

高糖环境下缬沙坦对肾小管上皮细胞-间充质转化过程中骨膜蛋白、转录激活因子1的影响

张光明^{1*}, 弓慧杰^{1,2}(1.成都市新都区人民医院内分泌/肾内科, 成都 610500; 2.泸州医学院肾病研究室, 四川泸州 646000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)13-1815-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.13.25

摘要 目的:研究在高糖环境下缬沙坦对肾小管上皮细胞-间充质转化(EMT)过程中骨膜蛋白(Periostin)、转录激活因子1(AP-1)的影响。方法:体外高糖环境下培养人肾小管上皮细胞(HK-2细胞),分为空白对照组和缬沙坦高、中、低剂量组(10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} mol/L),作用48 h;另设正常对照组。观察各组HK-2细胞形态学变化,检测各组HK-2细胞活力(OD值),细胞中Ⅲ型胶原含量、AP-1蛋白表达和Periostin、AP-1 mRNA表达。结果:与正常对照组比较,其余各组HK-2细胞部分细胞间隙增大并与附近的细胞脱离接触,细胞分裂旺盛,细胞活力、Ⅲ型胶原含量、AP-1蛋白表达和Periostin、AP-1 mRNA表达均增强($P<0.05$)。与空白对照组比较,缬沙坦高、中、低剂量组细胞活力、Ⅲ型胶原含量、AP-1蛋白表达和Periostin、AP-1 mRNA表达均更低($P<0.05$),其中缬沙坦中剂量组作用最明显($P<0.01$)。结论:体外高糖环境下可促进HK-2细胞EMT过程;缬沙坦可通过抑制AP-1的过表达进而下调转分化的肾小管上皮细胞中Periostin蛋白表达,从而减缓EMT过程。

关键词 缬沙坦;肾小管上皮HK-2细胞;上皮细胞-间充质转化;骨膜蛋白;转录激活因子1

Effects of Valsartan on Periostin and AP-1 during Renal Tubular Epithelial Cell-mesenchymal Tissue Transformation under the Condition of High Glucose

ZHANG Guangming¹, GONG Huijie^{1,2}(1.Dept. of Endocrinology/Nephrology, Chengdu Xindu District People's Hospital, Chengdu 610500, China; 2.Laboratory of Kidney Disease Research, Luzhou Medical College, Sichuan Luzhou 646000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of valsartan on periostin and AP-1 during renal tubular epithelial cell-mesenchymal tissue (EMT) transformation under the condition of high glucose. METHODS: Human renal tubular epithelial cells (HK-2 cells) were cultured *in vitro* under the condition of high glucose, and then divided into blank control group, valsartan high-dose, middle-dose and low-dose groups (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} mol/L); normal control group was set up. They were treated for 48 h. The morphology of HK-2 cells was observed; cell viability (OD value) of HK-2 cells were detected, and the content of Ⅲ type collagen, the protein expression of AP-1 and mRNA expression of Periostin and AP-1 were detected. RESULTS: Compared with normal control group, intercellular space of HK-2 cells enlarged and HK-2 cells were separated from nearby cells; exuberant cellular fission, cell viability, the content of Ⅲ type collagen, the protein expression of AP-1, mRNA expression of periostin and AP-1 were strengthened in other group ($P<0.05$). Compared with blank normal group, cell viability, the content of Ⅲ type collagen, the protein expression of AP-1, mRNA expression of periostin and AP-1 were lower in valsartan high-dose, medium-dose and low-dose groups ($P<0.05$), especially in valsartan medium-dose group ($P<0.01$). CONCLUSIONS: High glucose can promote EMT of HK-2 cells. Valsartan can down-regulate the protein expression of Periostin in renal tubular epithelial cell and slow down EMT via inhibiting the expression of AP-1.

