

学校编号: 10384
学号: 20120051302008

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

血清和糖皮质激素诱导蛋白激酶在肾细胞
中的定位及其与醛糖还原酶关系的研究

Subcellular localization of serum and glucocorticoid
inducible protein kinase(SGK) in renal cells and relationship
between SGK and aldose reductase

魏梅娟

指导教师姓名: 周克夫 副教授

刘仁海 副教授

专业名称: 水生生物学

论文提交日期: 2008年 5月

论文答辩日期: 2008年 6月

学位授予日期: 2008年 月

答辩委员会主席: 高亚辉 教授

评 阅 人: 许正平 教授

刘金明 副研究员

2008年 6月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。
本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人(签名):

年 月 日

目录

摘 要.....	1
Abstract.....	3
1 前言	5
1.1 引言	5
1.2 SGK 的发现	5
1.3 SGK1 的结构.....	6
1.4 SGK1 的调节机制	6
1.4.1 SGK1 的转录调节	6
1.4.2 SGK1 的磷酸化调节.....	8
1.5 SGK1 的细胞定位	9
1.6 SGK1 的生物学功能	11
1.6.1 SGK1 调节离子通道的功能.....	11
1.6.2 SGK1 抑制细胞凋亡的功能.....	12
1.6.3 SGK1 与糖尿病.....	13
1.7 AR 与糖尿病.....	15
1.8 AR 与 SGK1 的关系	16
1.9 本文研究的目的和意义	17
2 材料与方法.....	19
2.1 实验材料	19
2.1.1 细胞株.....	19
2.1.2 主要试剂.....	19
2.1.3 主要仪器	20
2.2 实验方法	21
2.2.1 质粒构建及纯化实验	21
2.2.2 细胞培养	25
2.2.3 药物处理	26
2.2.4 RNA 干扰实验	26

2.2.5 细胞转染.....	26
2.2.6 核浆分离提取蛋白质.....	27
2.2.7 蛋白提取与 Western blot.....	28
2.2.8 免疫细胞化学 (immunocytochemistry, ICC)	29
3 实验结果.....	34
3.1 高盐诱导 SGK 高表达.....	34
3.2 SGK1 的亚细胞定位.....	34
3.3 外源表达 SGK1 的亚细胞定位.....	38
3.3.1 构建获得表达质粒 sgk1-Flag-pCMV5.....	39
3.3.2 外源 SGK1 的表达及亚细胞定位.....	42
3.4 AR 与 SGK1 的关系	45
4 讨论	49
5 结论	52
参考文献.....	53
致 谢.....	63

Table of Contents

Abstract(in Chinese)	1
Abstract(in English)	3
1 Introduction	5
1.1 Introduction	5
1.2 The discovery of SGK	5
1.3 The structure of SGK1	6
1.4 Regulation of SGK1	6
1.4.1 Regulation of SGK1 by transcription	6
1.4.2 Regulation of SGK1 by phosphorylation.....	8
1.5 Subcellular localization of SGK1	9
1.6 The biological functions of SGK1	11
1.6.1 Regulation of ion channel by SGK1	11
1.6.2 Inhibition of apoptosis by SGK1	12
1.6.3 SGK1 and diabetes	13
1.7 AR and diabetes	15
1.8 AR and SGK1	16
1.9 Purpose and significance	17
2 Materials and methods	19
2.1 Materials	19
2.1.1 cell line.....	19
2.1.2 The list of chemical reagents.....	19
2.1.3 The list of apparatus	20
2.2 methods	21
2.2.1 Plamid construction and purification.....	21
2.2.2 Cell culture	25
2.2.3 Drug treatment.....	26
2.2.4 RNAi assay	26

2.2.5 Transfection	26
2.2.6 Preparation of cytosolic and nuclear fractions.....	27
2.2.7 Protein preparation and Western blot	28
2.2.8 Immunocytochemistry	29
3 Results.....	34
3.1 Induction of the expression of SGK by hypertonicity	34
3.2 The subcellular localization of SGK1.....	34
3.3 The subcellular localization of foreign SGK1.....	38
3.3.1 sgk1-Flag-pCMV5 plamid construction	39
3.3.2 The expression and subcellular localization of foreign SGK1	42
3.4 AR and SGK1	45
4 Discussion.....	49
5 Conclusion	52
References.....	53
Acknowledgement	63

