

IQGAP1 在调节足细胞细胞骨架重组中的作用

张晓波,唐凤英,周敏,朱颖,陈敏,周惠,陈连华

(南京医科大学附属淮安第一医院肾内科,江苏 淮安 223300)

[摘要] 目的:探讨 IQ 结构域 GTP 酶活化蛋白 1(IQ domain GTPase-activating protein 1, IQGAP1)对足细胞细胞骨架重组的调节作用。方法:嘌呤霉素(PAN)刺激小鼠足细胞后,运用实时定量 PCR 和 Western blot 印迹法分别检测细胞内 IQGAP1 mRNA 和蛋白表达水平,激光共聚焦显微镜观察足细胞骨架 F-actin 的分布,F-actin 肌动蛋白评分系统(CFS)对骨架重组进行分析,并进一步观察上调和下调足细胞 IQGAP1 表达对 PAN 诱导的足细胞骨架重组的影响。结果:①与对照组相比,PAN 刺激组足细胞内 IQGAP1 mRNA 和蛋白表达明显下降($P<0.05$),足细胞 F-actin 排列紊乱,CFS 明显升高;②IQGAP1 siRNA 进一步抑制 IQGAP1 表达后,PAN 引起的上述足细胞 F-actin 重组更加明显($P<0.05$);③转染 pCantag-myc-IQGAP1 质粒促进 IQGAP1 表达后,PAN 诱导的足细胞 F-actin 排列紊乱显著减轻,CFS 明显下降($P<0.05$)。结论:IQGAP1 能抑制嘌呤霉素诱导的足细胞骨架重组,对维持足细胞正常骨架结构起着重要作用。

[关键词] IQGAP1;足细胞;细胞骨架重组;嘌呤霉素

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)08-985-05

doi:10.7655/NYDXBNS20170813

The role of IQGAP1 in the regulation of cytoskeletal rearrangement in podocytes

Zhang Xiaobo, Tang Fengying, Zhou Min, Zhu Ying, Chen Min, Zhou Hui, Chen Lianhua

(Department of Nephrology, Huai'an First People's Hospital Affiliated to NJMU, Huai'an 223300, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the regulatory role of IQGAP1 in cytoskeletal rearrangement of podocytes. **Methods:** Conditionally immortalized mouse podocytes were used to perform cell culture and stimulated by puromycin aminonucleoside (PAN). RT-PCR and Western blot analysis were used to measure the level of IQGAP1 mRNA and protein, respectively. The cytoskeleton of F-actin was evaluated by FITC-conjugated phalloidin staining under laser confocal scanning microscope and semi-quantitative system with cortical F-actin score (CFS) was used to analyze the degree of actin cytoskeleton arrangement. We further explored the changes of cytoskeletal rearrangement after up- and down-regulation of IQGAP1. **Results:**①when compared with the control group, the expression of IQGAP1 mRNA and protein was significantly decreased after PAN stimulation in mouse podocytes ($P<0.05$). PAN stimulation induced cytoskeletal rearrangement including cortical F-actin ring formation, stress fiber attenuation and CFS up-regulation; ②the above rearrangement was exacerbated by IQGAP1 siRNA transfection ($P<0.05$); ③ PAN induced cortical F-actin ring formation and CFS up-regulation was abated after IQGAP1 plasmid transfection ($P<0.05$). **Conclusion:** IQGAP1 can inhibit PAN induced cytoskeleton rearrangement in podocytes and plays an important role in maintaining normal podocyte cytoskeleton.

[Key words] IQGAP1; podocytes; cytoskeleton rearrangement; puromycin aminonucleoside

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(08):985-989]

足细胞是肾小球滤过屏障的重要组成部分,其损伤是肾小球性蛋白尿发生的主要机制,参与多种肾小球疾病的发生发展。随着现代医学技术水平的不断提高,越来越多的肾脏疾病患者被确诊,对足细胞的研究也逐渐受到广泛重视,目前将以足细胞结构和功能损伤为主的肾小球疾病单独归类为足细胞病^[1]。足细胞数目改变(数量减少或密度降低)、

肾小球基底膜增厚和足突融合是足细胞病的特征性病变,其中足突融合最具典型,在多种肾脏疾病中均可出现。研究表明,在足突融合过程中,往往合并足细胞骨架重组,但其具体发生机制目前尚无统一论。IQ 结构域 GTP 酶活化蛋白 1(IQ domain GTPase-activating protein 1, IQGAP1)作为细胞内的一种支架蛋白,通过直接作用于靶分子而参与

