

# 高糖环境下 exendin - 4 对人肾小管上皮细胞 CTGF、BMP - 7 表达的影响

张继敏 兰丽珍 孔 瑜

**摘 要** 目的 探讨 exendin - 4 对高糖环境下人肾小管上皮细胞 (HK - 2) 结缔组织生长因子 (CTGF)、骨形态发生蛋白 - 7 (BMP - 7) 蛋白和 mRNA 表达的影响。方法 将体外培养的 HK - 2 细胞分为正常糖对照组 (NG)、高糖组 (HG)、甘露醇组 (MG)、高糖 + 不同浓度的 exendin - 4 组 (分别 exendin - 4 10、20、40 pmol/L), 于培养 48h 后, 采用免疫细胞化学、RT - PCR 方法检测 HK - 2 细胞 CTGF、BMP - 7 蛋白和 mRNA 表达量。结果 与 NG 相比, HG 组 HK - 2 细胞 CTGF mRNA 和蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05$ ), BMP - 7 mRNA 和蛋白表达明显降低 ( $P < 0.05$ ), 加入 exendin - 4 的各组 HK - 2 细胞 CTGF 表达较 HG 组均明显降低 ( $P < 0.05$ ), BMP - 7 的表达较 HG 组均明显升高 ( $P < 0.05$ )。结论 exendin - 4 可能会通过抑制高糖环境下 HK - 2 细胞 CTGF 高表达, 提高 BMP - 7 的表达, 改善糖尿病肾病。

**关键词** 胰高血糖素样肽 - 1 exendin - 4 人肾小管上皮细胞 结缔组织生长因子 骨形态发生蛋白 - 7

**Effect of Exendin - 4 on the Expression of Connective Tissue Growth Factor (CTGF) and Bone Morphogenetic Protein - 7 (BMP - 7) in Human Renal Tubular Epithelial Cell Cultured with High Concentration of D - glucose.** Zhang Jimin, Lan Lizhen, Kong Yu. Department of Endocrinology, The First Clinical Medical College, Shanxi Medical University, Shanxi 030001, China

**Abstract Objective** To investigate the effect of exendin - 4 on the expression of connective tissue growth factor (CTGF) and bone morphogenetic protein - 7 (BMP - 7) in human renal tubular epithelial cell cultured in high - glucose environment. **Methods** HK - 2 cells were subcultured under normal glucose (NG), high glucose (HG), mannitol glucose (MG) and high glucose with different concentrations of exendin - 4 group (including exendin - 4 10, 20, 40 pmol/L). The activity of CTGF and the expressions of BMP - 7 protein and mRNA in cultured HK - 2 cells were detected with immunocytochemistry and RT - PCR at 48h. **Results** Compared with the normal group, the expression of CTGF significantly increased in the high glucose group ( $P < 0.05$ ), the expression of BMP - 7 significantly decreased in the high glucose group ( $P < 0.05$ ). Compared with the high glucose group, the expressions of CTGF was significantly lower in all the exendin - 4 groups ( $P < 0.05$ ), the expressions of BMP - 7 significantly increased in all the exendin - 4 groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Exendin - 4 may modulate the process of diabetic nephropathy by inhibiting the expression of CTGF and increasing the expression of BMP - 7 in high glucose - induced HK - 2 cells.

**Key words** Glucagon like peptide - 1; Exendin - 4; Human renal tubular epithelial cell; Connective tissue growth factor; Bone morphogenetic protein - 7

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病主要微血管并发症之一, 目前 DN 发病机制尚未完全清楚, 以往对糖尿病肾病的研究多在肾小球方面, 近年, 肾小管上皮细胞在糖尿病肾病中的作用越来越引起人们的重视。就对肾功能的影响程度而言, 肾小管病变较肾小球病变更为突出, 且肾小管间质纤维化程度与肾功能衰竭的程度密切相关<sup>[1,2]</sup>。胰高血糖素样肽 - 1 (glucagon like peptide - 1, GLP - 1) 是由肠道 L 细胞分泌的一种肠促胰岛素, GLP - 1 受体广泛分

