

## 研究简报

# 波动性高糖对肾小管上皮细胞Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径的影响

曹罗元 黄宝英\* 富显果 刘金发 杨 菁

(福建中医药大学附属宁德市医院, 宁德 352100)

**关键词** 波动性高糖; 持续性高糖; Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径; EMT

肾脏纤维化分为肾小球硬化和肾小管间质纤维化(tubular interstitial fibrosis, TIF), 而TIF过程与肾损伤具有密切的关系。TIF是由于细胞外基质的过度沉积造成的, 肌成纤维细胞是TIF发生发展过程中产生细胞外基质的主要细胞, 该过程被成纤维细胞激活, 涉及上皮细胞向肌成纤维细胞的转分化<sup>[1-2]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径涉及细胞增殖、肿瘤发生与转移的调控。 $\beta$ -catenin是Wnt信号途径的关键分子, 在细胞的生长与分化过程中起着重要的作用, 甚至涉及组织再生, 在肾病的发生与发展过程中起重要的调控作用<sup>[3-4]</sup>。Huang等<sup>[4]</sup>研究发现, Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径异常与多囊性肾病密切相关。肾小管细胞肥大是早期糖尿病症状的特征, 研究表明, 高糖增强了肾小管细胞对钠的吸收, 从而导致细胞肥大。糖尿病与Na/K-ATPase活力紧密相关。肾小管上皮细胞转分化(tubular epithelial myofibroblast trans-differentiation, TEMT)是肾脏纤维化的重要病理基础, 过去的研究发现, 波动性高糖能显著促进内皮细胞、心肌细胞的纤维化进程<sup>[1-5]</sup>。波动性血糖对于糖尿病并发症的发生、发展有重要的影响, 其危害性甚至高于持续性的血糖升高, 而糖尿病患者的血糖是呈现波动性的<sup>[6]</sup>。但关于波动性高糖对肾小管上皮细胞影响的相关研究并不多见, 本研究将观察波动性高糖刺激对人肾小管上皮细胞Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径的影响, 以探究波动性高糖对肾小管上皮细胞转分化的影响。

实验材料: 人近端肾小管上皮细胞系HK-2(ATCC公司), D-glucose(Sigma公司), 兔抗E-cadherin抗体、小鼠抗 $\beta$ -catenin抗体、小鼠抗CK18抗体、小鼠抗GAPDH抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG(H+L)、

辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(H+L)(Santa Cruz公司), 兔抗 $\alpha$ -SMA多克隆抗体(Epitomics公司), DEME/F12(Gibco公司), 核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司)。

细胞培养和分组: 含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基常规培养HK-2细胞, 细胞融合达到70%左右, 无血清培养基饥饿培养12 h后, HK-2细胞分为正常组(NG, 5.5 mmol/L D-glucose)、甘露醇对照组(NG+M, 5.5 mmol/L D-glucose+19.5 mmol/L mannitol)、持续性高糖组(HG, 25 mmol/L D-glucose)、波动性高糖组(FHG, 5.5 mmol/L D-glucose与25 mmol/L D-glucose交替培养, 波动周期为12 h)。所有分组均在37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

## 免疫细胞化学检测 $\beta$ -catenin的表达情况

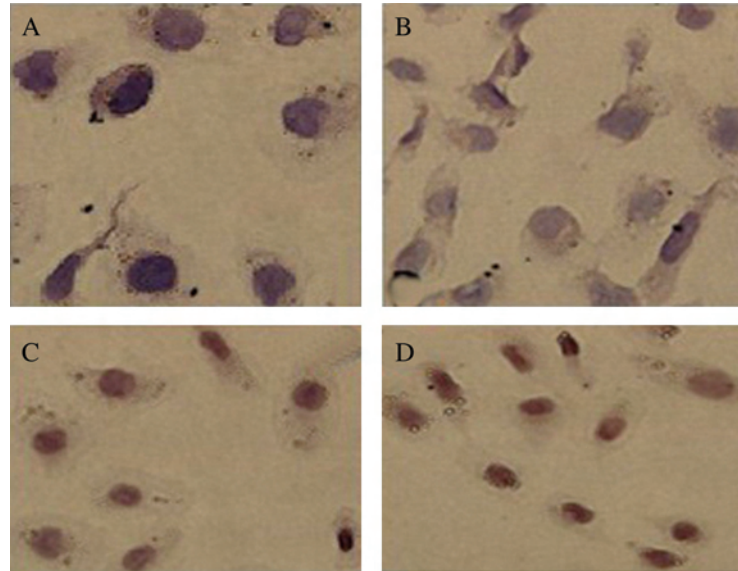
将赖氨酸处理过的无菌盖玻片爬片放于6孔板中, 按实验分组处理48 h。细胞用4%的多聚甲醛固定, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>室温孵育10 min灭活内源性过氧化物酶, 0.1% Triton X-100孵育20 min, 10% BSA封闭。加入小鼠抗 $\beta$ -catenin抗体(1:50), 4 °C过夜(PBS为阴性对照)。滴加生物素标记的山羊抗小鼠IgG(H+L)抗体(1:50), DAB显色, 苏木素对比染色、水洗。Olympus IX71显微镜观察(40 $\times$ )、拍照, 计算 $\beta$ -catenin阳性细胞核占一个视野中总细胞核的百分比, 以各组的均值进行比较。

