DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.04.005
文章编号：1005-8982（2024）04-0029-10

实验研究·论著

SMYD2介导高糖诱导大鼠肾成纤维细胞活化的机制研究*

左思洋[1]，李霞[2]，陈思羽[1]，陈敏[1]，彭睿[1]，邹雪[2]，龙合花[1]，
杨元[1]，元辉雄[1]，郭兵[3]，赵青青[2]，刘丽荣[1]
（1.贵州医科大学附属医院 临床检验中心，贵州 贵阳 550004；2.贵州医科大学附属医院精准医学研究院，贵州 贵阳 550004；3.贵州医科大学 重大疾病发病机制研究与药物防治实验室，贵州 贵阳 550025）

摘要：目的 探讨组蛋白赖氨酸甲基转移酶2(SMYD2)介导体外高糖环境下大鼠肾成纤维细胞(NRK-49F)活化的可能机制。**方法** 复制糖尿病(DM)小鼠模型，经全自动生化分析仪检测各组小鼠血糖(BG)、血肌酐(Scr)水平，经苏木精-伊红、Masson染色观察小鼠肾组织病理改变，经Western blotting检测各组小鼠肾组织纤维连接蛋白(Fibronectin)、Ⅰ型胶原蛋白(Collagen Ⅰ)、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、组蛋白H3赖氨酸4三甲基化(H3K4me3)、SMYD2、核转录因子-κB p65(NF-κB p65)及磷酸化NF-κB p65(NF-κB p-p65)蛋白表达，经免疫荧光检测各组小鼠肾组织α-SMA及SMYD2表达。复制体外DM细胞模型，使用正常糖(含5.5 mmol/L葡萄糖)或高糖(含30.0 mmol/L葡萄糖)处理NRK-49F细胞，经Western blotting检测SMYD2、α-SMA及细胞外基质(ECM)成分蛋白表达；经CCK-8法检测SMYD2特异性抑制剂AZ505的细胞毒性；在AZ505处理/不处理的条件下，经Western blotting检测SMYD2、α-SMA、H3K4me3、Fibronectin、Collagen Ⅰ、NF-κB p65、NF-κB p-p65蛋白表达，经免疫荧光检测α-SMA、SMYD2及NF-κB p-p65在细胞中的表达及空间定位情况。**结果** DM组血清BG、Scr水平高于NC组（P <0.05）。DM组肾组织α-SMA、Fibronectin、Collagen Ⅰ、SMYD2、H3K4me3、NF-κB p-p65蛋白相对表达量高于NC组（P <0.05），两组NF-κB p65蛋白相对表达量比较，差异无统计学意义（P >0.05）。HG刺激不同时间点NRK-49F细胞α-SMA、Collagen Ⅰ、Fibronectin、SMYD2蛋白相对表达量比较，差异均有统计学意义（P <0.05）。40 μmol/L组、60 μmol/L组NRK-49F细胞存活率较0 μmol/L组低（P <0.05）。HG组NRK-49F细胞Fibronectin、Collagen Ⅰ、SMYD2蛋白相对表达量较NG组高（P <0.05），HG + AZ505（20 μmol/L）组较HG组低（P <0.05）。HG组NRK-49F细胞Fibronectin、Collagen Ⅰ、α-SMA、H3K4me3、SMYD2蛋白相对表达量较NG组高（P <0.05），HG+AZ505组较HG组低（P <0.05）。HG组NRK-49F细胞NF-κB p-p65蛋白相对表达量较NG组高（P <0.05），HG+AZ505组较HG组低（P <0.05），各组大鼠NRK-49F细胞NF-κB p65蛋白相对表达量比较，差异无统计学意义（P >0.05）。**结论** SMYD2可介导高糖诱导的NRK-49F细胞活化，其机制可能与激活NF-κB细胞信号通路有关。

关键词： 糖尿病；大鼠肾成纤维细胞；组蛋白赖氨酸甲基转移酶2；AZ505
中图分类号： R587.1　　**文献标识码：** A

Mechanism underlying the role of SMYD2 in mediating high glucose-induced activation of rat renal fibroblasts*

收稿日期：2023-06-27
* 基金项目：国家自然科学基金（No:32060202）；贵州省科技计划项目[No:黔科合基础-ZK（2023）一般377]、黔科合基础-ZK（2023）一般379]
[通信作者] 刘丽荣，E-mail：lirongliu@gmc.edu.cn

Zuo Si-yang[1], Li Xia[2], Chen Si-yu[1], Chen Min[1], Peng Rui[1], Zou Xue[2], Long He-hua[1], Yang yuan[1], Yuan Hui-xiong[1], Guo Bing[3], Zhao Qing-qing[2], Liu Li-rong[1]

(1. Center for Clinical Laboratories, The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Guizhou Precision Medicine Institute, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3. Laboratory of Pathogenesis Research, Drug Prevention and Treatment of Major Diseases, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

