

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240144

· 论 著 ·

米扎格列净通过抑制钠-葡萄糖共转运体1的功能抑制常染色体显性多囊肾细胞增殖和纤维化

刘雯瑜^{1,2}, 吴双成¹, 张天琛³, 付莉莉¹, 解良瑜¹, 胡菀芊¹, 郝胜强^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)第二附属医院肾脏病科, 上海 200003

2. 中国人民解放军联勤保障部队北戴河康复疗养中心肾脏病科, 秦皇岛 066000

3. 海军军医大学(第二军医大学)第一附属医院病理科, 上海 200433

[摘要] **目的** 探究钠-葡萄糖共转运体1(SGLT1)抑制剂米扎格列净(MIZA)在常染色体显性多囊肾病(ADPKD)中的作用。**方法** 用蛋白质印迹法、qPCR、免疫荧光染色测定 $PKDI^{-/-}$ 小鼠和 $PKDI^{+/+}$ 小鼠肾脏组织、人肾癌旁组织和人ADPKD组织中SGLT1的表达和分布。用MIZA处理囊肿衬里上皮细胞OX161和肾小管上皮细胞UCL93, 37℃孵育24、48和72 h后通过MTT实验和集落形成实验观察细胞增殖情况。以100 μmol/L MIZA处理OX161细胞48 h后, 通过qPCR测定细胞中α1-I型胶原蛋白、α1-III型胶原蛋白和纤连蛋白1的mRNA表达量。用犬肾细胞MDCK 3D囊肿形成实验验证MIZA对囊肿形成的作用。通过mRNA-seq数据分析筛选UCL93细胞和OX161细胞、OX161细胞和100 μmol/L MIZA处理48 h后的OX161细胞的差异表达基因, 利用京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库进行通路富集分析。**结果** SGLT1在ADPKD患者和 $PKDI^{-/-}$ 小鼠多囊肾组织中的表达水平较正常肾脏组织升高($P<0.05$, $P<0.01$), 免疫荧光染色发现SGLT1主要表达在囊肿衬里上皮细胞。在体外实验中, MIZA呈浓度和时间依赖性地抑制多囊肾细胞的增殖和纤维化, 3D形成实验表明MIZA抑制了囊肿的形成。mRNA-seq数据分析和KEGG富集分析结果显示, OX161细胞和100 μmol/L MIZA处理48 h的OX161细胞的差异表达基因主要富集在PI3K-Akt、MAPK等信号通路, 与OX161细胞和UCL93细胞的差异表达基因富集通路相同。**结论** SGLT1抑制剂MIZA可能通过PI3K-Akt、MAPK等通路抑制多囊肾细胞的增殖和纤维化, 延缓多囊肾的生长, 是ADPKD的一个潜在治疗靶点。

[关键词] 常染色体显性多囊肾病; 钠-葡萄糖共转运体1; 细胞增殖; 纤维化; 磷脂酰肌醇3-激酶; 蛋白激酶B; 丝裂原活化蛋白激酶; 信号通路

[引用本文] 刘雯瑜, 吴双成, 张天琛, 等. 米扎格列净通过抑制钠-葡萄糖共转运体1的功能抑制常染色体显性多囊肾细胞增殖和纤维化[J]. 海军军医大学学报, 2024, 45(11): 1343-1351. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240144.

Mizagliflozin inhibits proliferation and fibrosis of autosomal dominant polycystic kidney cells by inhibiting function of sodium-glucose cotransporter 1

LIU Wenyu^{1,2}, WU Shuangcheng¹, ZHANG Tianchen³, FU Lili¹, XIE Liangyu¹, HU Wanqian¹, YU Shengqiang^{1*}

1. Department of Nephrology, The Second Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200003, China

2. Department of Nephrology, Beidaihe Rest and Recuperation Center, Joint Logistics Support Force of PLA, Qinhuangdao 066000, Hebei, China

3. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the role of sodium-glucose cotransporter 1 (SGLT1) inhibitor mizagliflozin (MIZA) in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). **Methods** Western blotting, quantitative polymerase chain reaction (qPCR), and immunofluorescence staining were used to determine the expression and distribution of SGLT1 in kidney tissues of $PKDI^{-/-}$ and $PKDI^{+/+}$ mice, human renal cancer adjacent tissue and ADPKD tissue. Renal cyst lining epithelial cells OX161 and renal tubular epithelial cells UCL93 were treated with MIZA, incubated at 37℃ for 24, 48, and 72 h,

[收稿日期] 2024-02-28 [接受日期] 2024-07-01

[作者简介] 刘雯瑜, 硕士生. E-mail: 11556037@qq.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885399, E-mail: ysqdd1@126.com

and then were subjected to methyl thiazolyl tetrazolium and colony formation assay to observe cell proliferation. The qPCR method was used to determine the mRNA levels of collagen 1 α 1, collagen 3 α 1, and fibronectin 1 in OX161 cells treated with 100 μ mol/L MIZA for 48 h. The Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell 3D cyst formation assay verified the effect of MIZA on cyst formation. The mRNA-seq technology was used to detect differentially expressed genes between UCL93 cells and OX161 cells, and between OX161 cells and OX161 cells treated with 100 μ mol/L MIZA for 48 h, and then the differentially expressed genes were analyzed with Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis. **Results** The expression level of SGLT1 was significantly increased in the tissues of ADPKD patients and *PKDI*^{-/-} mice compared to those in normal kidney tissues ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Immunofluorescence staining revealed that SGLT1 was mainly expressed in the cystic lining epithelial cells. Additionally, MIZA inhibited the proliferation and fibrosis of polycystic kidney cells in a concentration- and time-dependent manner, and also inhibited cyst formation in 3D formation assay *in vitro*. The mRNA-seq analysis and KEGG enrichment analysis showed that differentially expressed genes between OX161 cells and OX161 cells cultured in 100 μ mol/L MIZA for 48 h were mainly enriched in the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-protein kinase B (Akt) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways, which were the same as those between OX161 cells and UCL93 cells. **Conclusion** The SGLT1 inhibitor MIZA may inhibit the proliferation and fibrosis of polycystic kidney cells through signaling pathways such as PI3K-Akt and MAPK, delaying the growth of polycystic kidney, and it is a potential therapeutic target for ADPKD.