细胞极化、细胞迁移维持、细胞间黏附以及调节细胞骨架重组等一系列病理生理过程^[2]。因此,本研究拟通过体外培养小鼠足细胞探讨 IQGAP1 在足细胞细胞骨架重组中的调节作用。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠足细胞(上海博古生物科技有限公司),胎牛血清(Sciencell 公司,美国),RPMI1640 培养基(Gibco 公司,美国),小鼠重组干扰素(Perotech 公司,美国),兔抗小鼠 IQGAP1 抗体、近红外 800 荧光二抗(Santa Cruz 公司,美国),嘌呤霉素(PAN, Sigma 公司,美国),RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司,日本),异硫氰酸荧光素(FITC)、鬼笔环肽(phalloidin, Sigma 公司,美国),BCA 法蛋白定量测试盒(南京凯基),细胞转染试剂盒、IQGAP1 siRNA、pGantag-myc-IQGAP1 质粒(Invitrogen 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 足细胞培养和实验分组

对永生小鼠足细胞株进行复苏后,放入含有干扰素 10 U/mL、胎牛血清 10% 的 RPMI1640 培养基中并于 37 °C 5%CO₂ 的培养箱中进行培养。

实验分组:①对照组:未加任何刺激物;②PAN 刺激组:单纯加 100 μg/mL PAN;③IQGAP1 siRNA 转染组:加入 100 μg/mL PAN 和 IQGAP1 siRNA;④质粒转染组:加入 100 μg/mL PAN 和 pGantag-myc-IQGAP1 质粒。以上各组均培养 24 h,实验至少重复 3 次。

1.2.2 实时定量 PCR 法

应用 TRIzol RNA 提取液,按照氯仿-异丙醇法提取细胞总 RNA 后根据日本 TaKaRa 染料法实时荧光定量试剂盒说明书操作步骤进行实时定量 PCR。引物由上海捷瑞生物工程有限公司设计合成。IQGAP1 的下游引物和上游引物分别为 5'-TCTCG AGAAAGCTGCACAGA-3'、5'-GGGAAAGACAGTGA-3',β-actin 下游引物和上游引物分别为 5'-TAAAGACCTCTATGCCAACA-CAGT-3'、5'-CACGATGGAGGGCCGACT-ATC-3'。运用双标准曲线法对 IQGAP1 mRNA 表达水平进行分析,其中 IQGAP1 mRNA 的相对含量运用正常组和 PAN 刺激组的 IQGAP1 拷贝数比值来进行标示。

1.2.3 Western blot 印迹法

按照细胞全蛋白抽提试剂盒(南京凯基公司)说明书提取细胞总蛋白,以测定 IQGAP1 蛋白表达。冰

PBS 清洗 2 次,弃去 PBS,按照 200 μL/孔加入蛋白裂解液(含 0.1%蛋白酶抑制剂、0.5%苯甲基磺酰氟化物、0.5%磷酸酶抑制剂)。冰浴条件下进行匀浆,4 °C 10 000 r/min 离心 10 min(离心半径 15 cm)去除沉淀,留取上清。按照 BCA 法蛋白定量测试盒(南京凯基)说明书测定各组蛋白浓度。制备 5%浓缩胶和 10%分离胶,每孔上样量为 70 μg,进行 SDS-PAGE 电泳,加入一抗。4 °C 过夜,次日 PBST 洗膜 4 次,每次 5 min,加入二抗,按 1:5 000 稀释,室温孵育 1~2 h,PBST 洗膜 5 次,每次 5 min。ECL 显色(英国 GE Healthcare),胶片扫描后用 Quantity One 软件分析灰度值,并计算与 β-actin 的比值。

1.2.4 FITC-phalloidin 标记足细胞 F-actin 细胞骨架

种植细胞爬片,足细胞处理结束后去除培养基,预冷的 4 °C PBS 缓慢摇洗,4%多聚甲醛 4 °C 固定 30 min,5 mg/L FITC-phalloidin 室温避光孵育 30 min,2 mg/L Hoechst 33258 复染 3~5 min,PBS 清洗后,抗荧光淬灭封片剂封片,共聚焦荧光显微镜(FV-500, Olympus 公司,日本)观察并摄片。采用 F-actin 肌动蛋白重组评分(CFS)评价 F-actin 运动,并将其分为 4 个等级:①3 分:F-actin 存在完整的外周环;②2 分:外周环包膜边缘≥1/2;③1 分:外周环包膜边缘<1/2;④0 分:F-actin 应力纤维非常正常。