Abstract: Objective To investigate the possible mechanism underlying the role of the histone lysine methyltransferase SET and MYND domain-containing protein 2 (SMYD2) in mediating the activation of rat renal fibroblasts (NRK-49F) in a high glucose environment in vitro. **Methods** The mouse model of diabetes mellitus (DM) was established, and levels of blood glucose (BG) and serum creatinine (Scr) were measured via the automatic biochemical analyzer. The renal histopathological changes in mice were observed by hematoxylin-eosin and Masson staining. The protein expression levels of fibronectin, type I collagen (collagen I), alpha-smooth muscle actin (α-SMA), histone H3 lysine 4 trimethylation (H3K4me3), SMYD2, nuclear factor kappa B p65 (NF-κB p65) and phosphorylated NF-κB p65 (NF-κB p-p65) in the kidney tissues of DM mice were detected via Western blotting, and the expressions of αSMA and SMYD2 in the kidney tissues of DM mice were also detected via immunofluorescence. The cell models of DM were replicated in vitro, where NRK-49F cells were treated with glucose of normal concentration (containing 5.5 mmol/L of glucose) or high concentration (containing 30 mmol/L of glucose). Then protein expressions of SMYD2, α-SMA and components of extracellular matrix (ECM) were measured by Western blotting, and cell counting kit-8 was used to detect the cytotoxicity of SMYD2-specific inhibitor AZ505. When treated with or without AZ505, protein expressions of SMYD2, α-SMA, H3K4me3, fibronectin, collagen I, NF-κB p65 and NF-κB p-p65 were detected via Western blotting, and the expressions and distribution of α-SMA, SMYD2 and NF-κB p-p65 in NRK-49F cells were detected via immunofluorescence. **Results** The levels of BG and Scr in the DM group were higher than those in the NC group ($P < 0.05$). The relative protein expressions of α-SMA, fibronectin, collagen I, SMYD2, H3K4me3 and NF-κB p-p65 in the kidney tissues of the DM group were higher than those of the NC group ($P < 0.05$). There was no difference in the relative protein expression of NF-κB p65 between the two groups ($P > 0.05$). The relative protein expressions of α-SMA, collagen I, fibronectin and SMYD2 in NRK-49F cells were different among the distinct time points when mice were treated with HG ($P < 0.05$). The survival rate of NRK-49F cells in the 40 μmol/L group and the 60 μmol/L group was lower than that in the 0 μmol/L group ($P < 0.05$). The relative protein expressions of fibronectin, collagen I and SMYD2 in NRK-49F cells of the HG group were higher than those of the NG group ($P < 0.05$), while those of the HG + AZ505 (20 μmol/L) group were lower than those of the HG group ($P < 0.05$). The relative protein expressions of fibronectin, collagen I, α-SMA, H3K4me3 and SMYD2 in NRK-49F cells of the HG group were higher than those of the NG group ($P < 0.05$), while those of the HG + AZ505 (20 μmol/L) group were lower than those of the HG group ($P <0.05$). The relative protein expression of NF-κB p-p65 in NRK-49F cells of the HG group was higher than that of the NG group ($P < 0.05$), while that of the HG + AZ505 group was lower than that of the HG group ($P < 0.05$). There was no difference in the relative protein expression of NF-κB p65 in NRK-49F cells among the groups ($P > 0.05$). **Conclusions** SMYD2 mediates high glucose-induced activation of NRK-49F cells by a mechanism that may be related to the activation of the NF-κB signaling pathway.

Keywords: diabetes mellitus; rat renal fibroblast; SET and MYND domain-containing protein 2; AZ505

糖尿病(diabetes mellitus, DM)已成为全球患病率最高的慢性病之一[1]。国际糖尿病联合会报告指出,2021年全球DM患者达5.37亿,其中我国患者达1.41亿,且呈快速上升趋势[2]。糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是DM最常见的微血管并发症[3],DKD是慢性肾脏疾病(chronic kidney disease, CKD)的主要原因[4]。肾纤维化是CKD进展的必经之路,未受控制的肾纤维化最终导致CKD发展为终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)[5],给家庭和社会带来沉重负担。因此,寻找肾纤维化调控的有效靶点对DKD防治具有重要意义。

肾纤维化的主要病理特征是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)如Ⅰ型胶原蛋白(type Ⅰ collagen, Collagen Ⅰ)、Collagen Ⅲ、纤维连接蛋白

（Fibronectin）等的持续积累和沉积[6]。成纤维细胞在肾脏进行性纤维化和持续性炎症中起着至关重要的作用[7]。在DM发展为DKD的过程中，持续高血糖可诱导大量活性氧（reactive oxygen species, ROS）形成，加快促炎因子如白细胞介素-6（Interleukin 6, IL-6）、肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor, TNF-α）的释放[8-10]。在高血糖、缺氧和炎症的刺激下肾成纤维（NRK-49F）细胞转分化为肌成纤维细胞[10]，肌成纤维细胞通过表达α-平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin, α- SMA）及分泌大量的ECM成分蛋白导致广泛的肾组织纤维化[11]。核转录因子-κB（nuclear factor-κB, NF-κB）控制多种免疫及炎症相关基因，是细胞生长、分化和凋亡的重要调节因子[12]。NF-κB信号通路的激活在DKD的发生、发展中起重要调控作用[13]。研究表明在活化的NRK-49F细胞中，NF-κB信号通路可通过激活不同路径，促进促炎细胞因子和趋化因子释放[14]。然而NF-κB信号通路在DKD中的作用机制有待进一步阐明。

组蛋白赖氨酸甲基转移酶2（SET and MYND domain-containing protein 2, SMYD2）是一种含有SET和MYND结构域的组蛋白甲基转移酶[15]，SMYD2可对组蛋白的不同位点（H3K4、H3K36）进行甲基化修饰[16]，也可使非组蛋白如信号转导和激活转录因子3、NF-κB p65和p53等发生甲基化而影响细胞增殖、分化和存活[17]。在多囊肾病基因1突变小鼠的囊性肾上皮细胞中，可通过甲基化NF-κB p65激活SMYD2，影响囊性肾上皮细胞的增殖和活化[18]。本课题组前期研究发现SMYD2也高表达于DM小鼠肾组织[19]，然而SMYD2在DKD发展中确切的作用和分子机制有待进一步研究。因此，本研究基于DM小鼠模型和细胞模型，旨在探究SMYD2是否可介导高糖环境下NRK-49F细胞的活化及可能机制，为DKD防治靶点的相关研究提供理论依据和实验基础。

1　材料与方法

1.1　实验材料、主要试剂及仪器

10只SPF级健康雄性C57BL6小鼠，体重（180±20）g，购自北京华阜康生物科技股份有限公司，实验动物生产许可证号：SCXK（京）2014-004，实验动物使用许可证号：SYXK（黔）2018-0001。

DMEM正常糖培养基（含1 g/L葡萄糖）、DMEM高糖培养基（含4.5 g/L葡萄糖）、胎牛血清（fetal bovine serum, FBS）均购自美国Invitrogen Gibco公司，胰酶消化液、青链霉素混合液（双抗）均购自以色列Biological Industries生物科技公司，SMYD2特异性抑制剂AZ505购自美国APExBIO公司，ECL发光试剂盒购自常州天地人和生物科技有限公司，苏木精-伊红（hematoxylin and eosin, HE）试剂盒、Masson三色染色改良试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、CCK-8试剂盒、高效RIPA裂解液、抗荧光衰减封片剂、牛血清白蛋白封闭液（5% BSA）均购自北京索莱宝科技有限公司，Fibronectin（ab2413）兔多克隆抗体、H3K4me3（ab8580）兔单克隆抗体、H3（ab1791）兔单克隆抗体均购自艾博抗（上海）贸易有限公司，α-SMA（14395-1-AP）兔单克隆抗体、Collagen Ⅰ（14695-1-AP）兔多克隆抗体、SMYD2（21290-1-AP）兔单克隆抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司，NF-κB p65（D14E12）兔单克隆抗体、Phospho-NF-κB p65（Ser536）（93H1）兔单克隆抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司，SMYD2（sc393827）鼠单克隆抗体购自美国Santa Cruz Biotechnology生物技术公司，β-actin（PMK058S）兔单克隆抗体、HRP山羊标记抗兔/鼠二抗购自武汉普美克生物技术有限公司。