布于啮齿类动物和人体内。exendin - 4 是从生活在美国西南部的希拉毒蜥的唾液中分离出来的 GLP - 1 类似物, 在胰岛 GLP - 1 受体介导下发挥调节血糖作用, 属于 GLP - 1 受体激动剂。近年来, 人们对 GLP - 1 的研究发现其对肾脏具有保护作用, 但对于 GLP - 1 的肾脏保护作用是否与调节 CTGF、BMP - 7 的表达有关, 目前国内外文献报道较少。本文旨在研究 GLP - 1 类似物 exendin - 4 对高糖条件下肾小管上皮细胞 CTGF 和 BMP - 7 表达的影响, 为糖尿病肾小管间质纤维化的防治提供一个途径。

## 材料与方法

1. 材料: (1) 细胞株: 人肾脏近端小管上皮细胞株 (HK -

作者单位: 030001 太原, 山西医科大学 (张继敏、孔瑜); 山西医科大学第一附属医院内分泌科 (兰丽珍)

通讯作者: 兰丽珍, 电子信箱: lanlizhen@163.com

2)购自中国协和医科大学细胞中心。(2)实验药物与主要试剂:exendin-4(东莞宝丽健生物工程研究开发有限公司);胎牛血清、DMEM 低糖和高糖培养基(HyClone 公司);二甲基亚砷(美国 Sigma 公司);胰蛋白酶-EDTA 消化液(北京索莱宝科技有限公司)。兔抗 BMP-7 多克隆抗体、兔抗 CTGF 多克隆抗体、DAB 显色剂(武汉博士德公司),TRIzolRNA 提取试剂盒(Invitrogen 公司)、PCR 引物(上海生物工程有限公司);反转录(RT)试剂盒(Fermentas 公司),荧光定量 PCR 试剂(Roche 公司)。(3)实验主要仪器:CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(日本 SANYO 公司);生物净化工作台(苏州净化设备有限公司);倒置显微镜(重庆光电仪器总公司);BI-2000 医学图像分析系统(成都泰盟科技有限公司);荧光定量 PCR 仪 TL988(西安天隆科技有限公司)。

2. 方法:(1)细胞培养及分组:HK-2 细胞系用含 10% 灭活胎牛血清的低糖 DMEM 培养液(D-葡萄糖浓度 5.5mmol/L)于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中传代培养,每 2~3 天更换 1 次培养液,待细胞生长至 70%~80% 时更换为无血清 DMEM 培养液,使细胞生长同步化 24h。将细胞分为以下各组:①正常糖对照组(NG 组 含 5.5mmol/L D-葡萄糖);②高糖组(HG 组 含 30mmol/L D-葡萄糖);③甘露醇组(MG 组 含 24.5mmol/L 甘露醇和 5.5mmol/L D-葡萄糖,终浓度为 30mmol/L);④HG+不同浓度 exendin-4 干预组(HG+exendin-4 组),exendin-4 终浓度分别为 10、20、40pmol/L。48h 后取样观察,每组均含 3 瓶细胞( $n=3$ )。(2)免疫细胞化学染色:按实验分组条件于 6 孔板中培养细胞,细胞爬片经 PBS 洗涤后用 4% 多聚甲醛固定,0.1% Triton X-100 打孔,5% BSA 封闭,然后用一抗为兔抗 BMP-7 多克隆抗体(1:50,武汉博士德公司),兔抗 CTGF 多克隆抗体(1:100,武汉博士德公司),4℃ 孵育过夜,PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。第 2 天滴加生物素化山羊抗兔 IgG,37℃ 孵育 30min,DAB 显色。苏木精复染细胞核,中性树胶封片,拍照。图像用 BI-2000 医学图像分析系统进行分析,随机不重复选取 10 个高倍视野,测阳性细胞的平均光密度值。(3)RT-PCR 法检测各组 HK-2 细胞中 BMP-7、CTGFmRNA 表达:收集细胞,加入 1mlTrizol 提取总 RNA,反转录成 cDNA 进行 PCR 反应,按反转录试剂盒说明操作,内参为人的  $\beta$ -actin。PCR 引物序列: $\beta$ -actin 扩增片段为 184bp,上下游引物分别为 5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3'和 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3';CTGF 扩增片段为 153bp,上下游引物分别为 5'-GGAAAAGATTCCCACCCAAT-3'和 5'-TGCTCCTAAAGCCACACCTT-3';BMP-7 扩增片段为 133bp,上下游引物分别为 5'-TTTTCTGGATCCTCCATTGC-3'和 5'-CAAAAGCCATATGCTGCTCA-3'。反应条件:94℃ 预变性 10min;94℃ 变性 15s,58℃ 退火 60s,45 个循环结束。重复 3 次独立的 RT-PCR 全过程。荧光定量 TL988PCR 仪进行定量分析,目的基因扩增用 CT 值,首先计算各样本测定基因 X;CT 与内对照基

