

二甲双胍对高糖诱导的肾小管上皮细胞 TGF- β /ERK/MMP-9 通路及上皮间质转化的影响

常毅娜, 宋白利, 张文博, 付留俊

河南科技大学第一附属医院 内分泌科, 河南 洛阳 471000

摘要: 目的 探讨二甲双胍对高糖诱导的肾小管上皮 HK-2 细胞上皮间质转化 (EMT) 的影响及其机制。方法 以 0、7.5、15.0、30.0、60.0、120.0 mmol/L 二甲双胍作用 48 h 后, 采用噻唑蓝 (MTT) 法检测 HK-2 细胞活力以筛选合适的二甲双胍作用浓度; 将体外培养的 HK-2 细胞分为对照组 (5.5 mmol/L D-葡萄糖)、高渗组 (24.5 mmol/L 甘露醇和 5.5 mmol/L D-葡萄糖)、高糖组 (30 mmol/L D-葡萄糖)、高糖+7.5 mmol/L 二甲双胍组 (30 mmol/L D-葡萄糖+7.5 mmol/L 二甲双胍) 和高糖+15 mmol/L 二甲双胍组 (30 mmol/L D-葡萄糖+15 mmol/L 二甲双胍), 倒置显微镜观察各组 HK-2 细胞形态, 免疫印迹法 (Western blotting) 检测各组 HK-2 细胞中 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、E-钙黏附蛋白 (E-cadherin)、转化生长因子- β (TGF- β)、细胞外信号调节激酶 (ERK)、磷酸化 (p)-ERK、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 蛋白表达水平, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 α -SMA、E-cadherin、TGF- β 、ERK、MMP-9 mRNA 表达水平。结果 与对照组相比, 30.0、60.0 mmol/L 二甲双胍作用后 HK-2 细胞活力明显升高, 120.0 mmol/L 二甲双胍作用后 HK-2 细胞活力明显降低 ($P<0.05$), 而 7.5、15.0 mmol/L 二甲双胍作用后 HK-2 细胞活力差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与对照组比较, 高渗组细胞形态无明显改变, 且细胞中 α -SMA、E-cadherin、TGF- β 、MMP-9 蛋白和 mRNA 表达水平以及 p-ERK/ERK 蛋白、ERK mRNA 表达水平差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 但高糖组细胞失去原有形态变为长梭形, 且细胞中 α -SMA、TGF- β 蛋白和 mRNA 表达水平以及 p-ERK/ERK 蛋白、ERK mRNA 表达水平明显升高, 而 MMP-9、E-cadherin 蛋白和 mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.05$); 与高糖组比较, 高糖+7.5 mmol/L 二甲双胍组、高糖+15.0 mmol/L 二甲双胍组细胞形态由长梭形逐渐变成圆形或椭圆形, 且 α -SMA、TGF- β 蛋白和 mRNA 表达水平以及 p-ERK/ERK 蛋白、ERK mRNA 表达水平明显降低, 而 MMP-9、E-cadherin 蛋白和 mRNA 表达水平明显升高 ($P<0.05$), 且高糖+15.0 mmol/L 二甲双胍组细胞上述指标变化幅度大于高糖+7.5 mmol/L 二甲双胍组。结论 二甲双胍可抑制高糖诱导的肾小管上皮 HK-2 细胞 EMT, 其作用机制可能与抑制 TGF- β /ERK/MMP-9 通路活化有关。

关键词: 肾小管上皮细胞; 高糖; 二甲双胍; 上皮间质转化; 转化生长因子- β /细胞外信号调节激酶/基质金属蛋白酶 9 通路

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2021)04-0659-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.04.004

Effects of metformin on TGF- β /ERK/MMP-9 pathway and epithelial mesenchymal transition induced by high glucose in renal tubular epithelial cells

