

5-氮杂-2'-脱氧胞苷对高糖培养的 NRK-52E 细胞中分泌型卷曲相关蛋白 1 表达的影响

田平平¹, 宁洁¹, 邹琴^{2,3}, 卢雨微², 郭兵^{2,3}, 石明隽^{2,3*}

(1. 新乡医学院三全学院 护理学院, 河南 新乡 453003; 2. 贵州医科大学 病理生理学教研室, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州省常见慢性疾病发病机制及药物研究重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

摘要:目的 检测 DNA 甲基转移酶抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)干预肾小管上皮细胞(NRK-52E)后对分泌型卷曲相关蛋白 1(Sfrp1)表达变化的影响。方法 将 SD 大鼠随机分为正常组(NC 组)和糖尿病肾病组(DN 组),DN 组建模^[1-2]10 周后检测相关生化指标、计算肾脏指数(KI);免疫组化法检测肾组织中 Sfrp1 的表达;将 NRK-52E 细胞分为正常糖组(NG,葡萄糖 5.5 mmol/L)、高糖组(HG,葡萄糖 30 mmol/L)和高糖加 5-Aza-CdR 组(5-Aza-CdR 组,80 μ mol/L),用 Western blot 检测 Sfrp1、DNA 甲基转移酶(Dnmt)3a、Dnmt3b、col-III 和 col-IV 蛋白的表达;RT-qPCR 检测 Sfrp1 mRNA 的表达;Pearson 检验分析 Sfrp1 与 Dnmt3a、Dnmt3b、col-III 及 col-IV 的相关性。结果 DN 组大鼠 KI、血糖(BG)、24 h 尿蛋白(24 h UP)、肌酐水平均高于 NC 组。与 NC 组比,DN 组肾组织中 Sfrp1 表达明显降低。与 NG 组比,HG 组 Sfrp1 mRNA 和蛋白表达减少($P < 0.05$),Dnmt3a、Dnmt3b、col-III 和 col-IV 蛋白表达增加($P < 0.05$);与 HG 组相比,5-Aza-CdR 组 Sfrp1 mRNA 和蛋白表达增多($P < 0.05$);Dnmt3a、Dnmt3b、col-III 和 col-IV 蛋白表达减少($P < 0.05$);Sfrp1 与 Dnmt3a($r = -0.937, P < 0.05$)、Dnmt3b($r = -0.965, P < 0.05$)、col-III($r = -0.694, P < 0.05$)和 col-IV($r = -0.888, P < 0.05$)均呈负相关。结论 5-氮杂-2'-脱氧胞苷可能通过降低 Dnmt3a 和 Dnmt3b 表达,进而使 Sfrp1 表达升高。

关键词: 5-氮杂-2'-脱氧胞苷;DNA 甲基转移酶 3a;DNA 甲基转移酶 3b;分泌型卷曲相关蛋白 1;肾脏纤维化
中图分类号:R34 文献标志码:A

DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.2022.08.1194

Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on the expression of Sfrp1 in NRK-52E cells cultured with high glucose

TIAN Ping-ping¹, NING Jie¹, ZOU Qin^{2,3}, LU Yu-wei², GUO Bing^{2,3}, SHI Ming-jun^{2,3*}

(1. School of Nursing, Sanquan College of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003; 2. Department of Pathophysiology, Guizhou Medical University, Guiyang 550025; 3. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pathogenesis & Drug Research on Common Chronic Diseases, Guiyang 550025, China)

Abstract: Objective To detect expression changes of Sfrp1 in NRK-52E cells after 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) intervention. **Methods** Sprague-Dawley (SD) rats were divided into normal group (NC group) and diabetic nephropathy group (DN group) randomly. The related biochemical indexes were detected after successfully modeling^[1-2] for 10 weeks; kidney index (KI) was calculated; the expression of Sfrp1 in renal tissue was detected by

收稿日期:2021-09-15 修回日期:2022-04-26

基金项目:国家自然科学基金(82060142,81860135)