在NG组HK-2细胞中,  $\beta$ -catenin主要表达于肾小管上皮细胞的细胞膜, 少量表达于细胞质。HG组与

收稿日期: 2012-04-08 接受日期: 2012-05-08

福建省自然科学基金科技项目(No.2012J01435)和福建省宁德市科技计划(No.20100144)资助项目

\*通讯作者。Tel: 0593-2822372, E-mail: doctor\_hby@yahoo.com.cn



A: 正常组; B: 甘露醇对照组; C: 持续性高糖组; D: 波动性高糖组。

A: NG group; B: NG+M group; C: HG group; D: FHG group.

图1 免疫细胞化学检测肾小管上皮细胞 $\beta$ -catenin的表达(400 $\times$ )

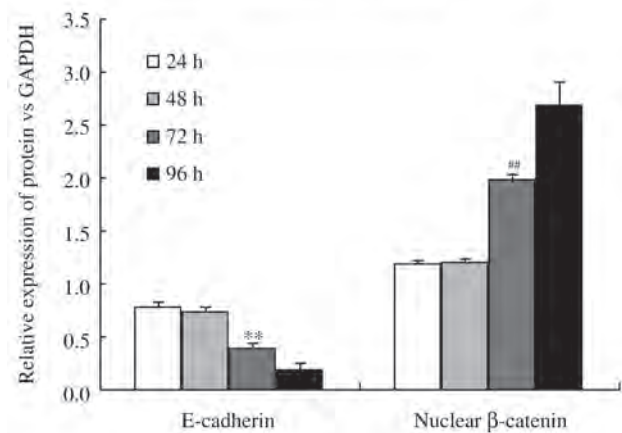
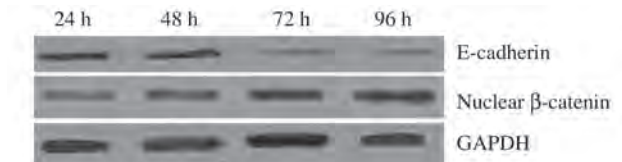
Fig.1 Immunocytochemistry of  $\beta$ -catenin in HK-2 cells(400 $\times$ )

FHG组HK-2细胞质与细胞核的 $\beta$ -catenin表达显著增强( $P < 0.01$ ), 并且, FHG组的 $\beta$ -catenin表达较HG组增强明显( $P < 0.05$ )(图1)。

### Western blot检测 $\beta$ -catenin/ $\alpha$ -SMA/CK18与E-cadherin的表达

将各组细胞培养24~96 h, 弃培养基, 用冰冷PBS洗3遍, 加入细胞裂解液RIPA(每毫升加入5  $\mu$ L蛋白酶抑制剂、10  $\mu$ L PMSF、5  $\mu$ L DTT), 冰浴30 min(每10 min振荡10 s), 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心10 min, 提取细胞总蛋白。采用凯基核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒提取核蛋白和胞浆蛋白, BCA法测定蛋白浓度。取细胞裂解蛋白20  $\mu$ g, 经10% SDS-PAGE凝胶电泳2 h, PVDF转膜(200 mA、1 h); 5%脱脂奶粉封闭PVDF膜2 h, 分别加入兔抗E-钙黏蛋白(E-cadherin)多克隆抗体、兔抗 $\alpha$ -SMA多克隆抗体、小鼠抗 $\beta$ -catenin单克隆抗体、小鼠抗CK18抗体。4  $^{\circ}$ C过夜, 洗膜后加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体或羊抗小鼠抗体(1:5 000稀释), 37  $^{\circ}$ C孵育1 h; 洗膜后加ECL试剂, 然后将PVDF膜放入X光片暗盒, 压片、显影、定影。