Cobas 8000型全自动生化分析仪购自瑞士罗氏公司，Axio Imager.A2型光学显微镜购自德国ZEISS公司。

1.2　方法

1.2.1　模型复制及分组　SPF级小鼠随机分为正常（NC）组和糖尿病（DM）组，各5只。DM组按55.0 mg/kg剂量腹腔注射STZ复制模型，1次/周，连续5周，48 h后小鼠尾静脉取血监测随机血糖，血糖> 16.7 mmol/L判定为模型复制成功；NC组给予相同剂量生理盐水。两组小鼠喂养标准饲料，自由饮水，于模型复制28周后处死。小鼠处死前6 h禁食不禁水，麻醉后，眼球摘除法取血，以4 000 r/min离心5 min，分离血清，置于-80 ℃冰箱冷冻保存。将肾脏组织对半分开，一半浸泡于4%的多聚甲醛，另一半保存于-80 ℃冰箱。

1.2.2　全自动生化分析仪检测生化指标　采用全自

动生化分析仪检测各组小鼠血糖(blood glucose, BG)、血肌酐(serum creatinine, Scr)水平。

1.2.3 HE、Masson染色观察肾脏病理改变 肾组织经4%中性甲醛固定后,石蜡包埋切片(3 μm厚),采用HE、Masson染色进行观察。

1.2.4 细胞培养 大鼠NRK-49F细胞在5% FBS、1%青链霉素混合液的DMEM低糖培养基中,于37 ℃、5%二氧化碳培养箱中静置培养,细胞生长密度达90%时使用胰酶消化液进行消化并传代。

1.2.5 高糖培养基(high glucose, HG)不同时间点刺激NRK-49F细胞活化 将NRK-49F细胞按1.5×10^9个/孔细胞密度接种于细胞培养6孔板中,待细胞密度达60%时对细胞进行24 h无血清饥饿处理。在0、6、12、24、36和48 h逐次加入HG培养基(含0.5% FBS、1%青链霉素混合液)在37 ℃、含5%二氧化碳培养箱中培养,阴性对照组加正常糖(normal glucose, NG)培养基(含0.5% FBS、1%青链霉素混合液),在37 ℃、二氧化碳培养箱中继续培养。处理完后,弃培养上清液、收集细胞、提取细胞蛋白待测。

1.2.6 CCK-8法检测AZ505对NRK-49F细胞毒性 将NRK-49F细胞按照1.0×10^3个/孔细胞密度接种于96孔板中,在37 ℃、5%二氧化碳培养箱中培养24 h,再进行24 h无血清饥饿处理。根据AZ505的作用浓度依次分为0.000 μmol/L组、0.156 μmol/L组、0.313 μmol/L组、0.625 μmol/L组、1.250 μmol/L组、2.500 μmol/L组、5.000 μmol/L组、10.000 μmol/L组、20.000 μmol/L组、40.000 μmol/L组、60.000 μmol/L组,每个浓度设置5个复孔。处理48 h后,弃原培养基,将CCK-8试剂与培养基按1∶9混合后加入各孔,于37℃、5%二氧化碳培养箱中孵育2 h。用酶标仪检测450 nm处的吸光度值,计算不同药物浓度作用下的细胞存活率,细胞存活率(%)=[(实验组-空白组)/(对照组-空白组)]×100%。

1.2.7 Western blotting检测蛋白表达 利用细胞刮刮取各组细胞、重悬于RIPA(与蛋白酶抑制剂PMSF按照100∶1混合)蛋白裂解缓冲液,超声提取蛋白并高速离心获取蛋白上清液。使用BCA蛋白质浓度测定试剂盒测定细胞蛋白浓度。与上样缓冲液(5×loading buffer,含二硫苏糖醇)混合后于100 ℃变性10 min,样本立即点泳或冷冻于-20 ℃。配制十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶[10%的聚丙烯酰胺分离胶(10 mL):4.1 mL超纯水+3.3 mL 30%丙烯酰胺+2.5 mL 1.5M Tris(pH 8.8)+0.1 mL 10% SDS +0.1 mL 10%过硫酸铵+6 μL促凝剂;5%聚丙烯酰胺浓缩胶(4 mL):2.6 mL超纯水+1.0 mL 30%丙烯酰胺+1.3 mL 1.5 mmol/L Tris(pH 6.8)+50 μL 10% SDS +50 μL 10%过硫酸铵+4 μL促凝剂],将等质量的蛋白样本加至各泳道,电泳结束后将蛋白由凝胶转移到PVDF膜上。使用5%脱脂牛奶常温封闭PVDF膜1 h。将PVDF膜与蛋白Fibronectin(1∶5 000)、Collagen Ⅰ(1∶1 000)、α-SMA(1∶1 000)、SMYD2(1∶2 000)、H3K4me3(1∶1 000)、H3(1∶5 000)、NF-κB p-p65(1∶1 000)、NF-κB p65(1∶1 000)和β-actin(1∶5 000)一抗于4 ℃摇晃孵育过夜,H3K4me3蛋白以H3为内参,其余蛋白以β-actin为内参。TBST洗膜3次,将PVDF膜与辣根过氧化物酶偶联的二抗摇晃孵育1 h。TBST洗膜3次,用增强化学发光溶液和凝胶成像仪系统显影、检测蛋白印迹条带,使用Image J软件分析蛋白条带灰度。

1.2.8 明确AZ505作用浓度并进行实验验证 根据CCK-8实验结果选择对NRK-49F细胞毒性较小浓度(2.500、5.000、10.000和20.000 μmol/L)的AZ505对细胞进行干预,经Western blotting明确AZ505抑制HG诱导NRK-49F细胞活化的作用浓度,并取AZ505作用浓度为20.000 μmol/L用于实验验证。将细胞分为NG组、NG+AZ505组、HG组、HG+AZ505组。NG培养基和HG培养基均含0.5% FBS、1%青链霉素混合液。处理48 h后,收集细胞、提取细胞蛋白,经Western bloting明确AZ505对HG诱导NRK-49F细胞活化的抑制作用。

