文章编号:1000-5404(2010)11-1165-04

论著

甲状旁腺激素相关肽在高糖诱导 NRK-52E 细胞转分化中的作用

梁华晟,钟宇华 (536000 广西 北海,广西北海市内分泌代谢病研究所)

[摘要] **目的** 探讨甲状旁腺素相关肽在高糖诱导大鼠肾小管导管上皮细胞株 NRK-52E 转分化作用。**方法** 应用 RT-PCR 及 Western blot 检测无糖组(无糖培养基培养),正常葡萄糖组(含 5 mmol/ L 葡萄糖 DMEM 培养基培养)组及高浓度葡萄糖组(含 16.7 mmol/L 葡萄糖 DMEM 培养基培养)中甲状旁腺素相关肽(parathyroid hormone-related peptide,PTHrP)及其受体 1 在大鼠肾小管导管上皮细胞株 NRK-52E 表达。10 pmol/L PTHrP 及 16.7 mmol/L 葡萄糖分别干预 72 h,应用 Western blot 检测转化因子 β、金属蛋白酶 2、Ⅰ型胶原及 α 平滑肌肌动蛋白表达情况。ROS 含量应用 CM2H2DCFDA 试剂盒检测。**结果** 与空白组和正常葡萄糖组相比,高浓度葡萄糖能显著上调 PTHrP($P<0.05$, $P<0.01$)和甲状旁腺激素受体 1(Type 1 receptor parathyroid hormone-related protein,PTH1R)($P<0.01$, $P<0.05$)蛋白及 PTHrP mRNA($P<0.01$)表达,PTH1R mRNA 在高浓度及正常葡萄糖浓度组的表达高于空白组($P<0.01$)。对比空白组,PTHrP 能显著上调 NRK-52E 细胞转化因子 β1($P<0.01$)、Ⅰ型胶原($P<0.01$)及 α 平滑肌肌动蛋白($P<0.01$)表达,而在高浓度葡萄糖状态下,其表达上调更显著($P<0.05$, $P<0.01$)。金属蛋白酶 2 在 PTHrP 及高浓度葡萄糖共同干预下表达上调($P<0.01$)。PTHrP 及高血糖均可以升高 NRK-53E 细胞 ROS 含量($P<0.01$, $P<0.01$)。**结论** 高浓度葡萄糖可能通过调控 PTHrP/PTH1R 的水平从而影响肾小管导管上皮转分化。

[关键词] 甲状旁腺激素相关蛋白质;细胞转分化;NRK-52E 细胞;葡萄糖;体外研究
[中图法分类号] R322.61; R394.1; R587.102 [文献标志码] A

Role of parathyroid hormone-related peptide in transdifferentiation of NRK-52E cells induced by high glucose

Liang Huasheng, Zhong Yuhua (Beihai Institute of Endocrine and Metabolic Diseases, Beihai, Guangxi Zhuang Autonomous Region, 536000, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the role of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) in transdifferentiation of NRK-52E cells induced by high glucose. **Methods** Expression of PTHrP and its receptor 1 in NRK-52E cells incubated with 0 (control group), 5 (normal glucose group) and 16.7mmol/L glucose (high glucose group), respectively, was detected by RT-PCR and Western blotting, respectively. Expression of TGF-β1, MMP2, type Ⅰ collagen and α-SMA in NRK-52E cells of normal and high glucose groups was detected by Western blotting and ROS was detected by CM2H2DCFDA after 72 h. **Results** The expression levels of PTHrP, PTHrP receptor 1 (PTH1R), and PTHrP mRNA were higher in high glucose group than in control and normal glucose groups ($P<0.05$). The expression of TGF-β1, type Ⅰ collagen, and α-SMA after interfered with PTHrP was significantly higher in normal and high glucose groups than in control group ($P<0.05$). The expression of MMP2 was up-regulated after interference with PTHrP and high glucose level ($P<0.01$). The PTHrP and high glucose level increased the ROS in NRK-52E cells ($P<0.01$). **Conclusion** High glucose level can influence the transdifferentiation of NRK-52E cells by regulating PTHrP and its receptor level.