CHANG Yi-na, SONG Bai-li, ZHANG Wen-bo, FU Liu-jun

Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of metformin on high glucose-induced epithelial mesenchymal transition (EMT) in HK-2 cells in renal tubular epithelium. **Methods** After treated with 0, 7.5, 15.0, 30.0, 60.0 and 120.0 mmol/L metformin for 48 h, the viability of HK-2 cells was detected by MTT method to select the appropriate concentration of metformin. HK-2 cells cultured *in vitro* were divided into control group (5.5 mmol/L D-glucose), hypertonic group (24.5 mmol/L mannitol and 5.5 mmol/L D-glucose), high glucose group (30 mmol/L D-glucose), high glucose + 7.5 mmol/L metformin group (30 mmol/L D-glucose + 7.5 mmol/L metformin) and high glucose + 15.0 mmol/L metformin group (30 mmol/L D-glucose + 15.0 mmol/L metformin). The morphology of HK-2 cells was observed under inverted microscope. Western blotting method was used to detect the protein expression levels of α -smooth muscle actin (α -SMA), E-cadherin, transforming growth factor- β (TGF- β), extracellular signal regulated kinase (ERK), phosphorylation

收稿日期: 2020-09-01

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目 (2018020300)

作者简介: 常毅娜 (1985—), 女, 硕士研究生, 主治医师, 从事糖尿病并发症与肥胖、肾上腺疾病研究。E-mail: cyh680610@163.com

(p)-ERK and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in HK-2 cells, and real time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the mRNA expression levels of α -SMA, E-cadherin, TGF- β , ERK and MMP-9. **Results** Compared with 0 mmol/L, 30 and 60 mmol/L metformin increased the viability of HK-2 cells significantly. After treated with 120.0 mmol/L metformin, the viability of HK-2 cells decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with those in the control group, there was no significant difference in HK-2 cell viability between the treat of 7.5 mmol/L and 15.0 mmol/L metformin ($P > 0.05$). Compared with those in the control group, there was no significant change in cell morphology in the hypertonic group, the expression levels of α -SMA, E-cadherin, TGF- β and MMP-9 protein and mRNA, and p-ERK/ERK protein and ERK mRNA were not significantly different ($P > 0.05$). However, the cells in high glucose group lost their original shape and became long spindle shape, the expression levels of α -SMA and TGF- β protein and mRNA, p-ERK/ERK protein and ERK mRNA were significantly higher, and the expression levels of MMP-9 and E-cadherin protein and mRNA were significantly lower ($P < 0.05$). Compared with those in high glucose group, the morphology of cells in high glucose + 7.5 mmol/L metformin group and high glucose + 15.0 mmol/L metformin group gradually changed from long spindle shape to round or oval shape, the expression levels of α -SMA and TGF- β protein and mRNA, p-ERK/ERK protein and ERK mRNA were significantly lower, the expression levels of MMP-9 and E-cadherin protein and mRNA were significantly higher ($P < 0.05$). The changes of the above indexes in high glucose + 15.0 mmol/L metformin group were greater than those in high glucose + 7.5 mmol/L metformin group. **Conclusion** Metformin can inhibit high glucose-induced EMT in HK-2 cells in renal tubular epithelium, which may be related to the inhibition of TGF- β /ERK/MMP-9 pathway activation.

Key words: renal tubular epithelial cells; high glucose; metformin; epithelial mesenchymal transition; transforming growth factor- β /extracellular signal regulated kinase/matrix metalloproteinase-9 pathway

糖尿病是影响全世界的公共卫生问题,而作为其最常见的微血管并发症糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)亦备受关注^[1]。肾间质纤维化是DN引发终末期肾衰竭的主要病理基础,而肾小管上皮细胞上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)是促进肾间质纤维化的重要机制^[2-4]。二甲双胍是一种双胍类口服降血糖药,具有降血糖、抗炎、抗肿瘤和延缓衰老等广泛的药理活性^[5-6]。有研究指出,二甲双胍可通过抑制不规则趋化因子蛋白的分泌保护高糖环境下人肾小管上皮 HK-2 细胞增殖^[7];然而,二甲双胍对高糖环境下 HK-2 细胞 EMT 的影响并不清楚。本研究通过体外实验观察二甲双胍对高糖诱导的 HK-2 细胞 EMT 的影响并分析其可能的作用机制,以期对二甲双胍治疗 DN 提供新的理论和实验依据。