因  $\beta$ -actin CT 的差值,即  $\Delta CT = CT_{(X)} - CT_{(\beta-actin)}$ ,再用各实验组样本的  $\Delta CT$  减去正常对照组样本的  $\Delta CT$ ,得到  $\Delta\Delta CT$ ,利用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  计算基因表达情况。

3. 统计学方法:全部数据经 SPSS 17.0 软件包进行统计,以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用单因素方差分析进行分析,两两比较用  $LSD-t$  多重比较, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。如果资料不符合正态分布,则采用非参数检验。

结 果

1. 各组细胞 CTGF、BMP-7 蛋白表达水平:HK-2 细胞阳性染色为胞质呈黄色至棕黄色颗粒状,阴性胞质为淡紫蓝色,胞核为蓝色。结果显示:NG 组和 MG 组,CTGF 有弱阳性信号表达,BMP-7 有阳性信号表达;HG 组,CTGF 阳性表达较 NG 组和 MG 组显著增加( $P < 0.05$ ),BMP-7 阳性表达显著降低( $P < 0.05$ );与 HG 组相比,HG+不同浓度 exendin-4 组 CTGF 阳性表达均明显降低( $P < 0.05$ ),BMP-7 阳性表达均明显升高( $P < 0.05$ ),且都呈浓度依赖性,但 HG+不同浓度 exendin-4 组的 CTGF、BMP-7 阳性表达水平均未恢复到 NG 组水平( $P < 0.05$ ,表 1 及图 1、图 2)。

表 1 各组肾小管上皮细胞 CTGF、BMP-7 的平均光密度( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别             | CTGF                          | BMP-7                         |
|----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| NG             | 0.191 $\pm$ 0.018             | 0.321 $\pm$ 0.009             |
| MG             | 0.187 $\pm$ 0.016             | 0.320 $\pm$ 0.017             |
| HG             | 0.378 $\pm$ 0.018 *           | 0.213 $\pm$ 0.021 *           |
| HG + exendin-4 |                               |                               |
| 10pmol/L       | 0.332 $\pm$ 0.017 ** $\Delta$ | 0.237 $\pm$ 0.017 ** $\Delta$ |
| 20pmol/L       | 0.289 $\pm$ 0.010 ** $\Delta$ | 0.269 $\pm$ 0.015 ** $\Delta$ |
| 40pmol/L       | 0.234 $\pm$ 0.020 ** $\Delta$ | 0.304 $\pm$ 0.015 ** $\Delta$ |

与 NG 组相比较,\* $P < 0.05$ ;与 HG 组相比较,\*\* $P < 0.05$ ;多重比较, $\Delta P < 0.05$

2. 各组细胞 CTGF 及 BMP-7mRNA 表达水平:NG 组和 MG 组,CTGFmRNA 有微量水平的表达,BMP-7mRNA 高表达;HG 组 CTGFmRNA 表达较 NG 组明显升高( $P < 0.05$ ),BMP-7mRNA 表达较 NG 组明显下降( $P < 0.05$ ),与 HG 组相比,HG+exendin-4(10pmol/L)组、HG+exendin-4(20pmol/L)组、HG+exendin-4(40pmol/L)组 HK-2 细胞 CTGFmRNA 表达均下调( $P < 0.05$ ),BMP-7mRNA 表达均上调( $P < 0.05$ ),且均呈浓度依赖性,但都没有恢复到 NG 组水平(表 2)。

