

# 吡格列酮对糖尿病大鼠肾脏组织中干细胞标志物表达的影响\*

张业<sup>1</sup>, 严瑞<sup>1,2</sup>, 李华<sup>1</sup>, 刘畅<sup>1</sup>, 周兴艳<sup>1</sup>, 朱春玲<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附院 肾内科, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 探讨过氧化物酶增殖物激活受体  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) 的特异性激动剂吡格列酮 (PIO) 对糖尿病大鼠 (DM) 肾脏组织中干细胞标志物 CD24、CD133 表达的影响。方法: 将 24 只大鼠均分为正常对照组 (NC 组)、糖尿病组 (DM 组) 和吡格列酮喂养组 (DP 组), DM 组和 DP 组用链脲佐菌素 (STZ) 复制 DM 大鼠模型, 造模成功后 DP 组大鼠用 PIO 灌胃 8 周; 3 组大鼠饲养至 16 周时处死取肾组织, 采用 Western blot 法检测肾组织中 CD24、CD133、E 钙黏蛋白 (E-cadherin)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 及 Fibronectin 蛋白的表达; qRT-PCR 检测肾组织中 CD24 和 CD133 mRNA 的表达。结果: 与 NC 组大鼠比较, DM 组大鼠肾组织 CD24、CD133 蛋白及 mRNA、Fibronectin、 $\alpha$ -SMA 蛋白表达增多, E-cadherin 表达减少, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与 DM 组比较, DP 组大鼠肾组织 CD24、CD133 蛋白及 mRNA、Fibronectin、 $\alpha$ -SMA 蛋白表达均减少, E-cadherin 表达增多, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论: 吡格列酮可能通过抑制 EMT 的发生, 影响糖尿病肾组织纤维化程度及 CD24、CD133 的表达。

**[关键词]** 糖尿病肾病; 肾脏纤维化; 上皮细胞向间质细胞转化; 肾脏干细胞; CD24; CD133; 吡格列酮

**[中图分类号]** R586.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)05-0557-05

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.05.012

## Effect of Pioglitazone on the Expression of Stem Cell Marker in Kidney Tissue of Diabetic Rats

ZHANG Ye<sup>1</sup>, YAN Rui<sup>1,2</sup>, LI Hua<sup>1</sup>, LIU Chang<sup>1</sup>, ZHOU Xingyan<sup>1</sup>, ZHU Chunling<sup>1,2</sup>

(1. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Nephrology,

Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of peroxidase-activated agonist gamma (PPAR $\gamma$ )-specific ligand pioglitazone (PIO) on the expression of stem cell marker CD24/CD133 and its mechanism in diabetic rats (DM). **Methods:** 24 rats were divided into normal control group (NC group), diabetic group (DM group), and Pioglitazone-fed group (DP group). DM rat model of DM group and DP group was replicated with streptozotocin (STZ). After successful modeling, DP group was perfused with PIO for 8 weeks. After 16 weeks, the three groups of rats were put to death for renal tissue; Western blot was used to detect the expression of CD24, CD133, E-cadherin,  $\alpha$ -SMA and Fibronectin protein in renal tissue. Meanwhile, the expression of CD24 and CD133 mRNA changes in renal tissues were detected by qRT-PCR. **Results:** Compared with NC group, the expression of CD24, CD133 protein and mRNA,  $\alpha$ -SMA and Fibronectin protein in DM group increased, and the expression of E-cadherin protein decreased, difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Compared with DM group, the expression of CD24, CD133 protein and mRNA,  $\alpha$ -SMA and Fibronectin protein in DP group de-

\*[基金项目] 贵州省科技厅社发攻关项目[黔科合 SY 字(2014)3021 号]; 贵州省科技厅联合基金项目[黔科合 LH 字(2014)7124 号]; 贵州省卫计委科技基金项目(gzwjkj2014-1-007)

\*\*通信作者 E-mail: GYZCL@Medmail.com.cn

网络出版时间: 2019-05-28 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190528.0228.012.html>

creased, and the expression of E-cadherin increased, difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Pioglitazone may affect the degree of fibrosis and the expression of CD24 and CD133 in diabetic kidney by inhibiting the occurrence of EMT.