[**Key words**] parathyroid hormone-related peptide; cell transdifferentiation; NRK-52E; glucose; *in vitro*

Supported by the Natural Science Foundation of Guangxi Province (0991294) and the Sci & Tech program of Beihai City of Guangxi Province. Corresponding author: Liang Huasheng, Tel: 86-779-2022492, E-mail:flowchaos@yahoo.com.cn

[基金项目] 广西科技厅自然科学基金(0991294);广西北海市科学研究与技术开发计划项目(200901059)
[通信作者] 梁华晟,电话:(0779)2022492, E-mail:flowchaos@yahoo.com.cn

肾组织纤维化是糖尿病肾病进程最重要的病理特征之一,其中涉及高血糖诱导肾小球硬化、肾小管间质纤维化及信号传导通路等改变,其中肾小管上皮细胞转分化为间充质细胞被视为参与肾脏纤维化主要作用机制之一[1],而其中机制尚未明确。甲状旁腺素相关肽(parathyroid hormone-related peptide,PTHrP)及其相关受体——甲状旁腺激素受体1(Type 1 receptor parathyroid hormone-related peptide,PTH1R)发现于20世纪80年代,最初认为其与顽固性高钙血症有关。近年来发现PTHrP/PTH1R作为一个肾间质纤维增殖相关靶点逐渐受到关注,有研究发现PTHrP高表达与肾小管纤维化显著相关[2]。因此,本实验将观察PTHrP及PTH1R在持续性高葡萄糖诱导大鼠肾小管导管上皮细胞株NRK-52E转分化的影响[3],以阐明PTHrP及PTH1R在参与糖尿病肾脏纤维化过程中可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

大鼠肾小管导管上皮细胞株NRK-52E购自中科院细胞库,培养基配备为DMEM培养液(美国GIBCO公司)基本配备为含加入10 ml进口胎牛血清(Sigma,USA)、1 ml双抗(青、链霉素各100 U/ml)、1 mmol/L EDTA。每周传代2~3次。

1.2 实验分组与处理

观察高糖对NRK-52E细胞株PTHrP/PTH1R表达分组及处理:①空白对照组(Control):为无糖培养基培养;②正常葡萄糖组:含5 mmol/ L葡萄糖DMEM培养基培养;③高浓度葡萄糖组:含16.7 mmol/L葡萄糖DMEM培养基培养。观察PTHrP对NRK-52E细胞高糖情况下NRK-52E细胞株转分化及细胞内活性氧(ROS)含量的作用,分组:①空白对照组(control);②高糖干预组,处理同前;③PTHrP干预组(PTHrP):无糖培养基应用10 pmol/L鼠重组PTHrP(Sigma公司)干预;④PTHrP及高糖联合干预组:含16.7 mmol/L的DMEM培养基应用10 pmol/L PTHrP干预。所有分组均在37℃、5% CO_2条件下培养3 d,每孔细胞均为每24小时换液1次。

1.3 Western blot检测蛋白表达

细胞裂解蛋白,加样后电泳,湿式电转移,封闭,然后与一抗(PTHrP、PTH1R、Ⅰ型胶原均购置美国Santa Cruz公司,转化因子β、金属蛋白酶2购置于英国ABCam公司、α平滑肌肌动蛋白购置于美国Dako公司)分别按1∶100、1∶75、1∶125、1∶75、1∶50及1∶50的比例孵育室温90 min(α平滑肌肌动蛋白及Ⅰ型胶原4 ℃,过夜),冲洗后PVDF膜与相应二抗(1∶1 000)室温孵育45 min后,再冲洗用ECL显影。

1.4 RT-PCR检测PTHrP及PTH1R mRNA表达

细胞总RNA按照美国Invitrogen公司产品说明采用TriZol提取,采用Superscript RT-PCR kit(美国Invitrogen公司)进行操作。RT-PCR反应条件如下:PTHrP(94 ℃变性30 s,61 ℃退火30 s,72 ℃复性30 s,72 ℃延长5 min,35个循环),PTH1R(95℃变性30 s,54℃退火30 s,72℃复性30 s,72℃延长5 min,36个循环),引物分别为PTHrP(GenBank accession no. NM_012636,上游5′-TGGTGTTCCTGCTCAGCTA-3′,下游5′-CCTCGTCGTCTGACCCAA-3′,268 bp);PTH1R(GenBank accession no. NM_020073,上游:5′-GGAAGCCTTGGCTTTTG-3′下游:5′-CGAACGTGACGTCATC-3′,481 bp)。DL2 000作为标准标记。内参以β-actin(200 bp)为参照。