1 材料

人肾小管上皮细胞株 HK-2 (货号: FS-X0109) 购于上海抚生实业有限公司; 低糖 DMEM 培养基 (货号: E600008)、胎牛血清 (货号: E510008)、青霉素/链霉素 (货号: B540732)、D-葡萄糖 (货号: A600219)、放射免疫沉淀法 (RIPA) 裂解液 (货号: C500007) 购于上海生工生物工程股份有限公司; 盐酸二甲双胍片 (规格 0.25 g, 生产批号: 190825) 购于常州制药厂有限公司; 噻唑蓝 (MTT) 试剂盒 (货号: M1020)、总 RNA 提取试剂盒 (货号: R1200) 购于北京索莱宝生物公司; 实时荧光定量 PCR

(qRT-PCR) 试剂盒 (货号: KGA1339) 购于南京凯基生物科技发展有限公司; β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (货号: ab179467)、细胞外信号调节激酶 (ERK) 抗体 (货号: ab184699)、磷酸化 (p)-ERK 抗体 (货号: ab17942) 和基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 抗体 (货号: ab137867) 购于美国 Abcam 公司; α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 抗体 (货号: 19245)、转化生长因子- β (TGF- β) 抗体 (货号: 3711)、E-钙黏附蛋白 (E-cadherin) 抗体 (货号: 14472) 购于美国 Cell Signaling Technology 公司; CKX53 倒置显微镜 (日本 Olympus); CFX96 Touch 荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); WD-9413A 凝胶成像分析系统 (北京六一生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

使用含 100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素双抗和 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 完全培养基在 80% 相对湿度、5% CO₂、37 °C 恒温培养箱内常规培养 HK-2 细胞。

2.2 MTT 实验筛选二甲双胍对 HK-2 细胞活力无影响的浓度

在 96 孔板上以每孔 1×10^5 个接种长势良好的对数生长期 HK-2 细胞, 正常培养贴壁后, 加入 0、7.5、15.0、30.0、60.0、120.0 mmol/L 二甲双胍 [以二甲基亚砜 (DMSO) 溶解] 孵育 24 h; 吸去上清

液, 加入 10 μ L MTT 试剂孵育 4 h 后, 加入二甲亚砜 100 μ L; 震荡至 MTT 结晶充分溶解后, 使用酶标仪检测 HK-2 细胞吸光度 (A) 值。每个处理设置 3 个复孔; 实验重复 3 次。

2.3 实验分组及处理

实验分为 5 组, 分别为对照组: 以含 5.5 mmol/L D-葡萄糖的培养基培养 48 h; 高渗组: 以含 24.5 mmol/L 甘露醇和 5.5 mmol/L D-葡萄糖的培养基培养 48 h; 高糖组: 以含 30 mmol/L D-葡萄糖的培养基培养 48 h; 高糖+7.5 mmol/L 二甲双胍组: 以含 30 mmol/L D-葡萄糖和 7.5 mmol/L 二甲双胍的培养基培养 48 h; 高糖+15 mmol/L 二甲双胍组: 以含 30 mmol/L D-葡萄糖和 15 mmol/L 二甲双胍的培养基培养 48 h。

2.4 倒置显微镜观察 HK-2 细胞形态

待 HK-2 细胞按照“2.3”项中的分组并同法处理结束后, 采用倒置显微镜观察各组 HK-2 细胞的形态变化。

2.5 免疫印迹法 (Western blotting) 检测 HK-2 细胞中 α -SMA、E-cadherin、TGF- β 、ERK、p-ERK 和 MMP-9 蛋白表达水平

收集“2.3”项处理结束后的各组细胞, 采用 0.25%胰蛋白酶消化, 加入 RIPA 裂解液抽提总蛋白后, 考马斯亮蓝法对总蛋白进行定量。将蛋白样品与等体积上样缓冲液混匀后, 沸水浴中变性 5 min; 按照每泳道 60 μ g 蛋白样品行 12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 转至聚偏氟乙烯膜上; 置于 5%脱脂奶粉中封闭 2 h, 加入 β -actin (1:2 000)、 α -SMA (1:1 000)、E-cadherin (1:1 000)、TGF- β (1:2 000)、ERK (1:2 000)、p-ERK (1:2 000) 和 MMP-9 (1:2 000) 特异性一抗于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 次日, 再以辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:5 000) 于室温下孵育 2 h 后, 发光剂显影; 使用图像分析软件 Quantity One 4.6 分析各组 HK-2 细胞中 α -SMA、E-cadherin、TGF- β 、ERK、MMP-9 蛋白表达水平, 以 β -actin 为内参进行校正。其中, 每个处理设置 3 个复孔; 实验重复 3 次。

