

# 吡格列酮对高糖诱导的大鼠肾小管上皮细胞-间充质细胞转分化的影响及机制研究<sup>△</sup>

孙 兰<sup>1,2\*</sup>, 张 帆<sup>1,2</sup>, 石明隽<sup>1,2</sup>, 田平平<sup>1,2</sup>, 郭 兵<sup>1,2#</sup>(1. 贵州医科大学基础医学院病理生理学教研室, 贵阳 550025; 2. 贵州省常见慢性疾病发病机制及药物研究重点实验室, 贵阳 550025)

中图分类号 R965.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)16-1949-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.16.06

**摘要** 目的:探讨吡格列酮(PIO)对高糖诱导的大鼠肾小管上皮细胞-间充质细胞转分化(EMT)的影响及可能机制,为防治糖尿病肾病提供理论依据及新靶点。方法:将大鼠肾小管细胞NRK-52E随机分为对照组(5.5 mmol/L葡萄糖)、高糖组(30 mmol/L葡萄糖)、PIO干预组(30 mmol/L葡萄糖+5.0 μmol/L PIO)、GW9662干预组(30 mmol/L葡萄糖+5.0 μmol/L PIO+5.0 μmol/L特异性拮抗剂GW9662)。前3组细胞分别在培养6、12、24、48 h时进行动态检测, GW9662干预组细胞在培养48 h时进行检测。采用Real-time PCR法检测细胞中第10号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源基因(PTEN)、过氧化物酶体增殖物激活受体γ(PPARγ) mRNA的表达水平;采用Western blotting法检测细胞中PTEN、PPARγ、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、上皮钙黏素(E-cadherin)的表达以及磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)信号通路的变化。结果:随培养时间的延长,与正常组比较,高糖组细胞中PPARγ、PTEN mRNA及蛋白(除PPARγ 6 h外)表达水平均显著降低,α-SMA、p-AKT<sup>(Thr308)</sup>蛋白表达水平均显著升高,E-cadherin蛋白表达水平显著降低( $P<0.05$ ),且呈时间依赖趋势;与高糖组比较,PIO组细胞中PPARγ(除6 h时的蛋白表达外)、PTEN的mRNA及蛋白表达水平均显著升高,α-SMA、p-AKT<sup>(Thr308)</sup>(除6 h外)蛋白表达水平均显著降低,E-cadherin蛋白表达水平显著增高( $P<0.05$ ),且呈时间依赖趋势。与高糖组比较,GW9662干预组细胞PTEN、PPARγ mRNA及蛋白表达水平,α-SMA、E-cadherin、p-AKT<sup>(Thr308)</sup>蛋白表达水平的差异均无统计学意义,PIO的作用效应被PPARγ拮抗剂GW9662阻断。结论:在高糖条件下PIO可能是通过激活PPARγ而实现对PTEN表达的调控,使PI3K/AKT信号通路受到抑制,进而抑制肾小管上皮细胞EMT的发生。

**关键词** 吡格列酮;肾小管上皮细胞;过氧化物酶体增殖物激活受体γ;第10号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源基因;磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B信号通路;上皮细胞-间充质细胞转分化;大鼠

## Effects and Mechanism Study of Pioglitazone on High Glucose-induced Epithelial-mesenchymal Transition in Renal Tubular Epithelial Cells of Rat

SUN Lan<sup>1,2</sup>, ZHANG Fan<sup>1,2</sup>, SHI Mingjun<sup>1,2</sup>, TIAN Pingping<sup>1,2</sup>, GUO Bing<sup>1,2</sup> (1. Dept. of Pathophysiology, College of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pathogenesis & Drug Research on Common Chronic Diseases, Guiyang 550025, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate the effects of pioglitazone (PIO) on high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in renal tubular epithelial cells of rat and its possible mechanism, and to provide theoretic reference and new target for the prevention and treatment of diabetic nephropathy. METHODS: The rat renal tubular epithelial NRK-52E cells were randomly divided into control group (5.5 mmol/L glucose), high-glucose group (30 mmol/L glucose), PIO intervention group (30 mmol/L glucose+5.0 μmol/L PIO), GW9662 intervention group (30 mmol/L glucose+5.0 μmol/L PIO+5.0 μmol/L specific antagonist GW9662). The cells of the first 3 groups were detected at 6, 12, 24, 48 h of culture, while those in GW9662 intervention group were detected at 48 h of culture. mRNA expression of PTEN and PPARγ were detected by real-time PCR. The protein expression of PTEN, PPARγ, α-SMA and E-cadherin as well as the changes of PI3K/AKT signaling pathway were determined by Western blotting assay. RESULTS: With the extension of culture time, compared with control group, the mRNA and protein expression of PPARγ (except for protein expression at 6 h) and PTEN in high-glucose group reduced significantly, while the protein expression of α-SMA and p-AKT<sup>(Thr308)</sup> increased significantly, and the protein expression of E-cadherin reduced significantly ( $P<0.05$ ), showing time-dependent trend. Compared with high-glucose group, the mRNA and the protein expression (except for 6 h) of PPARγ and PTEN were increased significantly in PIO intervention group, while the protein expression of α-SMA and p-AKT<sup>(Thr308)</sup> were decreased significantly, and the protein expression of E-cadherin was increased significantly ( $P<0.05$ ), showing time-dependent trend. There was no statistical significance in mRNA and

△ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81760131);贵州省教育厅青年科技人才成长项目(No.黔教教KY字[2018]191);贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(No.QZYY-2016-077)

\* 讲师,硕士。研究方向:糖尿病肾病肾脏纤维化。电话:0851-88416067。E-mail:2277359086@qq.com

# 通信作者:教授,博士生导师,硕士。研究方向:糖尿病肾病相关发病机制。电话:0851-88416067。E-mail:guobings@126.com

protein expression of PPAR $\gamma$  and PTEN, protein expression of E-cadherin,  $\alpha$ -SMA and p-AKT<sup>(Thr308)</sup> between GW9662 intervention group and high-glucose group; the effect of PIO was blocked by PPAR $\gamma$  antagonist GW9662. CONCLUSIONS: PIO may up-regulate the expression of PTEN by activating PPAR $\gamma$ , inhibit PI3K/AKT signaling pathway so as to inhibit the occurrence of EMT of renal tubular epithelial cells.

**KEYWORDS** Pioglitazone; Renal tubular epithelial cell; PPAR $\gamma$ ; PTEN; PI3K/AKT signaling pathway; Epithelial-mesenchymal transition; Rat

糖尿病肾病(Diabetic nephropathy, DN)的发病机制十分复杂。有研究表明,肾小管上皮细胞-间充质细胞转分化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)在促进肾间质纤维化及DN的发生发展中均有重要作用,是导致DN肾损伤的主要机制<sup>[1-2]</sup>。第10号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源基因(*PTEN*)可通过负性调控磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)信号通路而发挥抗纤维化效应<sup>[3]</sup>。本课题组前期研究发现, DN模型大鼠肾小管上皮细胞中PTEN表达水平显著降低,而采用胰岛素控制模型大鼠的血糖后,其肾小管上皮细胞中PTEN的表达有所上调且DN进展得以延缓<sup>[4-5]</sup>,但是影响PTEN表达的调控因素目前尚不清楚。有研究发现,过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )参与了对PTEN表达的调控<sup>[6-7]</sup>。噻唑烷二酮类药物是PPAR $\gamma$ 的选择性激动剂,其对抗转化生长因子 $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )诱导的纤维化的作用是通过活化PPAR $\gamma$ 实现的<sup>[8]</sup>,且其可以显著减轻肾纤维化<sup>[9]</sup>。然而,噻唑烷二酮类药物是否通过PPAR $\gamma$ 参与了高糖诱导的肾小管上皮细胞中PTEN表达的调控,从而发挥抗DN肾小管间质纤维化的作用尚未完全阐明。因此,本研究拟通过观察噻唑烷二酮类药物吡格列酮(PIO)对高糖条件下大鼠近端肾小管上皮细胞NRK-52E中PPAR $\gamma$ 、PTEN及PI3K/AKT信号通路表达的影响,并通过PPAR $\gamma$ 特异性拮抗剂GW9662进行反向验证,探讨PIO对高糖诱导的大鼠肾小管EMT的作用及可能机制,为DN的防治提供理论依据及新靶点。

## 1 材料

### 1.1 仪器

BSA2202S型电子天平(德国Sartorius公司); AL-LEGRA X-15R型低温高速离心机、DU800型核酸蛋白分析仪(美国Beckman公司); 3111型CO<sub>2</sub>细胞培养箱、MultiskanFC型全自动酶联免疫检测仪(美国Thermo Fisher Scientific公司); CX33型倒置显微镜(日本Olympus公司); DYCZ-24DN型迷你垂直电泳仪(北京六一生物科技有限公司); ChemiDoc型凝胶成像系统、CFX96型荧光定量PCR分析系统(美国Bio-Rad公司); U33V型超低温冰箱(日本Sanyo公司); TY-80S型摇床(常州市瑞华仪器制造有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

PIO原料药(美国Cayman公司,批号:71745,纯度:99.0%); PPAR $\gamma$ 特异性拮抗剂GW9662原料药(美国Selleckchem公司,批号:01,纯度:99.25%); 胎牛血清

(FBS,浙江天杭生物科技股份有限公司,批号:20170316); DMEM培养基、胰蛋白酶、cDNA Synthesis Kit逆转录试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号:8117033、1785989、00285627); 兔抗大鼠PPAR $\gamma$ 单克隆抗体、兔抗大鼠PTEN单克隆抗体、小鼠抗大鼠 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)多克隆抗体(美国CST公司,批号:12、6、1); 兔抗大鼠AKT1单克隆抗体、兔抗大鼠p-AKT<sup>(Thr308)</sup>单克隆抗体、小鼠抗大鼠 $\beta$ -actin单克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号:AD082821、AG092722、AH03193074); 兔抗大鼠上皮钙黏素(E-cadherin)多克隆抗体(北京博士德生物工程有限公司,批号:12P24); 辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG二抗、HRP标记的山羊抗小鼠IgG二抗(泰安普美生物科技有限公司,批号:028326、019215); RIPA强裂解液(北京索莱宝科技有限公司,批号:20180507); ECL显色剂(常州天地人和生物科技有限公司,批号:2018060701); SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> Perfect Real-time试剂盒(日本Takara公司,批号:BJA3002); MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(上海威奥生物科技有限公司); BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京碧云天生物研究所); TRIzol Reagent(RNA提取试剂,美国Invitrogen公司); 聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国Millipore公司); 二甲基亚砜(DMSO)等其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为超纯水。

