论著

文章编号:1000-5404(2013)11-1080-04

继发性甲状旁腺功能亢进症大鼠 Gcm2 的表达

练 渝,杨 阳,姜友昭,邓武权,陈 兵 (400038 重庆,第三军医大学西南医院内分泌科)

[摘要] **目的** 研究继发性甲状旁腺功能亢进症大鼠在病程中 Gcm2 的表达变化以及与甲状旁腺细胞增殖变化之间的关系。**方法** 5/6 肾切除结合高磷饲养建立大鼠继发性甲状旁腺功能亢进症模型,第 1、4、7、14、21、28 天取甲状旁腺和血清标本,ELISA 检测血清 i-PTH 浓度变化,Real-time PCR 和 Western blot 检测 Gcm2 mRNA 和蛋白表达的变化,免疫组化观察不同时间点甲状旁腺细胞的增殖变化情况。**结果** 与假手术对照组比较,造模后模型组 i-PTH 显著升高($P<0.01$);模型组 Gcm2 mRNA 的表达随时间进展升高趋势逐渐明显,在第 1、4、7 天仅缓慢升高,无统计学差异($P>0.05$),第 14 天始升高趋势明显($P<0.01$),于第 21 天升高至最高点,为假手术对照组的 9.92 倍($P<0.01$),第 28 天表达量稍有下降($P<0.01$);模型组 Gcm2 的蛋白表达呈先下调后升高的趋势,第 1 天先有所下调,第 4 天进行性升高,第 7 天稍有波动,第 14 天后一直处于显著升高的表达状态,于第 21 天到达最高点,第 28 天稍有回落($P<0.01$);模型组甲状旁腺细胞增殖在第 1 天便显著增强($P<0.01$),第 4 天达最高($P<0.01$),之后开始回落,至第 14 天回落到与假手术对照组相近的水平,一直到实验结束。**结论** 在继发性甲状旁腺功能亢进症发病过程中,Gcm2 的表达变化和甲状旁腺细胞增殖在时间进程上有相反的趋势,两者的交互作用可能是导致甲状旁腺功能亢进的部分原因。

[关键词] 甲状旁腺细胞;甲状旁腺功能亢进症;Gcm2;细胞增殖

[中图法分类号] R364.3; R394.2;R582.1 [文献标志码] A

Expression of Gcm2 in secondary hyperparathyroidism rats

Lian Yu, Yang Yang, Jiang Youzhao, Deng Wuquan, Chen Bing (Department of Endocrinology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the expression profile of glia cells missing 2 (Gcm2) in rats during the course of secondary hyperparathyroidism and its relationship with parathyroid cell proliferation. **Methods** A total of 42 female SD rats, at an age of 6 to 8 weeks, weighting 180 to 220 g, were randomly divided into sham-operation group ($n=6$) and hyperparathyroidism group ($n=36$). Rat model of secondary hyperparathyroidism was established by 5/6 nephrectomy combined with following high phosphorus feeding. Parathyroid glands and serum were collected after 6 rats of the model group were killed at the following intervals of 1, 4, 7, 14, 21 and 28 d, respectively. Serum level of intact parathyroid hormone (i-PTH) was detected by ELISA. The expression of Gcm2 at mRNA and protein levels was observed by real-time PCR and Western blotting, respectively. Parathyroid cell proliferation were observed by immunohistochemical assay. **Results** Compared with the sham-operation group, i-PTH levels were significantly elevated at all time points in the model group ($P<0.01$). In the model group, the mRNA expression of Gcm2 was increased gradually with time elapse, though without significant difference in the days 1, 4 and 7, but significantly higher in the day 14 ($P<0.01$), and reached the highest level in the day 21, which were increased by 9.92 fold when compared with sham-operation group ($P<0.01$), and then the level was decreased mildly in the day 28 ($P<0.01$). While, the expression of Gcm2 protein was slightly weakened in the first day, then gradually elevated in the day 4, and continued to raise till the highest level in the day 21 except a little fluctuation in the day 7, but the level was also decreased in the day 28 ($P<0.01$). The proliferative rate of parathyroid cells was very high in the day 1 ($P<0.01$), and reached the peak in the day 4 ($P<0.01$), and then became declined till to the normal rate since the day 14. **Conclusion** In the pathogenesis of secondary hyperparathyroidism, Gcm2 expression

[基金项目] 国家自然科学基金(81270870)

[通信作者] 陈 兵,电话:(023)68754138,E-mail: chenbing3@medmail.com.cn

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130327.1446.009.html(2013-03-27)

and parathyroid cell proliferation showed an opposite trend. The interaction between them may partly contribute to the hyperfunction of the parathyroid.