2.6 qRT-PCR 法检测 HK-2 细胞中 α -SMA、E-cadherin、TGF- β 、ERK、MMP-9 mRNA 表达水平

收集“2.3”项处理结束后的各组细胞, 采用 0.25%胰蛋白酶消化, 参照总 RNA 提取试剂盒说明

书提取细胞总 RNA; 分光光度计检测总 RNA 浓度后, 逆转录合成 cDNA; 参照 qRT-PCR 试剂盒说明书根据上海生工生物工程股份有限公司合成的 PCR 引物 (表 1) 在 20 μ L 反应体系下进行 PCR 扩增; 扩增参数为: 95 $^{\circ}$ C、4 min; 95 $^{\circ}$ C、15 s、52~60 $^{\circ}$ C、30 s、72 $^{\circ}$ C、30 s, 共 40 个循环。以 β -actin 为内参, α -SMA、E-cadherin、TGF- β 、ERK、MMP-9 mRNA 相对水平以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。其中, 每个处理设置 3 个复孔; 实验重复 3 次。

表 1 qRT-PCR 扩增引物序列
Table 1 Primer sequence of qRT-PCR

基因	引物序列
α -SMA	F:5'-GGGAATGG GACAAAAAGACA-3' R:5'-CTTCAGGGGCAACACGAA-3'
E-cadherin	F:5'-ACCCCCTGTTGGTGTCTTT-3' R:5'-TTCGGGCTTGTGTCAATCT-3'
TGF- β	F:5'-ACTACG CCAAAGAAGTCACCC-3' R:5'-AAGCCCTGTATTCCGTCTCC-3'
ERK	F:5'-TACACCAACCTCTCGTACATCG-3' R:5'-CATGTCTGAAGCGCAGTAAGATT-3'
MMP-9	F:5'-GCCACTACTGTGCCTTTGAGTC-3' R:5'-CCCTCAGAGAATCGCCAGTACT-3'
β -actin	F:5'-CACCATGAAGATCAAGATCATTGC-3' R:5'-GGCCGGACTCATCGTACTCCTGC-3'

2.7 数据处理分析

实验结果中细胞活力和 α -SMA、E-cadherin、TGF- β 、ERK、MMP-9 mRNA 及蛋白表达水平均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 多组间比较行单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK-q 检验。P<0.05 代表差异有统计学意义。

3 结果

3.1 二甲双胍对 HK-2 细胞活力的影响

MTT 实验结果显示, 与对照组 (0 mmol/L) 相比, 7.5、15.0 mmol/L 二甲双胍作用后 HK-2 细胞活力差异无统计学意义 (P>0.05), 但 30.0、60.0 mmol/L 二甲双胍作用后 HK-2 细胞活力明显升高, 而 120.0 mmol/L 二甲双胍作用后 HK-2 细胞活力明显降低 (P<0.05)。为了探讨二甲双胍对高糖诱导的 HK-2 细胞上皮间质转化的影响, 故后续选择对 HK-2 细胞活力无影响的 7.5、15.0 mmol/L 二甲双胍进行实验。见表 2。

表 2 不同浓度二甲双胍作用后 HK-2 细胞活力的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Table 2 Changes of HK-2 cell activity after metformin treatment at different concentrations ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	C/(mmol·L ⁻¹)	A 值
对照	0	0.25±0.02
二甲双胍	7.5	0.24±0.02
	15	0.26±0.03
	30	0.32±0.03*
	60	0.31±0.03*
	120	0.19±0.02*