HK-2细胞按分组进行培养24~96 h, HG组72 h E-cadherin的表达量较24 h明显下降( $P < 0.01$ , 图2)。而在FHG组中, 48 h E-cadherin的表达量较24 h明显下降( $P < 0.01$ , 图3), 即波动高糖加速了上皮细胞特



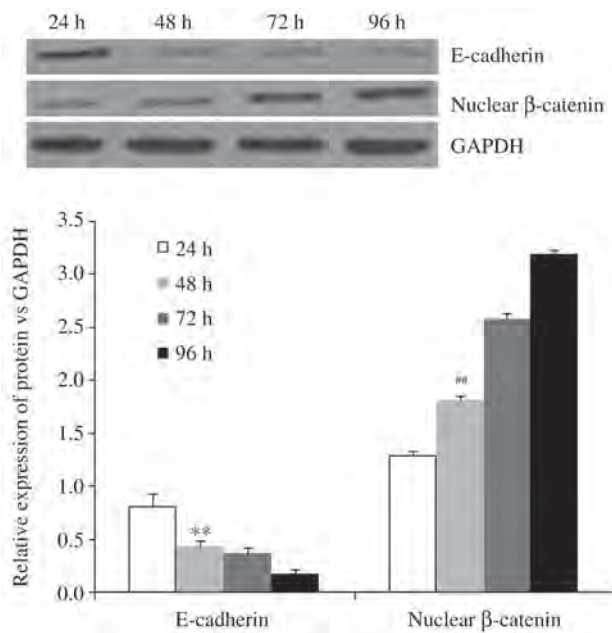
\*\* $P < 0.01$ , 与24 h组比较; ## $P < 0.01$ , 与48 h组比较。

\*\* $P < 0.01$  vs 24 h group; ## $P < 0.01$  vs 48 h group.

图2 持续性高糖对E-cadherin和细胞核 $\beta$ -catenin表达的影响

Fig.2 Relative protein expression level of E-cadherin and nuclear  $\beta$ -catenin at different time points in constant high glucose

性蛋白E-cadherin表达量的减少。FHG组72 h的肾小管上皮细胞E-cadherin与 $\beta$ -catenin的表达量与波动培养96 h没有明显差异( $P > 0.05$ , 图3); 在24, 48, 72 h



\*\* $P < 0.01$ 与24 h组比较; ## $P < 0.01$ , 与24 h组比较。

\*\* $P < 0.01$  vs 24 h group; ## $P < 0.01$  vs 24 h group.

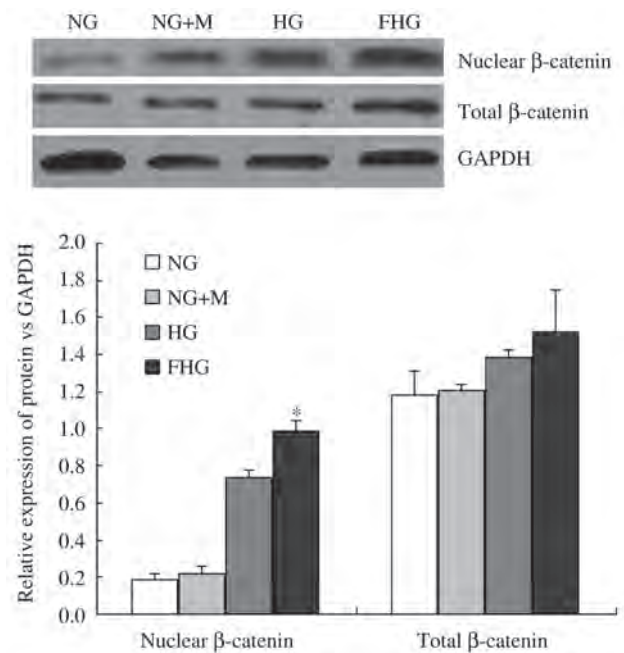
图3 波动性高糖对E-cadherin和细胞核 $\beta$ -catenin表达的影响  
Fig.3 Relative protein expression level of E-cadherin and nuclear  $\beta$ -catenin at different time points in intermittent high glucose