[**Key words**] parathyroid cells; hyperparathyroidism; Gcm2; cell proliferation

Supported by the National Nature Science Foundation of China (81270870). Corresponding author: Chen Bing, Tel: 86-23-68754138, E-mail: chenbing3@medmail.com.cn

决定神经前体细胞分化的神经胶质细胞缺失转录因子(glia cells missing, Gcm)是在果蝇中发现的。在哺乳动物中陆续发现了它的两个同源体:Gcm1和Gcm2。Gcm1的表达调控参与了胎盘血管迷路的形成。Gcm2在胚胎甲状旁腺发育和成熟甲状旁腺功能维持中发挥着指导细胞分化成熟[1]、调控细胞内分泌功能[2-3]等重要作用。研究发现,Gcm2的表达在甲状旁腺功能亢进症患者的甲状旁腺增生组织和腺瘤组织中与正常组织相比有所改变[4-5]。这是否表明Gcm2的表达变化参与了甲状旁腺细胞增殖的调控,抑或只是甲状旁腺细胞增殖后分化成熟和维持正常功能的需要,目前仍不清楚。本实验利用5/6肾切除结合高磷饲养的方法制作继发性甲状旁腺功能亢进症模型[6]。研究在该病发病过程中Gcm2的表达变化及甲状旁腺细胞的增殖情况,以明确两者在时间进程上的关系,旨在为进一步研究Gcm2的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立和分组

6~8周龄雌性SD大鼠42只(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),体质量180~220 g,按随机数字表法分为2组:甲状旁腺功能亢进症模型组(模型组,$n=36$),假手术对照组($n=6$)用作采集时间原点数据。模型组先在无菌条件下切除左肾的2/3体积,1周后切除全部右肾,然后饲以高磷饲料(含磷1.2%,含钙1.6%,委托第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心饲料配置中心参照美国营养学会1993年AIN-93G标准及高磷饲料配方[7]制作);假手术对照组仅剥离双肾包膜后常规饮食喂养1周。手术前后环境相同(室温15~25 ℃,正常昼夜节律,足够的饮水,无强光、噪音刺激)。存活的大鼠饲养至预定时间,经常规生化检测和全段甲状旁腺激素(intact parathyroid hormone, i-PTH)检测,以手术加高磷饲养后血清肌酐升高2倍以上和i-PTH升高3倍以上为造模成功的标准[6]。

1.2 标本采集及观测指标

1.2.1 甲状旁腺及血清标本采集 在5/6肾切除术和高磷饲养后的第1、4、7、14、21、28天分别处死4~6只模型组大鼠,解剖显微镜下摘取双侧甲状旁腺,断颈取血3 mL,离心收集血清样本。假手术对照组大鼠喂养1周后相同方法摘取双侧甲状旁腺、收集血清,作为第0天的样本。收集标本的时间均在上午9:00~11:00。收集好的甲状旁腺标本依据实验目的放于-80 ℃保存或4%多聚甲醛固定。