1.2.9 免疫荧光检测 肾组织用4%多聚甲醛固定、石蜡包埋后切片(厚3 μm),脱蜡后用EDTA(pH 9.0)进行抗原修复;用预热的4%多聚甲醛固定NRK-49F细胞30 min,随后用溶解于PBS的0.5% Triton X-100通透10 min,5% BSA常温封闭1 h,滴加一抗并于4 ℃孵育过夜,使用以下蛋白的一抗:鼠抗SMYD2(1∶200)、兔抗NF-κB p-p65(1∶300)、兔抗α-SMA(1∶300)。孵育结束后,PBS洗涤3次,5 min/次。将样本与Alexa Flour Plus 488/555荧光二抗(1∶200)常温避光孵育1 h。PBS洗涤3次后,用抗荧光淬灭封片剂封片,立即使用光学显微镜观察并采集图片。

1.3　统计学方法

数据分析采用 GraphPad Prism 9.2 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，比较用 t 检验或单因素方差分析。P <0.05 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　HG 诱导 NRK-49F 细胞活化

NC 组与 DM 组小鼠血清 BG、Scr 水平比较，经 t 检验，差异均有统计学意义（P <0.05），DM 组高于 NC 组。见表 1。

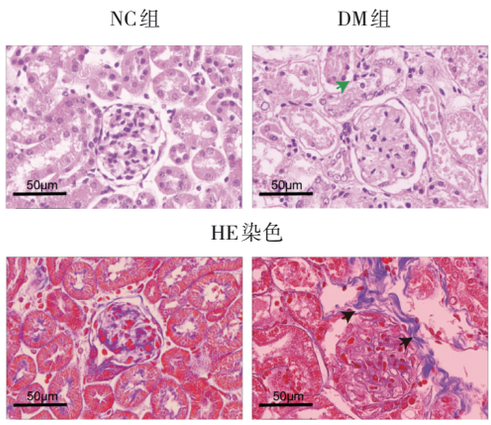
表 1　NC 组与 DM 组小鼠血清 BG、Scr 水平比较

（n =5，$\bar{x} \pm s$）

组别	BG/（mol/L）	Scr/（μmol/L）
NC 组	8.33 ± 1.70	5.98 ± 1.47
DM 组	30.49 ± 4.41	11.00 ± 0.71
t 值	10.480	6.899
P 值	0.000	0.000

2.2　NC 组与 DM 组小鼠肾组织 HE、Masson 染色

高倍镜下观察可见 DM 组小鼠肾小管排列紊乱，部分肾间质可见炎症细胞浸润且出现明显的蓝染的胶原纤维沉积，NC 组小鼠肾组织无明显病理改变。见图 1。



绿色箭头表示炎症细胞浸润；黑色箭头表示蓝染胶原纤维沉积。

图 1　NC 组与 DM 组小鼠肾组织 HE、Masson 染色

2.3　DM 组与 NC 组小鼠肾组织 α-SMA、Collgen Ⅰ、Fibronectin、SMYD2、H3K4me3、NF-κB p65、NF-κB p-p65 蛋白相对表达量比较

DM 组与 NC 组小鼠肾组织 α-SMA、Collagen Ⅰ、Fibronectin、SMYD2、H3K4me3、NF-κB p-p65 蛋白相对表达量比较，经单因素方差分析，差异均有统计学意义（P <0.05），DM 组高于 NC 组。两组 NF-κB p65 蛋白相对表达量比较，差异无统计学意义（P >0.05）。见图 2 和表 2。

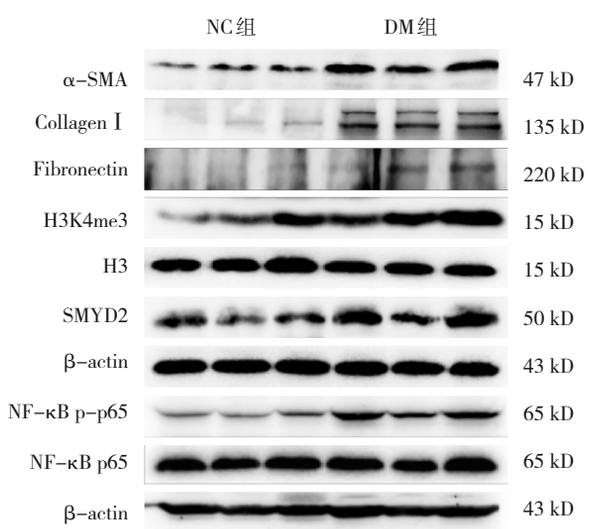


图 2　各组小鼠肾组织各蛋白条带图

免疫荧光结果示，高倍镜下观察可见 α-SMA、SMYD2 在 NC 组小鼠肾组织低表达，但在 DM 组小鼠肾组织中高表达。见图 3。

表 2　DM 组与 NC 组小鼠肾组织 α-SMA、Collgen Ⅰ、Fibronectin、SMYD2、H3K4me3、NF-κB p65、NF-κB p-p65 蛋白相对表达量比较　（n =5，$\bar{x} \pm s$）

组别	α-SMA	Collagen Ⅰ	Fibronectin	SMYD2	H3K4me3	NF-κB p65	NF-κB p-p65
NC 组	0.46 ± 0.09	0.26 ± 0.08	0.31 ± 0.11	0.52 ± 0.09	0.59 ± 0.24	1.67 ± 0.31	0.38 ± 0.07
DM 组	0.99 ± 0.16	1.26 ± 0.17	0.74 ± 0.88	0.89 ± 0.21	1.14 ± 0.20	1.64 ± 0.09	1.19 ± 0.17
t 值	4.981	9.490	5.356	2.813	2.998	0.352	12.420
P 值	0.008	0.000	0.006	0.048	0.040	0.742	0.000