KEYWORDS Valsartan; Renal tubular epithelial HK-2 cell; Epithelial cell-mesenchymal tissue transformation; Periostin; AP-1

缬沙坦(Valsartan)可从受体水平阻断任何来源的血管紧张素Ⅱ的效应。研究表明缬沙坦对糖尿病肾病具有保护作用,并且具有抗纤维化的疗效^[1-2]。肾小管间质纤维化是糖尿病肾病进展到晚期的基本病理变化,肾小管上皮细胞-间充质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)是肾小管间质纤维化的重要原因之一。高糖可诱导肾小管上皮细胞表型发生改变,向肌成纤维细胞转变,分泌并聚集细胞外基质而导致肾间质纤维化的发生发展^[3]。

骨膜蛋白(Periostin)是一种胞外基质分泌性蛋白,其可与整合素相互作用介导EMT,从而调节细胞的迁移和黏附^[4]。

*副主任医师。研究方向:糖尿病肾病。E-mail: 770930017@qq.com

Periostin表达阳性的细胞在迁移、入侵和黏附方面明显强于Periostin表达阴性的细胞^[5]。在以基质细胞增殖和迁移为特征的病理过程中可出现Periostin的过表达^[6]。Periostin可能通过调节胶原的生成,参与了肾间质纤维化的发展过程。其表达增强与肾脏组织的纤维化密切相关^[7]。本试验体外模拟高糖环境,研究缬沙坦对肾小管EMT过程中Periostin、转录激活因子1(AP-1)的影响,从分子角度进一步阐明EMT机制。

1 材料

1.1 仪器

微型凝胶电泳仪(日本Mupid公司);Tannon2500凝胶图像扫描系统(美国BioRad公司);AX-70荧光显微镜(日本Olympus光学仪器制造公司);10-240 VAC全光谱酶标仪(美

国 Thermo 公司)。

1.2 药品与试剂

缬沙坦胶囊(北京诺华制药有限公司,批号:H20040217,规格:每粒80 mg);胎牛血清(FBS)、改良型RPMI1640培养基(美国Hyclone公司);实时定量聚合酶链式反应(RT-PCR)试剂盒、Trizol试剂盒(成都博瑞克生物技术有限公司);小鼠抗人AP-1单抗(上海斯信生物科技有限公司);Ⅲ型胶原酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒、免疫组化试剂盒(上海西唐生物科技有限公司);CCK-8试剂盒(南京建成生物公司);瑞氏染液试剂盒(上海恒远生物科技有限公司)。

1.3 细胞

人近端肾小管上皮细胞株(HK-2)购于美国菌种保藏中心(ATCC)。

2 方法

2.1 细胞培养、分组与给药

分组方法参照文献[8](HK-2培养液内缬沙坦浓度为 10^{-4} mol/L),并设计了高、中、低剂量组开展以下研究。

HK-2细胞复苏后传代培养,细胞传代培养到一定的数量后,接种于放有盖玻片的6孔板培养,先以10%FBS的改良型RPMI1640培养细胞12 h,后用无血清培养基培养24 h使细胞同步化。将其分为5组,分别为正常对照组、空白对照组和缬沙坦高、中、低剂量组,每组设6个复孔,除正常对照组仅加入RPMI1640培养液外,其余各组在培养液中加入33 mmol/L的葡萄糖,缬沙坦高、中、低剂量组还分别加入 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} mol/L的缬沙坦。持续作用48 h后收集细胞和培养液用于各项检测。

2.2 瑞氏染色观察细胞形态学变化

采用细胞爬片的方法将HK-2细胞固定于盖玻片上。将盖玻片和载玻片浸泡于浓硫酸溶液中过夜,自来水冲洗20次以上,去离子水冲洗3次,烘干,包装后高压灭菌。将处于对数生长期的细胞,种于经高压灭菌的玻璃片上,置于CO₂培养箱中过夜,24 h后倒置显微镜下观察细胞的生长状态,瑞氏染色封片,拍照。

2.3 ELISA法检测细胞中Ⅲ型胶原的含量

收集各组细胞上清液,严格按照Ⅲ型胶原ELISA试剂盒说明进行操作,检测其中Ⅲ型胶原的含量。

2.4 CCK-8检测细胞活力

按照CCK-8试剂说明书进行操作。取各组HK-2细胞接种到96孔板中,每组6个复孔,37℃培养箱中培养2 h,每孔加入10 μl CCK-8试剂,继续培养2 h。酶标仪测定450 nm波长处的光密度(OD值),取平均值。