摘 要

血清和糖皮质激素诱导蛋白激酶（serum and glucocorticoid inducible protein kinase, SGK）是一种新发现的丝/苏氨酸蛋白激酶，与其他蛋白激酶主要在酶活性水平上受翻译后的磷酸化和去磷酸化调控显著不同的是，SGK1的转录、活性以及亚细胞定位受到不同胞内和胞外刺激因素的调节，是多种胞内信号途径的功能性交汇点，参与了细胞增殖、渗透调节、离子通道调节以及细胞生存和/或凋亡应答等过程，与糖尿病肾病、高血压等疾病密切相关。

然而，SGK1在信号转导通路中的分子机制还不是很清楚，其底物的发现也很有限。尤其SGK1的亚细胞定位研究仍存在很多争议，在细胞内表达外源的SGK1与细胞内源表达的SGK1的亚细胞定位也存在差异。因此，SGK1的亚细胞定位仍是值得深入探讨的问题，研究SGK1的亚细胞定位有利于进一步研究SGK1的底物以及其在各种细胞活动中所担任的角色和作用机制。在本文的研究中，我们通过免疫细胞化学，western blot，以及基因沉默（RNAi）等技术检测了小鼠肾内髓质集合管上皮细胞（mouse inner medullary collecting duct, mIMCD3）中内源表达的SGK1的亚细胞定位情况，同时构建了带有Flag标签的SGK1表达载体sgk1-Flag-pCMV5，通过免疫细胞化学和核浆分离等技术检测了外源SGK1在mIMCD3细胞中的分布情况。结果证明了在mIMCD3细胞中内源表达的SGK1定位于细胞核中，外源表达的SGK1在细胞质和细胞核都有分布，然主要还是分布于细胞核中。并且，我们发现了在mIMCD3细胞中，高盐培养环境可诱导SGK1的高表达。

醛糖还原酶（aldose reductase, AR）作为多元醇糖代谢通路中的限速酶，在糖尿病肾病中起着重要作用。近年来的研究也证实SGK1参与了糖尿病肾病的发生。然而，关于AR与SGK1之间是否存在关系的研究迄今仍未见报道。我们利用AR的化学酶抑制剂（zopolrestat, ARI）和AR siRNA，通过免疫细胞化学，

western blot 等技术进行 AR 与 SGK1 的关系研究, 结果发现, 在体外培养的 mIMCD3 细胞中, 当细胞内 AR 的活性被 ARI 抑制或 AR 的表达被 AR siRNA 抑制后, SGK1 的表达也受到抑制, 说明该细胞内 SGK1 的表达受到 AR 的正调控。

关键词: 血清和糖皮质激素诱导蛋白激酶(SGK); 醛糖还原酶 (AR); 细胞定位

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Serum and glucocorticoid inducible protein kinase, SGK is a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family. Unlike the vast majority of protein kinases, which are predominantly regulated at the enzymatic level by posttranslational phosphorylation and dephosphorylation, the transcript expression, activity and subcellular localization of SGK1 can be acutely controlled by a diverse set of stimuli. SGK is an important focal point of intracellular cross-talk to control many cellular processes, including cell proliferation, osmoregulation, ion channel regulation and cell survival and/or apoptotic responses. SGK1 is also found to contribute to the development of many disease such as diabetic nephropathy and hypertension.