1.2.5 IQGAP1 siRNA 转染

在 25 cm² 的 6 孔板中接种足细胞,在细胞融合达到 50%~60%的情况下开始转染,在 Hipofet 转染试剂 15 μL 中加入 IQGAP1 siRNA 1.5 μL,然后在 100 μL 无血清 RPMI1640 培养基中混入该转染试剂,均匀混合,15 min 后放入 2 mL 细胞培养基中,于 37 °C 5%CO₂ 培养箱中培养。

1.2.6 pGantag-myc-IQGAP1 质粒转染

在 25 cm² 的 6 孔板中接种足细胞,在细胞融合达到 50%~60%后开始转染,将 2 μL 质粒加入到 62 μL 转染试剂中,然后将该转染试剂混入到无血清 200 μL 培养基中,均匀混合,30 min 后放入 2 mL 细胞培养基中,于 37 °C 5%CO₂ 培养箱中培养。

1.3 统计学方法

运用 SPSS22.5 统计软件处理和分析数据,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,参数资料采用单因素方差分析,LSD 法进行组间比较,偏相关分析表示两变量之间的相关性, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PAN 抑制足细胞表达 IQGAP1

与对照组相比,50 mg PAN 刺激足细胞 6 h 后,

细胞内 IQGAP1 mRNA 表达明显下降($P<0.05$,图1A), Western 结果显示 IQGAP1 蛋白表达也减少 ($P<0.05$, 图 1B), 说明 PAN 在基因和蛋白水平均抑制了 IQGAP1 表达。

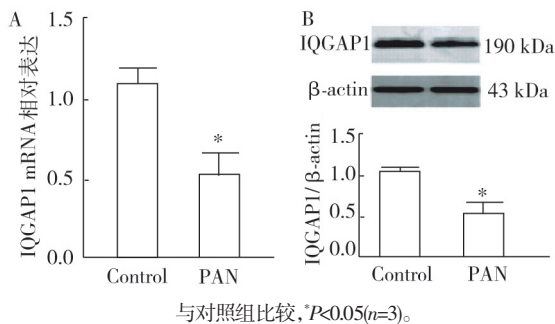


图 1 PAN 对足细胞 IQGAP1 表达的影响

Figure 1 The effect of PAN on the expression of IQGAP1

2.2 嘌呤霉素诱导足细胞 F-actin 排列紊乱,促进足细胞骨架重组

激光共聚焦显微镜下发现,在正常情况下,足细胞 F-actin 分布具备微丝样特征,应力纤维明显,而 PAN 刺激后,足细胞 F-actin 排列明显紊乱,F-actin 分布与胞体外周基本一致,形成 1 个比较完整的 F-actin 环(图 2 白色箭头所示)。进一步用 F-actin 肌动蛋白重组评分(CFS)定量分析,发现 PAN 刺激组足细胞 CFS 明显高于对照组($P<0.05$,图 2),表明 PAN 诱导了足细胞骨架重组。

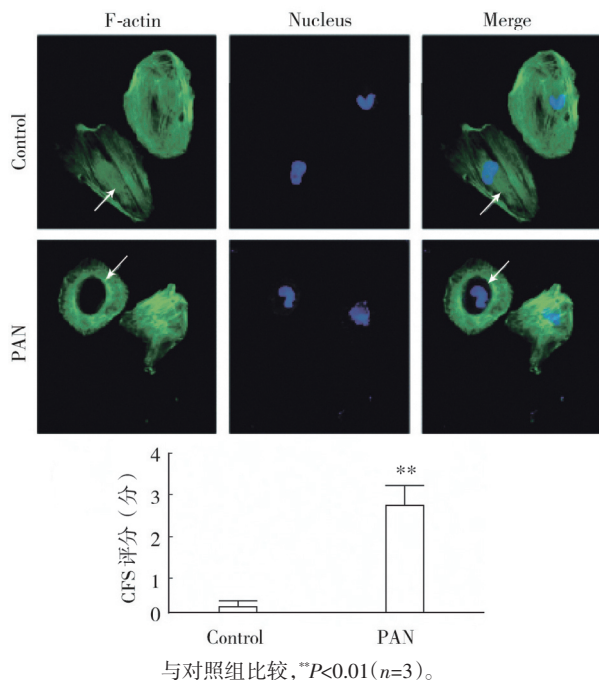
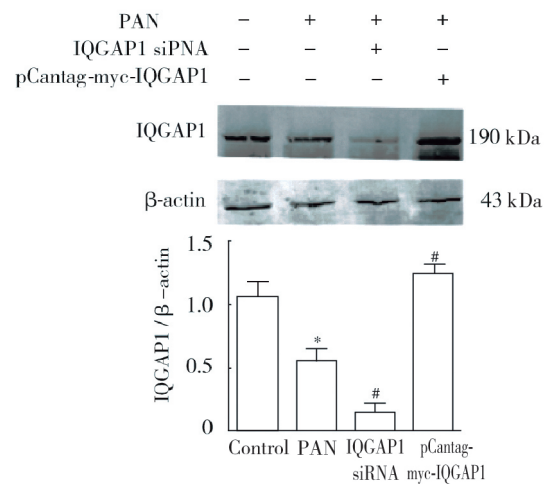