2.5 RT-PCR法检测细胞中Periostin和AP-1 mRNA表达情况

采用Trizol试剂盒提取各组HK-2细胞中的RNA,琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA完整性,紫外分光光度法测定RNA的浓度和纯度。取RNA 5 μg 逆转录合成cDNA,进行半定量PCR反应。Periostin基因引物(扩增片段为252 bp)的上游引物:5'-GCTGGCACCTGTGAATA-3',下游引物:5'-TCTCCCTT-GCTTACTCC-3'。AP-1基因引物(扩增片段为252 bp)的上游引物:5'-TGGAAACGACCTTCTATGACGATG-3',下游引物:5'-TGATGTGCCCGTTGCTGGAC-3'。内参GAPDH基因引物(扩增片段为293 bp)的上游引物:5'-ACCACAGTCCATGC-

CATCAC-3',下游引物:5'-TCCACCACCCGTTTGTGTA-3'。PCR产物经2.0%琼脂糖凝胶电泳。以AP-1/GAPDH、Periostin/GAPDH的OD值比值表示AP-1、Periostin mRNA的表达水平。每个目的基因重复测定6次,取平均值。

2.6 免疫组化法检测AP-1蛋白表达情况

将各组HK-2细胞接种于6孔板中,待细胞长至亚融合状态(约70%~80%满视野),再用无血清培养基培养24 h使其同步化。24 h后取出细胞爬片,根据免疫组化试剂盒所示方法检测各组HK-2细胞中AP-1蛋白的表达。每张切片在40倍倒置显微镜下随机选取30个不重叠视野,拍照,采用IPP分析软件分析计算积分光密度(IOD值)。

2.7 统计学方法

采用SPSS 18.8统计软件进行统计分析。数据以均数±标准差表示,组间采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞形态学变化

正常对照组HK-2细胞贴壁生长,密度正常。其余各组可见HK-2细胞部分细胞间隙增大并与附近的细胞脱离接触,细胞分裂旺盛,长短径比例减小,呈现出多形性,排列较乱。各组HK-2细胞形态学变化见图1。

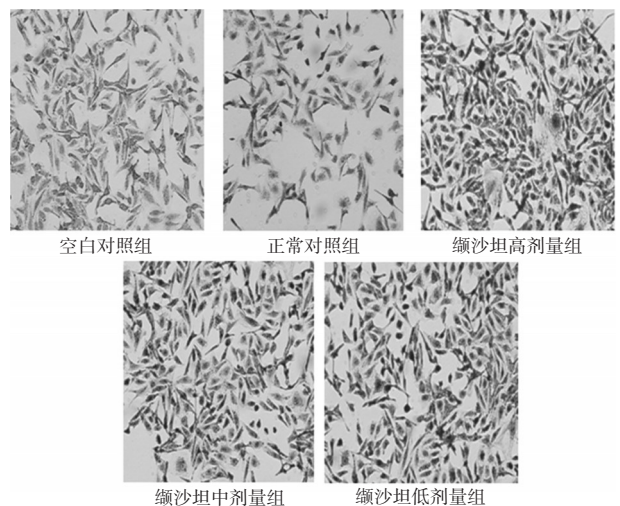


图1 各组HK-2细胞形态学变化($\times 100$)

Fig 1 Cellular morphology of HK-2 cells in each group ($\times 100$)

3.2 细胞中Ⅲ型胶原含量

与正常对照组比较,其余各组HK-2细胞中Ⅲ型胶原含量增加($P<0.05$)。与空白对照组比较,缬沙坦低、中、高剂量组HK-2细胞中Ⅲ型胶原含量降低($P<0.05$),其中缬沙坦中剂量组降低更明显($P<0.01$)。各组HK-2细胞中Ⅲ型胶原含量的检测结果见表1。

3.3 细胞活力情况

与正常对照组比较,其余各组HK-2细胞的OD值均升高($P<0.05$)。与空白对照组比较,缬沙坦低、中、高剂量组HK-2细胞的OD值均降低($P<0.05$),其中缬沙坦中剂量组降低更明显($P<0.01$)。各组HK-2细胞活力的检测结果见表2。