[**Key words**] autosomal dominant polycystic kidney disease; sodium-glucose cotransporter 1; cell proliferation; fibrosis; phosphatidylinositol 3-kinase; protein kinase B; mitogen-activated protein kinase; signaling pathway

[**Citation**] LIU W, WU S, ZHANG T, et al. Mizagliflozin inhibits proliferation and fibrosis of autosomal dominant polycystic kidney cells by inhibiting function of sodium-glucose cotransporter 1 [J]. Acad J Naval Med Univ, 2024, 45(11): 1343-1351. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240144.

常染色体显性多囊肾病 (autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD) 是一种最常见的单基因遗传性肾脏疾病, 其发病率为 1/2 500~1/1 000^[1-2]。ADPKD 多成年起病, 主要病理改变表现为双侧肾脏皮、髓质广泛囊肿形成并进行性增大、增多, 压迫正常的肾脏组织, 导致肾功能逐渐受损。ADPKD 患者肾小球滤过率随着年龄增长而逐渐下降, 常在 60 岁以后进入终末期肾病阶段^[3]。迄今为止只有托伐普坦被临床试验证实能部分延缓 ADPKD 患者的肾功能减退^[4-5], 但仍存在用药剂量大、不良反应多等问题, 因此亟待研发延缓 ADPKD 进展的药物。

钠-葡萄糖共转运体 (sodium-glucose cotransporter, SGLT) 是一类钠-溶质同向转运体家族, 共有 6 个亚型, 以 SGLT1 和 SGLT2 与肾脏的关系最为密切^[6]。SGLT1 主要分布于近端小管 S3 段, 具有高亲和力、低转运的特点, 在生理情况下重吸收近端小管内剩余的葡萄糖^[7]。在乳腺癌中, SGLT1 通过缺氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α) 通路将细胞代谢模式由脂肪酸 β 氧化转变为糖酵解, 促进间质纤维化和巨噬细胞 M2 浸润、极化^[8]。极化的巨噬细胞又能通过表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) /PI3K/Akt 通路引起 SGLT 表

达增加、细胞增殖, 形成恶性循环^[8-9]。在胃癌细胞中, SGLT1 能改变细胞代谢状态、促进细胞增殖, 抑制或敲除 *SGLT1* 能抑制上述作用^[10]。ADPKD 被认为是一种类肿瘤的疾病, 与肿瘤具有相似的病理生理特点, 如细胞快速增殖、纤维化增加、炎症细胞浸润和代谢改变等。有研究证实非选择性 SGLT 抑制剂根皮苷能降低 Han: SPRD 大鼠的双肾重/体重比、肾囊肿指数、尿蛋白, 抑制细胞增殖, 增加肌酐清除率^[11]。而选择性 SGLT2 抑制剂达格列净仅降低大鼠的尿蛋白、增加肌酐清除率, 其细胞增殖活性和肾囊肿指数与对照组相比没有明显改变^[12]。因此我们猜想, 非选择性 SGLT 抑制剂是通过抑制 SGLT1 的功能抑制囊肿衬里上皮细胞增殖和多囊肾进展。本研究利用特异性 SGLT1 抑制剂米格列净 (mizagliflozin, MIZA) 探究 SGLT1 在 ADPKD 中对细胞增殖和纤维化的作用及其分子机制, 为寻找新的药物靶点提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 细胞与主要试剂 人正常肾小管上皮细胞 UCL93 和人多囊肾囊肿衬里上皮细胞 OX161 由英国 Sheffield 大学 Albert CM Ong 教授赠送, 犬

肾细胞 MDCK 由瑞士苏黎世大学医院的 Rudolf P Wüthrich 教授赠送。胶原蛋白 (collagen, Col) I、基质胶购自美国 Corning 公司; DMEM/F12 培养基、HEPES 缓冲液购自上海源培生物科技股份有限公司; 青霉素-链霉素溶液购自北京兰杰柯科技有限公司; MIZA 购自美国 MedChemExpress 公司; PVDF 膜 (45 μm)、他莫昔芬购自美国 Merk 公司; DNA 酶 I、TRIzol 试剂盒、DNA marker、qPCR 试剂盒、反转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; 快速基因型鉴定试剂盒购自上海冠泰生物科技有限公司; ITS Media Supplement、Edu-594 细胞增殖检测试剂盒、胰酶细胞消化液购自上海碧云天生物技术有限公司; PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (10%)、超灵敏化学发光检测试剂盒、蛋白酶抑制剂、快速封闭液、TBST、蛋白裂解液、上样缓冲液购自上海雅酶生物医药科技有限公司; 兔抗 SGLT1 抗体购自英国 Abcam 公司; 荧光二抗购自美国 VectorLabs 公司; 4% 多聚甲醛固定液购于武汉塞维尔生物科技有限公司。

1.2 人正常肾脏和多囊肾组织 人正常肾脏组织来源于海军军医大学 (第二军医大学) 第二附属医院 3 例行肾癌切除术患者的癌旁肾组织, 所有组织均经病理切片证实无癌细胞。患者的多囊肾组织来源于海军军医大学 (第二军医大学) 第二附属医院 5 例行肾切除手术的 ADPKD 患者。本实验通过海军军医大学 (第二军医大学) 第二附属医院伦理委员会审批。