1.2.2 常规生化检测 血清中肌酐、总钙和无机磷由第三军医大学西南医院检验科采用AU5400全自动生化分析仪检测。

1.2.3 i-PTH检测 采用大鼠i-PTH酶联免疫试剂盒(上海沪尚生物科技有限公司)检测。

1.2.4 实时荧光定量PCR检测Gcm2 mRNA的表达 采用Trizol试剂盒(Invitrogen公司)提取甲状旁腺组织总RNA,鉴定完RNA纯度和完整性后,利用M-MLV逆转录试剂盒(Invitrogen公司)将其逆转录成cDNA。用Rotor Gene 3000荧光定量PCR仪进行实时荧光定量PCR检测Gcm2 mRNA的表达情况。Gcm2和内参β-actin的引物由生工生物工程(上海)公司合成,Gcm2上游:5′-ATGGGTGTGGAAGCCTGGAGAG-3′,下游:5′-GGGGAGCTTCAGTTCACAGATGT-3′,产物大小160 bp;内参β-actin上游:5′-TCAGGTCATCACTATCGGCAAT-3′,下游:5′-AAAGAAAGGGTGTAAAACGCA-3′,产物大小432 bp。反应条件:95 ℃ 3 min,95 ℃ 25 s,62 ℃ 40 s,共进行40个循环。每组3个复孔,取Ct平均值进行处理。以ΔCt值作为各时间点Gcm2的相对表达量,$\Delta Ct = Ct_{Gcm2} - Ct_{\beta\text{-actin}}$,$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Dn} - \Delta Ct_{D0}$,以$2^{-\Delta\Delta Ct}$进行差异比较。

1.2.5 Western blot检测Gcm2蛋白的表达 在甲状旁腺组织中加1 mL RIPA(含50 mmol/L Tris-HCl pH=7.5、1% NP40、1% Triton X-100、0.1% SDS、20 mmol/L EDTA、10 mmol/L EGTA)裂解,提取总蛋白,BCA法测定蛋白浓度。取50 μg上样,10%变性SDS-PAGE电泳。300 mA恒流4 h湿转至纤维素膜,室温封闭1 h。分别加入抗Gcm2抗体(Santa Cruz Inc. SC-79493,1∶1 000)及抗GAPDH(内参)抗体(1∶1 000)4 ℃孵育过夜。PBST漂洗后加入相应二抗室温孵育1 h。PBST洗膜后将纤维素膜浸入化学发光试剂,暗室曝光。使用Quantity One软件分析,计算各组光密度值与GAPDH光密度值之比,比较模型组与假手术对照组的蛋白相对表达量。

1.2.6 免疫组化检测细胞增殖 收集的各组甲状旁腺标本经4%多聚甲醛固定后制作石蜡切片,采用SABC法免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物公司)和兔抗大鼠Ki-67抗体(武汉博士德生物有限公司)进行免疫组化染色。利用Image J软件计数细胞,计算各组甲状旁腺细胞的Ki-67指数。以细胞核染成均一棕黄色,细胞质及细胞膜不着色为Ki-67阳性细胞,计数每张切片高倍视野(200倍或400倍)下甲状旁腺细胞数和甲状旁腺细胞中Ki-67阳性细胞数,平均每100个甲状旁腺细胞中阳性染色细胞核数为Ki-67指数。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件,数据以$\bar{x} \pm s$表示,组间比较方差齐性时行方差分析及Dunnett-t检验,方差不齐时行秩和检验(K-W检验)。

2 结果

模型组大鼠存活30只,死亡原因为麻醉意外死亡、术后出血和感染。通过生化及ELISA检测,确认造模成功28只;假手术对照组6只大鼠均存活。在预定的各时间点成功收集到模

型组24只大鼠和假手术对照组5只大鼠的甲状旁腺和血清样本,其余大鼠因无法找到甲状旁腺作排除处理。

2.1 肾功能及甲状旁腺素水平的变化

模型组大鼠血清肌酐和i-PTH在甲状旁腺功能亢进症造模后第1天便显著升高,至实验结束一直明显高于假手术对照组($P<0.01$);模型组血清总钙较假手术对照组在后期稍有升高,但差异无统计学意义($P>0.05$);模型组血清无机磷在甲状旁腺功能亢进症造模后第4天开始出现显著升高($P<0.01$),并维持至实验结束。见表1。