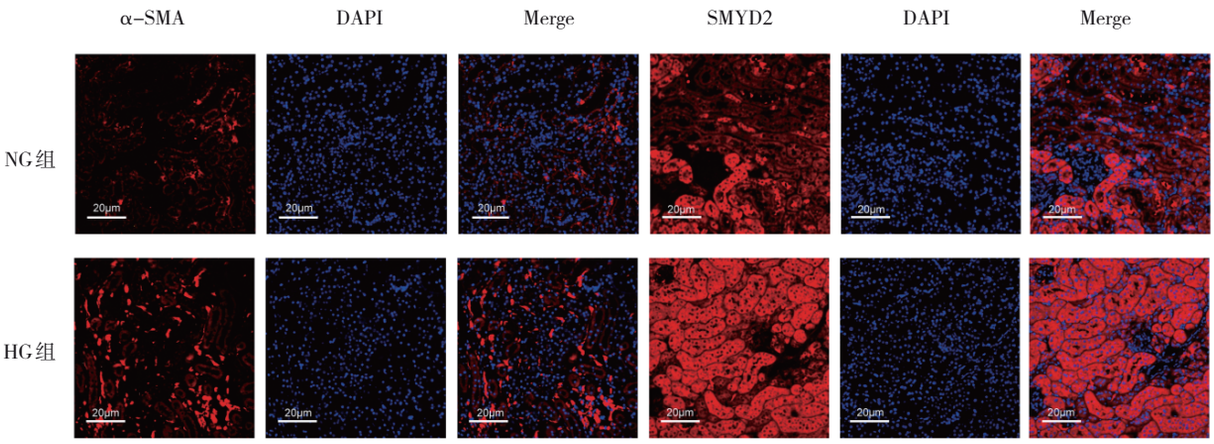


图3　各组小鼠肾组织免疫荧光检测α-SMA、SMYD2定位图

2.4　HG刺激不同时间点NRK-49F细胞α-SMA、Collagen Ⅰ、Fibronectin、SMYD2蛋白相对表达量比较

HG刺激大鼠0、6、12、24、36、48 h NRK-49F细胞α-SMA、Collagen Ⅰ、Fibronectin、SMYD2蛋白相对表达量比较，经单因素方差分析，差异均有统计学意义（P<0.05）。见表3和图4。

表3　HG刺激不同时间点NRK-49F细胞α-SMA、Collagen Ⅰ、Fibronectin、SMYD2蛋白相对表达量比较

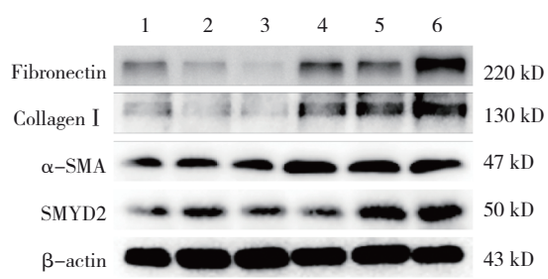
（n=3，$\bar{x} \pm s$）

时间	α-SMA	Collagen Ⅰ	Fibronectin	SMYD2
0 h	0.38 ± 0.05	0.31 ± 0.17	0.23 ± 0.06	0.65 ± 0.08
6 h	0.33 ± 0.04	0.38 ± 0.09	0.24 ± 0.08	0.79 ± 0.07
12 h	0.38 ± 0.09	0.41 ± 0.09	0.21 ± 0.07	0.75 ± 0.11
24 h	0.68 ± 0.08①②	0.86 ± 0.19①②③	0.58 ± 0.11①②③	0.69 ± 0.04
36 h	0.67 ± 0.08①②	0.99 ± 0.15①②③	0.67 ± 0.08①②③	1.01 ± 0.15①
48 h	0.72 ± 0.03①②③	1.04 ± 0.11①②③	0.73 ± 0.09①②③	1.08 ± 0.07①②③
F值	22.240	17.510	25.210	11.190
P值	0.000	0.000	0.000	0.000

注：①与0 h比较，P<0.05；②与6 h比较，P<0.05；③与12 h比较，P<0.05。

2.5　不同AZ505的作用浓度组NRK-49F细胞存活率比较

0.000 μmol/L组、0.156 μmol/L组、0.313 μmol/L组、0.625 μmol/L组、1.250 μmol/L组、2.500 μmol/L组、5.000 μmol/L组、10.000 μmol/L组、20.000 μmol/L组、40.000 μmol/L组和60.000 μmol/L组大鼠NRK-49F细胞存活率分别为（100.00 ± 0.00）%、（96.34 ± 1.82）%、（88.47 ± 1.44）%、（86.73 ± 1.33）%、（83.71 ± 1.29）%、（81.15 ± 2.34）%、（81.15 ± 2.48）%、（77.77 ± 2.16）、（71.91 ± 5.39）%、（23.24 ± 1.52）%、（0.09 ± 0.16）%，经单因素方差分析，差异有统计学意义（F=385.000，P=0.000）。40.000 μmol/L组、60.000 μmol/L组较0.000 μmol/L组低（P<0.05）。



1:0 h；2:6 h；3:12 h；4:24 h；5:36 h；6:48 h。

图4　HG刺激不同时间点NRK-49F细胞α-SMA、Collagen Ⅰ、Fibronectin、SMYD2蛋白条带图

2.6　AZ505可抑制HG诱导的NRK-49F细胞活化

NG组、HG组、HG + AZ505（2.500 μmol/L）组、HG + AZ505（5.000 μmol/L）组、HG + AZ505（10.000 μmol/L）组、HG+AZ505（20.000 μmol/L）组大鼠NRK-49F细胞Fibronectin、Collagen Ⅰ、SMYD2蛋白相对表达量比较，经单因素方差分析，差异均有统计学意义（P<0.05）。HG组较NG组高（P<0.05），HG + AZ505（20.000 μmol/L）组较HG组低（P<0.05），后续采用20.000 μmol/L AZ505作用浓度用于实验验证。见表4和图5A。

20 μmol/L AZ505干预后，NG组、NG + AZ505组、HG组、HG + AZ505组大鼠NRK-49F细胞Fibronectin、Collagen Ⅰ、α-SMA、H3K4me3、SMYD2

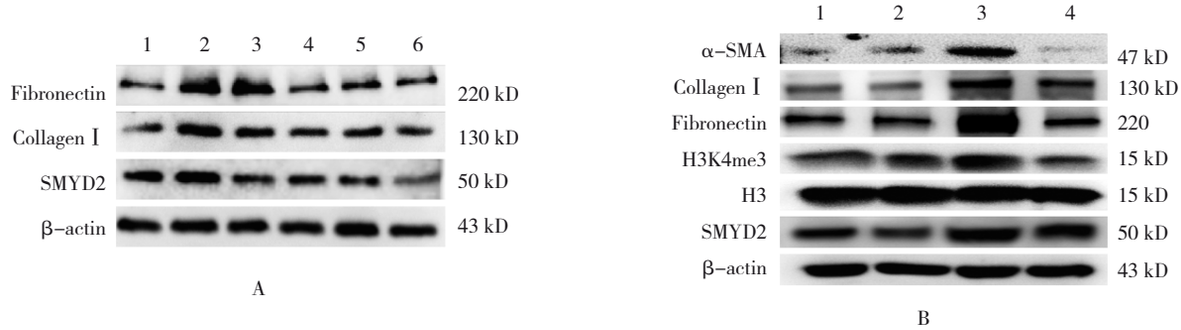
表 4　各组大鼠NRK49F细胞Fibronectin、Collagen Ⅰ、SMYD2蛋白相对表达量的比较　（n=3，$\bar{x} \pm s$）