1.3 瞬时受体电位通道相互作用多囊蛋白 1 (polycystin 1, transient receptor potential channel interacting; *PKDI*) 条件敲除小鼠的鉴定和诱导 正常 C57 小鼠 [野生型 (*PKDI*^{+/+} 小鼠)] 和 *PKDI*^{flx/flx}-Cre⁺ 小鼠 (*PKDI*^{-/-} 小鼠) 各 5 只, 由瑞士苏黎世大学 Rudolf P

Wüthrich 教授赠送, 在海军军医大学 (第二军医大学) SPF 级动物房培育。出生第 8 天时用消毒后的眼科剪剪取鼠尾, 用快速基因型鉴定试剂盒鉴定出 Cre⁺ 的小鼠。出生第 10 天时腹腔注射他莫昔芬 (10 mg/kg) 诱导 *PKDI* 基因敲除。出生第 31 天用颈椎脱臼法处死 *PKDI*^{-/-} 小鼠和 *PKDI*^{+/+} 小鼠, 生理盐水灌注后取双侧肾脏, 取半个肾脏用 4% 多聚甲醛溶液固定, 剩余组织放入液氮或 -80 °C 冰箱保存。

1.4 蛋白质印迹法检测 SGLT1 蛋白的表达 收集 *PKDI*^{-/-} 小鼠和 *PKDI*^{+/+} 小鼠肾脏组织、人正常肾脏组织、ADPKD 患者肾脏组织。将收集的肾脏组织加入蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂低温研磨, 研磨充分后 4 °C 12 000 r/min 离心 10 min (离心半径为 5.8 cm), 取上清, 加入上样缓冲液。按照 PAGE 凝胶快速制备试剂盒说明书配胶后上样, 开始电泳。电泳结束后采用湿转法将蛋白条带转印到 PVDF 膜上, 用快速封闭液封闭 30 min, 加入一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 加入二抗室温孵育 40 min, TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 洗膜完成后显影。用 ImageJ 软件计算条带灰度值。

1.5 qPCR 检测关键基因的表达 按照 TRIzol 试剂盒说明书提取 UCL93 细胞、OX161 细胞、MIZA (100 μmol/L) 培养 48 h 的 OX161 细胞以及人和小鼠肾脏组织的总 RNA。用紫外分光光度计测定 RNA 浓度, 按照反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 按照 qPCR 试剂盒说明书进行 PCR 扩增。引物序列见表 1, 所有引物均由北京擎科生物科技股份有限公司合成。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 15 s、58 °C 1 min, 35 个循环; 95 °C 15 s、60 °C 15 s、95 °C 15 s。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因的相对表达量。

表 1 引物序列 (5'-3')

Tab 1 Primer sequences (5'-3')

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Coll1A1</i>	GAGGGCCAAGACGAAGACATC	CAGATCACGTCATCGCACAAC
<i>Col3A1</i>	TGGTCTGCAAGGAATGCCTGGA	TCTTTCCTGGGACACCATCAG
<i>FN1</i>	ACAACACCGAGGTGACTGAGAC	GGACACAACGATGCTTCCTGAG
<i>SGLT1</i>	CCAGCAACTGTCCCACGATTAT	GGTGATGAAAGAAATGGCGAAG
<i>GAPDH</i>	TGTTGACGGCTTACCTGGAGAC	TGTTGACGGCTTACCTGGAGAC

Col: Collagen; FN1: Fibronectin 1; SGLT1: Sodium-glucose cotransporter 1; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

1.6 免疫荧光染色 待鉴定的组织和细胞用 4% 多聚甲醛溶液室温过夜固定; 用 75%、80%、95%、

100% 梯度乙醇脱水, 每阶段 30 min; 二甲苯透明化 10 min; 浸 58 °C 蜡液 3 次, 每次 30 min; 将细胞

转移至金属模具中,加入适量蜡液,凝固后形成蜡块。蜡块以2 μm 厚度连续切片,将切片置于40 $^{\circ}\text{C}$ 烘片机上过夜烘干;将切片脱蜡复水,用酸性修复液修复抗原,高压灭菌锅设置为121 $^{\circ}\text{C}$ 、2 min开始修复,修复结束后自然冷却至室温;用免疫疏水笔圈出载玻片上细胞的部位,用BSA封闭液室温孵育30 min;加入一抗工作液,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育;用PBS清洗3次,每次5 min;加入荧光二抗工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育40 min;用PBS清洗3次,每次5 min;用DAPI复染细胞核。封片后在荧光显微镜或共聚焦显微镜下观察。

1.7 MTT实验 将UCL93、OX161细胞按4000个/孔的密度接种于96孔板,12 h后换成含0、3.1、6.2、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ MIZA的培养基,在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养24、48和72 h后去除培养基,加入100 μL MTT溶液(0.5 mg/mL)后置于细胞培养箱中孵育4 h,轻轻吸除MTT溶液,迅速加入200 μL DMSO溶解甲基紫晶体,轻轻振荡至晶体完全溶解,用酶标仪检测490 nm波长处的光密度(D)值。

1.8 集落形成实验 将对数生长期的单层细胞常规消化离心,收集细胞沉淀。重悬细胞沉淀,以400、500个/孔的密度接种于12孔板,置于培养箱中培养,待贴壁后加入含0、25、50、75、100 $\mu\text{mol/L}$ MIZA的细胞培养液,继续培养1~2周。当培养皿中出现肉眼可见的集落时,停止培养,弃培养液,用PBS小心洗涤2~3次,弃PBS。每孔加入4%多聚甲醛溶液1 mL,固定15 min,弃固定液;每孔加入1 mL 0.1%结晶紫染色液15 min,流水缓缓洗去染液,空气干燥,拍照并计算集落形成率和集落形成面积。