[**Key words**] diabetic nephropathy; renal fibrosis; epithelial mesenchymal transformation; kidney stem cell; CD24; CD133; pioglitazone

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)作为糖尿病最常见的并发症,可引起进行性肾脏纤维化,最终发展为终末期肾病<sup>[1-2]</sup>。上皮细胞向间质细胞转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是促使多种器官纤维化发生的重要进程,使正常组织及肿瘤组织中产生具有干细胞特性的细胞<sup>[3]</sup>。已有研究表明,成年人肾含有肾脏干(祖)细胞(kidney stem cell),这些细胞既可表达小管细胞标记物,又可表达足细胞标记物<sup>[4]</sup>。近来对噻唑烷酮类化合物(thiazolidinediones, TZDs)吡格列酮(pioglitazone)及其受体 PPAR- $\gamma$  的研究表明, TZDs 可通过减轻胰岛素抵抗、改善糖脂代谢及一些独立于降糖外的作用直接减轻肾脏疾病<sup>[5]</sup>。因此,本研究以糖尿病大鼠(DM)为研究对象,观察肾组织中干细胞标志物及肾脏纤维化指标的表达变化,同时观察吡格列酮是否会影响上述指标的表达水平,为吡格列酮治疗 DN 提供新的理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料与试剂

SPF 级 SD 大鼠(雄性),体质量( $185 \pm 15$ ) g (购自华阜生物有限公司,许可证号 SCXK(京)2009-0004),链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京碧云天生物公司),预染 Marker(Thermo Scientific 公司),rabbit-anti- $\beta$ -actin(巴傲得生物科技有限公司),rabbit-anti-CD24(Proteintech 公司),rabbit-anti-CD133(abcam 公司),rabbit-anti-Fibronectin、rabbit-anti-E-cadherin、rabbit-anti- $\alpha$ -SMA(Proteintech 公司),总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技公司),引物合成(上海生工公司),real-time PCR 试剂盒(Takara 公司)

### 1.2 方法

**1.2.1 动物模型建立及实验分组** SD 大鼠共 24 只,随机均分为正常组(NC 组)、糖尿病组(DM 组)及吡格列酮治疗组(DP 组)。DM 及 DP 组大鼠禁食(不禁水)12 h 后,将 1% STZ 按照 55 mg/kg

腹腔注射,72 h 后通过其尾静脉检测血糖,当血糖  $\geq 16.7$  mmol/L 提示达到成模标准。NC 组给予同等体积的柠檬酸钠缓冲液腹腔注射。DP 组模型大鼠饲养 3 周后,给予吡格列酮 10 mg/(kg·d)灌胃治疗 8 周,每周休息 1 d;NC、DM 组予同等量的生理盐水灌胃。3 组大鼠饲养至 16 周时,大鼠禁食(不禁水)12 h,麻醉后取股动脉血,4℃离心后分离出血清,测定血清葡萄糖含量;之后处死大鼠,解剖、摘除双侧肾脏用于后续检测。

**1.2.2 肾组织 CD24、CD133、E-cadherin、 $\alpha$ -SMA 及 Fibronectin 蛋白测定** 取大鼠肾组织皮质部分,加入蛋白裂解液研磨后提取出总蛋白,蛋白浓度通过 BCA 法测定。将各组蛋白质样品加至 SDS-PAGE 凝胶中,经电泳、转膜、5%脱脂牛奶封闭后,用 CD24、CD133、E-cadherin、 $\alpha$ -SMA、FN 及  $\beta$ -actin 对应的一抗(分别按照 1:800、1:600、1:1 000、1:600、1:1 000 及 1:6 000 稀释)孵育转有蛋白的 PVDF 膜,将其放置于摇床上,并在 4℃冰箱中轻度摇晃过夜;TBST 洗膜 3 次后,加入 Goat Anti-Rabbit 二抗稀释液(1:6 000)后在室温中孵育 1 h;再次用 TBST 洗膜 3 次,ECL 显色,最后曝光成像。实验结果用 Imaje J 软件检测出不同分组、不同蛋白所得条带的灰度值,以  $\beta$ -actin 的灰度值作为内参,得出目的蛋白的相对含量。