组别	Fibronectin	Collagen Ⅰ	SMYD2
NG组	0.40 ± 0.05	0.52 ± 0.05	0.67 ± 0.12
HG组	0.97 ± 0.13	1.08 ± 0.09	1.04 ± 0.17
HG+AZ505（2.500 μmol/L）组	0.94 ± 0.11	0.90 ± 0.16	0.81 ± 0.07
HG+AZ505（5.000 μmol/L）组	0.70 ± 0.17	0.87 ± 0.09	0.75 ± 0.09
HG+AZ505（10.000 μmol/L）组	0.71 ± 0.15	0.90 ± 0.13	0.54 ± 0.07
HG+AZ505（20.000 μmol/L）组	0.66 ± 0.16	0.64 ± 0.12	0.37 ± 0.13
F值	7.228	9.572	12.420
P值	0.003	0.000	0.000

蛋白相对表达量比较，经单因素方差分析，差异均有统计学意义（P <0.05）。HG 组较 NG 组高（P < 0.05），HG + AZ505 组较 HG 组低（P <0.05）。见表 5 和图 5B。

2.7　各组大鼠 NRK49F 细胞 SMYD2 和 α–SMA、SMYD2 和 NF–κB p–p65 免疫荧光共定位

NG 组、NG + AZ505 组、HG 组、HG + AZ505 组大鼠 NRK–49F 细胞 SMYD2 和 α–SMA、SMYD2 和 NF–κB p–p65 免疫荧光共定位结果示，高倍镜下可见静息状态下，SMYD2 主要表达在细胞核、α–SMA 主要表达细胞质；HG 刺激后，两者的定位未发生改变但荧光强度均增加。静息状态下，NF–κB p–p65 主要表达细胞质，HG 刺激后，NF–κB p–p65 在细胞质和细胞核均有表达，即 SMYD2 和 NF–κB p–p65 在细胞核存在共定位，且两者的荧光强度均增强，以上现象均可被 AZ505 抑制。见图 6。



A：1：NG 组；2：HG 组；3：HG + AZ505（2.500 μmol/L）组；4：HG + AZ505（5.000 μmol/L）组；5：HG + AZ505（10.000 μmol/L）组；6：HG + AZ505（20.000 μmol/L）组。B：1：NG 组；2：NG + AZ505 组；3：HG 组；4：HG + AZ505 组。

图 5　各组大鼠 NRK49F 细胞的蛋白条带图

表 5　各组大鼠NRK49F细胞α–SMA、Collagen Ⅰ、Fibronectin、H3K4me3、SMYD2蛋白相对表达量的比较　（n=3，$\bar{x} \pm s$）

组别	α–SMA	Collagen Ⅰ	Fibronectin	H3K4me3	SMYD2
NG组	0.63 ± 0.28	0.56 ± 0.17	0.55 ± 0.09	0.28 ± 0.07	0.61 ± 0.08
HG组	1.39 ± 0.22①②	1.12 ± 0.10①②	1.15 ± 0.05①②	0.95 ± 0.09①②	1.06 ± 0.04①②
NG + AZ505组	0.51 ± 0.11	0.44 ± 0.07	0.57 ± 0.06	0.44 ± 0.16②	0.57 ± 0.03
HG + AZ505组	0.49 ± 0.25③	0.86 ± 0.08③	0.64 ± 0.12③	0.27 ± 0.12③	0.66 ± 0.08③
F值	10.870	23.060	33.270	23.490	35.190
P值	0.003	0.000	0.000	0.000	0.010

注：①与NG组比较，P<0.05；②与NG+AZ505组比较，P<0.05；③与HG组比较，P<0.05。

2.8　各组大鼠 NRK–49F 细胞 NF–κB p65、NF–κB p–p65 蛋白相对表达量比较

NG 组、NG + AZ505 组、HG 组、HG + AZ505 组大鼠 NRK–49F 细胞 NF–κB p–p65 蛋白相对表达量比较，经单因素方差分析，差异有统计学意义（P <0.05）；HG 组较 NG 组高（P <0.05），HG + AZ505 组较 HG 组低（P <0.05）。各组大鼠 NRK–49F 细胞 NF–κB p65 蛋白相对表达量比较，经单因素方差分析，差异无统计学意义（P >0.05）。见表 6 和图 7。

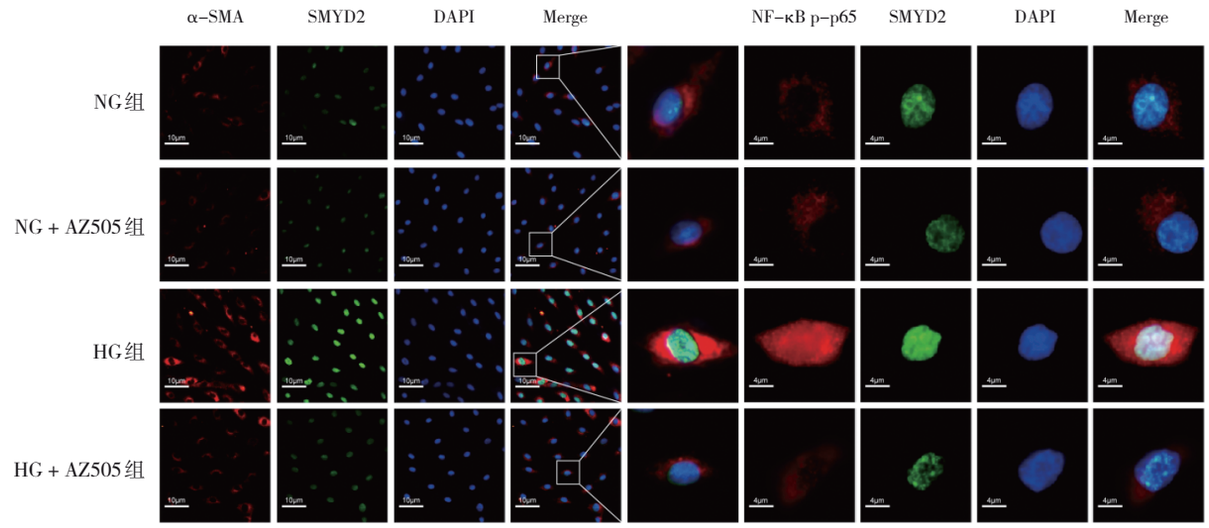
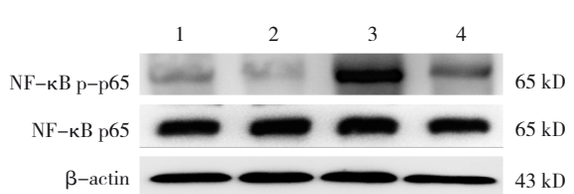