处理组中,核内 $\beta$ -catenin的表达量呈现逐渐上升的趋势(图2和图3),说明 $\beta$ -catenin的异位表达( $\beta$ -catenin由细胞质向细胞核内积聚)具有时间依赖性,而细胞总 $\beta$ -catenin的表达量相对恒定(组间差异没有统计学意义,图4)。

按各组培养条件培养HK-2细胞72 h,波动高糖对细胞核 $\beta$ -catenin的表达影响明显强于对总 $\beta$ -catenin的影响( $P < 0.05$ ,图4)。

按各组培养条件培养HK-2细胞72 h,间充质细胞标志蛋白 $\alpha$ -SMA在持续高糖与波动高糖的刺激下,表达量明显增加,而且波动高糖组的表达量高于持续高糖组( $P < 0.05$ ,图5),波动高糖组上皮细胞标志物细胞角蛋白CK18表达量较持续性高糖组下降明显( $P < 0.05$ ,图5)。

肾小管上皮细胞丧失上皮细胞黏附特性是肾小管上皮细胞向成纤维细胞转分化的标志性特征,即表皮黏附分子E-cadherin的表达下降<sup>[7]</sup>,E-cadherin是维持上皮细胞表型和极性的重要分子。肾小管上皮细胞形态由原来的圆形转变为具有成纤维细胞典型形态的梭形<sup>[1,8-9]</sup>。在对单侧输尿管梗阻所致慢性肾间质纤维化小鼠模型的研究中发现,Wnt/

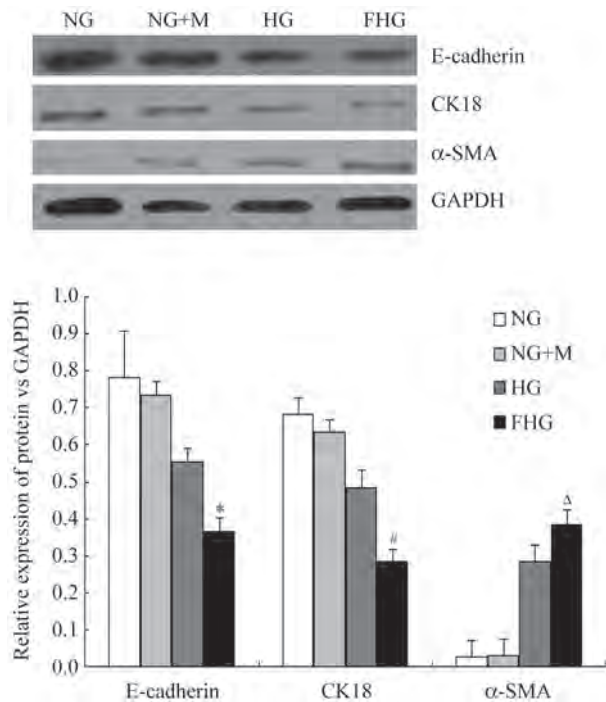


\* $P < 0.05$ ,与HG组比较。

\* $P < 0.05$  vs HG group.

图4 各组细胞核 $\beta$ -catenin与总 $\beta$ -catenin的相对表达情况  
Fig.4 Relative protein expression level of nuclear  $\beta$ -catenin and total  $\beta$ -catenin in HK-2 cells

$\beta$ -catenin信号途径中多种Wnt蛋白表达增强,并诱导促进纤维化的靶基因表达,提示该途径可能参与了肾间质的纤维化过程<sup>[10]</sup>,同时说明了在上皮细胞向间质细胞转分化(epithelial to myofibroblast transition, EMT)过程中Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径协同TGF $\beta$ /Smad途径激活转录因子(Snail、Slug、Twist),下调上皮细胞基因的表达,诱导间充质细胞的表达<sup>[11]</sup>。 $\beta$ -catenin作为细胞骨架蛋白,与E-cadherin、 $\alpha$ -连环蛋白( $\alpha$ -catenin)等共同参与了细胞连接的构建<sup>[12-13]</sup>。E-cadherin是EMT最为重要的标志物之一; $\alpha$ -SMA与纤维组织的结合是成纤维母细胞的重要特征, $\alpha$ -SMA在上皮细胞一般是不表达的,因此, $\alpha$ -SMA是肌成纤维细胞的标志性蛋白<sup>[1-2,14-15]</sup>。 $\beta$ -catenin的异位表达,即在细胞质内聚集并进入细胞核是Wnt途径发挥生物学作用的关键步骤<sup>[16-17]</sup>。Galichon等<sup>[18]</sup>建议选择波形蛋白(vimentin)与 $\beta$ -catenin作为判断肾脏病理的依据。在肾小管上皮细胞的转分化过程中,上皮细胞标志物细胞角蛋白18(cytokeratin 18, CK18)的表达量减少。这些研究表明,E-cadherin、 $\alpha$ -SMA、CK18与 $\beta$ -catenin是肾间质纤维化过程的重要参与者<sup>[1-2,11-18]</sup>。研究表明,间质肌成纤维细胞有大