### 1.3 PCR引物

PPAR $\gamma$ 、PTEN、 $\beta$ -actin引物由上海生工生物工程服务有限公司设计、合成,引物序列及产物大小见表1。

表1 引物序列及产物大小

基因名称	引物序列	产物大小, bp
PPAR $\gamma$	正义链: 5'-CGCAGCCTCAGCCAAGAC-3'	145
	反义链: 5'-TGGGGAGAGAGGACAGATGG-3'	
PTEN	正义链: 5'-CAATGTTTCAGTGGCGGAACCTT-3'	153
	反义链: 5'-GGCAATGGCTGAGGGAACT-3'	
$\beta$ -actin	正义链: 5'-GCCAACACAGTCTGTCT-3'	108
	反义链: 5'-AGGAGCAATGATCTTGATCTT-3'	

### 1.4 细胞

大鼠近端肾小管上皮细胞株NRK-52E购自中国科学院昆明细胞库(许可证号:KCB200815YJ)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养和药物母液制备

复苏NRK-52E细胞,接种于培养瓶(25 cm<sup>2</sup>规格)中,用含有10% FBS的DMEM培养基,置于37℃、5%

CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养(以下培养条件相同)。待细胞生长达80%~90%融合时,加入胰蛋白酶消化传代,取第3~5代细胞用于试验。另取PIO、GW9662适量,分别用DMSO溶解制成PIO、GW9662母液,试验时以含血清DMEM培养基稀释(确保DMSO体积分数不超过0.1%)。

## 2.2 MTT法检测PIO对NRK-52E细胞活性的影响

将NRK-52E细胞制成密度为 $2.5 \times 10^7$ 个/L的细胞悬液,以200  $\mu$ L/孔接种于96孔板中,置于细胞培养箱中培养,待细胞生长达80%融合时,换无血清DMEM培养基将细胞静置24 h后,再换为100  $\mu$ L含2%FBS的DMEM培养基配制的不同浓度PIO培养液。根据培养液中PIO浓度的不同分为7组,即空白对照组(不含细胞或PIO,检测时调零用)、阴性对照组(含细胞但不含PIO)和不同浓度PIO组(0.1、1.0、2.5、5.0、10  $\mu$ mol/L,浓度按预试验结果设置),每组设5个复孔。细胞继续培养48 h后,每孔加入5 mg/mL的MTT溶液20  $\mu$ L,继续培养4 h,完全吸弃上清后加Formazan溶解液150  $\mu$ L,置于摇床上低速振荡10 min,充分溶解紫色结晶物甲臜(Formazan)。采用全自动酶联免疫检测仪在波长570 nm处测定各孔的吸光度(OD),OD值越大则表明细胞活性越高。

## 2.3 细胞分组与处理

根据预试验和“2.2”项下MTT法试验结果,将细胞随机分组——(1)对照组:5.5 mmol/L葡萄糖(以含2%FBS的DMEM培养基配制,下同);(2)高糖组:30 mmol/L葡萄糖;(3)PIO干预组:30 mmol/L葡萄糖+5.0  $\mu$ mol/L PIO;(4)GW9662干预组:30 mmol/L葡萄糖+5.0  $\mu$ mol/L PIO+5.0  $\mu$ mol/L GW9662。各组细胞加入相应的葡萄糖或和药物后进行培养,其中对照组、高糖组和PIO干预组均分别设6、12、24、48 h共4个时间点进行相关指标动态检测,GW9662干预组在48 h时进行相关指标检测。分别提取各组细胞的RNA和蛋白用于后续检测。试验均重复6次。

## 2.4 Real-time PCR法检测NRK-52E细胞中PPAR $\gamma$ 、PTEN mRNA的表达水平

采用TRIzol法提取各组细胞总RNA,再采用核酸蛋白分析仪检测RNA浓度和纯度后,以所提取的RNA为模板逆转录合成cDNA。采用荧光定量PCR分析系统进行检测,以“1.3”项下相应引物进行PCR反应。反应体系(25  $\mu$ L):2 $\times$ TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)12.5  $\mu$ L,灭菌水8.5  $\mu$ L,上、下游引物各1  $\mu$ L,cDNA 2  $\mu$ L。反应条件:95  $^{\circ}$ C预变性30 s;95  $^{\circ}$ C变性5 s,60  $^{\circ}$ C退火30 s,72  $^{\circ}$ C延伸1 min,重复40个循环。以 $\beta$ -actin为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组细胞中PPAR $\gamma$ 、PTEN mRNA的相对表达水平。