图6　各组大鼠NRK49F细胞SMYD2和α-SMA、SMYD2和NF-κB p-p65免疫荧光共定位

表 6　各组大鼠NRK-49F细胞NF-κB p65、NF-κB p-p65蛋白相对表达量比较　（n=3，$\bar{x} \pm s$）

组别	NF-κB p65	NF-κB p-p65
NG组	1.09 ± 0.14	0.42 ± 0.29
HG组	1.06 ± 0.15	1.11 ± 0.18①②
NG+AZ505组	0.99 ± 0.19	0.65 ± 0.07
HG+AZ505组	1.31 ± 0.20	0.52 ± 0.25③
F值	1.904	6.027
P值	0.208	0.019

注：①与NG组比较，P<0.05；②与NG+AZ505组比较，P<0.05；③与HG组比较，P<0.05。



1：NG组；2：NG+AZ505组；3：HG组；4：HG+AZ505组。

图7　各组NRK49F细胞NF-κB p-p65、NF-κB p65蛋白条带图

3　讨论

肾纤维化是CKD向ESRD转化的共同途径[20]，ECM成分蛋白的过度沉积及瘢痕形成是进行性肾纤维化的主要病理事件[21]。肌成纤维细胞是肾纤维化的关键效应细胞[22]；在各种慢性损伤的作用下，肌成纤维细胞通过分泌Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ、Collagen Ⅳ、Fibronectin和层黏连蛋白发挥其促纤维化功能[23]。肌成纤维细胞来源包括NRK-49F细胞、周细胞、肾小管上皮细胞等，其中NRK-49F细胞活化是肌成纤维细胞的主要来源[24-25]。研究表明，在DKD进程中NRK-49F细胞活化不仅受多种生长因子及细胞信号通路的调控，如血管紧张素Ⅱ、转化生子因子-β及磷酸肌醇3-激酶/蛋白激酶B等[26]；还受表观遗传学的调控，如染色质组蛋白修饰、DNA甲基化及非编码RNA等，在DKD的发病机制中也起关键作用[27]，然而表观遗传调控在肾成纤维活化中的作用还有待进一步阐明。

SMYD2是研究最广泛的组蛋白赖氨酸甲基转移酶之一，在胃癌、膀胱癌、结肠癌及乳腺癌等患者中高表达[28]；尽管一些研究已经报道SMYD2在许多肿瘤中的作用和功能，但其在DKD进展中的作用尚未明确。本研究结果中，与NC组相比，DM组可诱导小鼠肾组织损伤、肾纤维化指标（Fibronectin、Collagen Ⅰ）、肌成纤维细胞活化标志物（α-SMA）、SMYD2及其组蛋白甲基化底物（H3K4me3）、NF-κB p65亚基磷酸化表达增高，表明DM组小鼠肾组织损伤且肾脏纤维化、肌成纤维细胞活化可能与SMYD2表达增高及NF-κB激活有关。在体外使用HG刺激NRK-49F细胞发现，HG可诱导NRK-49F细胞活化伴SMYD2表达上调；应用SMYD2特异性抑制剂AZ505可抑制HG诱导的NRK-49F细胞内SMYD2、ECM成分蛋白及α-SMA表达，提示SMYD2可能介导HG诱导的NRK-49F细胞活化。

炎症反应在肾纤维化进展中具有重要作用，NF-κB作为炎症反应的关键转录因子[29]，在肾脏纤

维化中NF-κB激活可通过诱导上皮间充质转化、激活肾间质成纤维细胞及影响炎症因子释放等方式调控其发生、发展[30-31]。SMYD2作为组蛋白甲基转移酶也可甲基化非组蛋白（如NF-κB），从而调控细胞的生长、增殖、凋亡[32-33]。在三阴性乳腺癌细胞系中SMYD2可通过协同甲基化和激活NF-κB，使NF-κB p65发生甲基化和磷酸化，促进乳腺癌细胞的增殖和活化[32]。研究表明，SMYD2可促进NF-κB p65磷酸化，SMYD2过表达可激活细胞中的NF-κB信号通路，从而促进炎症细胞因子的释放[33]。本课题组前期研究发现应用SMYD2特异性抑制剂AZ505可下调单侧输尿管闭塞小鼠模型中小鼠肾脏中肾纤维化指标的蛋白表达，AZ505或其特异性siRNA抑制SMYD2可抑制转化生长因子β1培养的肾间质成纤维细胞中蛋白的表达，明确了SMYD2是肾纤维化及NRK-49F细胞活化中的重要介质[34]。然而SMYD2通过NF-κB信号通路的激活如何调控DKD肾纤维化仍有待进一步明确。为评估SMYD2介导HG诱导的NRK-49F细胞活化中的可能机制，本研究经免疫荧光检测NF-κB p-p65和SMYD2在NRK-49F细胞共定位及Western blotting检测NF-κB p65总蛋白及磷酸化蛋白水平，发现AZ505可抑制NF-κB p-p65由细胞质转入细胞核、并抑制其表达上调，提示SMYD2可能通过调控NF-κB p65磷酸化介导HG诱导的肾脏成纤维细胞活化。

综上所述，SMYD2特异性抑制剂AZ505可抑制HG诱导的NRK-49F细胞活化，其机制可能与抑制NF-κB细胞信号通路激活相关，提示SMYD2可能通过调控NF-κB信号通路激活介导HG诱导的NRK-49F细胞活化。然而在DKD的发展中，SMYD2如何调控NF-κB细胞信号通路及可能涉及到的具体机制有待进一步研究，也是本课题组接下来的研究重点。

参 考 文 献 ：

[1] SAEEDI P, PETERSOHN I, SALPEA P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2019, 157: 107843.