* 通信作者 (corresponding author): smjtyf@126.com

immunohistochemistry. NRK-52E cells were divided into normal glucose group (NG, 5.5 mmol/L), high glucose group (HG, 30 mmol/L) and high glucose + 5-Aza-CdR group (5-Aza-CdR group); the expressions of Sfrp1, Dnmt3a, Dnmt3b, col-III and col-IV were detected by Western blot; the mRNA expression of Sfrp1 was detected by RT-qPCR; pearson test was used to analyze the correlation between Sfrp1 and Dnmt3a, Dnmt3b, col-III or col-IV. **Results** The level of KI, blood glucose, 24 h urinary protein and creatinine in DN group were all higher than those in NC group. The expression of Sfrp1 in renal tissue of DN group was significantly lower than that of NC group. The results of *in vitro* experiments showed as follows: the mRNA and protein expression of Sfrp1 were decreased in HG group ($P < 0.05$), while the protein expressions of Dnmt3a, Dnmt3b, col-III and col-IV in HG group were increased ($P < 0.05$); compared with HG group, the mRNA and protein expression of Sfrp1 was increased in 5-Aza-CdR group ($P < 0.05$), the protein expressions of Dnmt3a, Dnmt3b, col-III and col-IV in 5-Aza-CdR group were decreased ($P < 0.05$); Sfrp1 was negatively correlated with Dnmt3a ($r = -0.937$, $P < 0.05$), Dnmt3b ($r = -0.965$, $P < 0.05$), col-III ($r = -0.694$, $P < 0.05$) and col-IV ($r = -0.888$, $P < 0.05$). **Conclusions** The mechanism through which 5-Aza-2'-deoxycytidine inhibits renal fibrosis is potentially related to the reduction of Dnmt3a and Dnmt3b expression and the increase of Sfrp1 expression.

Key words: 5-Aza-2' deoxycytidine (5-Aza-CDR); DNA methyltransferase 3a (Dnmt3a); DNA methyltransferase 3b (Dnmt3b); secreted frizzled-related protein 1 (Sfrp1); renal fibrosis

肾脏纤维化是慢性肾脏疾病发展的常见病理过程。各种致病因素刺激使肾脏细胞不断分泌炎症介质及细胞因子等,促进细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的分泌与沉积,最终引起肾脏结构和功能的改变^[3]。

分泌型卷曲相关蛋白 1 (secreted frizzled-related protein 1, Sfrp1) 属于分泌型糖蛋白。本课题组研究发现,在糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)大鼠肾组织中,Sfrp1 表达减少可能参与肾脏纤维化的发生^[4]。也有研究发现,Sfrp1 甲基化与多种肿瘤的发生密切相关,其中 DNA 甲基化转移酶(DNA methyltransferase, Dnmts) 扮演着重要角色^[5-6]。Dnmts 共包含 Dnmt1、Dnmt2、Dnmt3a、Dnmt3b 和 Dnmt3l 5 个成员。在哺乳动物中,参与甲基化调节的主要有 Dnmt1、Dnmt3a 和 Dnmt3b^[7]。5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR) 是一种 DNA 甲基转移酶抑制剂,可共价结合 Dnmts,调节基因表达。

本研究拟从体外水平,利用 5-Aza-CdR 干预 NRK-52E 细胞,观察 Sfrp1、Dnmt3a、Dnmt3b、col-III 及 col-IV 在各组细胞中的表达变化,探讨 Dnmt3a、Dnmt3b、col-III 及 col-IV 与 Sfrp1 的关系以及 Sfrp1 在 DN 肾脏纤维化发病中的作用及意义,为 DN 的治疗

提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物:清洁级雄性 SD 大鼠 16 只,体质量 (180 ± 20)g [辽宁长生生物技术有限公司,生产许可证号:SCKK(辽)2015-0001]。

1.1.2 细胞:大鼠近端肾小管上皮细胞系(NRK-52E 细胞),购于美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)。

