

网络出版时间: 2022-11-29 09:43 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20221128.1714.012.html>

## 丝胶改善高糖诱导的足细胞上皮间质转化

葛婷<sup>1,2</sup>, 史硕<sup>1</sup>, 宋舒轩<sup>1</sup>, 阮鸿娇<sup>1</sup>, 陈志宏<sup>1</sup>, 宋成军<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨丝胶对高糖诱导下足细胞上皮间质转化(EMT)的影响。方法 以条件永生化小鼠足细胞株作为研究对象,采用高糖刺激构建足细胞损伤模型,分为正常(NG)组、高渗对照(MG)组、高糖损伤(HG)组、低中高剂量丝胶(LS、MS、HS)组。CCK-8法测定各组足细胞的活力;普通光学倒置显微镜下观察各组足细胞的形态结构;Transwell和细胞划痕实验检测迁移能力;Western blot法检测各组足细胞EMT相关间质表型因子Snail、 $\alpha$ -SMA、FSP-1、MMP-9及上皮表型因子Nephrin、E-cadherin、WT-1蛋白的表达水平。结果

与NG组比较,HG组足细胞活力降低( $P < 0.01$ ),足突广泛融合,迁移能力增强,Snail、 $\alpha$ -SMA、FSP-1、MMP-9蛋白表达上调( $P < 0.01$ ),Nephrin、E-cadherin、WT-1蛋白表达下调( $P < 0.01$ );与HG组比较,丝胶给药组足细胞活力均升高( $P < 0.05$ ),足突融合改善,迁移能力减弱,Snail、 $\alpha$ -SMA、FSP-1、MMP-9蛋白表达下调( $P < 0.05$ ),Nephrin、E-cadherin、WT-1蛋白表达上调( $P < 0.05$ )。结论 丝胶可以减轻高糖诱导的足细胞上皮间质转化。

**关键词** 丝胶;糖尿病肾病;足细胞;上皮间质转化

**中图分类号** R 587.2

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2022)12-1915-07

**doi:** 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.12.012

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)最重要的微血管并发症之一,中国约20%~40%的DM患者合并DKD,且2型糖尿病患者诊断时即可伴有DKD,DKD现已成为慢性肾脏病的主要病因<sup>[1]</sup>。

肾小球足细胞损伤与DKD患者早期微量白蛋白尿的产生密切相关<sup>[2]</sup>。足细胞是脏层上皮细胞,对维持肾小球滤过屏障(glomerular filtration barrier,

GFB)的功能具有重要作用。在高血糖等因素刺激下,足细胞会发生一系列适应性改变,包括细胞肥大、上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)及凋亡等<sup>[3]</sup>。其中,足细胞EMT已被证实是DKD发生进展的重要病理机制<sup>[4]</sup>。前期研究<sup>[5-6]</sup>表明,丝胶能有效保护2型糖尿病大鼠的肾脏损伤,但丝胶对DKD时肾脏损伤保护的作用机制仍需探讨。该研究在以往研究的基础上,以足细胞EMT为切入点,探讨丝胶对高糖损伤足细胞的保护作用,为丰富丝胶保护DKD时的肾脏损伤提供新的理论依据。

### 1 材料与方法

**1.1 细胞** 条件永生化小鼠足细胞(mouse podocyte clone-5, MPC-5)细胞株,购自广州吉妮欧生物科技有限公司。

**1.2 药物与试剂** 丝胶、D-葡萄糖和甘露醇均购自美国Sigma公司;IFN- $\gamma$ 购自美国PeproTech公司;I型鼠尾胶原蛋白、RIPA组织/细胞裂解液、BCA蛋白浓度测定盒试剂均购自北京索莱宝生物有限公司;4%多聚甲醛、0.1%结晶紫染色液和超敏ECL化学发光底物均购自合肥Biosharp公司;胎牛血清购自上海ExCell Bio公司;RPMI-1640无糖培养基购自武汉普诺赛公司;0.25%胰酶购自美国Gibco公司;CCK-8反应液购自美国APEX-BIO公司;DyLight<sup>TM</sup> 488荧光标记山羊抗兔IgG购自美国Rockland公司;DAPI购自美国CST公司;PVDF膜购自美国Millipore公司。兔抗小鼠WT-1和MMP-9抗体购自美国Affinity公司;兔抗小鼠Snail、 $\alpha$ -SMA、E-cadherin和 $\alpha$ -tubulin抗体均购自杭州华安生物公司;兔抗小鼠Nephrin、FSP-1购自美国Abcam公司;HRP标记山羊抗兔IgG购自美国KPL公司。

**1.3 主要仪器** CO<sub>2</sub>培养箱购自美国Thermo公司;BX63型正置荧光显微镜和IXplore Standard型倒置荧光显微镜均购自日本Olympus公司;Western blot设备购自北京六一公司;ELx808吸收光酶标仪购自美国伯腾公司;全自动化学发光图像分析系统购自上海Tanon公司。

2022-09-18 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81441133); 河北省自然科学基金(编号: H2013406096)

作者单位: <sup>1</sup>承德医学院人体解剖学教研室 承德 067000

<sup>2</sup>常熟市第一人民医院中心实验室 苏州 215500

作者简介: 葛婷,女,硕士;

陈志宏,女,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: czh1971@126.com;