1.5 活性氧(ROS)检测

各组细胞加入10 μl的1 mmol/ L CM2H2DCFDA(美国Invitrogen公司,终浓度为10 μmol/L)染色液,37 ℃避光孵育30 min,离心,PBS洗2次,重悬于1 ml含10 % FCS的RPMI培养液中。用BioTek公司全自动定量绘图酶标仪进行检测OD值,激发波长485 nm,发射波长528 nm。

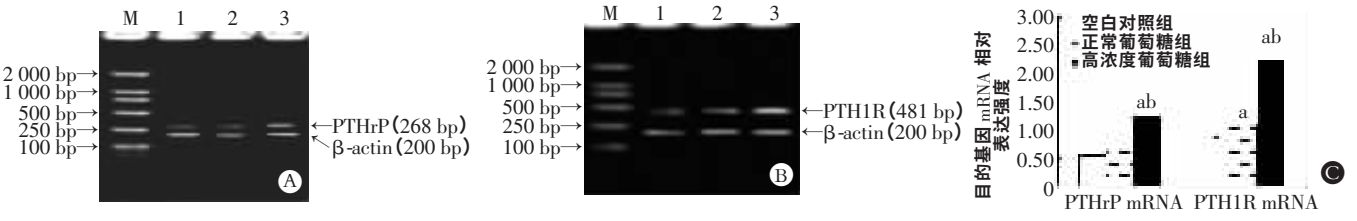
1.6 统计学处理

所有试验均重复3次以上,Western blot及RT-PCR图片检测采用Gel Doc XR+凝胶成像分析系统(美国BIO-RAD公司)扫描分析仪扫描凝胶图谱,采用Total Lab分析软件对条带进行密度扫描分析。采用SPSS 11.5统计软件,采用单因素方差分析SNK检验总体和组间差异。

2 结果

2.1 不同浓度葡萄糖对NRK-52E细胞株PTHrP及PTH1R表达的影响

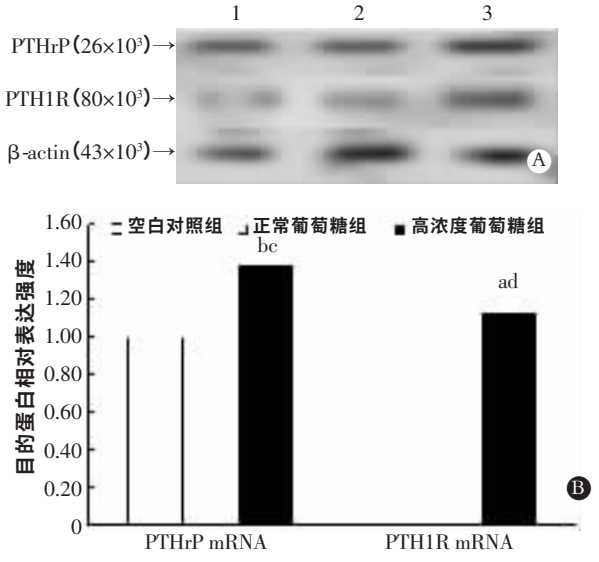
16.7 mmol/L葡萄糖浓度下,PTHrP及PTH1R mRNA表达显著高于5 mmol/L及空白对照组($P<0.01$),5 mmol/L葡萄糖浓度中PTH1R mRNA高于空白对照组($P<0.01$),提示随着葡萄糖浓度提高,PTHrP/PTH1RmRNA及蛋白表达显著升高。见图1、2。