1.1.3 试剂及试剂盒:链脲佐菌素(streptozotocin, STZ),5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR),小鼠抗大鼠 col-IV 单克隆抗体(Sigma-Aldrich 公司);两步法免疫组化检测试剂盒(北京中杉金桥公司);胎牛血清、DMEM 培养基和 0.25% 胰蛋白酶(Gibco Introvagen 公司);蛋白提取试剂盒(北京索莱宝公司);小鼠抗大鼠 β -actin 单克隆抗体(武汉普美克生物技术有限公司);兔抗大鼠 Dnmt3a、Dnmt3b、Sfrp1 和 col-III 多克隆抗体(北京博奥森公司);Trizol Regent(Ambion 公司);Sfrp1 和 β -actin 引物(上海生工生物技术工程服务有限公司);Revert Aid™ Firststrand cDNA Synthesis Kit(Thermo Fisher Scientific 公司);2×Super-

Real PreMix Plus(天根生化科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 DN 模型大鼠复制:模型复制方法参照文献^[1-2]。造模前禁食 6~8 h, DN 组尾静脉注射 STZ 55 mg/kg, NC 组尾静脉注射等量的无菌柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。72 h 后尾静脉采血检测各组大鼠血糖值,以血糖值 ≥ 16.7 mmol/L 为糖尿病动物模型(DM 模型)大鼠复制成功。1 周后,对各组大鼠行尿蛋白定性检测,结果阳性视为 DN 模型构建成功。10 周后乙醚麻醉大鼠,处死前 1 d 称重,留取 24 h 尿液;股动脉穿刺采血,离心后取血清;0.9% NaCl 冲洗肾脏至苍白色,称重并记录肾重(mg)/体质量(g)比值即肾脏指数(kidney index, KI);一侧肾脏固定于 4% 中性甲醛溶液中进行病理学相关检测;另一侧肾于 -80 °C 保存备用。

1.2.2 生化指标的检测:氧化酶法测血清葡萄糖(blood glucose, BG)浓度;邻苯三酚比色法测尿蛋白浓度,尿蛋白浓度与 24 h 尿量乘积为 24 h 尿蛋白(24 h urine protein, 24 h UP);酶分析法检测血清肌酐水平。

1.2.3 免疫组织化学染色:按照免疫组织化学染色说明书进行:脱蜡、水化、阻断内源性过氧化物酶、抗原修复、滴加一抗、二抗孵育、DAB 显色、复染、梯度乙醇脱水。自然晾干后,用二甲苯稀释后的中性树脂封片,光学显微镜下观察并拍照保存。

1.2.4 细胞的分组:待 NRK-52E 细胞增殖汇合度至 90% 时,弃上清,0.25% 胰蛋白酶消化,待细胞变圆加入 DMEM 培养基,吹打均匀,离心,加培养基重悬。将 NRK-52E 细胞随机分为正常糖组(NG, 葡萄糖 5.5 mmol/L)、高糖组(HG, 葡萄糖 30 mmol/L)和高糖加 5-Aza-CdR (80 μ mol/L)组(5-Aza-CdR 组),3 组细胞置 37 °C、5% CO₂ 温箱培养 48 h,提取蛋白和 RNA 备用。

1.2.5 Western blot 检测蛋白:用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测蛋白浓度,制备上样蛋白样品,SDS-PAGE 分离,并转至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶封闭 1 h,一抗孵育,浓度分别为 β -actin (1 : 4 000)、Dnmt3a (1 : 500)、Dnmt3b (1 : 500)、Sfrp1 (1 : 500)、col-III (1 : 500) 及 col-IV (1 : 1 000);4 °C 冰箱孵育过夜;1% 脱脂牛奶配置的二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜后, ECL 液显色, Bio-Rad 凝胶成像系统扫描检测