However, the precise mechanism by which SGK1 plays important roles in those signal transduction pathways has not been established. The substrates of SGK1's physiological effects also remain to be identified. The subcellular localization of SGK1 has not yet been conclusively established and the studies of subcellular localization of transiently expressed SGK1 using expression construct of SGK1 and endogenous SGK1 have provided controversial results. In this study, Immunocytochemistry and western blotting were performed to detect the expression and subcellular localization of SGK1 in mIMCD3 cells. We discovered that SGK1 was predominantly localized to the nucleus that can be greatly up-regulated by hypertonicity. This result was confirmed by SGK1 siRNA which reduced the expression of SGK1. Then the expression construct of SGK1 with Flag tag at the C-terminus was used to determine the subcellular localization of transiently expressed SGK1. We found that transiently expressed SGK1 can be detected in both nucleus and cytoplasm, although the positive signals were stronger in nucleus than that in cytoplasm.

Aldose reductase, AR as rate-limiting enzyme in the polyol pathway plays an important role in diabetic nephropathy. Recently, some experimental studies have suggested that SGK1 also contributes to the development of diabetic nephropathy. In

this study, we provided the first evidence that the expression of SGK1 can be significantly down-regulated when cells were treated with AR inhibitor. The conclusion was also confirmed by AR siRNA which reduced the expression of AR. In summary the expression of SGK1 can be significantly regulated by AR in cultured mIMCD3 cells. These results have important implications for SGK's roles in renal physiology and pathophysiology.

Key words: serum and glucocorticoid inducible protein kinase; aldose reductase; subcellular localization

1 前言

1.1 引言

各种细胞在生物体内都处于各种激素和胞外其它因素刺激下，因此而激活各种胞内信号转导通路。细胞要适应动态的外环境并执行一定的生理功能就需要各种调节因子间的信号转导，这样才能整合各种受体信号级联反应所传递出的胞内信号。各种各样的外部环境因素利用蛋白质的磷酸化/去磷酸化级联反应来快速、可逆地将信号从细胞膜传递至细胞浆和细胞核内。通过对这些级联反应中的各个蛋白成员的调控使细胞能够特异地、灵敏地对外界环境刺激作出合适的生理反应。血清和糖皮质激素诱导蛋白激酶(serum and glucocorticoid inducible protein kinase, SGK)就是这些胞内成员中的一员。许多证据已证明了SGK是胞内对话的重要交汇点，许多细胞表面受体、核受体和细胞应激通道汇集于此，从而参与很多细胞进程，包括细胞增殖、渗透调节、细胞生存和/或凋亡应答。

1.2 SGK 的发现

SGK是1993年Firestone^[1]等人在con8. 6d6 大鼠乳腺癌细胞中，通过糖皮质激素诱导转录表达的差异筛选首次发现的一种新的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。当细胞受到糖皮质激素或血清刺激时，SGK基因在30min.内表达迅速升高，故将其命名为血清和糖皮质激素诱导蛋白激酶——SGK。该酶基因全长2.4kb，编码一49KD的蛋白激酶。此后，1999年Kobayashi^[2]等人在人类和小鼠的基因库里发现了另外两种编码与SGK的同源性极高的蛋白质的基因，并将这两种蛋白质分别命名为SGK2、SGK3，而前面发现的SGK则被命名为SGK1。SGK1、SGK2和SGK3组成了SGK的蛋白家族，其中被研究最多的就是SGK1。这三种蛋白激酶的催化结构域具有高达80% 的相同的氨基酸序列。与SGK一样，SGK2、SGK3 也通过磷脂酰肌醇依赖性激酶-1 (phosphoinositide-dependent kinase 1, PDK1)磷酸化其活化环上的特异性Thr 调节位点而被激活。此外，SGK2、SGK3 也特异性识别RXXRX(R代表丝/苏氨酸残基,S/T) 这一基序。然而，它们在很多方面也具有显著的不同之处：如，PDK1对SGK1、SGK2和SGK3的磷酸化位点不同，分别为Thr256、Thr193和Thr253；SGK3与SGK1一样在各组织中均有较高水平的表达，而

SGK2只在肝、肾、胰腺中具有高表达；在Rat2成纤维细胞中，SGK1受血清或地塞米松刺激诱导快速高表达，而SGK2、SGK3则不受血清或地塞米松刺激诱导表达；SGK1的活性可完全被磷酸肌醇3-激酶（phosphoinositide 3-kinase, PI3K）蛋白激酶抑制剂所抑制，而SGK2、SGK3 只被部分抑制。