**1.2.3 肾组织中 CD24 和 CD133 mRNA 测定** 应用 Trizol 法提取大鼠肾组织的总 RNA 并测定其浓度,步骤参照北京天根公司提供说明书;选取 20  $\mu$ L 作为反转录的反应体系合成模板 cDNA,应用上海生工公司提供的 PCR 引物,采用 SYBR premix Ex TaqII 进行荧光定量 PCR。目的基因引物序列见表 1。

### 1.3 统计学方法

实验数据应用 SPSS 19.0 软件进行处理,用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示计量资料。数据通过方差齐性检验后,多组间采用单因素方差分析,两组样本比较采用 LSD 法分析比较;方差不齐则采用非参数检验 Tamhanes's  $T_2$  法。 $P < 0.05$  说明差异有统计学意义。

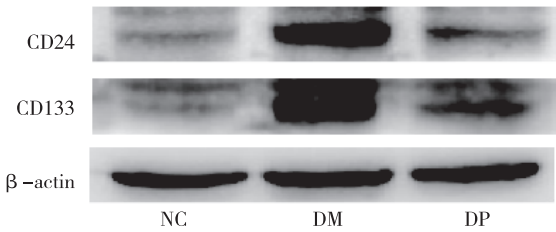
表 1 目的基因引物序列

Tab. 1	Primer sequence in real time RT-PCR	
目的基因	上游引物	下游引物
CD24	5'-CAACCAAACA	5'-AGCATTAGTTGG
	TCGGTTGCAC-3'	ATTTGGGGC-3'
CD133	5'-CCATGCTCTTAC	5'-CAGTATCGAGAC
	TTCCGGCT-3'	GGGCTTGT-3'
$\beta$ -actin	5'-ATATCGCTGCG	5'-TCTTGCTCTGGG
	CTCGTCGTC-3'	CCTCGTC-3'

2 结果

2.1 肾组织中的 CD24 和 CD133mRNA 表达

与 NC 组比较,DM 组大鼠肾组织 CD24、CD133 mRNA 表达增多,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),DP 组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与 DM 组比较,DP 组两种 mRNA 表达显著减少( $P < 0.05$ )。见图 1。



(<sup>1</sup>)与 NC 组比较, $P < 0.05$ ; (<sup>2</sup>)与 DM 组比较,  $P < 0.05$   
图 2 各组大鼠肾组织 CD24 和 CD133 蛋白表达

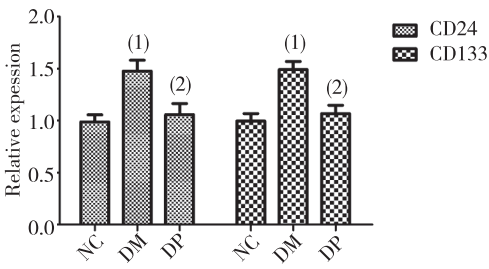
Fig. 2 The protein expression of CD24 and CD133 in renal tissues in each group

2.3 肾组织中 E-cadherin、 $\alpha$ -SMA 及 Fibronectin 蛋白表达

与 NC 组比较,DM 组大鼠肾组织 Fibronectin、 $\alpha$ -SMA 蛋白表达增多,E-cadherin 表达减少,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),DP 组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与 DM 组比较,DP 组大鼠肾组织 Fibronectin、 $\alpha$ -SMA 蛋白表达减少,E-cadherin 表达增多,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ) ,见图 3。

3 讨论

糖尿病肾病的病理发展包括肾小球硬化和肾小管间质的纤维化。在促纤维化因子及炎性因子作用下可发生肾小管 EMT<sup>[6]</sup>,并引起细胞外基质(extracellularmatrix,ECM)的过度沉积。纤维蛋白是细胞外基质的框架,主要包括胶原蛋白(colla-



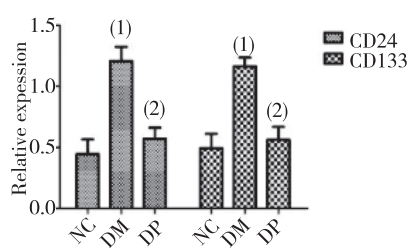
(<sup>1</sup>)与 NC 组比较, $P < 0.05$ ; (<sup>2</sup>)与 DM 组比较,  $P < 0.05$