PVDF 膜上的目的蛋白曝光度, Image Lab 5.1 图像分析软件分析蛋白信号的相对含量,以 β -actin 为内参,计算各目标蛋白的相对含量。

1.2.6 RT-qPCR 检测 mRNA: Trizol 法提取各组 NRK-52E 细胞总 RNA,按照 RevertAid™ Firststrand cDNA Synthesis Kit 说明书反转录 cDNA,按照 Talent qPCR PreMix (SYBR Green) 说明书行 RT-qPCR,引物序列见表 1。mRNA 的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 Sequence of primers used in RT-qPCR

gene	sequence(5'-3')
β -actin	F:GCCAACACAGTGTGTCT
	R:AGGAGCAATGATCTTGATCTT
Sfrp1	F:CTCTCCAAGTGGCAGAGGAC
	R:GAGGACACTCGCTGGAGTTC

1.3 统计学分析

SPSS17.0 和 GraphPad Prism5 统计软件,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较先进行正态性检验,再采用独立样本 *t* 检验;相关性分析采用 Pearson 相关分析。

2 结果

2.1 各组大鼠肾脏指数及相关生化指标

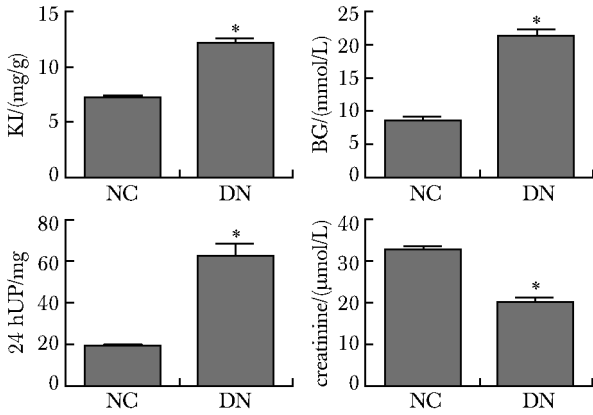
与 NC 组比较, DN 组大鼠 KI 较高 ($P < 0.05$); DN 组大鼠 BG、24 hUP、肌酐水平较 NC 组升高 ($P < 0.05$) (图 1)。提示 DN 模型大鼠复制成功。

2.2 免疫组织化学检测结果

可清晰检测出 Sfrp1 蛋白在肾脏组织中的表达位置和表达量。可见 Sfrp1 蛋白阳性表达呈棕红色,细胞核呈蓝色。结果显示, NC 组 Sfrp1 阳性表达主要分布于肾小管上皮细胞,而 DN 组大鼠 Sfrp1 表达不明显(图 2)。

2.3 5-Aza-CdR 干预高糖培养的 NRK-52E 细胞后, Sfrp1 表达恢复

与 NC 组比, HG 组 Sfrp1 蛋白表达减少 ($P < 0.05$), 而给予 5-Aza-CdR 干预后, Sfrp1 蛋白表达较 HG 组增多 ($P < 0.05$) (图 3)。RT-qPCR 结果与蛋白表达水平结果趋向一致 ($P < 0.05$) (图 4)。



*P<0.05 compared with NC group

图 1 两组大鼠 KI、BG、24 h UP、肌酐水平比较

Fig 1 Comparison of kidney index, blood glucose, 24 h urinary protein and creatinine levels between the two groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

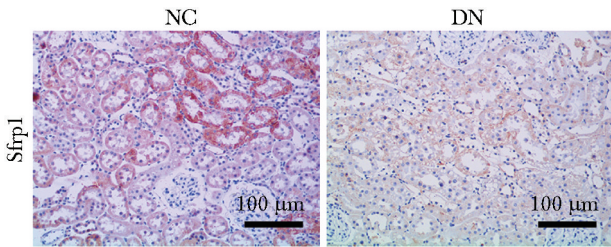
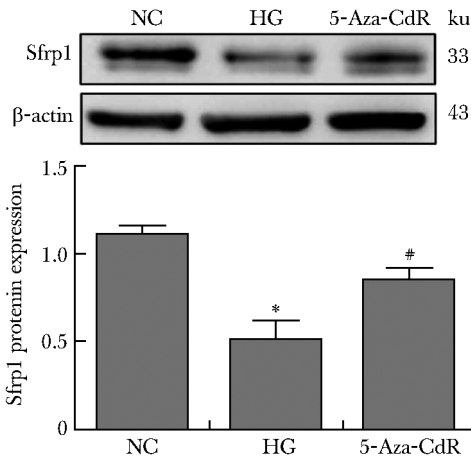