[2] OGURTSOVA K, GUARIGUATA L, BARENGO N C, et al. IDF diabetes atlas: global estimates of undiagnosed diabetes in adults for 2021[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2022, 183: 109118.

[3] TANASE D M, GOSAV E M, ANTON M I, et al. Oxidative stress and NRF2/KEAP1/ARE pathway in diabetic kidney disease (DKD): new perspectives[J]. Biomolecules, 2022, 12(9): 1227.

[4] COCKWELL P, FISHER L A. The global burden of chronic kidney disease[J]. Lancet, 2020, 395(10225): 662-664.

[5] LI S S, SUN Q, HUA M R, et al. Targeting the Wnt/β-catenin signaling pathway as a potential therapeutic strategy in renal tubulointerstitial fibrosis[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 719880.

[6] BOOR P, FLOEGE J. Renal allograft fibrosis: biology and therapeutic targets[J]. Am J Transplant, 2015, 15(4): 863-886.

[7] SATO Y, MII A, HAMAZAKI Y, et al. Heterogeneous fibroblasts underlie age-dependent tertiary lymphoid tissues in the kidney[J]. JCI insight, 2016, 1(11): e87680.

[8] HUNG P H, HSU Y C, CHEN T H, et al. Recent advances in diabetic kidney diseases: from kidney injury to kidney fibrosis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(21): 11857.

[9] PITOCCO D, TESAURO M, ALESSANDRO R, et al. Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(11): 21525-21550.

[10] QI W E, CHEN X M, PORONNIK P, et al. The renal cortical fibroblast in renal tubulointerstitial fibrosis[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38(1): 1-5.

[11] TOMASEK J J, GABBIANI G, HINZ B, et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(5): 349-363.

[12] TANIGUCHI K, KARIN M. NF-κB, inflammol/Lation, immol/Lunity and cancer: coming of age[J]. Nat Rev Immol/Lunol, 2018, 18(5): 309-324.

[13] WANG Y L, ZHU X J, YUAN S G, et al. TLR4/NF-κB signaling induces GSDMD-Related pyroptosis in tubular cells in diabetic kidney disease[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2019, 10: 603.

[14] CAMPANHOLLE G, LIGRESTI G, GHARIB S A, et al. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 3. Novel mechanisms of kidney fibrosis[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2013, 304(7): C591-C603.

[15] SPELLMON N, HOLCOMB J, TRESCOTT L, et al. Structure and function of SET and MYND domain-containing proteins[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(1): 1406-1428.

[16] XU S T, ZHONG C, ZHANG T L, et al. Structure of human lysine methyltransferase Smyd2 reveals insights into the substrate divergence in Smyd proteins[J]. J Mol Cell Biol, 2011, 3(5): 293-300.

[17] YI X, JIANG X J, FANG Z M. Histone methyltransferase SMYD2: ubiquitous regulator of disease[J]. Clin Epigenetics, 2019, 11(1): 112.

[18] LI L X, FAN L X, ZHOU J X, et al. Lysine methyltransferase SMYD2 promotes cyst growth in autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. J Clin Invest, 2017, 127(7): 2751-2764.

[19] 简久莹, 张妮, 余婷, 等. 组蛋白甲基化转移酶2在糖尿病肾病小鼠肾组织中的表达变化及其意义[J]. 实用医学杂志, 2020, 36(23): 3194-3198.

[20] ZHANG S P, HUANG Q, CAI X X, et al. Osthole ameliorates renal fibrosis in mice by suppressing fibroblast activation and epithelial-mesenchymal transition[J]. Front Physiol, 2018, 9: 1650.

[21] TOMASEK J J, GABBIANI G, HINZ B, et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(5): 349-363.

[22] HUMPHREYS B D. Mechanisms of renal fibrosis[J]. Annu Rev Physiol, 2018, 80: 309-326.

[23] WANG Y T, LU M Q, XIONG L P, et al. Drp1-mediated mitochondrial fission promotes renal fibroblast activation and fibrogenesis[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(1): 29.

[24] MACK M, YANAGITA M. Origin of myofibroblasts and cellular events triggering fibrosis[J]. Kidney Int, 2015, 87(2): 297-307.

[25] SRIVASTAVA S P, HEDAYAT A F, KANASAKI K, et al. microRNA crosstalk influences epithelial-to-mesenchymal, endothelial-to-mesenchymal, and macrophage-to-mesenchymal transitions in the kidney[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 904.

[26] ZHANG Y, JIN D, KANG X, et al. Signaling pathways involved in diabetic renal fibrosis[J]. Frontiers In Cell and Developmental Biology, 2021, 9: 696542.

[27] KATO M, NATARAJAN R. Diabetic nephropathy-emerging epigenetic mechanisms[J]. Nat Rev Nephrol, 2014, 10(9): 517-530.

[28] WU L, KOU F, JI Z Y, et al. SMYD2 promotes tumorigenesis and metastasis of lung adenocarcinoma through RPS7[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(5): 439.

[29] ZHANG S P, HUANG Q, CAI X X, et al. Osthole ameliorates renal fibrosis in mice by suppressing fibroblast activation and epithelial-mesenchymal transition[J]. Front Physiol, 2018, 9: 1650.

[30] YU H, LIN L B, ZHANG Z Q, et al. Targeting NF-κB pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study[J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 209.

[31] LIU B C, TANG T T, LV L L, et al. Renal tubule injury: a driving force toward chronic kidney disease[J]. Kidney Int, 2018, 93(3): 568-579.

[32] LI L X, ZHOU J X, CALVET J P, et al. Lysine methyltransferase SMYD2 promotes triple negative breast cancer progression[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(3): 326.

[33] WU W J, WANG J H, XIAO C X, et al. SMYD2-mediated TRAF2 methylation promotes the NF-κB signaling pathways in inflammol/Latory diseases[J]. Clin Transl Med, 2021, 11(11): e591.

[34] LIU L R, LIU F, GUAN Y J, et al. Critical roles of SMYD2 lysine methyltransferase in mediating renal fibroblast activation and kidney fibrosis[J]. FASEB J, 2021, 35(7): e21715.

（李科 编辑）

本文引用格式：左思洋, 李霞, 陈思羽, 等. SMYD2介导高糖诱导大鼠肾成纤维细胞活化的机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2024, 34(4): 29-38.

Cite this article as: ZUO S Y, LI X, CHEN S Y, et al. Mechanism underlying the role of SMYD2 in mediating high glucose-induced activation of rat renal fibroblasts[J]. China Journal of Modern Medicine, 2024, 34(4): 29-38.