图 2 PAN 刺激对足细胞 F-actin 骨架分布的影响(免疫荧光,×400)

Figure 2 The effect of PAN on F-actin arrangement in podocytes (immunofluorescence, ×400)

2.3 pCantag-myc-IQGAP1 质粒和 IQGAP1 siRNA 转染对足细胞 IQGAP1 表达的影响

运用 Western blot 方法检测细胞转染效果。与 PAN 刺激组相比,转染 pCantag-myc-IQGAP1 后细胞内 IQGAP1 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$); 而转染 IQGAP1 siRNA 后,IQGAP1 蛋白表达则受到明显抑制,表达显著减少 ($P<0.05$,图 3)。说明 pCantag-myc-IQGAP1 质粒和 IQGAP1 siRNA 对足细胞内 IQGAP1 的表达起到了明显的上调和下调作用。



与对照组比较,* $P<0.05$;与 PAN 组比较,# $P<0.05$ ($n=3$)。

图 3 IQGAP1 siRNA、pCantag-myc-IQGAP1 质粒转染对足细胞 IQGAP1 表达的影响

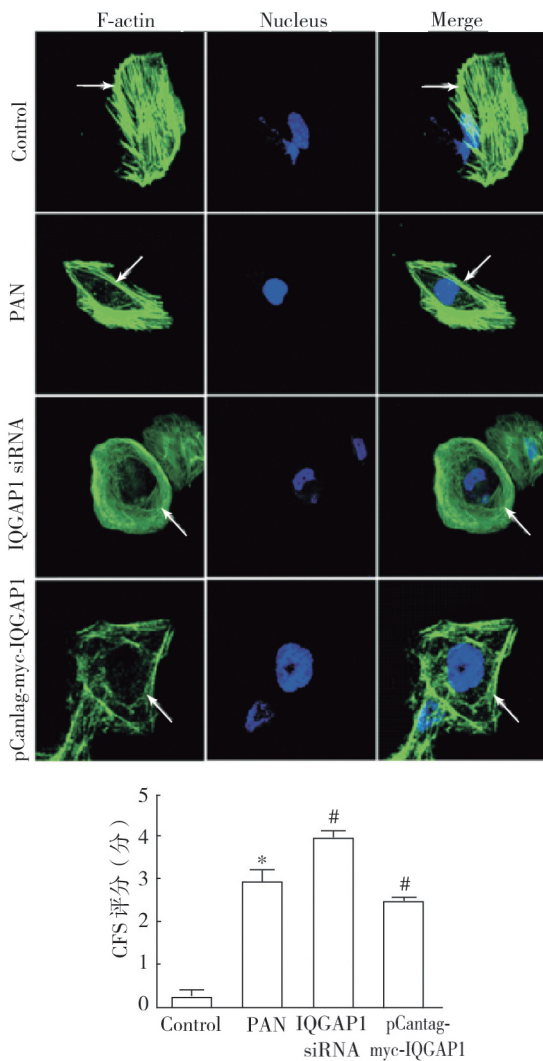
Figure 3 The effect of IQGAP1 siRNA and pCantag-myc-IQGAP1 transfection on the expression of IQGAP1