图 2 两组大鼠肾脏组织中 Sfrp1 的表达

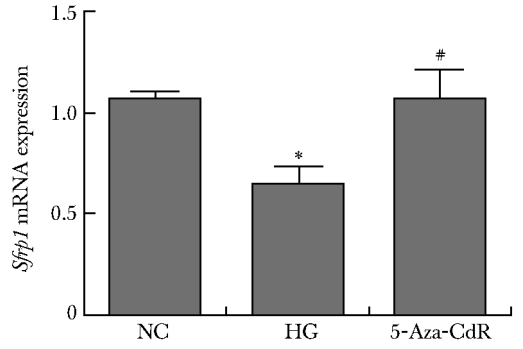
Fig 2 Expression of Sfrp1 in kidney tissues between the two groups of rats



*P<0.05 compared with NC group; #P<0.05 compared with HG group

图 3 各组细胞中 Sfrp1 蛋白表达量的比较

Fig 3 Comparison of Sfrp1 protein expression in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)



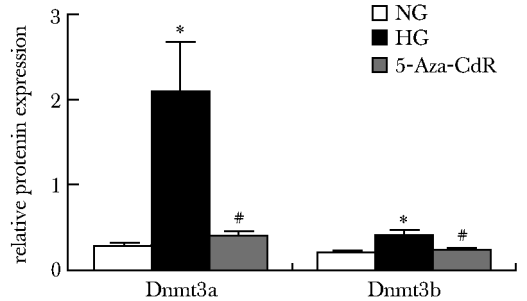
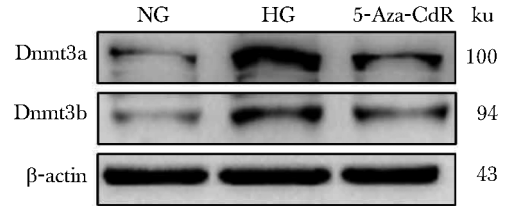
*P<0.05 compared with NC group; #P<0.05 compared with HG group

图 4 各组细胞中 Sfrp1 mRNA 表达量的比较

Fig 4 Comparison of Sfrp1 mRNA expression in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

2.4 5-Aza-CdR 干预高糖培养的 NRK-52E 细胞后, Dnmt3a 和 Dnmt3b 蛋白表达减少

与 NC 组比, HG 组 Dnmt3a 和 Dnmt3b 蛋白表达增多 ($P<0.05$), 而与 HG 组比, 5-Aza-CdR 组 Dnmt3a 和 Dnmt3b 蛋白表达减少 ($P<0.05$) (图 5)。



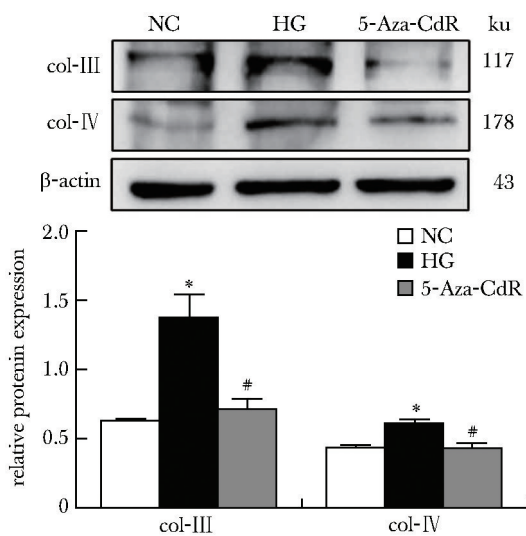
*P<0.05 compared with NC group; #P<0.05 compared with HG group