## 2.5 Western blotting法检测NRK-52E细胞中PPAR $\gamma$ 、PTEN、E-cadherin、 $\alpha$ -SMA、p-AKT<sup>(Thr308)</sup>蛋白的表达水平

各组细胞以RIPA强裂解液裂解后,于4  $^{\circ}$ C下以

12 000 r/min离心10 min,取上清液,采用BCA法进行蛋白浓度测定。将蛋白样品煮沸10 min使其变性后,取适量小心上样,待电泳后转移至PVDF膜上,将膜放入5%脱脂奶粉液中,于室温下温和振荡封闭1 h;以TBST缓冲液在摇床上洗涤3次后,分别加入 $\beta$ -actin、E-cadherin、 $\alpha$ -SMA、p-AKT<sup>(Thr308)</sup>抗体(稀释度均为1:400),PPAR $\gamma$ 、PTEN抗体(稀释度均为1:800)和AKT1抗体(稀释度为1:300),于4  $^{\circ}$ C下在摇床上温和振荡孵育过夜;加入相应的羊抗兔或山羊抗小鼠二抗(分别对应PPAR $\gamma$ 、p-AKT<sup>(Thr308)</sup>、PTEN、AKT1、E-cadherin一抗和 $\beta$ -actin、 $\alpha$ -SMA一抗,稀释度均为1:5 000),于室温下在摇床上温和振荡孵育1 h;以TBST缓冲液在摇床上洗膜3次,加入ECL显色剂,并在凝胶成像系统中曝光显影。采用Image Lab 5.1图像分析软件对目的蛋白条带进行灰度分析,计算其与内参( $\beta$ -actin或AKT1)灰度值的比值,以表示目的蛋白的相对表达水平。

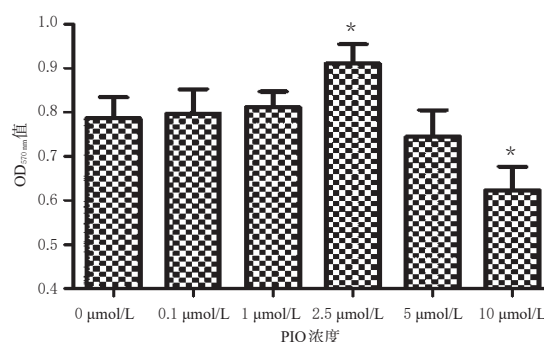
## 2.6 统计学方法

采用SPSS 20.0软件对试验数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 $t$ 检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 不同浓度PIO对NRK-52E细胞活性的影响

MTT试验结果显示,PIO 0.1~2.5  $\mu$ mol/L浓度组细胞活性与阴性对照组比较均呈升高趋势,且当PIO浓度为2.5  $\mu$ mol/L时,对细胞增殖有显著促进作用( $P < 0.05$ );PIO 5~10  $\mu$ mol/L浓度组细胞活性与阴性对照组比较均呈下降趋势,且当PIO浓度为10  $\mu$ mol/L时,其对细胞增殖有显著抑制作用( $P < 0.05$ )。这表明PIO对NRK-52E细胞活性的影响具有双相性。本次研究选择5  $\mu$ mol/L的PIO进行后续试验。不同浓度PIO对NRK-52E细胞活性的影响见图1。



注:与阴性对照组比较,\* $P < 0.05$

Note: vs. negative control group, \* $P < 0.05$

图1 不同浓度PIO对NRK-52E细胞活性的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Fig 1 Effects of PIO with different concentrations on viability of NRK-52E cells( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

### 3.2 不同条件下 NRK-52E 细胞中相应因子的 mRNA 及蛋白表达的动态变化

3.2.1 mRNA 表达的动态变化 Real-time PCR 法结果显示,随着高糖处理时间的逐渐延长,高糖组细胞中 PPAR $\gamma$ 和 PTEN mRNA 的相对表达水平均较对照组显著降低( $P<0.05$ ),且呈时间依赖趋势;与高糖组比较,PIO 干预组细胞中 PPAR $\gamma$ 、PTEN mRNA 的相对表达水平(除 6 h 外)均显著升高( $P<0.05$ ),且呈时间依赖趋势。不同条件下 NRK-52E 细胞中 PPAR $\gamma$ 、PTEN mRNA 表达水平的动态变化见表 2。

表 2 不同条件下 NRK-52E 细胞中 PPAR $\gamma$ 、PTEN mRNA 表达水平的动态变化( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Tab 2 Dynamic changes of mRNA expression of PPAR $\gamma$  and PTEN in NRK-52E cells under different conditions( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	培养时间,h	PPAR $\gamma$	PTEN
对照组	6	1.00 $\pm$ 0.06	0.98 $\pm$ 0.06
	12	1.01 $\pm$ 0.07	0.97 $\pm$ 0.03
	24	0.98 $\pm$ 0.06	0.99 $\pm$ 0.06
	48	0.99 $\pm$ 0.08	0.96 $\pm$ 0.05
高糖组	6	0.75 $\pm$ 0.08*	0.77 $\pm$ 0.04*
	12	0.62 $\pm$ 0.07*	0.60 $\pm$ 0.06*
	24	0.48 $\pm$ 0.03*	0.51 $\pm$ 0.04*
	48	0.31 $\pm$ 0.04*	0.38 $\pm$ 0.07*
PIO 干预组	6	0.92 $\pm$ 0.07	0.93 $\pm$ 0.05
	12	0.85 $\pm$ 0.05**	0.87 $\pm$ 0.05**
	24	0.70 $\pm$ 0.03**	0.73 $\pm$ 0.04**
	48	0.70 $\pm$ 0.04**	0.71 $\pm$ 0.07**