1.3 SGK1 的结构

SGK1是由氨基端(N 末端)、中间结构域和羧基端(C 末端) 三部分组成的。在SWISS-MODEL同源建模预测出的SGK1的三维结构图中显示，SGK1的中间结构域从第82位到355位氨基酸，包含了几乎所有的主要氨基酸序列，其中包括ATP结合区域、催化结构域、泛素连接酶结合区以及可被核转运蛋白 α - 输入蛋白(importin- α)识别的核定位信号(nuclear localization signal, NLS)，形成了功能性的丝/苏氨酸蛋白激酶^[3]（图1）。虽然SGK1缺少PH(pleckstrin homology, PH) 结构域，但其结构与蛋白激酶B (protein kinase B, PKB) 具有高度的相似性，尤其是它的催化结构域与PKB有54%的同源性，与PKB一样特异性识别RXXRX（R代表丝/苏氨酸残基,S/T）这一基序。与PKB一样，SGK1也有两个特异性Ser/Thr 调节位点，一个是位于其催化结构域的活化环上的Thr256，另一个是位于C 末端的Ser422，与PKB的Thr308、Ser473极其相似^[4,5]。因此，很多PKB的底物目前发现也是SGK1的底物，如糖原合成激酶-3 (glycogen synthase kinase 3, GSK-3)^[6]、Forhead转录因子成员FoxO3a^[7,8]、Raf、I κ B激酶 β (I κ B kinases β , IKK β)、cAMP反应结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)^[9~11]等，但是SGK1与PKB磷酸化底物的位点不全相同，例如两者都能磷酸化FoxO3a的Thr32，SGK1使FoxO3a的Ser315 磷酸化,而PKB则磷酸化Ser253^[8]。

1.4 SGK1 的调节机制

1.4.1 SGK1 的转录调节

与目前已发现的绝大多数蛋白激酶主要受翻译后的磷酸化和去磷酸化的调节显著不同的是，SGK1在转录水平上就受到一系列细胞外刺激的调控，这种调控因为刺激不同和细胞类型不同也有所不同。除了糖皮质激素和血清，后来的研究陆续发现了醛固酮^[12~14]、山梨醇^[15]、胰岛素、胰岛素样生长因子(insulin-like