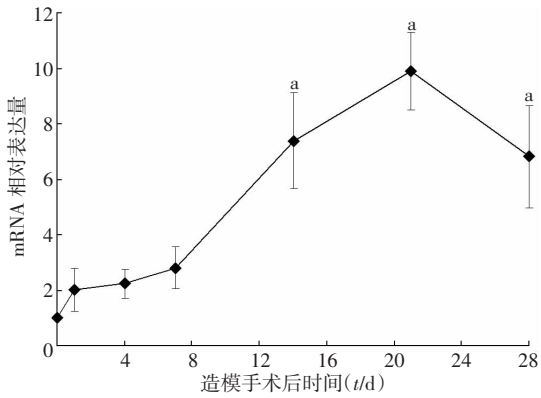
表1 2组大鼠血清肌酐、总钙、无机磷及全段甲状旁腺激素的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	Cr(μmol/L)	Ca(mmol/L)	Pi(mmol/L)	i-PTH(ng/L)
假手术对照组	5	27.4±2.3	2.48±0.10	2.42±0.21	26.19±4.98
模型组造模后					
第1天	4	124.3±10.8[a]	2.40±0.15	2.57±0.08	108.01±8.49[a]
第4天	4	107.5±9.9[a]	2.55±0.08	3.43±0.35[a]	90.31±6.57[a]
第7天	4	109.8±9.8[a]	2.48±0.03	3.58±0.24[a]	87.60±5.42[a]
第14天	4	98.5±21.7[a]	2.50±0.05	3.56±0.32[a]	104.71±7.71[a]
第21天	4	89.5±5.8[a]	2.62±0.14	3.58±0.45[a]	93.68±14.58[a]
第28天	4	72.3±4.0[a]	2.61±0.13	3.59±0.26[a]	79.99±6.33[a]

a:$P<0.01$,与假手术对照组比较

2.2 Real-time PCR检测Gcm2 mRNA的表达变化

与假手术对照组比较,模型组大鼠甲状旁腺细胞Gcm2 mRNA表达随时间进展升高趋势逐渐明显:在第1、4、7天仅缓慢升高,无统计学差异($P>0.05$);第14天升高趋势明显($P<0.01$);于第21天升高至最高点,为假手术对照组的9.92倍($P<0.01$);第28天表达量稍有下降($P<0.01$)。见图1。



第0天为假手术对照组,第1、4、7、14、21、28天为相应的模型组
a:$P<0.01$,与假手术对照组比较

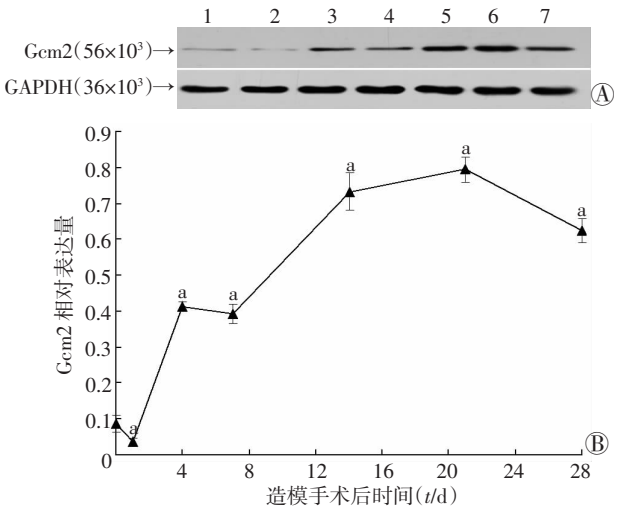
图1 Real-time PCR检测造模后不同时间点大鼠Gcm2 mRNA的表达变化

2.3 Western blot检测Gcm2蛋白的表达变化

与假手术对照组相比,模型组大鼠甲状旁腺细胞Gcm2的蛋白表达在第1天时先有下调变化,于第4天进行性升高,第7天稍有波动,第14天后一直处于显著升高的表达状态,于第21天到达最高点,第28天稍有回落。模型组各时间点的表达量与假手术对照组的相比均有明显差异($P<0.01$)。见图2。

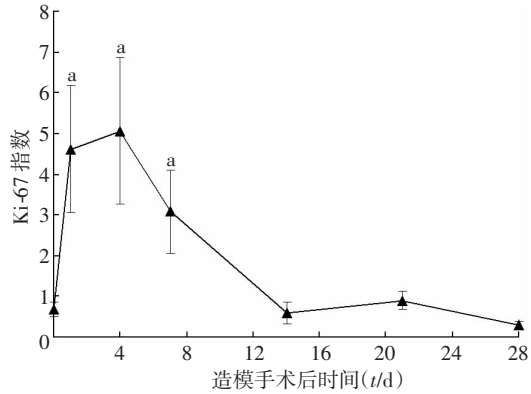
2.4 免疫组化检测甲状旁腺细胞增殖

Ki-67阳性细胞散在于甲状旁腺不同部位。Ki-67指数在造模后的第1天便显著升高($P<0.01$);第4天升高至最高点($P<0.01$);第7天显著降低($P<0.01$);第14~28天,Ki-67指数一直处于与假手术对照组相近的水平($P>0.05$)。见图3。