M:DNA标准;1:空白对照组;2:正常葡萄糖组;3:高浓度葡萄糖组

A:PTHrP mRNA表达;B:PTH1R mRNA表达 C:定量分析结果 a:$P<0.01$,与空白组比较;b:$P<0.01$,与正常葡萄糖组比较

图1 RT-PCR检测各组PTHrP及PTH1R mRNA表达



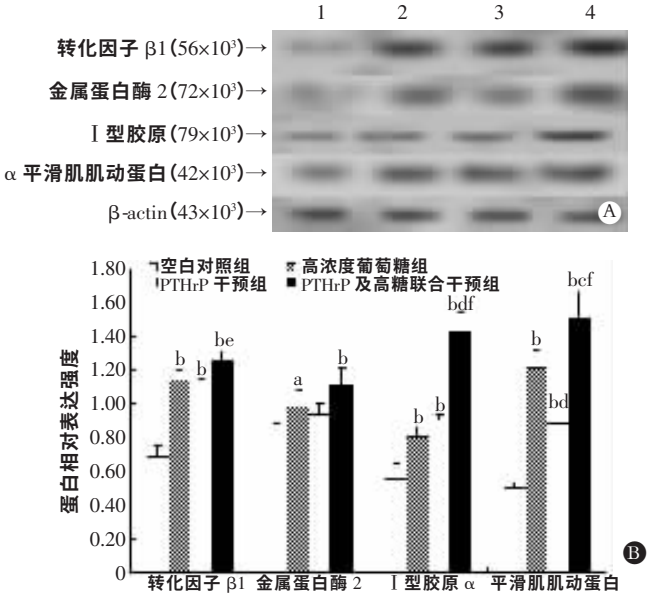
A:Western blot 结果　1:空白对照组;2:正常葡萄糖组;3:高浓度葡萄糖组

B:半定量分析结果　a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与空白对照组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与正常葡萄糖组比较

图 2　Western blot 检测各组 PTHrP 及 PTH1R 蛋白表达

2.2　PTHrP 对高糖诱导 NRK-52E 细胞株转分化影响

转化因子 β、金属蛋白酶 2、I型胶原及 α 平滑肌肌动蛋白均为目前反映肾小管导管上皮转分化的重要细胞因子,为此本研究将检测上述细胞因子在不同干预条件下的表达情况(图 3),



A:Western blot 结果　1:空白对照组;2:高浓度葡萄糖组;3:PTHrP 干预组;4:PTHrP 及高糖联合干预组

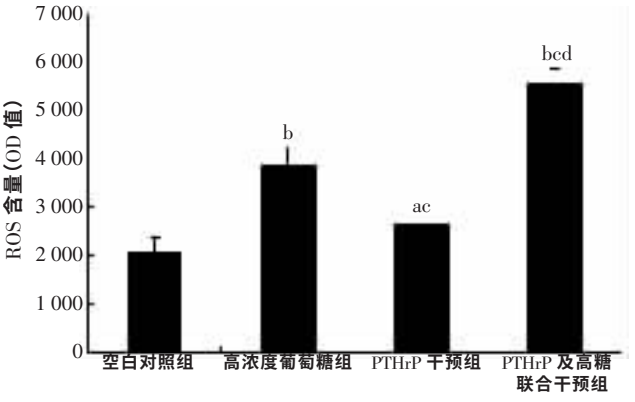
B:半定量分析结果　a: $P<0.05$,b: $P<0.01$, 与空白对照组比较;c: $P<0.05$,d: $P<0.01$,与高浓度葡萄糖组比较; e: $P<0.05$, f: $P<0.01$, 与 PTHrP 干预组比较

图 3　Western blot 检测各组转化因子 β、金属蛋白酶 2、Ⅰ型胶原及 α 平滑肌肌动蛋白表达

结果提示高浓度葡萄糖比较空白对照组能显著上调转化因子 β、金属蛋白酶 2、Ⅰ型胶原及 α 平滑肌肌动蛋白表达($P<0.05$);PTHrP 能比较空白对照组显著提高转化因子 β1、Ⅰ型胶原及 α 平滑肌肌动蛋在 NRK-52E 细胞株表达水平($P<0.05$),在高浓度葡萄糖情况下 PTHrP 促进作用较高糖组及 PTHrP 组更明显($P<0.05$)。在 PTHrP 及高浓度葡萄糖作用下,金属蛋白酶 2 表达上调($P<0.05$)。