2.4 IQGAP1 对足细胞 F-actin 分布的影响

上述结果表明 PAN 可以诱导足细胞骨架重组,抑制 IQGAP1 的表达,但是 IQGAP1 是否与足细胞骨架重组有关仍不明确,因此通过进一步改变 IQGAP1 的表达来观察足细胞骨架重组情况。结果表明与 PAN 刺激组相比,当用 siRNA 进一步抑制 IQGAP1 表达后,足细胞 F-actin 排列更加紊乱,CFS 进一步升高($P<0.05$,图 4)。而转染 pCantag-myc-IQGAP1 质粒促进 IQGAP1 表达后,足细胞 F-actin 排列紊乱得到明显改善,并且 CFS 也显著降低($P<0.05$,图 4)。以上结果提示 IQGAP1 能显著减轻 PAN 诱导的足细胞骨架重组,对维持足细胞正常的骨架结构起到重要作用。

3 讨论

足突融合是肾小球疾病状态下足细胞损伤的特征性超微结构改变,与足细胞骨架组装密切相关^[3]。在正常情况下,足突细胞骨架包括短枝状 F-actin 相



与对照组比较,* $P < 0.05$;与 PAN 组比较,# $P < 0.05$ ($n=3$)。

图 4 IQGAP1 siRNA 及 pCantag-myc-IQGAP1 质粒转染对足细胞 F-actin 分布的影响(免疫荧光,×400)

Figure 4 The effect of IQGAP1 siRNA and pCantag-myc-IQGAP1 transfection on F-actin arrangement podocytes (immunofluorescence, ×400)

关蛋白和细胞骨架 2 个部分,以环状微丝束为主要特征,但在病理状态下,F-actin 会出现排列紊乱,并且分布方向与细胞膜明显一致,构成具有典型特征的外周环^[4-5]。PAN 在肾脏疾病中应用广泛,其诱导的微小病理性肾动物模型在临床表现和病理改变上与人类相比具有一定的相似性,而微小病理性肾病最具特征性的病理改变就是足突广泛融合^[5],因此本研究采用 PAN 体外刺激小鼠足细胞观察其细胞骨架重组情况。IQGAP1 是细胞内的一种支架蛋白,能够作用于多个靶分子,包括 S100B、F-actin、E-cadherin、ERK1/2、APC 以及 ELC 等,通过直接作用于上述靶分子的信号激酶和细胞骨架网络,而参

与细胞极化、细胞迁移维持、细胞间黏附以及调节细胞骨架重组等一系列病理和生理过程^[6-8]。足细胞是表达 IQGAP1 的主要细胞,IQGAP1 在肾小球和肾小管中的分布方向通常与毛细血管袢一致^[9-12]。有研究表明 IQGAP1 能够结合细胞骨架蛋白、CD2AP、裂孔膜蛋白、NCK1/2 以及 MAG I -1,对足细胞屏障滤过功能和足细胞迁移能力产生影响,即抑制 IQGAP1 表达后,足细胞屏障功能和迁移能力明显减弱,表明 IQGAP1 与足细胞疾病的发生发展有着密不可分的联系^[13-16],但是 IQGAP1 与足细胞骨架重组之间的关系尚不十分明确。本研究发现当用 PAN 刺激足细胞后,细胞内 IQGAP1 表达明显减少,细胞 F-actin 排列明显紊乱,F-actin 肌动蛋白重组评分升高,提示 IQGAP1 可能与足细胞骨架重组有关。当进一步抑制 IQGAP1 表达后,我们发现 F-actin 排列更加紊乱,F-actin 肌动蛋白重组评分继续升高,而促进 IQGAP1 表达后,上述情况明显改善,这表明 IQGAP1 能够抑制 PAN 诱导的足细胞骨架重组,对足细胞正常骨架的维持起到重要作用。但是 IQGAP1 对细胞骨架重组的具体作用机制仍不清楚。郑海宁等^[12]发现 ERK1/2 是 IQGAP1 信号通路的下游分子,IQGAP1 可以通过活化 ERK1/2MAPK 信号通路介导 Ang II 诱导的足细胞凋亡,因此不排除 ERK1/2 可能参与了 IQGAP1 对足细胞骨架的重组作用,但这只是猜测,仍需以实验来进一步研究探讨。

[参考文献]