图 5 各组细胞中 Dnmt3a、Dnmt3b 蛋白表达量的比较

Fig 5 Comparison of Dnmt3a, Dnmt3b protein expression in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

2.5 5-Aza-CdR 干预高糖培养的 NRK-52E 细胞后, col-III 和 col-IV 蛋白表达减少

与 NC 组比, HG 组 col-III 和 col-IV 蛋白表达增多 ($P<0.05$); 而与 HG 组比, 5-Aza-CdR 组 col-III 和 col-IV 蛋白表达减少 ($P<0.05$) (图 6)。



* $P < 0.05$ compared with NC group; # $P < 0.05$ compared with HG group

图6 各组细胞中相关蛋白表达的比较

Fig 6 Comparison of related proteins expression in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

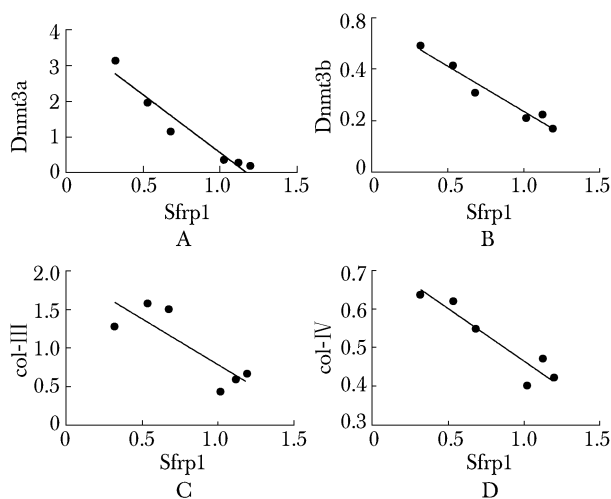
2.6 Sfrp1 与 Dnmt3a、Dnmt3b、col-III 及 col-IV 蛋白表达量呈负相关

肾小管上皮细胞中 Sfrp1 与 Dnmt3a ($r = -0.937, P < 0.05$)、Dnmt3b ($r = -0.965, P < 0.05$)、col-III ($r = -0.694, P < 0.05$) 及 col-IV ($r = -0.888, P < 0.05$) 均呈负相关 (图 7)。

3 讨论

随着全球人口老龄化的加速,DM 已成为影响人类健康的重大问题。DN 是 DM 的主要微血管并发症。研究表明,表观遗传机制所介导的基因调控与 DN 的发生发展密切相关^[8-9]。表观遗传学涉及 DNA 甲基化、组蛋白修饰、微小 RNA、染色质重塑等^[10]。近年来 DNA 甲基化受到研究者的广泛关注。

Dnmts 是 DNA 甲基化过程中的关键酶,通过其催化作用参与 DNA 甲基化修饰^[11-12]。在哺乳动物中,Dnmt1、Dnmt3a 和 Dnmt3b 具有催化活性,其异常表达可影响 DNA 甲基化水平和后期转录合成^[4]。本课题组前期研究结果发现^[7],在糖尿病肾脏疾病大鼠肾组织中,Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b、Dnmt31



A. correlation between Sfrp1 and Dnmt3a; B. correlation between Sfrp1 and Dnmt3b; C. correlation between Sfrp1 and col-III; D. correlation between Sfrp1 and col-IV

图7 Sfrp1 与 Dnmt3a、Dnmt3b、col-III、col-IV 蛋白表达相关

Fig 7 Correlation between Sfrp1 and protein expression of Dnmt3a, Dnmt3b, col-III and col-IV

表达增高。其中,Dnmt3a 和 Dnmt3b 与 Sfrp1 的相关性更明显。本次体外实验结果显示 Dnmt3a、Dnmt3b 与 Sfrp1 呈负相关,与前期结果一致。