图 1 各组大鼠肾组织 CD24 和 CD133 mRNA 表达

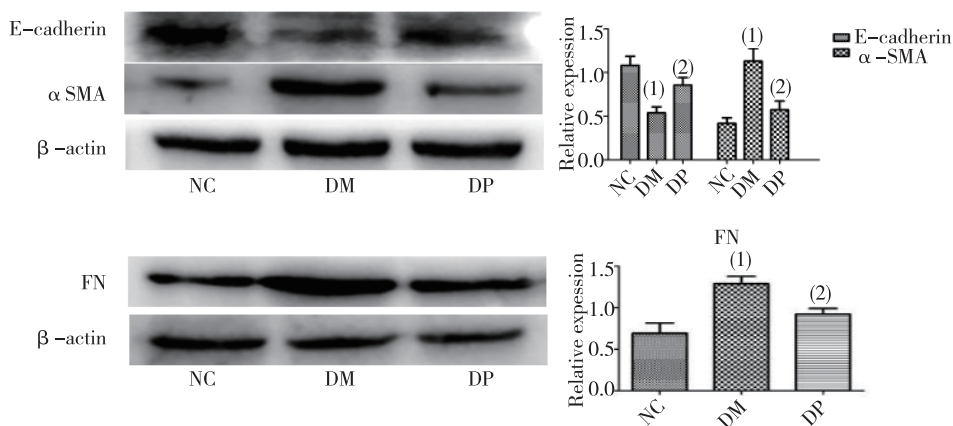
Fig. 1 Expression of CD24 mRNA and CD133 mRNA in kidney tissue in each group

2.2 CD24 和 CD133 蛋白表达

与 NC 组比较,DM 组大鼠肾组织 CD24、CD133 蛋白表达增多,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),DP 组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与 DM 组比较,DP 组大鼠肾组织两种蛋白表达均减少,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 2。



gen)、纤连蛋白(fibronectin)和弹性蛋白(elastin),它们可作为预测 ECM 沉积的因子<sup>[7]</sup>。有研究证实<sup>[4,8]</sup>,成年人肾脏组织中存在干/祖细胞区室,如 Bowman's 囊中的 CD24<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>细胞。在不同的急性肾损伤(AKI)小鼠模型中都证实了此类细胞在肾脏修复中的作用:输注后可以降低小鼠的死亡率,改善肾功能<sup>[9]</sup>。在阿奇霉素所致慢性肾损伤小鼠模型中证实,上述细胞可产生新的肾小管上皮细胞及足细胞,并且在急性或慢性肾脏损伤的患者肾脏组织中发现 CD24<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>细胞增殖活跃<sup>[10]</sup>。但目前对肾脏干细胞的研究大多集中在对胚胎肾、急性肾损伤模型及外源性干细胞治疗方式,在成体及慢性肾损伤中是否存在干细胞仍有争议<sup>[11]</sup>。Kusaba<sup>[12]</sup>通过对细胞损伤和修复的克隆分析认为,干细胞标记物的产生是由于终末分化的上皮细胞在损伤后发生了去分化,使其在间充质状态期间



(<sup>1</sup>) 与 NC 组比较,  $P < 0.05$ ; (<sup>2</sup>) 与 DM 组比较,  $P < 0.05$

图3 各组大鼠肾组织中 E-cadherin、 $\alpha$ -SMA 及 Fibronectin 的表达

Fig. 3 The protein expression of E-cadherin、 $\alpha$ -SMA and Fibronectin in kidney tissues in each group

发生了再表达,而不是干细胞群的功能体现。CD24、CD133 可表达于多种细胞,并作为多数器官和肿瘤组织中干/祖细胞的表面抗原标志物<sup>[13]</sup>。