宋成军,男,研究员,硕士生导师,责任作者, E-mail: songchengjun@126.com

## 1.4 方法

**1.4.1 细胞培养及分组给药** 足细胞复苏后于含 5.5 mmol/L D-葡萄糖、5% 胎牛血清、1% 100 × 的青-链霉素混合液和 10 U/ml 小鼠 IFN- $\gamma$  的无糖 RPMI-1640 培养基中,在 33 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,后转入不含小鼠 IFN- $\gamma$  的上述培养基中,37 °C 培养 14 d 左右,待细胞分化成熟后用于后续实验。前期通过预实验发现,足细胞在各个糖浓度(5.5、10、20、30、40、50、60 mmol/L)作用 24 h 后细胞活力下降不明显;30、40、50、60 mmol/L 的葡萄糖作用 48 h 均可导致足细胞活力明显降低。综合考虑渗透压等因素,确定 30 mmol/L 的葡萄糖作用 48 h 作为建立高糖致足细胞损伤模型的条件。因此,将成熟足细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔的密度接种于铺有 I 型鼠尾胶原蛋白的 6 孔板中,待细胞融合至 70% ~ 80% 时,于无血清的培养基中饥饿 12 h 使其同步化后,分成以下 6 组: NG 组(正常组: 5.5 mmol/L D-葡萄糖)、MG 组(高渗对照组: 5.5 mmol/L D-葡萄糖 + 24.5 mmol/L 甘露醇)、HG 组(高糖损伤组: 30 mmol/L D-葡萄糖)、LS 组(低剂量丝胶组: 30 mmol/L D-葡萄糖 + 150  $\mu$ g/ml 丝胶)、MS 组(中剂量丝胶组: 30 mmol/L D-葡萄糖 + 300  $\mu$ g/ml 丝胶)、HS 组(高剂量丝胶组: 30 mmol/L D-葡萄糖 + 600  $\mu$ g/ml 丝胶)。各组给药干预时间为 48 h。

**1.4.2 间接免疫荧光细胞化学法** 只有成熟的足细胞才具有其特有的生物学性状及功能,才能用于后续实验。制作细胞爬片, PBS 冲洗, 预冷的 4% 多聚甲醛室温固定 20 min, 0.3% Triton X-100 透膜 20 min, 山羊血清室温封闭 20 min, 1:100 稀释的兔抗 Nephlin 4 °C 孵育过夜。次日, 一抗 37 °C 复温 30 min 后, 1:100 稀释的 DyLight™488 荧光标记山羊抗兔 IgG 避光 37 °C 孵育 1 h 后, DAPI 染核 15 min, 于荧光显微镜下观察各组足细胞中 Nephlin 蛋白的定位分布。

**1.4.3 CCK-8 法检测** 将足细胞以  $2.5 \times 10^4$  /ml 的密度接种到 96 孔板中, 每孔 200  $\mu$ l, 每组细胞设 6 个复孔。按照分组, 于显微镜下观察干预培养 48 h 后各组足细胞形态, 并于每孔加入 10  $\mu$ l CCK-8 反应液, 于在 37 °C 培养箱中反应 2 h 后, 在 450 nm 波长处检测每孔的吸光度值, 并计算细胞活力(细胞活力 = 实验组吸光度值/正常组吸光度值  $\times$  100%)。

**1.4.4 Transwell 实验** 2 h 前湿化小室。将各处理组足细胞用 0.25% 胰酶消化后, 将各处理组无血

清 RPMI-1640 培养基重悬, 以  $3 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 Transwell 的上室, 每孔 200  $\mu$ l, 并将 600  $\mu$ l 含 20% FBS 的 RPMI-1640 培养基加入下室。37 °C 孵育 48 h 后, 用 4% 多聚甲醛室温固定 40 min, 再用 0.1% 结晶紫工作液避光染色 10 ~ 20 min。染色完成后, 用棉签擦去小室内侧未迁移的足细胞, 于显微镜  $\times 100$  镜下, 任选意 3 个视野, 拍照, 计数。

**1.4.5 划痕实验** 将各处理组足细胞用 0.25% 胰酶消化制成细胞悬液, 接种于 6 孔板, 待细胞密度达 90% 时, 使用 1 ml 枪尖垂直于孔板底部画直线, PBS 缓冲液清洗 3 次。于无血清 RPMI-1640 培养基中 37 °C 培养 48 h 后, 于显微镜  $\times 40$  镜下拍照, 运用 Image-Pro Plus 6.0 软件测得细胞的迁移面积, 并计算细胞的相对迁移率[相对迁移率 = (划痕面积 0 h - 划痕面积 48 h) / 划痕面积 0 h  $\times$  100% ]。