[1] 杨英杰,梁伟,刘以鹏,等. IQGAP1 在调节足细胞细胞骨架重组中的作用[J]. 武汉大学学报(医学版),2015, 36(1): 6-10

[2] Barisoni L, Schnaper HW, Kopp JB. Advances in the biology and genetics of the podocytopathies: implications for diagnosis and therapy[J]. Arch Pathol Lab Med, 2014, 133(2): 201-216

[3] 查冬青. Nephron 表达在 PINCH-1-ILK- α -parvin 复合物介导足细胞黏附改变中的作用及分子机制 [D]. 武汉: 武汉大学,2013

[4] Schwarz K, Simon M, Reiser J, et al. Podocin a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm interacts with CD2AP and nephrin [J]. J Clin Invest, 2012,108(11): 1621-1629

[5] 张璐,任志龙,杨倩,等. C 末端 Src 激酶在血管紧张素 II 诱导足细胞骨架重构中的作用[J]. 中华肾脏病杂志,2015, 31(11): 842-847

[6] 解智慧. 一种新的介导细胞间黏附的肌动蛋白相关蛋

- 白 KIAA1522 在食管癌中作用及其机制的研究[D]. 北京:协和医科大学,2014
- [7] Mundel P, Reiser J, Zuniga MBA, et al. Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines[J]. *Exp Cell Res*, 2014,236(1): 248-258
- [8] Lehtonen S, Ryan JJ, Kudlicka K, et al. Cell junction-associated proteins IQGAP1, MAGI-2, CASK, spectrins and alpha-actinin are components of the nephrin multiprotein complex[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2005,102(28): 9814-9819
- [9] Liu Y, Liang W, Yang Q, et al. IQGAO1 mediates angiotensin II-induced apoptosis of podocytes via the ERK1/2MAPK signaling pathway [J]. *Am J Nephrol*, 2013, 38(5): 430-444
- [10] 梁伟,任志龙,韦忠平,等. 稳定血管紧张素 II 诱导的足细胞细胞骨架改变的机制研究[J]. *中国病理生理杂志*,2012,28(12): 2216-2221
- [11] 刘以鹏,梁伟,杨倩,等. 血管紧张素 II 诱导肾小球 IQGAP1 表达改变及细胞凋亡 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2013, 29(1): 27-32
- [12] 郑海宁,苏东明,董成龙,等. 高糖对体外培养的足细胞自噬的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(1): 433-446
- [13] 饶佳. 血管形成素样蛋白 3 在儿童原发性肾病综合征及足细胞损伤中的研究[D]. 上海:复旦大学, 2014
- [14] 罗流涛. 骨髓间充质干细胞对阿霉素大鼠足细胞骨架 F-actin 的影响及机制探讨研究[D]. 福州:福建医科大学, 2013
- [15] 刘以鹏,梁伟,陈星华,等. IQGAP1 在血管紧张素 II 诱导足细胞凋亡中的作用及其机制探讨[J]. *中华肾脏病杂志*,2014,30(3): 210-216
- [16] 刘志辉,宋明旭,周希科,等. IQGAP1 通过 mTOR 信号通路促进肝癌细胞增殖 [J]. *中国肿瘤临床*,2011, 38 (20): 1247-1250

[收稿日期] 2016-07-13

参考文献著录原则和方法

1. 为了反映论文的科学依据和作者尊重他人研究成果的严肃态度,以及读者提供有关信息的出处,应在论文的结论(无致谢段时)或致谢之后列出参考文献。
2. 参考文献列出的一般应限于作者直接阅读过的、最主要的、发表在正式出版物上的文献。私人通信和未公开发表的资料,一般不宜列入参考文献,可紧跟在引用的内容之后注释或标注在当页的地脚。
3. 参考文献著录应执行 GB7714-2005 的规定,建议采用顺序编码制。
4. 顺序编码制的要求如下:
 - (1) 在引文处按论文中引用文献出现的先后,用阿拉伯数字连续编序,将序号置于方括号内,并视具体情况把序号作为上角标,或作为语句的组成部分。如“张xx^[1]研究发现……”,“李xx等^[2]认为……”,“模型构建参考文献[3]”。
 - (2) 参考文献的每条文献著录项目应齐全,著录格式为:
主要责任者. 题名:其他题名信息[文献类型标志]. 其他责任者. 版本项. 出版地:出版者,出版年,引文页码[引用日期]. 获取和访问路径
 - (3) 论文中若同一篇参考文献出现引用多次的情况,则不需重复著录,按参考文献首次出现的顺序标注上角即可。