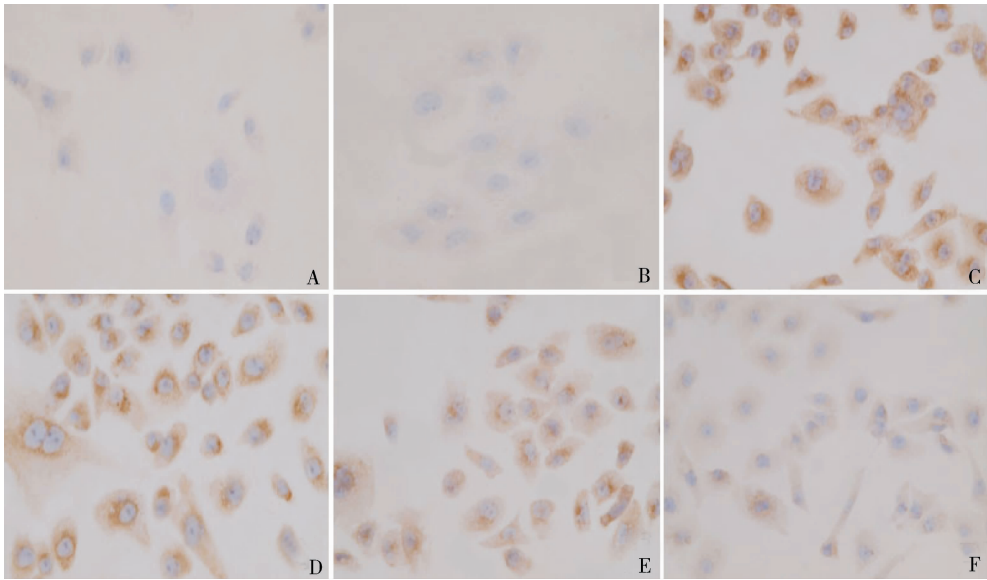


图1 各组人肾小管上皮细胞 CTGF 蛋白的表达 (SABC, ×400)

A. 正常糖对照组;B. 甘露醇组;C. 高糖组;D. 高糖 + 10pmol/L exendin - 4 组;E. 高糖 + 20pmol/L exendin - 4 组;F. 高糖 + 40pmol/L exendin - 4 组

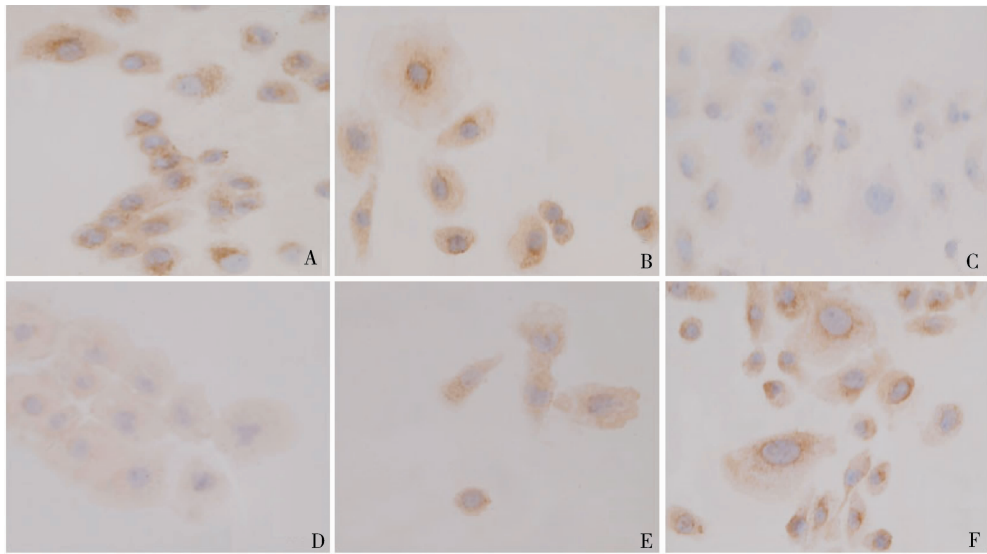


图2 各组人肾小管上皮细胞 BMP - 7 蛋白的表达 (SABC, ×400)