**1.4.6 Western blot 法检测** 收集各组细胞, 用 RIPA 裂解并提取总蛋白, 于 8% ~ 12% 的 SDS-PAGE 凝胶上分离, 后转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后加入一抗( Snail 1:1 000,  $\alpha$ -SMA 1:1 000, FSP-1 1:1 000, MMP-9 1:1 000, Nephlin 1:1 000, E-cadherin 1:1 000, WT-1 1:1 000,  $\alpha$ -tubulin 1:5 000) 4 °C 孵育过夜, 洗膜后二抗室温孵育 1 h。通过全自动化学发光图像分析系统采集各蛋白条带。用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析其灰度值, 并以目的蛋白值与内参蛋白值的比值为结果进行统计分析。以上实验均独立重复 3 次。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 23.0 统计学软件处理数据, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA), 组间两两比较采用 LSD- $t$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 足细胞分化成熟的鉴定** 33 °C 增殖态的足细胞生长活跃, 体积中等, 为多边形, 无突起伸出, 细胞迅速生长至融合状态, 呈铺路石样外观; 消化传代后的 37 °C 分化态足细胞继续生长, 细胞体和细胞核较增殖状态增大, 自细胞体伸出树枝样突起, 常见双核, 相邻细胞间形成连接。见图 1。37 °C 培养至第 3 天, 足细胞中 Nephlin 蛋白分布于核周及细胞质中; 在 37 °C 培养至第 14 天, 足细胞中 Nephlin 蛋白则分布于核周及细胞膜, 此为分化成熟足细胞 Nephlin 蛋白的分布特征。见图 2。

**2.2 丝胶对高糖诱导下足细胞细胞形态的影响** NG 组和 MG 组足细胞自胞体伸出树枝样突起, 相邻

细胞间形成连接;经HG处理后的足细胞皱缩变圆,足突广泛融合,渐成“梭形细胞样”,且出现漂浮、脱落现象;与HG组相比,LS、MS、HS三组足细胞体积较大,足突融合改善,脱落细胞较少。见图3。

**2.3 丝胶对高糖诱导下足细胞活力的影响** HG组足细胞活力低于NG组( $P < 0.01$ );LS组、MS组、

HS组足细胞活力均高于HG组( $P < 0.01$ )。见图4和表1。

#### 2.4 丝胶对高糖诱导下足细胞迁移能力的影响

各组足细胞纵向迁移能结果显示,HG组迁移至下室的足细胞数量高于NG组( $P < 0.01$ );LS组、MS组、HS组迁移至下室的足细胞数逐渐下降,均低于

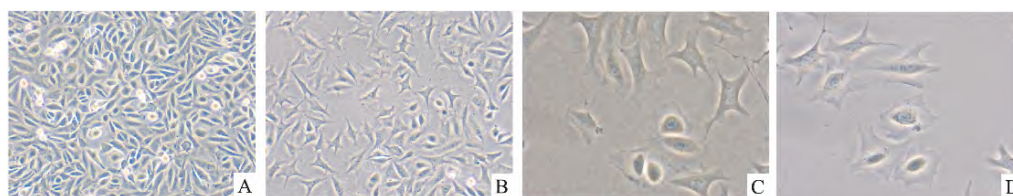


图1 不同培养温度下足细胞的形态结构

A: 33 °C  $\times 100$ ; B: 37 °C 第7天  $\times 100$ ; C: 37 °C 第14天(双核形态)  $\times 200$ ; D: 37 °C 第14天(一般形态)  $\times 200$