注:与对照组相同时间点比较,\* $P<0.05$ ;与高糖组相同时间点比较,\*\* $P<0.05$

Note: vs. control group at the same time point, \* $P<0.05$ ; vs. high-glucose group at the same time point, \*\* $P<0.05$

### 3.2.2 蛋白表达的动态变化 Western blotting 法结果显

示,随着高糖培养时间的逐渐延长,高糖组细胞中 PPAR $\gamma$ (除 6 h 外)、PTEN、E-cadherin 蛋白的相对表达水平均较对照组显著降低, $\alpha$ -SMA、p-AKT<sup>(Thr308)</sup>蛋白的相对表达水平均显著升高( $P<0.05$ ),且呈时间依赖趋势;与高糖组比较,PIO 干预组细胞中 PPAR $\gamma$ (除 6 h 外)、PTEN(除 6 h 外)和 E-cadherin 蛋白相对表达水平均显著升高, $\alpha$ -SMA、p-AKT<sup>(Thr308)</sup>(除 6 h 外)蛋白相对表达水平均显著降低( $P<0.05$ ),且呈时间依赖趋势。不同条件下 NRK-52E 细胞中各目的蛋白表达的电泳图见图 2,蛋白表达水平的动态变化见表 3。

### 3.3 PIO 和 PPAR $\gamma$ 拮抗剂 GW9662 对高糖条件下 NRK-52E 细胞中相应因子的 mRNA 及蛋白表达的影响

3.3.1 对 mRNA 表达的影响 Real-time PCR 法结果显示,与高糖组比较,PIO 干预组细胞中 PPAR $\gamma$ 、PTEN mRNA 的相对表达水平均显著升高( $P<0.05$ ),而 GW9662 干预组细胞中 PPAR $\gamma$ 、PTEN mRNA 相对表达水平的差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),表明 PIO 的作用效应被 PPAR $\gamma$ 拮抗剂 GW9662 阻断。PIO 和 GW9662 对高糖条件下 NRK-52E 细胞中 PPAR $\gamma$ 、PTEN mRNA 表达水平的影响见表 4。

3.3.2 对蛋白表达的影响 Western blotting 法结果显示,与高糖组比较,PIO 干预组细胞中 PPAR $\gamma$ 、PTEN 和 E-cadherin 蛋白的相对表达水平均显著升高, $\alpha$ -SMA、p-AKT<sup>(Thr308)</sup>蛋白的相对表达水平均显著降低( $P<0.05$ );而与高糖组比较,GW9662 干预组细胞中各蛋白相对表达水平的差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),表明 PPAR $\gamma$ 拮抗剂 GW9662 可以阻断 PIO 的作用效应。PIO 和 GW9662 对高糖条件下 NRK-52E 细胞中 PPAR $\gamma$ 、PTEN、E-cadherin、 $\alpha$ -SMA、p-AKT<sup>(Thr308)</sup>蛋白表达影响的电泳图

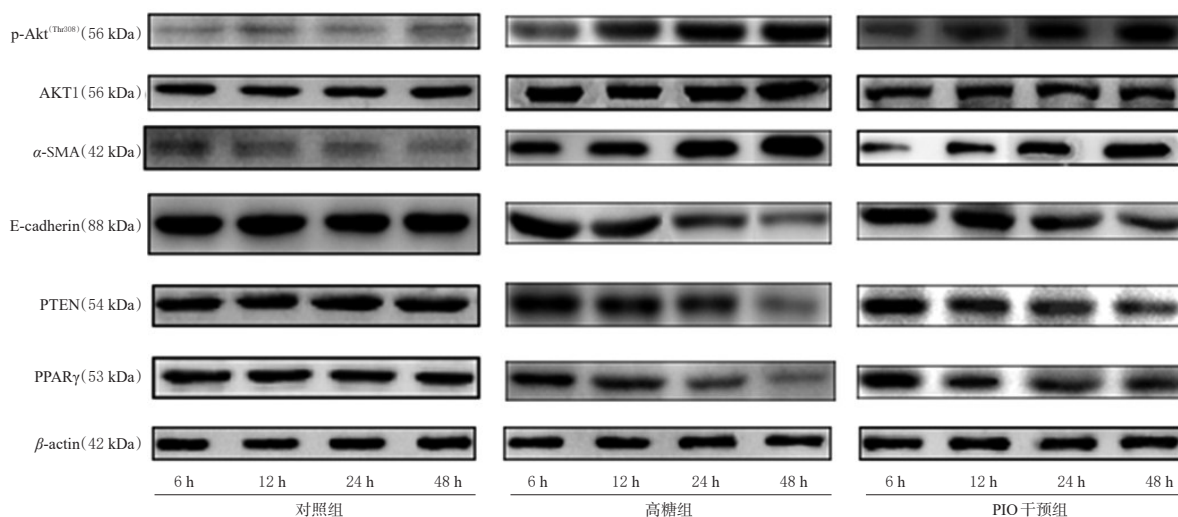


图 2 不同条件下 NRK-52E 细胞中 PPAR $\gamma$ 、PTEN、 $\alpha$ -SMA、E-cadherin 和 p-AKT<sup>(Thr308)</sup>蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electropherograms of protein expression of PPAR $\gamma$ , PTEN,  $\alpha$ -SMA, E-cadherin and p-AKT<sup>(Thr308)</sup> in NRK-52E cells under different conditions