与对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group

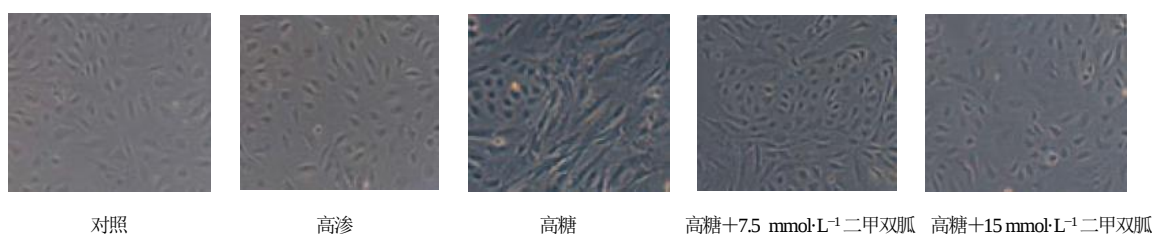


图 1 倒置显微镜观察 HK-2 细胞形态 (×200)

Fig.1 The morphology of HK-2 cells was observed by inverted microscope (× 200)

高渗组细胞中 α -SMA、E-cadherin、TGF- β 、p-ERK/ERK、MMP-9 蛋白表达水平差异均无统计学意义; 但高糖组细胞中 α -SMA、TGF- β 和 p-ERK/ERK 蛋白表达水平明显高于对照组, 而 MMP-9 和 E-cadherin 蛋白表达水平明显低于对照组 ($P<0.05$); 与高糖组比较, 高糖+7.5 mmol/L 二甲双胍组和高糖+15 mmol/L 二甲双胍组细胞中 α -SMA、TGF- β 和 p-ERK/ERK 蛋白表达明显降低, 而 MMP-9 和 E-cadherin 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$), 且高糖+15 二甲双胍组细胞中上述指标变化更为明显。见图 2 和表 3。

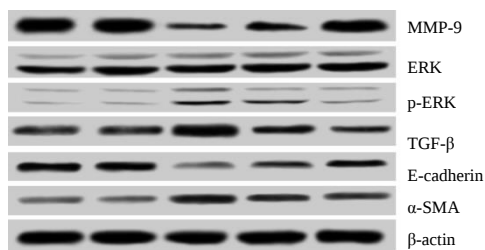


图 2 Western blotting 检测 HK-2 细胞中 α -SMA、E-cadherin、TGF- β 、ERK、p-ERK 和 MMP-9 蛋白表达

Fig. 2 The expressions of α -SMA, E-cadherin, TGF- β , ERK, p-ERK and MMP-9 in HK-2 cells were detected by Western blotting

3.2 二甲双胍对高糖诱导的 HK-2 细胞形态的影响

倒置显微镜观察结果显示, 对照组和高渗组细胞均呈圆形或椭圆形, 两组之间细胞形态未见明显差异; 与对照组比较, 高糖组细胞失去原有形态变为长梭形; 与高糖组比较, 高糖+7.5 mmol/L 二甲双胍组、高糖+15 mmol/L 二甲双胍组细胞由长梭形逐渐变成圆形或椭圆形, 且高糖+15 mmol/L 二甲双胍组细胞变化最为明显。见图 1。

3.3 二甲双胍对高糖诱导的 HK-2 细胞中 α -SMA、E-cadherin、TGF- β 、ERK、p-ERK、MMP-9 蛋白表达水平的影响

Western blotting 检测结果显示, 与对照组比较,

3.4 二甲双胍对高糖诱导的 HK-2 细胞中 α -SMA、E-cadherin、TGF- β 、ERK 和 MMP-9 mRNA 表达水平的影响

与对照组相比, 高渗组细胞中 α -SMA、E-cadherin、TGF- β 、ERK 和 MMP-9 mRNA 表达水平差异无统计学意义, 但高糖组细胞中 α -SMA、TGF- β 和 ERK mRNA 表达水平明显升高, 而 MMP-9 和 E-cadherin mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.05$); 与高糖组相比, 高糖+7.5 mmol/L 二甲双胍组、高糖+15 mmol/L 二甲双胍组细胞中 α -SMA、TGF- β 和 ERK mRNA 表达水平明显降低, 而 MMP-9 和 E-cadherin mRNA 表达水平明显升高 ($P<0.05$), 且高糖+15 mmol/L 二甲双胍组细胞中上述指标的变化幅度明显大于高糖+7.5 mmol/L 二甲双胍组。见表 4。