A:Western blot检测结果 1:假手术对照组;2~7:分别为模型组造模第1、4、7、14、21、28天;B:半定量分析结果 第0天为假手术对照组,第1、4、7、14、21、28天为相应的模型组 a:$P<0.01$,与假手术对照组比较

图2 Western blot检测造模后不同时间点大鼠Gcm2蛋白的表达变化



第0天为假手术对照组,第1、4、7、14、21、28天为相应的模型组
a:$P<0.01$,与假手术对照组比较

图3 造模后大鼠不同时间点Ki-67指数的变化

3 讨论

Gcm表达于果蝇胚胎神经前体细胞,决定其向胶质细胞或神经元分化。但Gcm在哺乳动物中的同源体Gcm1和Gcm2,却分别特异性地表达于胎盘迷路和甲状旁腺。Gcm2在胚胎阶段与Foxn1基因表达于第3和第4咽囊甲状旁腺/胸腺共同原基不同区域的细胞中,决定这些细胞向甲状旁腺或是胸腺方向分化[8]。敲除了Gcm2的小鼠将缺失甲状旁腺[1]。Gcm2基因的不同变异也见于人类多种家族性甲状旁腺功能减退症[9-12]。除此之外,在成熟个体的甲状旁腺中,Gcm2也特异而持续地表达[13],提示其在维持成体甲状旁腺细胞功能中仍发挥重要作用。已有研究证实,Gcm2的下游调节基因包括钙敏感性受体(calcium-sensing receptor,CaSR)[2]和PTH[3]等甲状旁腺细

胞赖以维持内分泌功能的重要分子。这些证据表明，Gcm2是决定甲状旁腺细胞分化和维持特异性内分泌功能的关键分子。

除了与甲状旁腺功能减退症有关，在甲状旁腺功能亢进症中也发现Gcm2的表达异常。Gcm2是否还参与了对甲状旁腺细胞增殖的调控呢？Correa等[4]利用RT-PCR对因功能亢进（包括原发性和继发性）而切除的人甲状旁腺病变组织进行了研究，发现甲状旁腺腺瘤组织中Gcm2的表达较正常组织降低。而Kebebew等[5]用相同的PCR引物检测甲状旁腺病变组织时，却发现甲状旁腺腺瘤、腺癌和增生组织中Gcm2的表达相对正常甲状旁腺组织明显升高。2个研究得出截然不同的结果。这提示Gcm2的表达在甲状旁腺功能亢进过程中并不是简单升高或者降低，而可能是在病程中针对不同情况有着不同的变化。本研究通过制备经典的继发性甲状旁腺功能亢进症大鼠模型[6]，检测了甲状旁腺功能亢进过程中Gcm2在mRNA及蛋白水平的表达变化和甲状旁腺细胞的增殖情况，结果显示Gcm2蛋白的表达与甲状旁腺细胞的增殖在时间进程上的变化趋势有所区别。在甲状旁腺功能亢进症造模后的最初几天内，甲状旁腺细胞的增殖便明显增强，这与既往研究结果一致[14]；Gcm2 mRNA表达在最初几天缓慢上调，但Gcm2的蛋白表达却先有一个下调的变化，提示Gcm2的表达可能存在转录后调控机制。从第7天开始，甲状旁腺细胞的增殖逐渐回复到正常水平，而Gcm2的表达却开始明显增强，这可能跟Gcm2促进甲状旁腺细胞分化成熟的功能有关。甲状旁腺细胞的增殖与Gcm2的表达水平似乎呈现一种此消彼长的趋势。鉴于Gcm2在甲状旁腺细胞中扮演着决定分化的重要角色，而细胞增殖能力与细胞分化程度一般呈相反的变化趋势，我们推测，Gcm2表达下调可能是甲状旁腺细胞发生增殖的必要条件，而Gcm2表达的上调对甲状旁腺细胞增殖可能有抑制作用，当然也有可能两者之间并没有直接的因果关系，而只是同时受其他共同因素作用的结果。这些都需要进一步的体外细胞实验来验证。