\* $P < 0.05$ , 与HG组比较; # $P < 0.05$ , 与HG组比较;  $\Delta P < 0.05$ , 与HG组比较。  
\* $P < 0.05$  vs HG group; # $P < 0.05$  vs HG group;  $\Delta P < 0.05$  vs HG group.

图5 各组E-cadherin/CK18/ $\alpha$ -SMA的相对表达情况  
Fig.5 Relative protein expression level of E-cadherin, CK18 and  $\alpha$ -SMA in HK-2 cells

约36%来源于EMT过程<sup>[19]</sup>, 因此, 肌成纤维细胞标志物 $\alpha$ -SMA的出现或者增多, 同时伴有上皮细胞标志蛋白(E-cadherin、CK18)的减少或者消失作为细胞转分化的标志。

本研究结果表明, 人近端小管上皮细胞系HK-2在高糖刺激下, 上皮细胞的形态较NG+M组发生明显的变化, 由圆形转为梭形(图1)。波动培养24~72 h的E-cadherin与 $\beta$ -catenin的表达量变化呈现一定的线性关系, 说明波动性高糖对肾小管上皮细胞的影响具有时间依赖性(图2和图3)。各组间细胞总 $\beta$ -catenin表达量的差异不具有统计学意义, 而HG组与FHG组的核内 $\beta$ -catenin表达量较NG+M组增加明显(图4), 因此,  $\beta$ -catenin在高糖的刺激下发生了异位表达(由细胞质向细胞核内积聚)。

FHG组上皮细胞黏性蛋白E-cadherin表达量比HG组下降明显( $P < 0.05$ ), 且 $\beta$ -catenin出现异位表达, 胞核的表达量显著增强( $P < 0.05$ ), 上皮细胞标志物细胞角蛋白CK18表达显著下降( $P < 0.05$ )。间充质细胞标志蛋白 $\alpha$ -SMA表达显著增强( $P < 0.05$ ); 表明波动性高糖较持续性高糖加速了肾小管的EMT过程, 而

TIF过程中产生的主要细胞(肌成纤维细胞)有大约36%来源于EMT过程<sup>[19]</sup>。Kalluri等<sup>[20]</sup>和Carew等<sup>[21]</sup>研究表明, 小鼠的肾脏纤维化过程中, 大约30%的成纤维细胞来源于肾小管上皮细胞。波动性高糖加速了肾小管的EMT过程, 也就加速了TIF的进程, 加快了肾功能衰竭的发展。因此, 波动性高糖对肾脏的损伤效应强于持续性高糖。

综上所述, Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径参与了波动性高糖诱导的TEMT过程, 在TIF过程中起着重要的作用。波动性高糖对肾脏的损伤效应强于持续性高糖, 而糖尿病患者的血糖呈现波动性。因此, 糖尿病血糖控制, 不仅是降低高血糖、防止低血糖, 更应当控制血糖波动, 以延缓糖尿病并发症的进展。而在科研实践中, 采用波动性高糖研究糖尿病肾病机制, 探究防治糖尿病肾病策略更具有指导意义。