A. 正常糖对照组;B. 甘露醇组;C. 高糖组;D. 高糖 + 10pmol/L exendin - 4 组;E. 高糖 + 20pmol/L exendin - 4 组;F. 高糖 + 40pmol/L exendin - 4 组

表2 各组肾小管上皮细胞 CTGF 及 BMP - 7mRNA 的  $2^{-\Delta\Delta CT}$  ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

| 组别               | CTGF              | BMP - 7           |
|------------------|-------------------|-------------------|
| NG               | 1                 | 1                 |
| MG               | 0.972 ± 0.229     | 0.955 ± 0.182     |
| HG               | 6.163 ± 0.161 *   | 0.183 ± 0.040 *   |
| HG + exendin - 4 |                   |                   |
| 10pmol/L         | 4.486 ± 0.285 *#Δ | 0.286 ± 0.048 *#Δ |
| 20pmol/L         | 3.181 ± 0.244 *#Δ | 0.415 ± 0.036 *#Δ |
| 40pmol/L         | 2.001 ± 0.378 *#Δ | 0.602 ± 0.117 *#Δ |

与 NG 组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 HG 组比较, #  $P < 0.05$ ; 多重比较, Δ  $P < 0.05$

讨 论

肾间质纤维化是多种原因引起的慢性肾脏疾病进展为肾衰竭的共同通路,肾小管上皮损伤后的病理改变是肾间质纤维化的始动因素<sup>[3]</sup>。在糖尿病持续高血糖状态下,尿糖的产生及肾小管间质组织和周围血管中葡萄糖浓度的升高,诱导肾小管细胞凋亡,促使小管萎缩,进而发展为肾小管纤维化。它的形成是一个多因素、多细胞参与的复杂过程,尤其是促纤维化因子和抗纤维化因子的失衡。

CTGF 是一种新发现的具有多种功能的细胞因

子,多种肾组织细胞均可分泌,近年,随着对 CTGF 结构和生物学功能的深入研究,CTGF 在 DN 肾间质纤维化的作用越来越重要。CTGF 是转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 发挥其致纤维化效应的下游因子,它不仅引起肾小球硬化,还可促进肾小管间质纤维化<sup>[4]</sup>。研究发现链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠肾组织中 CTGF 蛋白和 mRNA 表达水平均明显升高<sup>[5]</sup>。Umezono 等<sup>[6]</sup>利用原位杂交方法观察 DN 患者肾活检标本,发现在肾间质小管萎缩和间质纤维化区域 CTGF mRNA 表达较高,且与纤维化程度有关。这些均提示 CTGF 在糖尿病肾病肾小管间质纤维化发展过程中是一个关键性致病因子。本研究表明在高糖刺激下, HK-2 细胞 CTGF 蛋白及 mRNA 表达明显增加。甘露醇组与低糖组相比, CTGF 表达无明显变化,说明该作用与高糖所导致的高渗透压无关。exendin-4 干预组 CTGF 的表达均较高糖组明显减少。有研究表明, exendin-4 可通过作用于肾脏的 GLP-1 受体抑制 TGF- $\beta$  的表达, 改善糖尿病肾病<sup>[7]</sup>。由此可推测, exendin-4 可能通过抑制 TGF- $\beta$ , 进而阻止其发挥生物学效应的下游因子 CTGF 的表达, 改善高糖所致肾间质纤维化。