2.3　PTHrP 对高糖诱导 NRK-52E 细胞株 ROS 含量影响

高糖通过诱导细胞 ROS 含量的提高,是促进肾小管导管上皮细胞转分化的重要机制,为此,本研究检测 PTHrP 作用于高糖诱导 NRK-52E 细胞株 ROS 含量(图 4),结果提示高糖、PTHrP 均能显著提高细胞 ROS 含量水平,而联合高糖及 PTHrP 作用后,NRK-52E 细胞中 ROS 含量升高最明显。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与空白对照组比较;c:$P<0.01$,与高浓度葡萄糖组比较;d:$P<0.01$,与 PTHrP 干预组比较

图 4　高糖及 PTHrP 对 NRK-52E 细胞 ROS 含量的影响

3　讨论

肾间质纤维化是糖尿病肾病进程的转归之一,更是糖尿病肾功能衰竭的最主要的病理基础,其病理主要表现为肾间质细胞数量增多,纤维增生。其中肾间质细胞增多病因众多,目前认为肾小管导管上皮在病理状态下转分化为成纤维细胞是导致肾间质细胞原因之一[4]。高浓度葡萄糖能是诱导肾小管导管上皮转分化因已经为大家共识[5],但具体机制非常复杂。

本研究提示,在高浓度葡萄糖浓度作用 72 h 后,PTHrP 及 PTH1R 蛋白和 mRNA 水平均显著升高。与 Izquierdo 等[6]在糖尿病大鼠中肾脏 PTHrP 及 PTH1R 表达升高的结果一致,提示 PTHrP 及 PTH1R 可能参与糖尿病肾小管导管上皮转分化病程。Lorenzo 等[7]研究认为 PTHrP 及 PTH1R 在肾脏纤维化作用机制考虑有以下原因:一方面 PTHrP 与 PTH1R 结合同时激活 C-fos 及 Activator protein 1(AP-1),继而 PTHrP 通过旁分泌的形式促进间质细胞的增殖,另一方面,PTHrP/PTH1R 可能直接激活蛋白激酶 A 及 cAMP 等

表达通过自分泌的作用于本体细胞促进细胞表型的变化。Ardura 等[8]研究也提示 PTHrP 与 PTH1R 结合后可能与血管内皮生长因子协同作用直接促进肾衰竭大鼠模型中间质细胞的增殖,而在肾小管上皮细胞的研究则发现 PTHrP 与 PTH1R 结合诱导 ERK1/2 表达,继而促进肾小管上皮间充质转变[9]。

由于 PTHrP 作为一种促细胞增殖的因子也为大家共识,但在转分化的研究上却存在争议。有研究发现 PTHrP 具有抑制细胞转分化的作用[10],为证实 PTHrP 是否参与高浓度葡萄糖状态下肾小管导管上皮转分化的进程,本研究将应用 PTHrP 在不同条件下干预 NRK-52E 细胞株,结果发现,PTHrP 能显著上调转化因子 β1、Ⅰ型胶原及 α 平滑肌肌动蛋白表达,而且在高浓度葡萄糖状态下,其上调表达作用更为显著,同时 PTHrP 与高浓度葡萄糖共同作用后,金属蛋白酶 2 也同样表达上调。由于 α 平滑肌肌动蛋白为肌成纤维细胞的标志性蛋白,是反映上皮细胞转分化主要观察指标。目前发现,高糖促转分化的作用机制主要是通过上调各种细胞分化或基质增殖的蛋白水平,例如转化因子 β1、Ⅰ型胶原及金属蛋白酶 2:转化因子 β1 信号通路在器官纤维化中的作用已经明确,其水平升高可以通过上调 Smad 系列蛋白表达,诱导小管细胞转分化为纤维细胞[11]。而Ⅰ型胶原及金属蛋白酶 2 是参与基质沉积及积聚的主要调控蛋白,同时以自分泌及旁分泌的方式作用本体细胞或邻近细胞,从而放大致纤维化的效应[12,13]。此结果也进一步提示了 PTHrP 及 PTH1R 可能是通过影响转化因子 β1 等细胞因子从而参与高浓度葡萄糖诱导肾小管导管上皮转分化。