1.9 MDCK细胞囊肿形成模型 将MDCK细胞消化后,按 4×10^4 个/mL的密度接种于3D培养基(每2 mL含DMEM/F12 300 μL 、HEPES 20 μL 、60 mg/mL的 NaHCO_3 80 μL 、Col I 1.7 mL),将配制好的3D培养基接种于48孔板,放入培养箱静置30 min,待3D培养基凝固后加入400 μL 含0、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ MIZA的细胞培养液,继续培养1周。

1.10 mRNA-seq数据分析 使用TRIzol试剂提取UCL93细胞、OX161细胞和MIZA(100 $\mu\text{mol/L}$)培养48 h的OX161细胞的总RNA,检测合格后用磁珠富集mRNA,反转录得到cDNA,纯化、修复

后进行PCR富集得到cDNA文库。对cDNA文库进行质量检测后用Illumina NovaSeq 6000测序平台进行测序。使用R 4.2.1软件进行数据分析,将差异倍数 ≥ 2 且错误发现率 < 0.01 作为筛选标准得到差异表达基因,使用R 4.2.1软件中的clusterProfiler包对差异表达基因进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析。采用Fisher确切概率法进行统计学分析,选择标准为特定通路中差异表达基因数量 ≥ 2 个且 $P < 0.05$ 。

1.11 统计学处理 应用GraphPad Prism 8.3.0软件进行统计分析。所有数据均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间的比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 SGLT1在ADPKD患者和PKDI^{-/-}小鼠的肾脏组织中表达升高 蛋白质印迹法分析结果显示,与人正常肾脏组织比较,ADPKD患者的肾脏组织中SGLT1蛋白表达水平升高(1.23 ± 0.37 vs 0.51 ± 0.15 , $P < 0.05$;图1A);与PKDI^{+/+}小鼠比较,PKDI^{-/-}小鼠肾脏组织中SGLT1的表达水平也升高(0.77 ± 0.11 vs 0.25 ± 0.09 , $P < 0.01$;图1B)。qPCR检测结果显示,ADPKD患者和PKDI^{-/-}小鼠肾脏组织中SGLT1 mRNA的表达量分别高于人正常肾脏组织和PKDI^{+/+}小鼠肾脏组织(2.05 ± 0.50 vs 1.00 ± 0.28 , $P < 0.01$; 2.86 ± 1.25 vs 1.00 ± 0.21 , $P < 0.01$)。

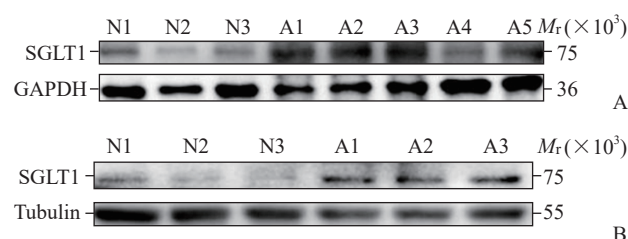


图1 蛋白质印迹法检测SGLT1蛋白在肾脏组织中的表达

Fig 1 Expression of SGLT1 protein in kidney tissue detected by Western blotting

A: SGLT1 protein expression in human normal renal tissues (N1-N3) and renal tissues of ADPKD patients (A1-A5); B: SGLT1 protein expression in the kidney tissues of PKDI^{+/+} mice (N1-N3) and PKDI^{-/-} mice (A1-A3). SGLT1: Sodium-glucose cotransporter 1; ADPKD: Autosomal dominant polycystic kidney disease; PKDI: Polycystin 1, transient receptor potential channel interacting; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

2.2 SGLT1 表达分布在囊肿衬里上皮细胞 ADPKD 患者肾脏和人正常肾脏免疫荧光染色结果 (图 2A~2D) 显示, SGLT1 在人正常肾脏表达于近端小管的管腔面细胞膜上, 在 ADPKD 患者肾脏组织中主要分布在囊肿衬里上皮细胞。对 $PKDI^{+/+}$ 和 $PKDI^{-/-}$ 小鼠肾脏组织进行 SGLT1 和莲藕凝集素 (lotus tetragonolobus lectin, LTL) 的免疫荧光

共染 (图 2E、2F), 发现在 $PKDI^{+/+}$ 小鼠肾脏组织中 SGLT1 表达于肾脏皮质近端小管细胞膜上, 而在 $PKDI^{-/-}$ 小鼠多囊肾组织中 SGLT1 高表达于囊肿衬里上皮细胞膜上, 皮质和髓质均有分布, 与 LTL 部分共染, 提示 SGLT1 在多囊肾组织中主要表达于囊肿衬里上皮细胞, 且与囊肿衬里上皮细胞是否为近端小管来源无关。