研究发现^[13-14],Sfrp1 在直肠癌、肾癌等肿瘤疾病中处于高甲基化水平,低表达状态。本次实验以 NRK-52E 细胞为研究对象,将细胞分为 NC、HG 和 5-Aza-CdR 组。结果发现,5-Aza-CdR 组 Dnmt3a 和 Dnmt3b 表达较 HG 组降低,且在一定程度上恢复了 Sfrp1 的表达。同时 5-Aza-CdR 组 NRK-52E 细胞纤维化程度降低到接近正常细胞水平,提示 Dnmt3a 和 Dnmt3b 可能与 Sfrp1 甲基化有关,并影响肾脏纤维化的发生。此次实验结果显示 col-III、col-IV 与 Sfrp1 呈负相关。提示,Sfrp1 表达降低可能导致肾脏纤维化时细胞外基质沉积增多。

综上所述,5-Aza-CdR 可能通过抑制 Dnmt3a、Dnmt3b 的表达,改善肾脏纤维化,其机制可能与抑制 Sfrp1 甲基化,恢复 Sfrp1 表达有关,但 Dnmt3a、Dnmt3b 与 Sfrp1 的具体作用位点仍需进一步实验研究。

参考文献:

- [1] Yuan H, Zhang X, Zheng W, *et al.* Minocycline attenuates kidney injury in a rat model of streptozotocin induced diabetic nephropathy [J]. *Biol Pharm Bull*, 2016, 39:1231-1237.
- [2] 田平平, 刘忠强, 孔静, 等. DNA 甲基转移酶及分泌型卷曲相关蛋白 1 在糖尿病肾脏疾病大鼠肾组织中的表达研究 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2018, 26:594-598.
- [3] Calle P, Hotter G. Macrophage phenotype and fibrosis in diabetic nephropathy [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21:1-14.
- [4] 孔静, 田平平, 李圆圆, 等. Wnt4 及其抑制因子在糖尿病肾病大鼠肾组织中的表达 [J]. *基础医学与临床*, 2018, 38:194-199.
- [5] Kadian LK, Yadav R, Nanda S, *et al.* High-risk HPV infection modulates the promoter hypermethylation of APC, SFRP1, and PTEN in cervical cancer patients of North India [J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47:9725-9732.
- [6] 王礼贤, 李琰, 康山. DNA 甲基化转移酶 DNMTs 和甲基化结合蛋白 MBDs 在卵巢子宫内膜异位症中的表达及相关性研究 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2020, 49:312-317.
- [7] Giri AK, Aittokallio T. DNMT inhibitors increase methylation in the cancer genome [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10:1-11.
- [8] Li Y, Ren D, Shen Y, *et al.* Altered DNA methylation of TRIM13 in diabetic nephropathy suppresses mesangial collagen synthesis by promoting ubiquitination of CHOP [J]. *EBioMedicine*, 2020, 51:1-13.
- [9] Shi M, Tian P, Liu Z, *et al.* MicroRNA-27a targets Sfrp1 to induce renal fibrosis in diabetic nephropathy by activating Wnt/ signalling [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40:1-13.
- [10] 李亚东, 张红霞, 张亚霞. 肝癌的表观遗传学研究进展 [J]. *生命的化学*, 2021, 41:1763-1769.
- [11] 肖泉, 王艳林, 黄利鸣. DNA 甲基转移酶与肿瘤关系的研究进展 [J]. *生命科学*, 2019, 31:87-92.
- [12] Milena J, Ivana N, Dejan N, *et al.* Genetic and epigenomic modifiers of diabetic neuropathy [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22:1-19.
- [13] Dobre M, Salvi A, Pelisenco IA, *et al.* Crosstalk between DNA methylation and gene mutations in colorectal cancer [J]. *Front Oncol*, 2021, 11:1-8.
- [14] Kubiliute R, Zalimas A, Bakavicius A, *et al.* Clinical significance of ADAMTS19, BMP7, SIM1, and SFRP1 promoter methylation in renal clear cell carcinoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2021, 5:4979-4990.