糖尿病肾脏纤维化主要原因之一是高糖诱导氧化应激[14],而氧化应激最主要反应指标是 ROS 含量。在本研究中,发现高糖及 PTHrP 均可以显著提高 NRK-52E 细胞株的 ROS 含量,而二者联合作用后,NRK-52E 细胞 ROS 含量达到最高峰。Ramila 等[15]在转基因 PTHrP 大鼠梗阻性肾小管病理模型发现,PTHrP 能显著促进炎症因子 NF-κB 表达,从而推断 PTHrP 可能是诱导炎症反应重要因子。结合本研究结果。由此可以进一步认为 PTHrP 及 PTH1R 在高糖诱导肾小管导管上皮细胞转分化过程中,可能依赖于高糖诱导细胞内氧化应激作用。

综上所述,在本研究中可以得到以下结论,高浓度葡萄糖可以诱导 PTHrP 及其受体 PTH1R 的表达,而在高浓度的葡萄糖状态下 PTHrP 可以显著促进 NRK-52E 细胞的转分化,但是本研究仍缺乏进行抑制 PTHrP 及 PTH1R 表达后观察高糖状态下 NRK-42E 细胞转分化的研究,可能是下一步研究努力的方向,以便更清晰的阐明高糖对 NRK-52E 细胞转分化作用机制。

参考文献:

[1] Yasuda H. Pathophysiology and treatment for diabetic neuropathy[J]. Rinsho Shinkeigaku, 2009, 49(4): 149 - 157.

[2] Chiarelli F, Gaspari S, Marcovecchio M L. Role of growth factors in diabetic kidney disease[J]. Horm Metab Res, 2009, 41(8): 585 - 593.

[3] Makino Y, Haneda M. Potential therapeutic targets for diabetic nephropathy[J]. Nippon Rinsho, 2009, 67(8): 1627 - 1635.

[4] Advani A, Gilbert R E, Thai K, *et al*. Expression, localization, and function of the thioredoxin system in diabetic nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(4): 730 - 741.

[5] Tian L, Li C, Qi J, *et al*. Diabetes-induced upregulation of urotensin II and its receptor plays an important role in TGF-beta1-mediated renal fibrosis and dysfunction[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008, 295(5): E1234 - E1242.

[6] Izquierdo A, Lopez-Luna P, Ortega A, *et al*. The parathyroid hormone-related protein system and diabetic nephropathy outcome in streptozotocin-induced diabetes[J]. Kidney Int, 2006, 69(12): 2171 - 2177.

[7] Lorenzo O, Ruiz-Ortega M, Esbrit P, *et al*. Angiotensin II increases parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and the type 1 PTH/PTHrP receptor in the kidney[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(6): 1595 - 1607.

[8] Ardura J A, Berruguete R, Ramila D, *et al*. Parathyroid hormone-related protein interacts with vascular endothelial growth factor to promote fibrogenesis in the obstructed mouse kidney[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 295(2): F415 - F425.

[9] Ardura J A, Rayego-Mateos S, Ramila D, *et al*. Parathyroid hormone-related protein promotes epithelial-mesenchymal transition[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(2): 237 - 248.

[10] Rehan V K, Asotra K, Torday J S. The effects of smoking on the developing lung: insights from a biologic model for lung development, homeostasis, and repair[J]. Lung, 2009, 187(5): 281 - 289.

[11] Hills C E, Al-Rasheed N, Al-Rasheed N, *et al*. C-peptide reverses TGF-beta1-induced changes in renal proximal tubular cells: implications for treatment of diabetic nephropathy[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 296(3): F614 - F621.

[12] Lo C S, Chen C H, Hsieh T J, *et al*. Local action of endogenous renal tubular atrial natriuretic peptide[J]. J Cell Physiol, 2009, 219(3): 776 - 786.

[13] Li H, Liu D, Zhao C Q, *et al*. High glucose promotes collagen synthesis by cultured cells from rat cervical posterior longitudinal ligament via transforming growth factor-beta1[J]. Eur Spine J, 2008, 17(6): 873 - 881.

[14] Liu F, Brezniceanu M L, Wei C C, *et al*. Overexpression of angiotensinogen increases tubular apoptosis in diabetes[J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(2): 269 - 280.

[15] Ramila D, Ardura J A, Esteban V, *et al*. Parathyroid hormone-related protein promotes inflammation in the kidney with an obstructed ureter[J]. Kidney Int, 2008, 73(7): 835 - 847.

(**收稿**:2009-11-03;**修回**:2010-01-10)

(编辑 吴培红)