - ERK interaction promote the apoptotic effect of DAPK. *EMBO J*, 2005, 24: 294-304.
- [18] Amaravadi R, Thompson CB. The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *J Clin Invest*, 2005, 115: 2618-2624.
- [19] Zhang H, Ding J, Fan Q, et al. TRPC6 up-regulation in Ang II-induced podocyte apoptosis might result from ERK activation and NF-kappaB translocation. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2009, 234: 1029-1036.
- [20] Roy M, Li Z, Sacks DB. IQGAP1 is a scaffold for mitogen - activated protein kinase signaling. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 7940-7952.
- [21] Brown MD, Sacks DB. Protein scaffolds in MAP kinase signalling. *Cell Signal*, 2009, 21: 462-469.
- [22] Sbroglio M, Bertero A, Velasco S, et al. ERK1/2 activation in heart is controlled by melusin, focal adhesion kinase and the scaffold protein IQGAP1. *J Cell Sci*, 2011, 124: 3515-3524.

(收稿日期:2012-06-10)

(本文编辑:孙玉玲)