EMT 分为 1 型参与胚胎形成及器官发育,2 型参与组织再生与创伤、炎症后的修复和 3 型参与肿瘤相关疾病 3 种类型<sup>[14]</sup>。有研究证实,在肺组织<sup>[15]</sup>、乳腺组织<sup>[16]</sup>及皮肤组织<sup>[16]</sup>中,EMT 的发生可诱导细胞获得干性特征,使已分化的细胞表现出类似干/祖细胞增殖克隆和自我更新的特性,但它们的增殖种类与分化方向不定<sup>[17]</sup>。在 EMT 发生过程中,具有上皮表型特征的 E-钙黏蛋白(E-cadherin)可表达下调,具有成纤维表型特征的  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)可上调<sup>[18]</sup>。大量研究证实,在 STZ 诱导的糖尿病鼠中,噻唑烷二酮类药物可通过调节糖代谢、脂代谢对肾脏产生间接保护作用<sup>[19]</sup>;还可通过直接保护肾脏血管内皮细胞及减轻足细胞损伤,抑制肾脏系膜的增生,防止肾小球硬化,抑制肾小管的间质纤维化<sup>[20]</sup>。而在 DM 大鼠中,吡格列酮是否可通过抑制 EMT 的进程,减轻肾脏纤维化,并影响肾脏干细胞标志物的表达目前尚不清楚。

因此,为了探讨吡格列酮对肾脏中干细胞标志物表达的影响,本研究采用腹腔注射 STZ 的方法复制大鼠 DN 模型,用 Westernblot、Real-time PCR 的方法检测 CD24、CD133、E-cadherin、 $\alpha$ -SMA、Fibronectin 蛋白及 CD24、CD133mRNA 的表达变化。实验发现,DM 大鼠肾组织中肾脏纤维化标志物 Fibronectin 蛋白表达增加,肾小管上皮细胞表型标

志物 E-cadherin 蛋白减少而纤维细胞标志物  $\alpha$ -SMA 蛋白大量表达,与之伴随的是 CD24、CD133 蛋白及 mRNA 表达上调;而在 DP 大鼠肾组织中发现 Fibronectin、 $\alpha$ -SMA 蛋白、CD24、CD133 蛋白及 mRNA 表达均下降,E-cadherin 蛋白表达增多。因此,本实验认为 CD24、CD133 参与了肾脏纤维化的进程。由此猜测,在糖尿病大鼠肾组织中,EMT 的发生可诱导已分化的上皮细胞转分化至间充质细胞,这类细胞获得了扩增和迁移等干细胞特征,并且可表达干细胞标志物,它们可能分化成了肌成纤维细胞,分泌细胞外基质,导致肾脏纤维化的发生。同时,成体肾脏干细胞只有在肾脏发挥修复作用时才可由静止状态转向增殖状态<sup>[21]</sup>。Lasagni 等<sup>[22]</sup>发现,在局灶性肾小球硬化症的小鼠模型中,阻断 Notch 通路可减轻肾小球损伤,但会引起干细胞的增殖减少。随着糖尿病肾病的进展,可能使 CD24<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>细胞等肾脏干细胞的激活,这类细胞在体内发生了增殖与分化,一定程度上参与修复肾脏固有细胞的损伤,最终大鼠肾脏纤维化的程度可能取决于肾脏固有细胞的死亡与肾脏干/祖细胞的再生之间的平衡。而吡格列酮可能通过抑制 EMT 进程,使具有干性特征的间充质细胞及其分化的肌成纤维细胞减少,从而减轻了肾脏纤维化程度,同时也使肾脏干细胞的增殖减少。

综上,在 DN 条件下,大鼠肾组织中干细胞标志物 CD24、CD133 的表达变化可能与 EMT 有关,同时证实了吡格列酮可抑制 EMT、减轻肾脏纤维化并影响肾脏干细胞标志物的表达水平。今后,将通