3.4 细胞中Periostin和AP-1 mRNA表达情况

与正常对照组比较,其余各组HK-2细胞中Periostin和

表1 各组HK-2细胞中Ⅲ型胶原含量的检测结果($\bar{x} \pm s, n=6, \text{ng/ml}$)

Tab 1 The content of Ⅲ type collagen in HK-2 cells of each group($\bar{x} \pm s, n=6, \text{ng/ml}$)

组别	Ⅲ型胶原
空白对照组	421.62 ± 22.21*
缬沙坦高剂量组	342.65 ± 27.64**
缬沙坦中剂量组	239.84 ± 18.42***
缬沙坦低剂量组	391.25 ± 26.71**
正常对照组	141.31 ± 12.88

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$;与空白对照组比较, # $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$; vs. blank control group, # $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表2 各组HK-2细胞活力的检测结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Viability of HK-2 cells in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

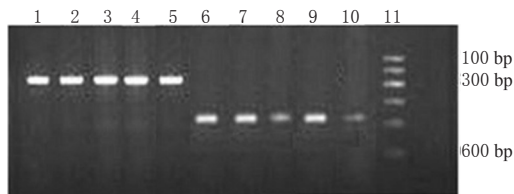
组别	OD值
空白对照组	1.131 ± 0.08*
缬沙坦高剂量组	0.739 ± 0.05**
缬沙坦中剂量组	0.421 ± 0.04***
缬沙坦低剂量组	0.925 ± 0.06**
正常对照组	0.261 ± 0.02

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$;与空白对照组比较, # $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$; vs. blank control group, # $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

AP-1 mRNA表达均增强($P < 0.05$)。与空白对照组比较,缬沙坦低、中、高剂量组HK-2细胞中Periostin和AP-1 mRNA表达均减弱($P < 0.05$),其中缬沙坦中剂量组减弱更明显($P < 0.01$)。各组HK-2细胞Periostin和AP-1 mRNA表达的电泳图见图2(图中1~5分别为空白对照组、缬沙坦高剂量组、缬沙坦中剂量组、缬沙坦低剂量组、正常对照组的内参条带,6~10分别为以上各组的的目的条带,11为marker),检测结果见表3。

Periostin mRNA:



AP-1 mRNA:

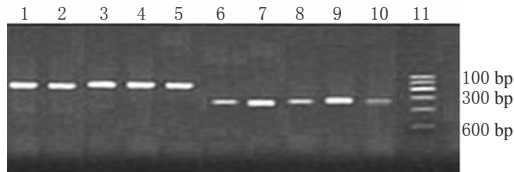


图2 各组HK-2细胞Periostin和AP-1 mRNA表达的电泳图
Fig 2 Electrophoretogram of mRNA expression of Periostin and AP-1 in HK-2 cells of each group

3.5 细胞中AP-1蛋白表达变化

与正常对照组比较,其余各组HK-2细胞中AP-1蛋白表达均增强($P < 0.05$)。与空白对照组比较,缬沙坦低、中、高剂量组HK-2细胞中AP-1蛋白表达均减弱($P < 0.05$),其中缬沙坦中剂量组减弱更明显($P < 0.01$)。各组HK-2细胞AP-1蛋白表

达的显微镜图见图3,检测结果见表4。

表3 各组HK-2细胞Periostin和AP-1 mRNA表达的检测结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 3 mRNA expression of Periostin and AP-1 in HK-2 cells of each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Periostin/GAPDH	AP-1/GAPDH
空白对照组	0.517 ± 0.046*	0.721 ± 0.075*
缬沙坦高剂量组	0.421 ± 0.045**	0.715 ± 0.048**
缬沙坦中剂量组	0.382 ± 0.030***	0.642 ± 0.031***
缬沙坦低剂量组	0.452 ± 0.069**	0.691 ± 0.084**
正常对照组	0.324 ± 0.039	0.537 ± 0.067

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$;与空白对照组比较, # $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$; vs. blank control group, # $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