BMP-7 是新发现的肾脏内分泌激素,属于 TGF- $\beta$  细胞因子超家族,在抗肾间质纤维化中扮演着重要的角色,是一种有效的肾脏保护因子。BMP-7 主要表达于肾脏远端小管和集合管,在近段小管有少量表达。肾脏疾病时, BMP-7 可通过抑制上皮细胞的凋亡、促进肾间质细胞外基质的降解、减少促炎症因子释放、对抗 TGF- $\beta_1$  的致肾纤维化作用来保护肾脏。同时, BMP-7 还可通过促进 E-钙黏蛋白的重新表达,促使间质细胞向正常上皮细胞转分化,恢复肾脏正常结构和功能<sup>[8]</sup>。本研究结果表明在低糖组 HK-2 细胞中 BMP-7 mRNA 和蛋白有少量表达<sup>[9,10]</sup>。与正常糖组相比,高糖作用下的肾小管上皮细胞 BMP-7 蛋白及 mRNA 表达明显降低。体外实验研究发现 p38MAPK 信号通路可能参与介导高糖刺激肾小管上皮细胞 BMP-7 表达的下调。在 exendin-4 组,肾小管上皮细胞 BMP-7 蛋白及 mRNA 表达较高糖组均明显上调<sup>[11]</sup>。至于 exendin-4 通过何种途径介导 BMP-7 表达增加有待进一步研究。

其结果表明 exendin-4 可通过上调 BMP-7 的表达发挥对肾脏的保护作用,从而对 DN 肾小管间质纤维化的发生发展起到预防及逆转作用。

本研究结果提示, exendin-4 可能会通过抑制肾组织 CTGF 的过度表达和升高肾组织 BMP-7 的表达,来延缓糖尿病肾病肾间质纤维化的进展,为今后运用 GLP-1 治疗 DN 提供了实验依据。

#### 参考文献

- 1 Yamagishi S, Fukami K, Okuda S, *et al.* Molecular mechanisms of diabetic nephropathy and its therapeutic intervention[J]. *Curr Drug Targets*, 2007, 8(8): 952-959
- 2 Soldatos G, Cooper ME. Diabetic nephropathy: important pathophysiologic mechanisms[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2008, 82: S75-S79
- 3 张爱青, 甘卫华, 陈荣华, 等. 胰岛素样生长因子-1 对人肾小管上皮细胞转分化及胶原合成的作用[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2007, 23(2): 127-129
- 4 Mason RM. Connective tissue growth factor (CCN2), a pathogenic factor in diabetic nephropathy. What does it do? How does it do it[J]. *J Cell Commun Signal*, 2009, 3(2): 95-104
- 5 Lai PB, Zhang L, Yang LY. Quercetin ameliorates diabetic nephropathy by reducing the expressions of transforming growth factor- $\beta_1$  and connective tissue growth factor in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Ren Fail*, 2012, 34(1): 83-87
- 6 Umezono T, Toyoda M, Kato M, *et al.* Glomerular expression of CTGF, TGF- $\beta$  and type IV collagen in diabetic nephropathy[J]. *J Nephrol*, 2006, 19(6): 751-757
- 7 Kodera R, Shikata K, Kataoka HU, *et al.* Glucagon-like peptide-1 receptor agonist ameliorates renal injury through its anti-inflammatory action without lowering blood glucose level in a rat model of type 1 diabetes[J]. *Diabetologia*, 2011, 54(4): 965-978
- 8 Veerasamy M, Nguyen TQ, Motazed R, *et al.* Differential regulation of E-cadherin and alpha-smooth muscle actin by BMP 7 in human renal proximal tubule epithelial cells and its implication in renal fibrosis[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 297(5): F1238-F1248
- 9 何春梅, 郑法雷, 连耀国, 等. 血管内皮生长因子对肾小管上皮-间充质细胞转化的作用及其与骨形成蛋白-7、分化抑制因子表达的关系[J]. *中国医学科学院学报*, 2008, 30(6): 703-710
- 10 Bramlage CP, Tampe B, Koziol M, *et al.* Bone morphogenetic protein (BMP)-7 expression is decreased in human hypertensive nephrosclerosis[J]. *BMC Nephrology*, 2010, 11: 31
- 11 肖瑛, 方开云, 石明隽, 等. P38MAPK 介导高糖下调肾小管上皮细胞表达 BMP-7[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(9): 1759-1763

(收稿: 2012-01-04)

(修回: 2012-02-16)