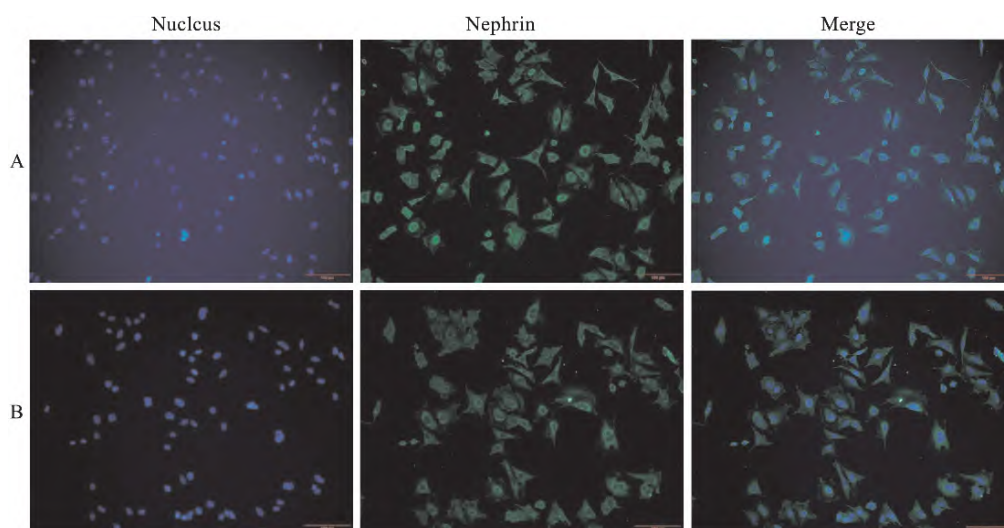


图2 未成熟与成熟足细胞 Nephrin 蛋白的分布  $\times 100$

A: 37 °C 第3天; B: 37 °C 第14天

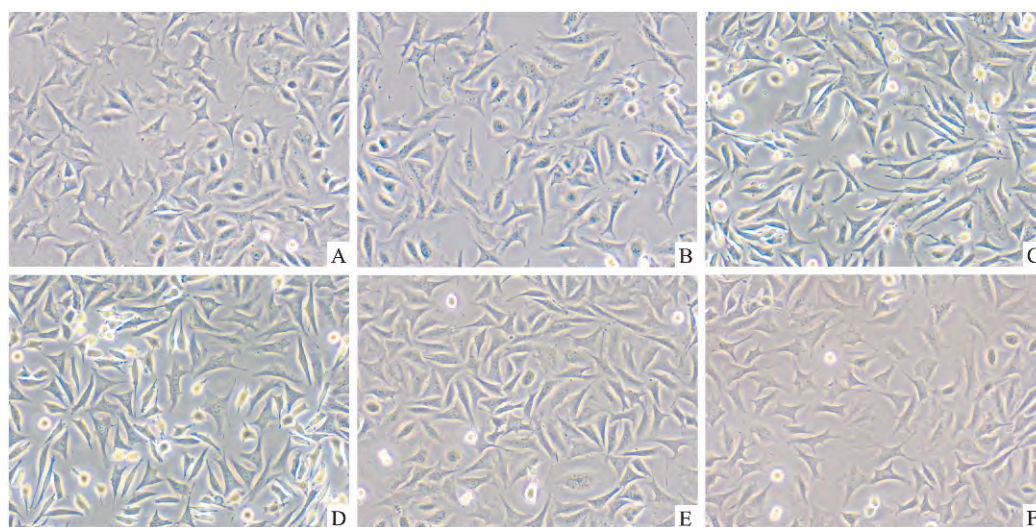


图3 各组足细胞的一般形态  $\times 100$

A: NG组; B: MG组; C: HG组; D: LS组; E: MS组; F: HS组



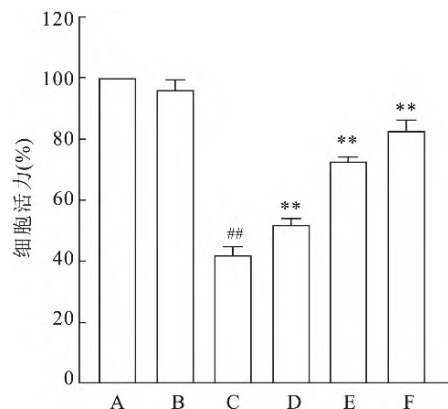


图4 不同浓度丝胶对足细胞活力的影响

A: NG 组; B: MG 组; C: HG 组; D: LS 组; E: MS 组; F: HS 组; 与 NG 组比较:  $^{##}P < 0.01$ ; 与 HG 组比较:  $^{**}P < 0.01$

HG 组 ( $P < 0.05$ )。见图 5、表 1。各组足细胞侧向迁移能力结果显示, HG 组划痕愈合率高于 NG 组 ( $P < 0.01$ ); LS 组、MS 组、HS 组划痕愈合率数逐渐下降, 均低于 HG 组 ( $P < 0.05$ )。见图 6、表 1。

表 1 不同浓度丝胶对足细胞活力和迁移能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	足细胞活力 (%)	纵向迁移足细胞数 (个)	足细胞划痕愈合率 (%)
NG	100.00 $\pm$ 0.00	87 $\pm$ 28	14.41 $\pm$ 1.17
MS	96.03 $\pm$ 3.10	116 $\pm$ 32	16.51 $\pm$ 1.07
HG	42.09 $\pm$ 2.64 $^{##}$	920 $\pm$ 76 $^{##}$	54.04 $\pm$ 1.62 $^{##}$
LS	52.12 $\pm$ 1.89 $^{**}$	772 $\pm$ 142 $^{*}$	49.90 $\pm$ 1.42 $^{*}$
MS	72.68 $\pm$ 1.58 $^{**}$	372 $\pm$ 36 $^{**}$	36.38 $\pm$ 4.05 $^{**}$
HS	83.03 $\pm$ 3.03 $^{**}$	174 $\pm$ 66 $^{**}$	24.53 $\pm$ 1.71 $^{**}$
F 值	309.622	69.000	193.870
P 值	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

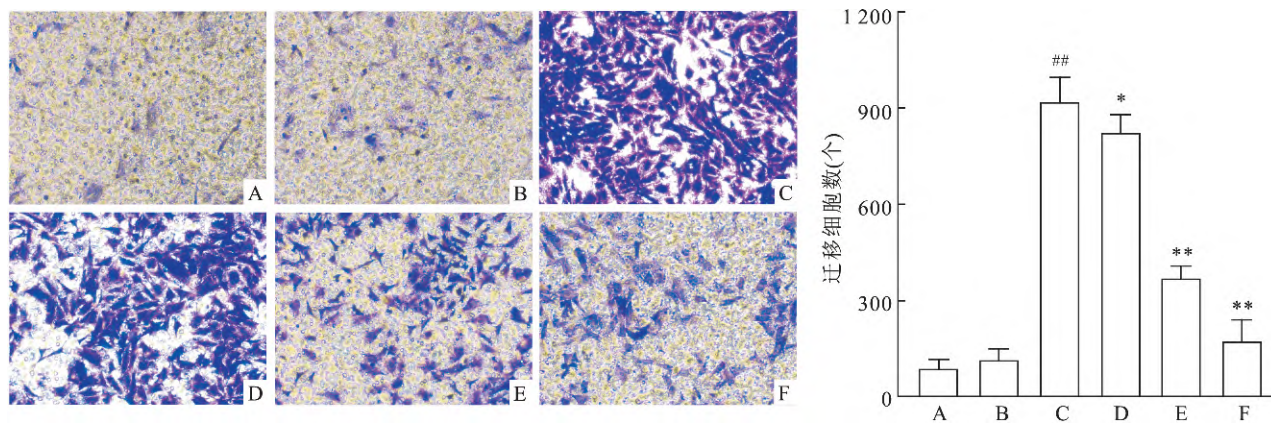
与 NG 组比较:  $^{##}P < 0.01$ ; 与 HG 组比较:  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$