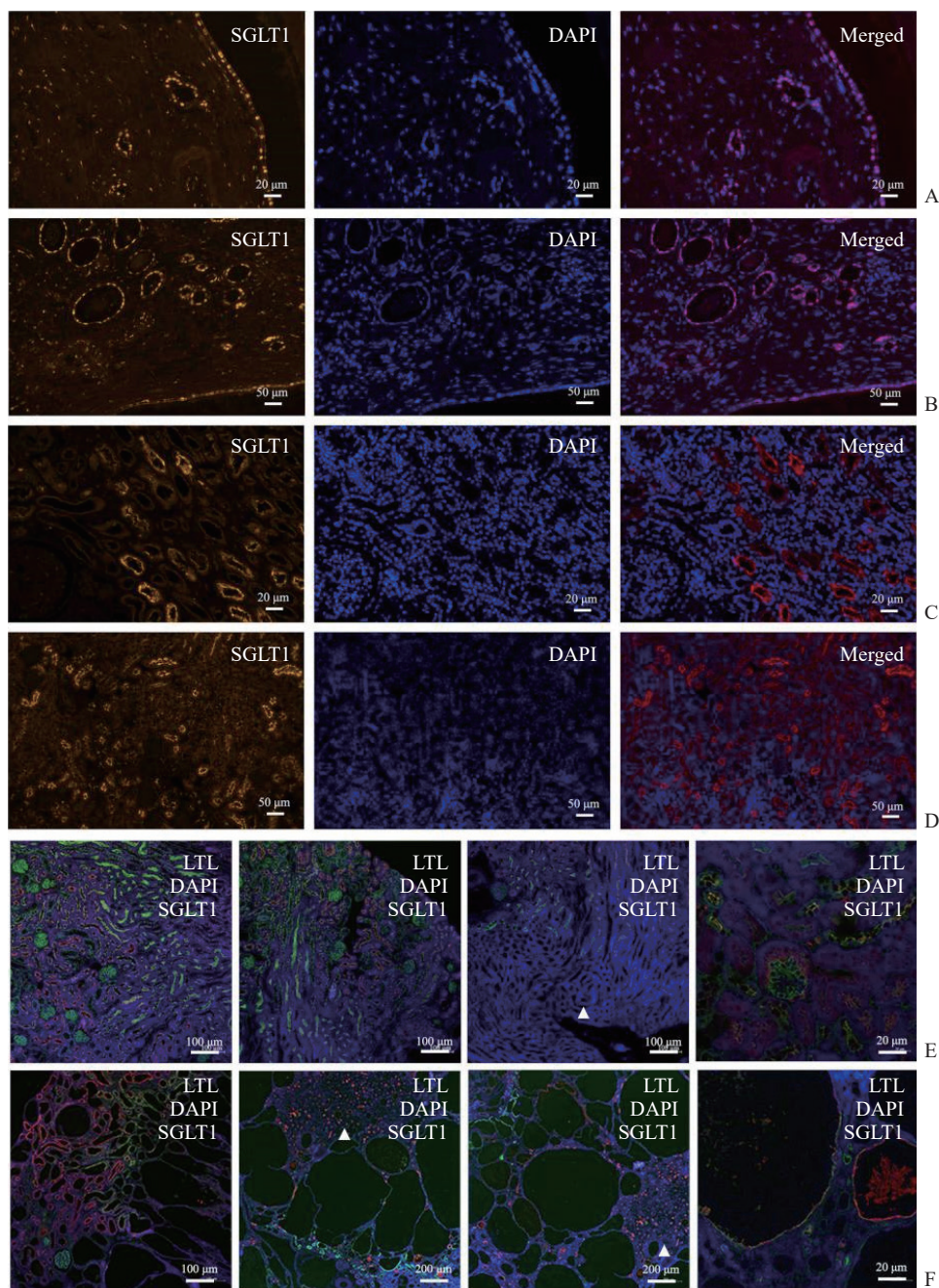


图 2 免疫荧光染色检测 SGLT1 在肾脏组织中的分布

Fig 2 Distribution of SGLT1 in kidney tissue detected by immunofluorescence staining

A, B: Kidney tissues of ADPKD patients; C, D: Human normal renal tissues; E: Kidney tissues of $PKDI^{+/+}$ mice; F: Kidney tissues of $PKDI^{-/-}$ mice. “△” indicates renal medullary region. SGLT1: Sodium-glucose cotransporter 1 (red fluorescence); DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole (blue fluorescence); LTL: Lotus tetragonolobus lectin (green fluorescence); ADPKD: Autosomal dominant polycystic kidney disease; PKD1: Polycystin 1, transient receptor potential channel interacting.