4 讨论

EMT 是一种上皮细胞转化为间质细胞的生物学过程, 在胚胎发育、器官纤维化和肿瘤形成等过程中发挥着重要作用^[8]。EMT 是肾间质纤维化发生的中心环节, 肾小管上皮细胞是肾间质肌成纤维细胞的重要来源, 在一定条件刺激下, 可通过发生 EMT 获得肌成纤维细胞特性, 即上皮标志蛋白

表 3 各组 HK-2 细胞中 α -SMA、E-cadherin、TGF- β 、ERK、p-ERK、MMP-9 蛋白表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)Table 3 Comparison of protein expression of α -SMA, E-cadherin, TGF- β , ERK, p-ERK and MMP-9 in HK-2 cells in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	α -SMA	E-cadherin	TGF- β	p-ERK/ERK	MMP-9
对照	0.25 $\pm$ 0.03	0.71 $\pm$ 0.05	0.41 $\pm$ 0.03	0.13 $\pm$ 0.02	1.26 $\pm$ 0.12
高渗	0.23 $\pm$ 0.03	0.68 $\pm$ 0.04	0.43 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.03	1.30 $\pm$ 0.15
高糖	0.56 $\pm$ 0.04*	0.24 $\pm$ 0.02*	0.94 $\pm$ 0.06*	0.45 $\pm$ 0.03*	0.35 $\pm$ 0.03*
高糖+7.5 mmol·L ⁻¹ 二甲双胍	0.43 $\pm$ 0.03 [#]	0.36 $\pm$ 0.03 [#]	0.66 $\pm$ 0.04 [#]	0.30 $\pm$ 0.03 [#]	0.54 $\pm$ 0.03 [#]
高糖+15.0 mmol·L ⁻¹ 二甲双胍	0.32 $\pm$ 0.02 [#]	0.45 $\pm$ 0.03 [#]	0.42 $\pm$ 0.03 [#]	0.18 $\pm$ 0.02 [#]	0.89 $\pm$ 0.06 [#]

与对照组比较: * $P<0.05$; 与高糖组比较: $^{\#}P<0.05$ * $P<0.05$ vs control group; $^{\#}P<0.05$ vs high glucose group表 4 各组 HK-2 细胞中 α -SMA、E-cadherin、TGF- β 、ERK、MMP-9 mRNA 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)Table 4 Comparison of the mRNA expression levels of α -SMA, E-cadherin, TGF- β , ERK and MMP-9 in each group of cells ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	α -SMA	E-cadherin	TGF- β	ERK	MMP-9
对照	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
高渗	0.96 $\pm$ 0.06	1.01 $\pm$ 0.06	0.98 $\pm$ 0.06	1.02 $\pm$ 0.09	0.95 $\pm$ 0.06
高糖	3.35 $\pm$ 0.21*	0.53 $\pm$ 0.03*	4.26 $\pm$ 0.32*	2.76 $\pm$ 0.18*	0.48 $\pm$ 0.03*
高糖+7.5 mmol·L ⁻¹ 二甲双胍	2.80 $\pm$ 0.16 [#]	0.64 $\pm$ 0.03 [#]	3.67 $\pm$ 0.21 [#]	2.15 $\pm$ 0.10 [#]	0.56 $\pm$ 0.04 [#]
高糖+15.0 mmol·L ⁻¹ 二甲双胍	1.96 $\pm$ 0.12 [#]	0.72 $\pm$ 0.05 [#]	2.85 $\pm$ 0.16 [#]	1.68 $\pm$ 0.12 [#]	0.68 $\pm$ 0.04 [#]

与对照组比较: * $P<0.05$; 与高糖组比较: $^{\#}P<0.05$ * $P<0.05$ vs control group; $^{\#}P<0.05$ vs high glucose group