过体外实验及基因干预的方法,从而较为全面、直接地研究肾脏干细胞的作用及吡格列酮在其中发挥的作用。

## 4 参考文献

- [1] ZEJUN M, LIH Z, YAN L, et al. Lovastatin alleviates endothelial-to-mesenchymal transition in glomeruli via suppression of oxidative stress and TGF- $\beta$ 1 signaling[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2017, 8:473.
- [2] JIANAN G, XIAOYAN Y, CHUNYU L, et al. Herba artemisiae capillaris extract prevents the development of streptozotocin-induced diabetic nephropathy of rat[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, (2018):1-13.
- [3] MANI S A, GUO W, LIAO M J, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells[J]. *Cell*, 2008, 133(4):704-715.
- [4] RONCONI E, SAGRINATI C, ANGELOTTI M L, et al. Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2009, 20(2):322-332.
- [5] MAEHIRA F, ISHIMINE N, MIYAGI I, et al. Anti-diabetic effects including diabetic nephropathy of anti-osteoporotic trace minerals on diabetic mice[J]. *Nutrition*, 2011, 27(4):488-495.
- [6] ALLISON, SUSAN J. Fibrosis:targeting EMT to reverse renal fibrosis[J]. *Nature Reviews Nephrology*, 2015, 11(10):565-570.
- [7] DORMANDY J A, CHARBONNEL B, ECKLAND D J A. Secondary prevention of macro vascular events in patients with type II diabetes in the proactive study (prospective pioglitazone clinical trial and macro vascular events): A randomised controlled trial[J]. *Journal of Vascular Surgery*, 2006, 43(3):639-640.
- [8] SALLUSTIO F, COSTANTINO V, COX S N, et al. Human renal stem/progenitor cells repair tubular epithelial cell injury through TLR2-driven inhibin-A and microvesicle-shuttled decorin[J]. *Kidney International*, 2013, 83(3):392-403.
- [9] PO-TSANG L, LIN H, JIANG S, et al. Mouse kidney progenitor cells accelerate renal regeneration and prolong survival after ischemic injury[J]. *Stem Cells*, 2010, 28(3):12.
- [10] ANGELOTTI M L, RONCONI E, BALLERINI L, et al. Characterization of renal progenitors committed toward tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury[J]. *Stem Cells*, 2012, 30(8):1714-1725.
- [11] LITTLE M H, BERTRAM J F. Is There such a thing as a renal stem cell[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2009, 20(10):2112-2117.
- [12] KUSABA T, LALLI M, KRAMANN R, et al. Differentiated kidney epithelial cells repair injured proximal tubule[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(4):1527-1532.
- [13] WALLER T E, BRAY R, WARNKE R, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning[J]. *Blood*, 1997, 90(12):5013-5021.
- [14] THIERY J P, ACLOQUE, HUANG R Y, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. *Cell*, 2009, 139(5):871-890.
- [15] VAUGHAN A E, CHAPMAN H A. Regenerative activity of the lung after epithelial injury[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2013, 1832(7):922-930.
- [16] LYSY P A, SMETS F, SIBILLE C, et al. Human skin fibroblasts: from mesodermal to hepatocyte-like differentiation[J]. *Hepatology*, 2007, 46(5):1574-1585.
- [17] NIETO M A, HUANG R Y, JACKSON R A, et al. EMT: 2016[J]. *Cell*, 2016, 166(1):21-45.
- [18] SUN Y B, QU X, CARUANA G, et al. The origin of renal fibroblasts/myofibroblasts and the signals that trigger fibrosis[J]. *Differentiation*, 2016, 92(3):102-107.
- [19] ISSHIKI K, HANEDA M, KOYA D, et al. Thiazolidinedione compounds ameliorate glomerular dysfunction independent of their insulin-sensitizing action in diabetic rats[J]. *Diabetes*, 2000, 49(6):1022.
- [20] KURU KARABAS M, AYHAN M, GUNEY E, et al. The effect of pioglitazone on antioxidant levels and renal histopathology in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *ISRN Endocrinology*, 2013, 2013:1-8.
- [21] GRANDE M T, SÁNCHEZ-LAORDEN, BERTA, et al. Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease[J]. *Nature Medicine*, 2015, 27(8):237-243.
- [22] LASAGNI L, BALLERINI L, ANGELOTTI M L, et al. Notch activation differentially regulates renal progenitors proliferation and differentiation toward the podocyte lineage in glomerular disorders[J]. *Stem Cells*, 2010, 28(9):12.

(2019-02-19 收稿, 2019-04-28 修回)  
中文编辑: 刘平; 英文编辑: 赵毅