2.3 MIZA抑制多囊肾细胞的生长 MTT实验结果(图3)显示,UCL93和OX161细胞的增殖抑制率随MIZA浓度、培养时间的增加而升高,且抑制率在培养48 h时增加最明显。集落形成实验结果(表2)显示,随着MIZA浓度的升高,

UCL93、OX161细胞的集落形成率、集落形成面积呈减少趋势。MTT实验和集落形成实验均显示MIZA对OX161细胞的增殖抑制作用相较于UCL93细胞更高。

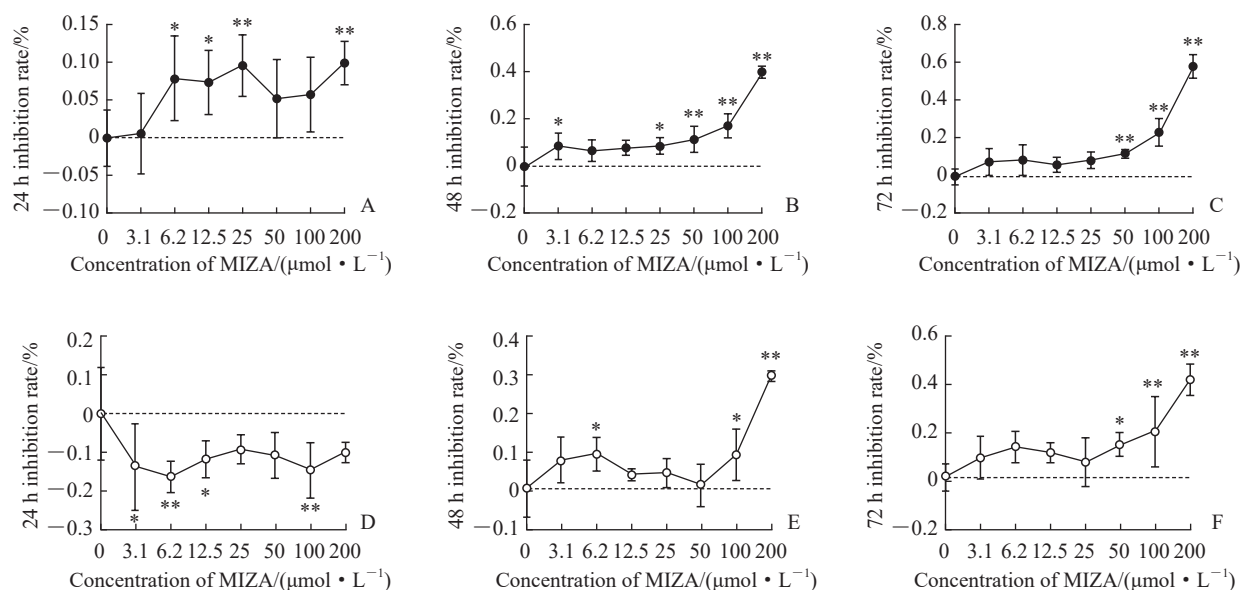


图3 MTT实验检测MIZA对OX161和UCL93细胞增殖的影响

Fig 3 Effect of MIZA on proliferation of OX161 and UCL93 cells detected by MTT assay

A-C: Inhibition rate of MIZA on the proliferation of OX161 cells at 24, 48 and 72 h; D-F: Inhibition rate of MIZA on the proliferation of UCL93 cells at 24, 48 and 72 h. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$ MIZA group. $n=5$, $\bar{x}\pm s$. MIZA: Mizagliflozin; MTT: Methyl thiazolyl tetrazolium.

表2 集落形成实验结果

Tab 2 Results of colony formation assay

Item	MIZA/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)				
	0	25	50	75	100
OX161 cell					
Formation rate/%	0.78 ± 0.08	0.70 ± 0.06	$0.55\pm 0.08^{**}$	$0.48\pm 0.08^{**}$	$0.35\pm 0.08^{**}$
Average area/ μm^2	626.6 ± 60.8	625.2 ± 63.6	$239.8\pm 49.5^{**}$	$289.2\pm 61.6^{**}$	$169.0\pm 40.6^{**}$
UCL93 cell					
Formation rate/%	0.86 ± 0.05	0.82 ± 0.07	$0.60\pm 0.06^{**}$	$0.60\pm 0.06^{**}$	$0.48\pm 0.08^{**}$
Average area/ μm^2	576.6 ± 35.9	493.7 ± 49.7	$481.1\pm 36.9^*$	$416.3\pm 67.0^{**}$	$358.3\pm 43.7^{**}$

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$ MIZA group. MIZA: Mizagliflozin.

2.4 MIZA抑制囊肿形成和生长 MDCK细胞的3D形成实验在体外模拟了囊肿的形成(图4),结果表明MIZA对细胞囊肿的形成和生长具有抑制作用,在不同浓度(0、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$) MIZA作用下,MDCK细胞囊肿直径分别为(138.3 ± 46.2)、(131.0 ± 51.9)、(113.8 ± 29.6)、(104.2 ± 34.7)和(48.4 ± 12.0) μm 。在MIZA 50~200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内,MDCK细胞囊肿直径逐渐

缩小($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.5 MIZA减轻多囊肾细胞的纤维化 qPCR检测结果显示,OX161细胞中*Coll1A1*、*Col3A1*、*FN1* mRNA的表达量高于UCL93细胞(均 $P<0.01$);加入100 $\mu\text{mol/L}$ MIZA培养48 h后,OX161细胞中*Coll1A1*、*Col3A1*、*Fn1* mRNA的表达量降低(均 $P<0.01$)。见表3。

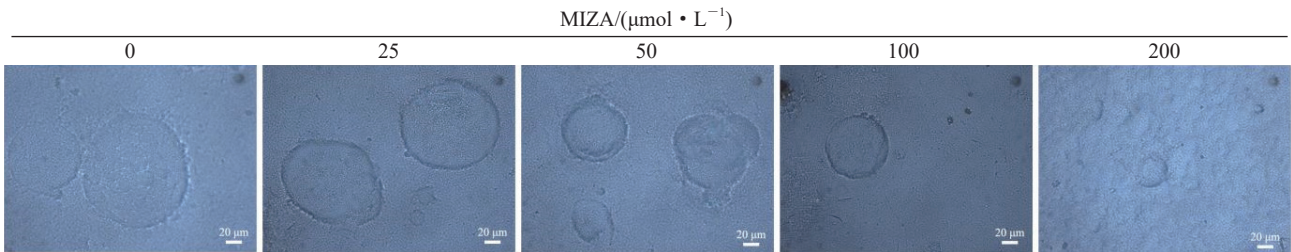


图 4 3D 囊肿形成实验观察 MIZA 对 MDCK 细胞囊肿形成和生长的影响

Fig 4 Effect of MIZA on cyst formation and development in MDCK cells detected by 3D cyst formation assay

MIZA: Mizagliflozin; MDCK: Madin-Darby canine kidney.