见图3,对蛋白表达水平的影响见表5。

表3 不同条件下NRK-52E细胞中PPAR $\gamma$ 、PTEN、 $\alpha$ -SMA、E-cadherin和p-AKT<sup>(Thr308)</sup>蛋白表达水平的动态变化( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 3 Dynamic changes of protein expression of PPAR $\gamma$ , PTEN,  $\alpha$ -SMA, E-cadherin and p-AKT<sup>(Thr308)</sup> in NRK-52E cells under different conditions( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	培养时间, h	PPAR $\gamma$ / $\beta$ -actin	PTEN / $\beta$ -actin	$\alpha$ -SMA / $\beta$ -actin	E-cadherin / $\beta$ -actin	p-AKT <sup>(Thr308)</sup> / AKT1
对照组	6	1.21 $\pm$ 0.04	1.24 $\pm$ 0.05	0.16 $\pm$ 0.06	1.80 $\pm$ 0.05	0.13 $\pm$ 0.05
	12	1.22 $\pm$ 0.03	1.21 $\pm$ 0.06	0.17 $\pm$ 0.10	1.73 $\pm$ 0.06	0.13 $\pm$ 0.06
	24	1.18 $\pm$ 0.08	1.20 $\pm$ 0.05	0.15 $\pm$ 0.10	1.80 $\pm$ 0.06	0.11 $\pm$ 0.06
	48	1.23 $\pm$ 0.06	1.20 $\pm$ 0.06	0.16 $\pm$ 0.11	1.78 $\pm$ 0.07	0.12 $\pm$ 0.07
高糖组	6	1.13 $\pm$ 0.03	1.10 $\pm$ 0.04*	0.86 $\pm$ 0.04*	1.34 $\pm$ 0.06*	0.35 $\pm$ 0.07*
	12	0.91 $\pm$ 0.05*	0.99 $\pm$ 0.02*	1.19 $\pm$ 0.08*	0.95 $\pm$ 0.04*	0.60 $\pm$ 0.03*
	24	0.36 $\pm$ 0.06*	0.45 $\pm$ 0.03*	1.65 $\pm$ 0.09*	0.54 $\pm$ 0.05*	1.03 $\pm$ 0.04*
	48	0.19 $\pm$ 0.04*	0.16 $\pm$ 0.03*	2.27 $\pm$ 0.06*	0.09 $\pm$ 0.03*	1.54 $\pm$ 0.07*
PIO干预组	6	1.15 $\pm$ 0.04	1.22 $\pm$ 0.05	0.48 $\pm$ 0.08**	1.64 $\pm$ 0.08**	0.23 $\pm$ 0.07
	12	1.09 $\pm$ 0.03**	1.12 $\pm$ 0.05*	0.67 $\pm$ 0.09**	1.42 $\pm$ 0.04**	0.30 $\pm$ 0.04**
	24	0.57 $\pm$ 0.03**	0.68 $\pm$ 0.06**	0.65 $\pm$ 0.11**	1.36 $\pm$ 0.06**	0.61 $\pm$ 0.08**
	48	0.45 $\pm$ 0.06**	0.54 $\pm$ 0.04**	0.98 $\pm$ 0.11**	0.52 $\pm$ 0.04**	0.96 $\pm$ 0.08**

注:与对照组相同时间点比较, \* $P < 0.05$ ;与高糖组相同时间点比较, \*\* $P < 0.05$

Note: vs. control group at the same time point, \* $P < 0.05$ ; vs. high-glucose group at the same time point, \*\* $P < 0.05$

表4 PIO和GW9662对高糖条件下NRK-52E细胞中PPAR $\gamma$ 、PTEN mRNA表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 4 Effects of PIO and GW9662 on mRNA expression of PPAR $\gamma$  and PTEN in NRK-52E cells under high-glucose condition( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	PPAR $\gamma$	PTEN
对照组	1.02 $\pm$ 0.06	0.99 $\pm$ 0.07
高糖组	0.34 $\pm$ 0.07*	0.37 $\pm$ 0.06*
PIO干预组	0.75 $\pm$ 0.08**	0.73 $\pm$ 0.09**
GW9662干预组	0.38 $\pm$ 0.09*	0.38 $\pm$ 0.09*

注:与对照组比较, \* $P < 0.05$ ;与高糖组比较, \*\* $P < 0.05$

Note: vs. control group, \* $P < 0.05$ ; vs. high-glucose group, \*\* $P < 0.05$

#### 4 讨论

DN是糖尿病最常见的并发症,主要有肾小球硬化和肾小管间质纤维化等病理表现,但其发病机制中的很多具体环节目前尚不甚清楚。近年来研究认为,肾小管间质纤维化在DN的发生发展中具有更为重要的作用<sup>[10-11]</sup>。而已有研究表明,促进肾间质纤维化并进一步导致DN肾脏损伤的主要机制是EMT<sup>[1-2]</sup>。目前认为,上皮细胞标志物E-cadherin表达于上皮细胞中,在EMT过程中其表达减少甚至消失,而间质细胞标志物 $\alpha$ -SMA在EMT早期则表达增多<sup>[12]</sup>。PTEN是第一个被发现具有磷酸酶活性的抑癌基因,可通过负性调控PI3K/AKT信号通路而发挥抗纤维化效应<sup>[3]</sup>。本研究结果也验证了随着