## 参考文献 (References)

- 1 Fragiadaki M, Mason RM. Epithelial-mesenchymal transition in renal fibrosis-evidence for and against. *Int J Exp Pathol* 2011; 92(3): 143-50.
- 2 Papageorgis P, Lambert AW, Ozturk S, Gao F, Pan H, Manne U, et al. Smad signaling is required to maintain epigenetic silencing during breast cancer progression. *Cancer Res* 2010; 70(3): 968-78.
- 3 Lancaster MA, Gleeson JG. Cystic kidney disease: the role of Wnt signaling. *Trends Mol Med* 2010; 16(8): 349-60.
- 4 Huang K, Zhang JX, Han L, You YP, Jiang T, Pu PY, et al. MicroRNA roles in beta-catenin pathway. *Mol Cancer* 2010; 9: 252.
- 5 Beltramo E, Berrone E, Tarallo S, Porta M. Different apoptotic responses of human and bovine pericytes to fluctuating glucose levels and protective role of thiamine. *Diabetes Metab Res Rev* 2009; 25(6): 566-76.
- 6 Sanchez AP, Sharma K. Transcription factors in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Expert Rev Mol Med* 2009; 11: e13.
- 7 Strutz F, Muller GA. Transdifferentiation comes of age. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15(11): 1729-31.
- 8 Tian YC, Fraser D, Attisano L, Phillips AO. TGF-beta1-mediated alterations of renal proximal tubular epithelial cell phenotype. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285(1): F130-42.
- 9 Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(5): 392-401.
- 10 Pulkkinen K, Murugan S, Vainio S. Wnt signaling in kidney development and disease. *Organogenesis* 2008; 4(2): 55-9.
- 11 Schlessinger K, Hall A, Tolwinski N. Wnt signaling pathways meet Rho GTPases. *Genes Dev* 2009; 23(3): 265-77.
- 12 He W, Dai C, Li Y, Zeng G, Monga SP, Liu Y. Wnt/beta-catenin signaling promotes renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(4): 765-76.
- 13 Zheng L, Amano K, Iohara K, Ito M, Imabayashi K, Into T, et al. Matrix metalloproteinase-3 accelerates wound healing following dental pulp injury. *Am J Pathol* 2009; 175(5): 1905-14.
- 14 Javelaud D, van Kempen L, Alexaki VI, Le Scolan E, Luo K,

- Mauviel A. Efficient TGF-beta/SMAD signaling in human melanoma cells associated with high c-SKI/SnoN expression. *Mol Cancer* 2011; 10(1): 2.
- 15 Mauviel A. Transforming growth factor-beta: A key mediator of fibrosis. *Methods Mol Med* 2005; 117: 69-80.
- 16 Brembeck FH, Rosario M, Birchmeier W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16(1): 51-9.
- 17 Bienz M. beta-Catenin: A pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr Biol* 2005; 15(2): R64-7
- 18 Galichon P, Hertig A. Epithelial to mesenchymal transition as a biomarker in renal fibrosis: Are we ready for the bedside? *Fibrogenesis Tissue Repair* 2011; 4: 11.
- 19 Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 2002; 110(3): 341-50.
- 20 Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112(12): 1776-84.
- 21 Carew RM, Wang B, Kantharidis P. The role of EMT in renal fibrosis. *Cell Tissue Res* 2012; 347(1): 103-16.

## Effect of Intermittent High Glucose on Tubular Epithelial Myofibroblast Transdifferentiation in HK-2 Cells

Cao Luoyuan, Huang Baoying\*, Fu Xianguo, Liu Jinfa, Yang Jing

(The Affiliated Ningde Municipal Hospital of Fujian University of TCM, Ningde 352100, China)

**Abstract** The effects of intermittent high glucose on Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in tubular epithelial myofibroblast transdifferentiation in human kidney proximal tubular epithelial cell line (HK-2) cells were studied. HK-2 cells were divided into four groups: normal-glucose group (NG), mannitol control group (NG+M), intermittent high glucose group (FHG) and constant high glucose group (HG). Immunocytochemistry staining was used to observe the expression of  $\beta$ -catenin. The protein expression of  $\beta$ -catenin, CK18, E-cadherin and  $\alpha$ -SMA was assessed by Western blot. Intermittent high glucose compared with mannitol control group, E-cadherin down-regulated striking in HK-2 ( $P<0.01$ ); intermittent high glucose compared with constant high glucose E-cadherin was decreased ( $P<0.05$ ). The expression of cytoplasmic and nuclear fraction of  $\beta$ -catenin was enhanced by intermittent high glucose. The expression of  $\alpha$ -SMA and CK18 was significantly increased in intermittent high glucose stimulation compared with constant high glucose ( $P<0.05$ ). These data suggested that Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway plays a functional role for tubular epithelial myofibroblast transdifferentiation in HK-2 cells induced by intermittent high glucose. Compared with the constant high glucose group, intermittent high glucose has much more strong damaged effects on kidney.

**Key words** intermittent high glucose; constant high glucose; Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway; epithelial to mesenchymal transition

Received: April 8, 2012 Accepted: May 8, 2012

This work was supported by the Fujian Science and Technology Project of Natural Science Foundation (No.2012J01435) and the Ningde Planning Project of Science and Technology (No.20100144)

\*Corresponding author. Tel: 86-593-2822372, E-mail: doctor\_hby@yahoo.com.cn