表 3 MIZA 对细胞纤维化相关基因表达的影响

Tab 3 Effect of MIZA on expression of cell fibrosis-related genes

Cell	<i>n</i> = 3, $\bar{x} \pm s$		
	<i>Col1A1</i>	<i>Col3A1</i>	<i>FN1</i>
UCL93	1.00 ± 0.39**	1.00 ± 0.18**	1.00 ± 0.18**
OX161	26.45 ± 3.79	19.02 ± 2.48	2.13 ± 0.42
OX161 + 100 μmol/L MIZA	11.76 ± 2.02**	8.67 ± 1.43**	0.99 ± 0.25**

***P* < 0.01 vs OX161 cells. MIZA: Mizagliflozin; Col: Collagen; FN1: Fibronectin 1.

2.6 MIZA 可能通过 PI3K-Akt、MAPK 通路抑制多囊肾细胞的纤维化 通过 mRNA-seq 筛选 UCL93 细胞和 OX161 细胞、OX161 细胞和 100 μmol/L MIZA 培养 48 h 的 OX161 细胞的差异表达基因, 结果显示 OX161 细胞和 UCL93 细胞共有 4 994 个差异表达基因, 其中 2 361 个基因表达上调, 2 633 个基因表达下调。OX161 细胞和 100 μmol/L MIZA 培养 48 h 的 OX161 细胞共有 153 个差异表达基因, 其中 123 个基因上调、30 个基因下调 (图 5A)。

KEGG 富集分析结果显示, UCL93 细胞和 OX161 细胞差异表达基因主要参与的信号通路有 PI3K-Akt、MAPK 等信号通路 (图 5B)。OX161 细胞和 100 μmol/L MIZA 培养 48 h 的 OX161 细胞的差异基因表达主要参与的信号通路也包括 PI3K-Akt、MAPK 等信号通路 (图 5C)。这提示 MIZA 可能通过 PI3K-Akt 信号通路和 MAPK 信号通路抑制多囊肾细胞的纤维化。

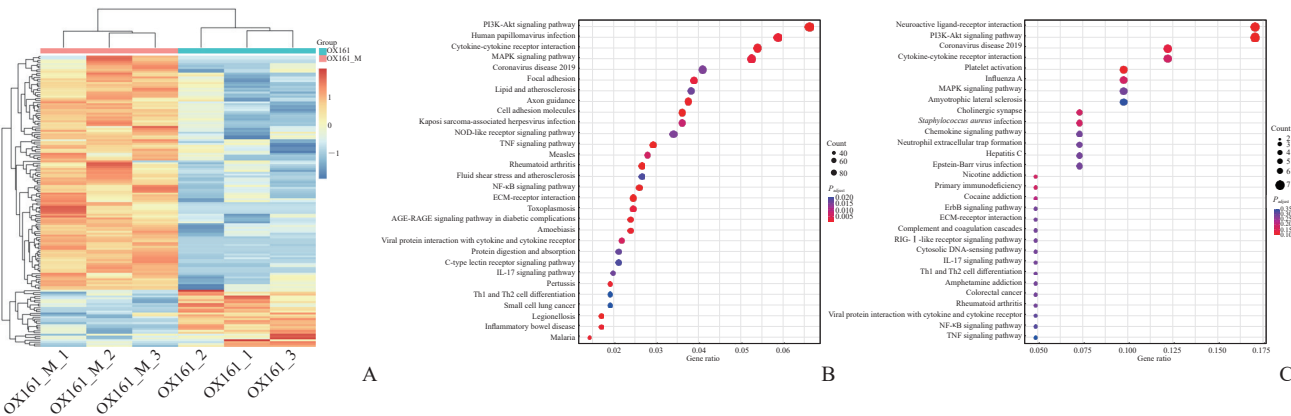


图 5 mRNA-seq 数据分析预测 MIZA 的作用机制

Fig 5 Analysis of mRNA-seq data to predict the mechanism of MIZA

A: Heatmap of differentially expressed genes between OX161 cells and OX161 cells treated with 100 μmol/L MIZA for 48 h (OX161-M); B: KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes between OX161 cells and UCL93 cells; C: KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes between OX161 cells and OX161 cells treated with 100 μmol/L MIZA for 48 h. MIZA: Mizagliflozin; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase; Akt: Protein kinase B; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; NOD: Nucleotide-binding oligomerization domain; TNF: Tumor necrosis factor; NF-κB: Nuclear factor κ B; ECM: Extracellular matrix; AGE: Advanced glycation end product; RAGE: Receptor of advanced glycation end product; IL-17: Interleukin 17; Th: T helper cell; ErbB: Epidermal growth factor receptor; RIG: Retinoic acid-induced gene.

3 讨 论

ADPKD是最常见的遗传性肾病,是导致终末期肾病的第4位病因,全球约有600万ADPKD患者^[3]。编码多囊蛋白1的*PKD1*基因突变是引起ADPKD的最常见原因。ADPKD与恶性肿瘤细胞类似,以细胞增殖和生长增加、细胞极性异常、细胞代谢改变、肾间质纤维化和巨噬细胞浸润为特征,这些因素共同促进了囊肿的生长和肾功能的减退。多囊肾引起细胞的代谢改变包括糖酵解增加、脂肪酸 β 氧化减少、谷氨酸的利用改变、线粒体功能缺陷,而抑制代谢变化可以延缓囊肿的生长^[13]。

SGLT1在多种肿瘤疾病中高表达、促进细胞增殖,是一个潜在的治疗靶点。Guo等^[14]通过免疫组织化学染色技术检测了SGLT1在结直肠癌患者和正常人中的表达,发现其在结直肠癌患者中表达明显升高。Casneuf等^[15]和Lai等^[16]发现,SGLT1在胰腺癌和卵巢癌中升高且与预后有关。Hanabata等^[17]发现SGLT1的表达与口腔鳞状细胞癌的分化有关。SGLT1的高表达可以增加细胞对葡萄糖的摄取,促进糖酵解,促进细胞的生长^[10]。本研究发现SGLT1在ADPKD中高表达,且主要表达在囊肿衬里上皮细胞上,提示SGLT1在ADPKD的细胞增殖和纤维化中可能起重要作用。