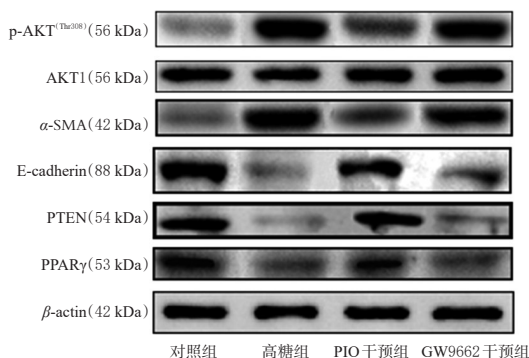


图3 PIO和GW9662对高糖条件下NRK-52E细胞中PPAR $\gamma$ 、PTEN、E-cadherin、 $\alpha$ -SMA、p-AKT<sup>(Thr308)</sup>蛋白表达影响的电泳图

Fig 3 Electropherograms of effects of PIO and GW9662 on protein expression of PPAR $\gamma$ , PTEN, E-cadherin,  $\alpha$ -SMA and p-AKT<sup>(Thr308)</sup> in NRK-52E cells under high-glucose condition

表5 PIO和GW9662对高糖条件下NRK-52E细胞中PPAR $\gamma$ 、PTEN、 $\alpha$ -SMA、E-cadherin、p-AKT<sup>(Thr308)</sup>蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 5 Effects of PIO and GW9662 on protein expression of PPAR $\gamma$ , PTEN,  $\alpha$ -SMA, E-cadherin and p-AKT<sup>(Thr308)</sup> in NRK-52E cells under high-glucose condition( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	PPAR $\gamma$ / $\beta$ -actin	PTEN / $\beta$ -actin	$\alpha$ -SMA / $\beta$ -actin	E-cadherin / $\beta$ -actin	p-AKT <sup>(Thr308)</sup> / AKT1
对照组	0.76 $\pm$ 0.05	0.98 $\pm$ 0.04	0.16 $\pm$ 0.04	1.41 $\pm$ 0.08	0.16 $\pm$ 0.08
高糖组	0.14 $\pm$ 0.02*	0.14 $\pm$ 0.05*	1.78 $\pm$ 0.09*	0.19 $\pm$ 0.08*	1.73 $\pm$ 0.13*
PIO干预组	0.58 $\pm$ 0.05**	0.77 $\pm$ 0.09**	1.03 $\pm$ 0.04**	0.85 $\pm$ 0.10**	1.01 $\pm$ 0.05**
GW9662干预组	0.15 $\pm$ 0.01*	0.14 $\pm$ 0.06*	1.76 $\pm$ 0.07*	0.21 $\pm$ 0.09*	1.76 $\pm$ 0.07*

注:与对照组比较, \* $P < 0.05$ ;与高糖组比较, \*\* $P < 0.05$

Note: vs. control group, \* $P < 0.05$ ; vs. high-glucose group, \*\* $P < 0.05$

高糖处理时间的逐渐延长,体外培养的肾小管上皮细胞NRK-52E中PPAR $\gamma$ 和PTEN的mRNA及蛋白表达水平,以及上皮细胞标志物E-cadherin的蛋白表达水平均较对照组进行性降低,而间质细胞标志物 $\alpha$ -SMA和PI3K/AKT通路因子p-AKT<sup>(Thr308)</sup>的蛋白表达水平均较正常对照组进行性升高。这提示,PI3K/AKT信号通路可以在高糖条件下被激活,同时高糖培养的NRK-52E细胞中PPAR $\gamma$ 和PTEN的表达较正常时明显降低,表明肾小管上皮细胞发生了明显的EMT。

噻唑烷二酮类药物是PPAR $\gamma$ 的选择性激动剂,有研究发现,其抗肾脏纤维化病变的机制是通过活化PPAR $\gamma$ 而实现的<sup>[9]</sup>。研究表明,PPAR $\gamma$ 对PTEN表达进行调控的机制可能是其可以与位于PTEN上游的2个反应元件直接结合<sup>[6-7]</sup>。然而,噻唑烷二酮类药物是否通过活化PPAR $\gamma$ 而具有上调高糖诱导的NRK-52E细胞中PTEN表达的功能,从而发挥抗EMT的作用,尚未有研究阐明。本研究选用噻唑烷二酮类抗糖尿病药物PIO,通过

MTT检测显示,PIO对NRK-52E细胞增殖的影响具有双相性,浓度为2 μmol/L时能促进细胞增殖,10 μmol/L时则抑制细胞增殖。本次试验选择5 μmol/L浓度的PIO,该浓度既可对NRK-52E细胞产生一定抑制作用,又对细胞增殖无明显影响。