**2.5 丝胶对高糖诱导下足细胞转分化相关蛋白表达的影响** Western blot 实验结果显示, 与 NG 组相比, HG 组足细胞间质表型因子 Snail、 $\alpha$ -SMA、FSP-1

和 MMP-9 蛋白的表达均升高 ( $P < 0.01$ ); 与 HG 组相比, 不同浓度丝胶给药组  $\alpha$ -SMA、FSP-1 和 MMP-9 蛋白的表达均降低 ( $P < 0.01$ ), MS 组和 HS 组 Snail 蛋白的表达降低 ( $P < 0.05$ )。见图 7。与 NG 组相比, HG 组足细胞上皮表型因子 Nephrin、E-cadherin 和 WT-1 蛋白的表达均降低 ( $P < 0.01$ ); 与 HG 组相比, 不同浓度丝胶给药组 Nephrin 蛋白的表达均降低 ( $P < 0.01$ ), MS 组和 HS 组 WT-1 蛋白的表达升高 ( $P < 0.01$ ), HS 组 E-cadherin 蛋白的表达升高 ( $P < 0.05$ )。见图 8 和表 2。

### 3 讨论

足细胞不仅是肾小球疾病的“被动受害者”, 更是肾小球疾病发生和发展的“主动参与者”。近来研究表明, 肾小球足细胞功能的缺失是 DKD 早期发生的关键事件, 在蛋白尿的发生、发展中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。作为 GFB 的最后一道防线, 足细胞凋亡在很长一段时间内被认为是足细胞丢失, 导致蛋白尿的主要原因。然而, 近期有研究表明, DKD 病人尿沉渣中大约有 86% 的足细胞并没有凋亡, 提示除了凋亡以外尚有其他介导足细胞丢失的机制, 这可能与发生在凋亡之前的足细胞 EMT 有关<sup>[8]</sup>。流行病学及干预研究均证实, 高糖是 DKD 发生发展的始动因素, 且高糖诱导的足细胞 EMT 与 DKD 时蛋白尿的形成和基底膜的增厚密切相关。当足细胞发生 EMT 时, 将诱发以下两个生物学事件<sup>[9]</sup>: ① 细胞骨架蛋白重排、足突融合、裂孔膜间隙增大, 细胞形态也从树枝分叉状转变为梭形; ② EMT 相关表型因子的表达发生改变。发生 EMT 后, 足细胞的迁移性增强, 从 GBM 脱落, 最终导致 GFB 功能受损, 蛋白质漏入肾小囊腔。因此, 延缓足细胞 EMT 对 DKD 的

图5 不同浓度丝胶对足细胞纵向迁移能力的影响  $\times 100$ 

A: NG 组; B: MG 组; C: HG 组; D: LS 组; E: MS 组; F: HS 组; 与 NG 组比较:  $^{##}P < 0.01$ ; 与 HG 组比较:  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$

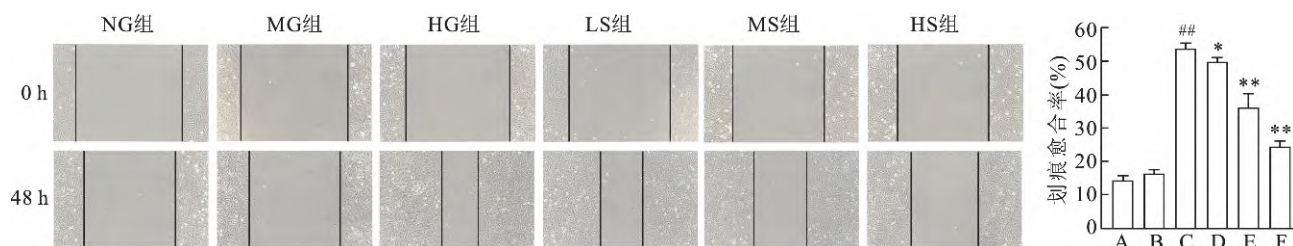


图6 不同浓度丝胶对足细胞侧向迁移能力的影响 ×40

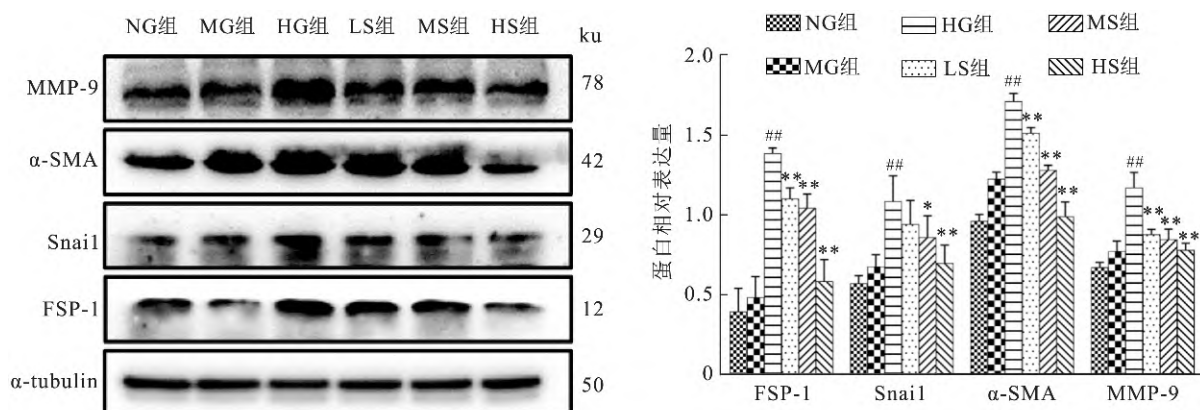
A: NG 组; B: MG 组; C: HG 组; D: LS 组; E: MS 组; F: HS 组; 与 NG 组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与 HG 组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 