E-cadherin 表达减少而间充质细胞标志蛋白 α -SMA 表达增多等; 而肌成纤维细胞具有肌细胞和成纤维细胞的特性, 能够分泌大量的细胞外基质, 促进肾间质纤维化的发生^[9]。高血糖是 DN 肾间质纤维化的重要因素, 具有诱导肾小管上皮细胞 EMT 的作用^[10]。本研究以 30 mmol/L D-葡萄糖刺激后发现, 人肾小管上皮 HK-2 细胞由原有的圆形或椭圆形变为长梭形的成纤维细胞样形态, 同时 HK-2 细胞中 α -SMA 蛋白和 mRNA 表达水平明显升高, 而 E-cadherin 蛋白和 mRNA 表达水平明显降低。结果表明, 高糖可诱导 HK-2 细胞 EMT 的发生。

TGF- β 是细胞内一种重要的转化生长因子, 可通过诱导 EMT 促进肾间质纤维化的发生^[11]; ERK 是丝裂原活化蛋白激酶家族的成员, 可通过调控下游转录因子及蛋白的表达促进细胞外基质合成, 加速肾间质纤维化^[12]; MMP-9 是基质金属蛋白酶家族成员, 具有降解细胞外基质 IV 型胶原的作用, 与肾间质纤维化的发生密切相关^[13]。在梗阻性肾病研究中发现, TGF- β /ERK 通路活化可通过上调 Notch3 表达促进肾小管间质纤维化^[14]; 在与肾间质

纤维化有关的肾衰竭研究中发现, 肾康注射液可通过抑制 ERK 通路活化上调 MMP-9 表达促进细胞外基质降解^[15]。本研究以 30 mmol/L D-葡萄糖刺激后发现, HK-2 细胞中 TGF- β mRNA 和蛋白表达水平及 p-ERK/ERK 蛋白、ERK mRNA 表达水平明显升高, 而 MMP-9 mRNA 和蛋白表达水平明显降低。结果表明, 高糖可调控 HK-2 细胞中 TGF- β /ERK/MMP-9 通路活化。提示, TGF- β /ERK/MMP-9 通路活化可能是高糖诱导 HK-2 细胞 EMT 发生的重要机制。

二甲双胍是一种治疗糖尿病的常用药, 可通过增加胰岛素敏感性抑制葡萄糖的产生而发挥降糖作用^[16]; 此外, 二甲双胍还可通过抑制 TGF- β 信号通路减轻吉非替尼诱导的肺纤维化^[17]。本研究以对 HK-2 细胞活性无影响的 7.5、15.0 mmol/L 二甲双胍作用后发现, 高糖刺激所致的 α -SMA 蛋白、mRNA 表达水平上调和 E-cadherin 蛋白、mRNA 表达水平下调以及细胞形态变化均明显恢复。结果表明, 二甲双胍可抑制高糖诱导的人肾小管上皮细胞 EMT。该结果与 Guan 等^[18]研究所得出的二甲双胍通过抑制 Egr-1 表达改善大鼠肾小管上皮 NRK-52E 细胞

EMT的结果相似。有研究指出,二甲双胍可通过抑制TGF- β 表达减轻肾脏缺血再灌注损伤引起的肾脏间质纤维化^[19];可通过抑制TGF- β /ERK途径减轻人肾小管上皮细胞纤维化^[20];同时,二甲双胍还可上调MMP-9表达水平改善糖尿病大鼠肾细胞外基质代谢减轻肾间质纤维化^[21]。本研究进一步检测发现,二甲双胍处理后可明显逆转高糖对HK-2细胞中TGF- β 及ERK、MMP-9 mRNA和蛋白的调控作用。结果表明,二甲双胍可抑制高糖环境下HK-2细胞中TGF- β /ERK/MMP-9通路活化。这提示,二甲双胍抑制人肾小管上皮细胞EMT可能是通过抑制TGF- β /ERK/MMP-9通路活化来实现的。