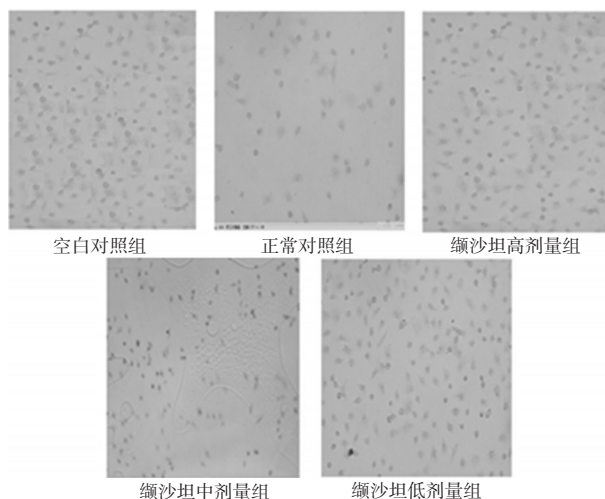


图3 各组HK-2细胞AP-1蛋白表达的显微镜图(×40)

Fig 3 Microscope of mRNA expression of AP-1 in HK-2 cells of each group(×40)

表4 各组HK-2细胞AP-1蛋白表达的检测结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 4 Protein expression of AP-1 in HK-2 cells of each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	IOD值
空白对照组	67 281 ± 856*
缬沙坦高剂量组	62 121 ± 1 254**
缬沙坦中剂量组	50 738 ± 789***
缬沙坦低剂量组	59 258 ± 1 104**
正常对照组	25 841 ± 892

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$;与空白对照组比较, # $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$; vs. blank control group, # $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

4 讨论

AP-1作为细胞核内转录调节因子,不仅能调节胶原基因与相关细胞因子的表达,还可以介导各类细胞因子促进纤维化病变发生发展,在发病机制中处于中心环节调控地位^[9-10]。在肾脏疾病中,EMT在肾间质纤维化的发生和发展中起重要作用,而抑制或逆转EMT的发生和发展,已成为控制肾间质纤维化的重要途径之一。本试验结果提示,高糖环境可刺激HK-2细胞发生形态学上的基本改变及Ⅲ型胶原含量增加

($P < 0.05$)。这表明在高糖的刺激下 HK-2 细胞有大量的胶原蛋白表达、细胞外基质的积累。由此可推断,高糖诱导 HK-2 细胞转分化成功。在此基础上继续进行后续试验以证明笔者的假设:高糖可能激活 AP-1,从而对 Periostin 的启动子活性产生调控作用,上调 Periostin 的基因表达。

高糖能够直接诱导刺激肾小管上皮细胞 AP-1 活化,并且诱导其表型发生转化,AP-1 细胞 EMT 过程中起了重要的调控作用。高糖环境能够诱发氧化应激,氧化应激是高糖环境下对 Periostin 蛋白调控的重要机制之一,而氧化应激是肾损伤的基础^[11]。在体外高糖环境下培养的肾小管上皮细胞转分化中 AP-1 的活化起着重要的作用^[12-13]。本试验中细胞爬片、免疫组化和 RT-PCR 结果证实,高糖刺激条件下 HK-2 细胞 AP-1 呈高表达状态。在体外高糖培养的 HK-2 细胞,检测到有 III 型胶原蛋白分泌,提示高糖诱导肾小管上皮细胞表型转化,这可能是糖尿病肾病肾间质纤维化的重要机制之一。同时结果显示,经缬沙坦干预后 AP-1 的表达明显减弱,表明在高糖环境下,缬沙坦可以抑制 HK-2 细胞的转分化及 AP-1 的表达。由此笔者推测,高糖环境下缬沙坦对 HK-2 细胞转分化的这种抑制作用,可能是其防止或减轻肾间质纤维化、延缓慢性肾疾患发展的重要机制之一。