图7 不同浓度丝胶对足细胞间质表型因子表达的影响

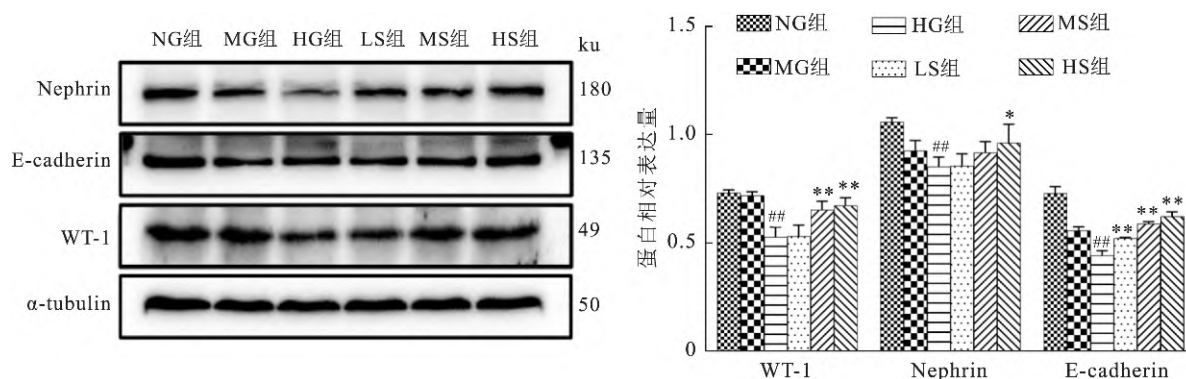
与 NG 组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与 HG 组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 

图8 不同浓度丝胶对足细胞上皮表型因子表达的影响

与 NG 组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与 HG 组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 表2 不同浓度丝胶对足细胞各表型因子表达的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

组别	FSP-1	Snail	α-SMA	MMP-9	Nephrin	E-cadherin	WT-1
NG	0.40 ± 0.15	0.57 ± 0.05	0.96 ± 0.04	0.67 ± 0.03	0.73 ± 0.03	1.06 ± 0.02	0.73 ± 0.01
MS	0.49 ± 0.13	0.68 ± 0.08	1.23 ± 0.04	0.77 ± 0.06	0.56 ± 0.02	0.93 ± 0.05	0.72 ± 0.02
HG	1.39 ± 0.03 <sup>##</sup>	1.09 ± 0.16 <sup>##</sup>	1.71 ± 0.05 <sup>##</sup>	1.17 ± 0.09 <sup>##</sup>	0.44 ± 0.02 <sup>##</sup>	0.85 ± 0.04 <sup>##</sup>	0.53 ± 0.05 <sup>##</sup>
LS	1.10 ± 0.07 <sup>*</sup>	0.94 ± 0.15	1.51 ± 0.03 <sup>*</sup>	0.88 ± 0.03 <sup>*</sup>	0.52 ± 0.00	0.86 ± 0.05	0.53 ± 0.05 <sup>*</sup>
MS	1.04 ± 0.09 <sup>*</sup>	0.86 ± 0.14 <sup>*</sup>	1.28 ± 0.03 <sup>*</sup>	0.85 ± 0.06 <sup>*</sup>	0.59 ± 0.01 <sup>*</sup>	0.92 ± 0.05	0.65 ± 0.04 <sup>*</sup>
HS	0.59 ± 0.14 <sup>*</sup>	0.70 ± 0.11 <sup>*</sup>	0.99 ± 0.09 <sup>*</sup>	0.78 ± 0.04 <sup>*</sup>	0.62 ± 0.02 <sup>*</sup>	0.96 ± 0.09 <sup>*</sup>	0.67 ± 0.04 <sup>*</sup>
F 值	40.551	7.573	93.654	93.654	70.069	6.083	17.673
P 值	<0.000 1	0.002 0	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	0.005 0	<0.000 1

与 NG 组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与 HG 组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