综上所述，在继发性甲状旁腺功能亢进症发病过程中，首先表现为甲状旁腺细胞的增殖增强和Gcm2蛋白的表达抑制，之后Gcm2的表达增强以促进增殖后细胞的分化和功能成熟，由此共同作用成为导致甲状旁腺功能亢进的部分原因。本研究明确了Gcm2在继发性甲状旁腺功能亢进症发病过程中的表达变化，以及与甲状旁腺细胞增殖在时间进程上的关系，为进一步揭示Gcm2的功能提供了实验依据，并为针对甲状旁腺功能亢进症不同的病程阶段制定相应的临床治疗策略提供了启示。同时，Gcm2作为一个在甲状旁腺细胞中特异性表达的转录因子，发挥着决定细胞分化、维持成熟功能的关键作用，可能是甲状旁腺功能亢进症或减退症1个潜在的治疗靶点。其调节可能涉及多条通路，它们与Gcm2之间的相互作用机制值得进一步研究。

参考文献：

[1] Gunther T, Chen Z F, Kim J, *et al*. Genetic ablation of parathyroid glands reveals another source of parathyroid hormone[J]. Nature, 2000, 406(6792): 199-203.

[2] Canaff L, Zhou X, Mosesova I, *et al*. Glial cells missing-2 (GCM2) transactivates the calcium-sensing receptor gene: effect of a dominant-negative GCM2 mutant associated with autosomal dominant hypoparathyroidism[J]. Hum Mutat, 2009, 30(1): 85-92.

[3] Kawahara M, Iwasaki Y, Sakaguchi K, *et al*. Involvement of GCMB in the transcriptional regulation of the human parathyroid hormone gene in a parathyroid-derived cell line PT-r: effects of calcium and 1, 25(OH)2D3[J]. Bone, 2010, 47(3): 534-541.

[4] Correa P, Akerstrom G, Westin G. Underexpression of Gcm2, a master regulatory gene of parathyroid gland development, in adenomas of primary hyperparathyroidism[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2002, 57(4): 501-505.

[5] Kebebew E, Peng M, Wong M G, *et al*. GCMB gene, a master regulator of parathyroid gland development, expression, and regulation in hyperparathyroidism[J]. Surgery, 2004, 136(6): 1261-1266.

[6] Denda M, Finch J, Slatopolsky E. Phosphorus accelerates the development of parathyroid hyperplasia and secondary hyperparathyroidism in rats with renal failure[J]. Am J Kidney Dis, 1996, 28(4): 596-602.

[7] 王小兵，王笑云，周富华. 自制含不同磷、钙量的大鼠实验饲料的研究[J]. 中国血液净化，2003，2(8)：436-438.

[8] Gordon J, Bennett A R, Blackburn C C, *et al*. Gcm2 and Foxn1 mark early parathyroid- and thymus-specific domains in the developing third pharyngeal pouch[J]. Mech Dev, 2001, 103(1/2): 141-143.

[9] Mannstadt M, Bertrand G, Muresan M, *et al*. Dominant-negative GCMB mutations cause an autosomal dominant form of hypoparathyroidism[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93(9): 3568-3576.

[10] Mirczuk S M, Bowl M R, Nesbit M A, *et al*. A missense glial cells missing homolog B (GCMB) mutation, Asn502His, causes autosomal dominant hypoparathyroidism[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(7): 3512-3516.

[11] Tomar N, Bora H, Singh R, *et al*. Presence and significance of a R110W mutation in the DNA-binding domain of GCM2 gene in patients with isolated hypoparathyroidism and their family members[J]. Eur J Endocrinol, 2010, 162(2): 407-421.

[12] Yi H S, Eom Y S, Park IeB, *et al*. Identification and characterization of C106R, a novel mutation in the DNA-binding domain of GCMB, in a family with autosomal-dominant hypoparathyroidism[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2012, 76(5): 625-633.

[13] Nonaka D. Study of parathyroid transcription factor Gcm2 expression in parathyroid lesions[J]. Am J Surg Pathol, 2011, 35(1): 145-151.

[14] Dusso A S, Pavlopoulos T, Naumovich L, *et al*. p21(WAF1) and transforming growth factor-alpha mediate dietary phosphate regulation of parathyroid cell growth[J]. Kidney Int, 2001, 59(3): 855-865.

（收稿：2013-02-28；修回：2013-03-09）

（编辑 龙 亮）