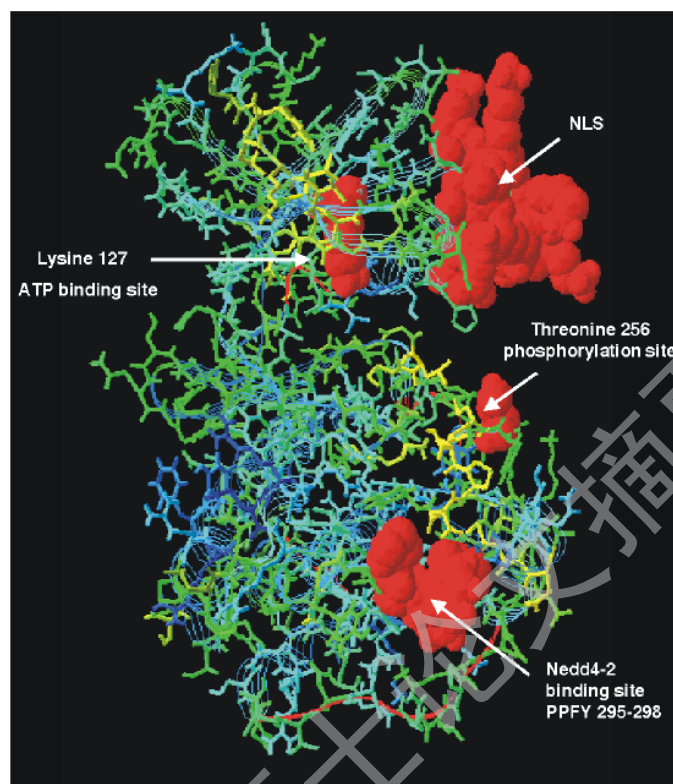


图1 SWISS-MODEL同源建模预测出的SGK1的三维结构图（引自文献[3]）

growthfactor-1, IGF-1)^[16]、热休克蛋白^[5]、肿瘤抑制因子p53^[17]、促卵泡激素 (FSH)^[18]、转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)^[19~21]、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 等^[22]，以及渗透压^[15,23]、紫外照射^[5,24]、DNA损伤^[25]、脑损伤^[26]等多种因素可以调节SGK1的基因转录。Gary L. 等人利用转录因子结合位点预测软件MatInspector 提出了在SGK1的启动区有许多可供转录因子结合的位点 (图2)，包括已鉴定的结合位点，如，-1000 bp左右的糖皮质激素应答元件 (glucocorticoid response elements, GRE)^[27]、-1380 bp和-1345 bp之间的p53的结合位点等^[28]。这或许也说明了SGK1的表达之所以能受如此多的胞外刺激的影响，正是因为其启动区有这么多的转录因子结合位点可供激素或胞外胁迫启动，从而在转录水平上调节SGK1的表达。

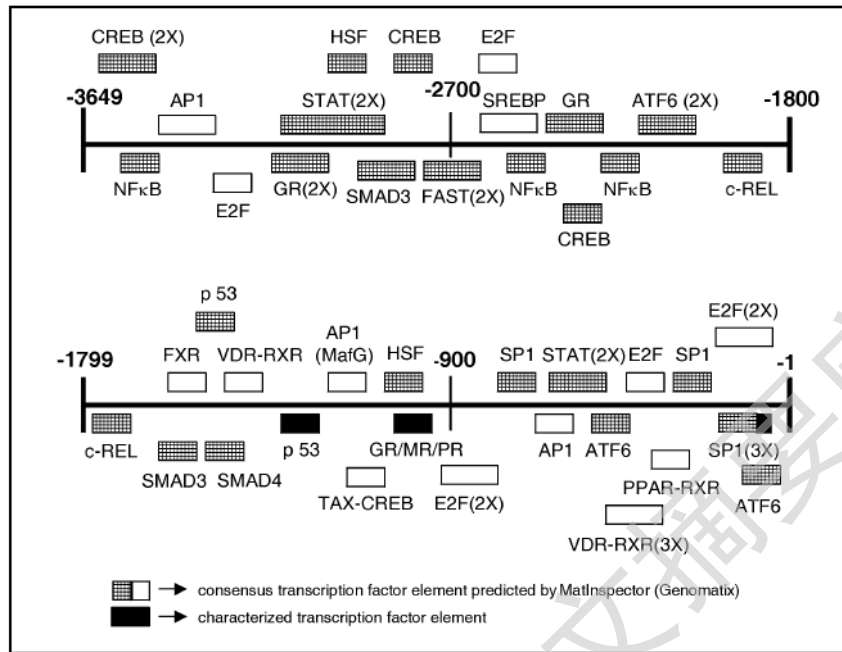


图2 SGK1启动区上的转录因子结合位点（引自文献[3]）

1.4.2 SGK1 的磷酸化调节

除了快速的转录调节外，SGK1还受翻译后的磷酸化/去磷酸化调节。胞外刺激通过不同的信号通路磷酸化SGK1从而活化该激酶的活性，是SGK1另一种重要的调节方式。首先，各种胞外刺激由各种核受体、细胞表面受体等，通过调节SGK1启动区的活性，在转录水平上调控SGK1的表达；其次，各种胞外刺激激活PI3K，而SGK1则作为PI3K信号转导途径的下游成分被磷酸化而激活，从而调节各种生长因子和胰岛素的促有丝分裂和细胞生存应答（如图3）。这条信号转导途径与PI3K活化PKB过程类似，所不同的是，SGK1没有PH结构域，不能像PKB那样被PI3K的磷酸化产物磷脂酰肌醇三磷酸(PIP₃)结合，因此，PDK1的PIF基序是激活SGK1所必需的，而PKB的激活可以不依赖PIF基序。SGK1的激活包括PIP₃依赖的磷脂酰肌醇依赖性激酶-2 (phosphoinositide-dependent kinase 2, PDK2)磷酸化Ser422和磷脂酰肌醇-3, 4, 5三磷酸(PIP₃)非依赖的PDK1磷酸化Thr256两个过程，即，PDK2被PIP₃激活后，磷酸化SGK1上位于C-末端的疏水结构域中的Ser422残基，Ser422被磷酸化后促进PDK1的PIF基序与SGK1结合，加