本研究结果表明二甲双胍可抑制高糖诱导的肾小管上皮HK-2细胞EMT,其作用机制可能与抑制TGF- β /ERK/MMP-9通路活化有关。本研究仅从细胞水平上阐述了二甲双胍抑制肾小管上皮细胞EMT的作用及可能机制,下一步将通过体内动物实验进一步验证,以期二甲双胍治疗DN提供新线索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 丁小强,朱加明. 糖尿病肾病诊治的研究进展、存在问题与展望[J]. 上海医学, 2018, 41(2): 73-77.
- [2] Menon M C, Ross M J. Epithelial-to-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in renal fibrosis: a new twist on an old tale [J]. *Kidney Int*, 2016, 89(2): 263-266.
- [3] Chen Z, Dong F, Lu J, et al. Polarized M2c macrophages have a promoting effect on the epithelial-to-mesenchymal transition of human renal tubular epithelial cells [J]. *Immunobiology*, 2018, 223(12): 826-833.
- [4] Chen X, Yang Y, Liu C, et al. Astragaloside IV ameliorates high glucose-induced renal tubular epithelial-mesenchymal transition by blocking mTORC1/p70S6K signaling in HK-2 cells [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(2): 709-716.
- [5] 邓丽丽,赵晓彤,陈明卫. 二甲双胍降糖外作用的最新研究进展[J]. 中国综合临床, 2019, 35(6): 572-576.
- [6] 谭晓勇,吴邦财,刘利权,等. 二甲双胍抗膀胱癌药理机制的研究进展[J]. 药物评价研究, 2019, 42(9): 1886-1890.
- [7] 乔青燕,金惠敏,顾燕红,等. 二甲双胍对高糖环境下人肾小管上皮细胞的保护机制[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(22): 3328-3329.
- [8] 依超,温海滨,覃勋,等. 三七皂苷R1对高糖诱导HK-2细胞转分化的作用及其机制研究[J]. 广西医科大学学报, 2018, 35(3): 311-314.
- [9] 黄虹,江纓,袁放,等. 大蒜素对高糖诱导人肾小管上皮细胞转分化的影响[J]. 医学研究杂志, 2016, 45(6): 74-78.
- [10] 李进冬,李亚丰,魏鹏翔,等. 西格列汀对高糖诱导肾小管上皮细胞转分化的影响[J]. 徐州医学院学报, 2017, 37(3): 154-157.
- [11] 孙雪,梅峰. TGF- β /Smad信号通路诱导肾上皮细胞间充质转化机制的研究进展[J]. 山东医药, 2017, 57(30): 102-104.
- [12] Zhao J R, Xu S S, Dong Q, et al. The role of the ERK Signaling pathway on high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition in cultured human renal tubular epithelial cells [J]. *J Biomater Tissue Eng*, 2018, 8(3): 405-409.
- [13] 生士凤,苟蓉,陈军童,等. 缺氧诱导因子1 α -肾损伤分子1信号通路对高糖环境下人肾小管上皮细胞细胞外基质降解的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2016, 32(2): 126-131.
- [14] Mei H, Jin Z, Hui X, et al. The TGF β -ERK pathway contributes to Notch3 upregulation in the renal tubular epithelial cells of patients with obstructive nephropathy [J]. *Cell Signal*, 2018 51(1): 139-151.
- [15] 杨晶晶. 肾康注射液调控ERK1/2/MMPs信号通路促进肾衰竭模型鼠细胞外基质降解的作用和机制[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(20): 3805-3813.
- [16] 王珍,秦旭平. 二甲双胍药理作用及其机制研究进展[J]. 中南医学科学杂志, 2018, 46(3): 326-328, 332.
- [17] Li L, Huang W, Li K, et al. Metformin attenuates gefitinib-induced exacerbation of pulmonary fibrosis by inhibition of TGF- β signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(41): 43605-43619.
- [18] Guan M P, Li W Q, Xu L L, et al. Metformin improves epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 in renal tubular epithelial NRK-52E cells via inhibiting Egr-1 [J]. *J Diabetes Res*, 2018, 27(1): 1031367-1031367.
- [19] 苏娟. 二甲双胍对大鼠肾缺血再灌注损伤后纤维化的影响[J]. 中国医药导报, 2018, 15(22): 22-26.
- [20] Yi H, Huang C, Shi Y, et al. Metformin attenuates folic acid induced renal fibrosis in mice [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 7045-7054.
- [21] 宋成军,张亚平,李健,等. 丝胶对糖尿病大鼠肾基质金属蛋白酶-9/基质金属蛋白酶组织抑制因子-1的调节作用[J]. 解剖学杂志, 2013, 36(6): 1053-1056.

[责任编辑 刘东博]