本研究结果显示,PIO干预组细胞在不同作用时间(除少数时间点外)下,其PPAR $\gamma$ 、PTEN mRNA及蛋白表达水平均较高糖组显著升高, $\alpha$ -SMA和p-AKT<sup>(Thr308)</sup>蛋白表达水平均较高糖组显著降低,上皮细胞标志物E-cadherin蛋白表达水平较高糖组显著升高,且呈时间依赖趋势。这提示,PIO可一定程度地激活PPAR $\gamma$ 、上调PTEN并抑制PI3K/AKT信号通路的过度激活,从而表现出抑制NRK-52E细胞EMT发生和进展的作用。

为了进一步确定PIO是否通过PPAR $\gamma$ 途径上调PTEN来发挥抑制EMT的作用,笔者应用PPAR $\gamma$ 特异性拮抗剂GW9662进行反向验证。GW9662能不可逆性地与PPAR $\gamma$ 的285位半胱氨酸位点共价结合,有体外细胞试验已证实,1~10 μmol/L的GW9662具有特异性拮抗PPAR $\gamma$ 活化的功能<sup>[13]</sup>。因此,选择GW9662作为验证药物来确定PIO是否通过PPAR $\gamma$ 依赖性途径对PTEN的表达产生影响。本研究结果显示,与高糖组比较,PIO确能使PPAR $\gamma$ 和PTEN mRNA及蛋白的表达水平以及E-cadherin蛋白的表达水平明显升高,使 $\alpha$ -SMA、p-AKT<sup>(Thr308)</sup>蛋白的表达水平明显降低;而加入PPAR $\gamma$ 特异性拮抗剂GW9662干预后,PPAR $\gamma$ 、PTEN mRNA及蛋白的表达水平以及其余各蛋白的表达水平与高糖组均无显著性差异,即GW9662阻断了PIO对NRK-52E细胞的上述所有保护性作用。这进一步明确了PIO是通过PPAR $\gamma$ /PTEN/PI3K/AKT通路来发挥对NRK-52E细胞发生EMT的抑制作用。

综上,在高糖条件下PIO可能是通过激活PPAR $\gamma$ 而实现对PTEN表达的调控,使PI3K/AKT信号通路受到抑制,进而抑制肾小管上皮细胞EMT的发生。本研究结果可为明确DN的发病机制以及寻找DN防治的有效药物提供理论依据。

## 参考文献

[1] LOEFFLER I, WOLF G. Epithelial-to-mesenchymal transition in diabetic nephropathy: fact or fiction? [J]. *Cells*, 2015,4(4):631-652.  
[2] 周星丞,张帆,严瑞,等. SAA1在狼疮小鼠肾脏中的表达及其对小鼠肾小管上皮细胞EMT的作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2019,35(21):2561-2565,2575.

[3] LI L, ZHU X, SHOU T, et al. MicroRNA-28 promote cell proliferation and invasion in gastric cancer via the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 17(3):4003-4010.  
[4] 王圆圆,刘瑞霞,郭兵,等.大鼠肾组织PETN表达下调在糖尿病肾病发展中的作用[J]. *生理学报*, 2011,63(4):325-332.  
[5] 李霜,王圆圆,郭兵,等.控制血糖对糖尿病大鼠肾PTEN表达及纤维化病变的影响[J]. *贵阳医学院学报*, 2012,37(1):14-19.  
[6] LIU YW, DAI B, XU CG, et al. Rosiglitazone inhibits transforming growth factor- $\beta_1$  mediated fibrogenesis in ADPKD cyst-lining epithelial cells[J]. *PLoS One*, 2011. DOI:10.1371/journal.pone.0028915.  
[7] ZAMBRANO S, BLANCA AJ, RUIZ-ARMENTA MV, et al. L-carnitine attenuates the development of kidney fibrosis in hypertensive rats by upregulating PPAR- $\gamma$  [J]. *Amer J Hypertens*, 2014,27(3):460-470.  
[8] BONOFIOLIO D, GABRIELE S, AQUILA S, et al. Estrogen receptor alpha binds to peroxisome proliferator-activated receptor response element and negatively interferes with peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling in breast cancer cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 17(11):6139-6147.  
[9] FANG HQ, FANG WT, CAO HW, et al. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate induce apoptosis via the PPAR $\gamma$ /PTEN/AKT pathway in differentiated human embryonic stem cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2019. DOI: 10.1016/j.fct.2019.05.060.  
[10] 彭君,彭家清,秦鹏,等. miR-27a-3p靶向SnoN抑制高糖诱导的人近端肾小管上皮细胞EMT的作用[J]. *免疫学杂志*, 2020,36(1):45-51.  
[11] 孙小鸿,黄凯鹏,黄河清. Connexin43通过SIRT1-HIF1- $\alpha$ 通路改善糖尿病肾小管间质纤维化的研究[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2019,33(9):718.  
[12] LAMOUILLE S, XU J, DERYNCK R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014,15(3):178-196.  
[13] LEESNITZER LM, PARKS DJ, BLEDSOE RK, et al. Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferators activated receptors by GW9662[J]. *Biochemistry*, 2002,41(21):6640-6650.

(收稿日期:2020-02-13 修回日期:2020-06-28)

(编辑:段思怡)