速PDK1磷酸化Thr256 残基，从而完全激活SGK1^[29~31]。激活后的SGK1在细胞质中或转运入细胞核中发挥其生物学功能。

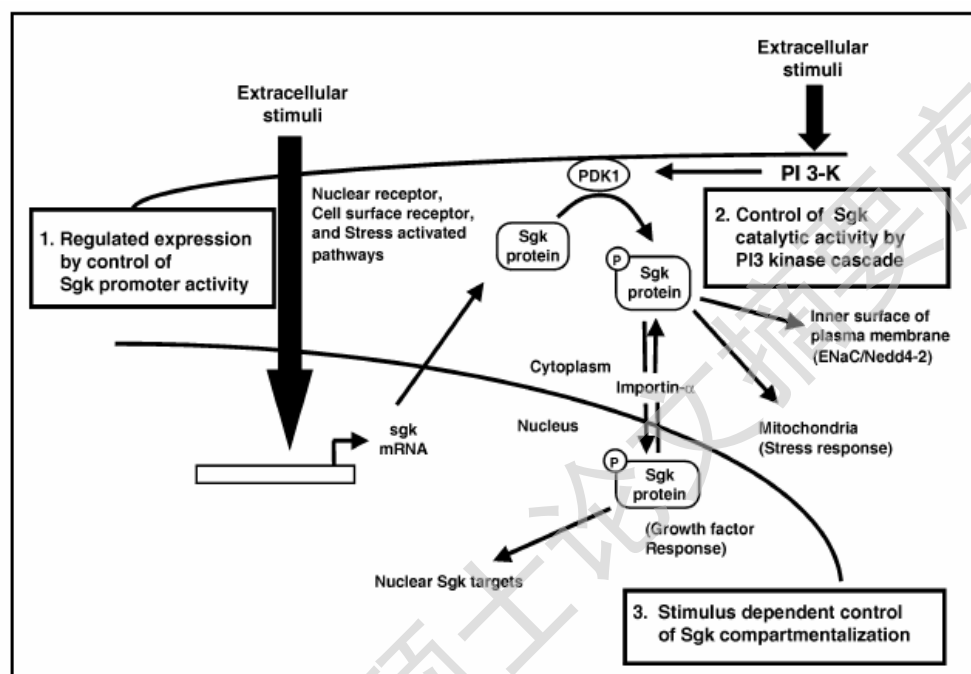


图3 SGK1的调节机制（引自文献[3]）

1.5 SGK1 的细胞定位

importin- α 介导了SGK1的核质穿梭。importin- α 能识别其运送蛋白的核定位信号，并通过与 β -输入蛋白（importin- β ）及其受体相互作用使受体转运蛋白复合物通过核孔复合体穿梭入核。研究发现，SGK1分子的131~141位氨基酸（KKAILKKKEEK）是核定位信号，且可被importin- α 识别。SGK1的三维结构图中显示，SGK1的核定位信号位于SGK1分子的外表面，更便于与importin- α 结合。体外实验也证明了SGK1的核定位信号确实能介导SGK1结合到importin- α 上并转运入核。SGK1的核定位信号上的位点突变可以减弱SGK1与importin- α 的结合并阻止其入核^[3,32]。SGK1通过其核定位信号与importin- α 结合为SGK1在特定的诱导条件下入核提供了机制上的基础。

SGK1的亚细胞定位受到不同激素、各种胞外刺激和细胞周期的严格调控。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库