治疗至关重要。

中国传统医学将 DKD 纳入中医“脾瘅”、“水肿”、“消肾”、“关格”或“溺毒”等范畴<sup>[10]</sup>。中医学也认为“消肾”是由“消渴病”(DM 的中医学病名)进一步发展而来。目前,西医对 DKD 的干预主要包括纠正血糖、血压和血脂异常以及改变生活方式。雷米普利和替米沙坦仍然是 DKD 的首选治疗药物,二者联合虽可将蛋白尿降低至正常范围,却翻倍了血清肌酐的浓度<sup>[11]</sup>。因此,近年来国内外学者都将目光聚焦在具有降糖功效且无毒副作用的天然药物—丝胶<sup>[12]</sup>。丝胶于蚕茧壳的中间丝腺中产生,是一种由 18 种氨基酸组成的天然高分子水溶性蛋白。蚕茧壳煮水治疗消渴古方早有记载,现代药理学研究表明蚕茧壳水解物中的多肽和氨基酸混合物能有效降低血糖,何立群教授自拟的“四蚕汤”(蚕茧壳 12 g,僵蚕 12 g,蚕砂 15 g,蝉衣 4.5 g)更是在治疗 DKD 和缓解蛋白尿方面具有显著疗效<sup>[13]</sup>。本课题组的前期研究结果也已表明丝胶能显著降低血糖,纠正因高糖刺激而受损的肾脏组织<sup>[5-6,14]</sup>,但是丝胶对肾脏的保护作用是否与延缓足细胞 EMT 相关目前尚不清楚。

该研究进一步探讨丝胶对 DKD 下足细胞的保护作用,表明丝胶可以增强高糖刺激下受损足细胞的细胞活力,恢复其正常细胞形态。Nephrin、E-cadherin 和 WT-1 是维持足细胞骨架的重要分子,足细胞损伤时表达会下调,本研究证实丝胶可以上调高糖受损足细胞 Nephrin、E-cadherin 和 WT-1 蛋白的表达。此外,Snail 的高表达是公认的启动 EMT 的关键步骤<sup>[15]</sup>,足细胞大量表达 Snail、 $\alpha$ -SMA、FSP-1 和 MMP-9 则表明了足细胞骨架重新排列,表型发生转化。本研究亦证实了丝胶可以下调 Snail、 $\alpha$ -SMA、FSP-1 和 MMP-9 蛋白的表达。Transwell 和划痕实验均提示,高糖刺激下足细胞的迁移能力,HS 组(600  $\mu$ g/ml 丝胶) < MS 组(300  $\mu$ g/ml 丝胶)和 LS 组(150  $\mu$ g/ml 丝胶)。

## 参考文献

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版) [J]. 中华糖尿病杂志 2018, 10(1): 4-67.
- [2] Mallipattu S K, He J C. The podocyte as a direct target for treatment of glomerular disease? [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2016, 311(1): F46-51.
- [3] Zhang L, Wen Z, Han L, et al. Research progress on the pathological mechanisms of podocytes in diabetic nephropathy [J]. Diabetes Res 2020, 2020: 7504798.
- [4] Shi Y, Gao Y, Wang T, et al. Ginsenoside Rg1 alleviates podocyte EMT passage by regulating AKT/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -Catenin pathway by restoring utophagic activity [J]. Evid Based Complement Alternat Med 2020: 1903627.
- [5] 宋成军, 郝祥俊, 陈志宏. 丝胶对糖尿病肾病大鼠肾功能和肾脏 TIMP-1 表达的影响 [J]. 中国老年学杂志 2010, 30(15): 2157-9.
- [6] Liu D, Chen C, Wang D, et al. Effect of sericin on the p38MAPK signaling pathway and NLRP3 inflammasome in the kidney of type 2 diabetic rats [J]. Exp Ther Med 2020, 20(6): 267.
- [7] Diez-Sampedro A, Lenz O, Fornoni A. Podocytopathy in diabetes: a metabolic and endocrine disorder [J]. Am J Kidney Dis, 2011, 58(4): 637-46.
- [8] Li Y, Kang Y S, Dai C, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria [J]. Am J Pathol 2008, 172(2): 299-308.
- [9] Thiery J P, Sleeman J P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions [J]. Nat Rev Mol Cell Bio 2006, 7(2): 131-42.
- [10] 崔玉枝, 孙新宇. 糖尿病肾病中医病名及病因病机浅谈 [J]. 中医临床研究 2014, 6(29): 49-50.
- [11] Mann J F, Schmieder R E, McQueen M, et al. Renal outcomes with telmisartan, ramipril, or both, in people at high vascular risk (the ONTARGET study): a multicentre, randomised, double-blind, controlled trial [J]. Lancet 2008, 372(9638): 547-53.
- [12] Tariq M, Tahir H M, Butt S A, et al. Silk derived formulations for accelerated wound healing in diabetic mice [J]. PeerJ, 2021, 9: e10232.
- [13] 张亚亨, 李慧, 刘雪乐, 等. 中药蚕茧壳的药理及临床研究进展 [J]. 上海中医药杂志 2020, 54(4): 102-5.
- [14] 陈志宏, 宋成军, 付秀美, 等. 丝胶预处理对 DN 大鼠肾脏细胞外基质相关蛋白表达的影响 [J]. 中国医科大学学报 2010, 39(2): 112-5.
- [15] Wang Y, Liu Y, Zhang L, et al. miR-30b-5p modulate renal epithelial-mesenchymal transition in diabetic nephropathy by directly targeting SNAI1 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 535: 12-8.