高糖可诱导氧自由基的生成,促进细胞外基质沉积。Periostin 能够与胶原蛋白直接交联,促进细胞间基质的整合与沉积^[14-15]。在本试验中,与正常对照组比较,AP-1 过表达的空白对照组 HK-2 细胞 Periostin 蛋白表达明显增强($P < 0.05$)。结合 AP-1 的试验结果显示,高糖环境下 HK-2 细胞 III 型胶原与 AP-1 及 Periostin 的表达水平相一致;而经缬沙坦干预后的高糖 HK-2 细胞中 III 型胶原、AP-1 及 Periostin 均明显下降。

综上所述,缬沙坦对糖尿病肾病具有保护作用,且具有抗纤维化的疗效。可以推测:(1)高糖环境诱导肾小管上皮细胞向间充质细胞转分化,引起 AP-1 表达增强;(2)体外高糖诱导的 AP-1 过表达可能上调转分化的肾小管上皮细胞中 Periostin 蛋白表达,从而促进了纤维化进程;(3)缬沙坦可抑制肾小管上皮细胞转分化、减少高糖诱导的 AP-1 高表达、降低 Periostin 蛋白表达,进而减缓纤维化进程。

参考文献

- [1] 刘纪实,宁建平,张浩,等.缬沙坦对糖尿病肾病大鼠肾小管上皮细胞整合素连接激酶表达的影响[J].中国中西医结合肾病杂志,2007,8(10):572.
- [2] 张令强,贺福初. c-Jun/激活蛋白-1 活性调节研究进展[J].生物化学与生物物理进展,2002,29(6):872.
- [3] 文晓彦,郑法雷,孙阳,等.缬沙坦抑制人类肾小管上皮细胞转分化的初步研究[J].中华肾病杂志,2000,16(4):244.
- [4] Coutu DL, Wu JH, Monette A, et al. Periostin, a member of a novel family of vitamin K-dependent proteins is expressed by mesenchymal stromal cells[J]. *J Biol Chem*, 2008,283(26):17 991.
- [5] Riener MO, Fritzsche FR, Soll C, et al. Expression of the extracellular matrix protein periostin in liver tumours and bile duct carcinomas[J]. *Histopathology*, 2010, 56 (5) : 604.
- [6] Stansfield WE, Andersen NM, Tang RH, et al. Periostin is a novel factor in cardiac remodeling after experimental and clinical unloading of the failing heart[J]. *Ann Thorac Surg*, 2009,88(6):1 916.
- [7] Iekushi K, Taniyama Y, Azuma J, et al. Novel mechanisms of valsartan on the treatment of acute myocardial infarction through inhibition of the antiadhesion molecule periostin[J]. *Hypertension*, 2007, 49(6):1 409.
- [8] 文晓彦,郑法雷.缬沙坦抑制人类肾小管上皮细胞转分化的初步研究[J].中华肾病杂志,2008,21(4):28.
- [9] 刘琳.转录激活蛋白-1 与纤维化病变的关系[J].国际口腔医学杂志,2004,31(s1):194.
- [10] 吕智美,邓华聪,诸葛福媛,等. AP-1 活化在高糖诱导肾小管上皮细胞转分化中的作用[J].第三军医大学学报,2008,30(22):2 107.
- [11] 华春秀,万英,唐华.万古霉素对人肾小管上皮细胞中肾损伤分子-1 表达的影响研究[J].中国药房,2011,22(45):4 244.
- [12] Viedt C, Dechend R, Fei J, et al. MCP-1 induces inflammatory activation of human tubular epithelial cells: involvement of the transcription factors, nuclear factor-kappaB and activating protein-1[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(6):1 534.
- [13] Lv ZM, Wang Q, Wan Q, et al. The role of the p38 MAPK signaling pathway in high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition of cultured human renal tubular epithelial cells[J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(7):e22 806.
- [14] Takayama G, Arima Y, Kanaji T, et al. Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals[J]. *J Allergy Clinical Immunology*, 2006, 118(1):98.
- [15] Norris RA, Damon B, Mironov V, et al. Periostin regulates collagen fibrillogenesis and the biomechanical properties of connective tissues[J]. *J Cell Biochem*, 2007, 101(3):695.

(收稿日期:2015-08-14 修回日期:2015-10-12)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊,欢迎投稿、订阅