## Sericin ameliorates epithelial – mesenchymal transition of podocytes induced by high glucose

Ge Ting<sup>1,2</sup>, Shi Shuo<sup>1</sup>, Song Yuxuan<sup>1</sup>, Ruan Hongjiao<sup>1</sup>, Chen Zhihong<sup>1</sup>, Song Chengjun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Human Anatomy, Chengde Medical University, Chengde 067000;

<sup>2</sup>Centralab, Changshu No. 1 People's Hospital, Suzhou 215500)

**Abstract Objective** To explore the effect of sericin on podocyte epithelial-mesenchymal transition induced by

网络出版时间: 2022-11-28 18:07 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20221128.1714.013.html>

## 沉默 MFGE8 对骨肉瘤细胞 U2OS 增殖、 凋亡、侵袭及迁移的影响

李 阳<sup>1</sup> 阮铭暄<sup>1</sup> 王 震<sup>2</sup> 张香路<sup>2</sup> 黄 斐<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨乳脂肪球表皮生长因子 8 蛋白(MFGE8)在骨肉瘤细胞系中的表达及对骨肉瘤细胞(U2OS)增殖、凋亡、侵袭及迁移能力的影响。方法 利用 Western blot 方法检测 MFGE8 蛋白在正常成骨细胞及骨肉瘤细胞系中的表达; GEO 数据库分析 MFGE8 mRNA 表达与骨肉瘤患者预后的关系; 下调 MFGE8 后检测其对 U2OS 细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭的影响。结果 Western blot 方法显示 MFGE8 蛋白在骨肉瘤细胞中的表达高于正常成骨细胞, 且与骨肉瘤患者的预后呈负相关(均  $P < 0.05$ ); 与 sh-Ctrl(转染了空载组的 U2OS 细胞)组相比, sh-MFGE8(转染了 sh-MFGE8 的 U2OS 细胞)组 U2OS 细胞的愈合率及侵袭数均降低, 增殖抑制率和凋亡率均升高, 且差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论

MFGE8 在骨肉瘤细胞 U2OS 中高表达, 下调 MFGE8 可以抑制 U2OS 的增殖、侵袭及迁移, 诱导其凋亡。

**关键词** 骨肉瘤; MFGE8; 增殖; 凋亡; 侵袭; 迁移

中图分类号 R 738.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)12-1921-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.12.013

骨肉瘤是儿童与成年人中最常见的原发性恶性肿瘤之一<sup>[1-2]</sup>。当今骨肉瘤的主要治疗方式为手术切除联合术后辅助化疗, 复发率较高且预后不良<sup>[3-4]</sup>。目前, 骨肉瘤的发生发展机制仍不明确, 临床上也缺乏相关标志物的检测。因此, 明确骨肉瘤的发生发展机制, 寻找有效的分子靶点改善其预后具有重要的意义<sup>[5]</sup>。

乳脂肪球表皮生长因子 8 蛋白(milk fat globule egr and factor VIII, MFGE8)是一种存在于多物种的亲脂性糖蛋白, 其氨基末端包含一段 RGD(精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸)整合蛋白序列, RGD 序列可以与整合素异二聚体相互作用, 从而使 MFGE8 参与肿瘤细胞间黏附、信号转导等过程<sup>[6-7]</sup>。MFGE8 对骨肉瘤是否有影响目前尚无报道。该研究分析了 MFGE8 蛋白在骨肉瘤细胞系与对照组中的表达, 利用慢病毒转染干扰骨肉瘤细胞中的 MFGE8 蛋白, 观察其对骨肉瘤细胞生物学行为的影响。

2022-09-29 接收

基金项目: 安徽高校自然科学研究重点项目(编号: KJ2020A0187)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学第二附属医院骨科, 合肥 230601

<sup>2</sup>安徽医科大学第四附属医院骨科, 合肥 230012

作者简介: 李 阳, 男, 硕士研究生;

黄 斐, 男, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail:

huangfei@ahmu.edu.cn

high glucose. **Methods** Conditional immortalized mouse podocytes were used as the research object to construct podocyte injury model by high glucose stimulation. The podocytes were divided into normal (NG) group, hypertonic control (MG) group, high glucose injury (HG) group, low, medium and high dose sericin (LS, MS, HS) group. CCK-8 method was used to determine the viability of podocytes in each group; the morphological structure of podocytes in each group was observed by ordinary optical inverted microscope. The migration ability was detected by Transwell and cell scratch test. Western blot was used to detect the expression levels of EMT-related mesenchymal phenotype factors Snail,  $\alpha$ -SMA, FSP-1, MMP-9 and epithelial phenotype factors Nephrin, E-cadherin, and WT-1 in podocytes of each group. **Results** Compared with NG group, HG group showed lower podocyte activity ( $P < 0.01$ ), worse podocyte status and enhanced podocyte migration ability, up-regulated Snail,  $\alpha$ -SMA, FSP-1 and MMP-9 protein expressions ( $P < 0.01$ ), and down-regulated Nephrin, E-cadherin and WT-1 protein expressions ( $P < 0.01$ ). Compared with HG group, the viability of podocytes in sericin group increased ( $P < 0.05$ ), the state of podocytes was improved, the migration ability of podocytes was weakened, the expression of Snail,  $\alpha$ -SMA, FSP-1 and MMP-9 was down-regulated ( $P < 0.05$ ), and the expression of Nephrin, E-cadherin and WT-1 was up-regulated ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Sericin can alleviate podocyte epithelial-mesenchymal transition induced by high glucose.

**Key words** sericin; diabetic kidney disease; podocyte; epithelial-mesenchymal transition