本研究以肾小管上皮细胞UCL93和囊肿衬里上皮细胞OX161为细胞模型,用不同浓度的特异性SGLT1抑制剂MIZA处理细胞,检测细胞的增殖情况。MTT实验和集落形成实验结果显示,MIZA呈浓度和时间依赖性抑制OX161细胞和UCL93细胞的增殖,并且相同浓度的MIZA对OX161细胞增殖的抑制率高于UCL93细胞,提示MIZA对正常肾小管上皮细胞有较小的不良反应。100 $\mu\text{mol/L}$ MIZA对OX161细胞有明显的抑制增殖作用,但对UCL93的抑制作用较轻微。本研究采用MCDK细胞的3D模型实验观察囊肿的形成,再用不同浓度的MIZA进行处理,结果显示随着MIZA浓度的升高囊肿的直径逐渐缩小。

除了对细胞增殖有影响,抑制SGLT1的功能在糖尿病性心脏病患者中还可以缓解心脏组织的纤维化现象^[18]。本实验采用qPCR技术检测了Col、Fn1等纤维化指标,结果显示*Col1A1*、*Fn1*和*Col3A1* mRNA在OX161细胞中的表达量明显升

高,而用100 $\mu\text{mol/L}$ MIZA处理后,这些指标的表达量明显降低,提示SGLT1在促进纤维化方面具有重要作用。

抑制SGLT1的功能或敲除*SGLT1*可以通过改变代谢过程、抑制PI3K-Akt和MAPK等信号通路抑制肿瘤细胞的增殖^[9,19]。本研究通过mRNA-seq数据分析,筛选出差异表达基因并进行了KEGG富集分析,发现OX161细胞和UCL93细胞的差异表达基因主要富集在PI3K-Akt和MAPK信号通路,100 $\mu\text{mol/L}$ MIZA培养48 h的OX161细胞和OX161细胞的差异表达基因也主要富集在PI3K-Akt和MAPK信号通路,提示SGLT1抑制剂MIZA可能通过PI3K-Akt和MAPK信号通路影响多囊肾细胞的增殖和纤维化。

综上所述,SGLT1在ADPKD中的表达升高,且主要表达于多囊肾囊肿衬里上皮细胞上。抑制SGLT1的功能可以通过PI3K-Akt和MAPK信号通路抑制多囊肾细胞的增殖和纤维化,有望成为治疗ADPKD的干预靶点。

[参 考 文 献]

- [1] LANKTREE M B, HAGHIGHI A, GUIARD E, et al. Prevalence estimates of polycystic kidney and liver disease by population sequencing[J]. J Am Soc Nephrol, 2018, 29(10): 2593-2600. DOI: 10.1681/ASN.2018050493.
- [2] XUE C, ZHOU C C, WU M, et al. The clinical manifestation and management of autosomal dominant polycystic kidney disease in China[J]. Kidney Dis, 2016, 2(3): 111-119. DOI: 10.1159/000449030.
- [3] CORNEC-LE GALL E, ALAM A, PERRONE R D. Autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. Lancet, 2019, 393(10174): 919-935. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32782-X.
- [4] TORRES V E, CHAPMAN A B, DEVUYST O, et al. Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. N Engl J Med, 2012, 367(25): 2407-2418. DOI: 10.1056/NEJMoa1205511.
- [5] TORRES V E, CHAPMAN A B, DEVUYST O, et al. Tolvaptan in later-stage autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. N Engl J Med, 2017, 377(20): 1930-1942. DOI: 10.1056/NEJMoa1710030.
- [6] WRIGHT E M, LOO D D, HIRAYAMA B A. Biology of human sodium glucose transporters[J]. Physiol Rev, 2011, 91(2): 733-794. DOI: 10.1152/physrev.00055.2009.

- [7] VRHOVAC I, BALEN EROR D, KLESSEN D, et al. Localizations of Na⁺-D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2 in human kidney and of SGLT1 in human small intestine, liver, lung, and heart[J]. *Pflugers Arch*, 2015, 467(9): 1881-1898. DOI: 10.1007/s00424-014-1619-7.
- [8] NIU X, MA J, LI J, et al. Sodium/glucose cotransporter 1-dependent metabolic alterations induce tamoxifen resistance in breast cancer by promoting macrophage M2 polarization[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12: 509. DOI: 10.1038/s41419-021-03781-x.
- [9] WANG J, JI H, NIU X, et al. Sodium-dependent glucose transporter 1 (SGLT1) stabled by HER2 promotes breast cancer cell proliferation by activation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in HER2⁺ breast cancer[J]. *Dis Markers*, 2020, 2020: 6103542. DOI: 10.1155/2020/6103542.
- [10] SHI M, WANG C, JI J, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of SGLT1 inhibits proliferation and alters metabolism of gastric cancer cells[J]. *Cell Signal*, 2022, 90: 110192. DOI: 10.1016/j.cellsig.2021.110192.
- [11] WANG X, ZHANG S, LIU Y, et al. Targeting of sodium-glucose cotransporters with phlorizin inhibits polycystic kidney disease progression in Han: SPRD rats[J]. *Kidney Int*, 2013, 84(5): 962-968. DOI: 10.1038/ki.2013.199.
- [12] RODRIGUEZ D, KAPOOR S, EDENHOFER I, et al. Inhibition of sodium-glucose cotransporter 2 with dapagliflozin in Han: SPRD rats with polycystic kidney disease[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2015, 40(6): 638-647. DOI: 10.1159/000368540.
- [13] MI Z, SONG Y, CAO X, et al. Super-enhancer-driven metabolic reprogramming promotes cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. *Nat Metab*, 2020, 2: 717-731. DOI: 10.1038/s42255-020-0227-4.
- [14] GUO G F, CAI Y C, ZHANG B, et al. Overexpression of SGLT1 and EGFR in colorectal cancer showing a correlation with the prognosis[J]. *Med Oncol*, 2011, 28(Suppl 1): S197-S203. DOI: 10.1007/s12032-010-9696-8.
- [15] CASNEUF V F, FONTEYNE P, VAN DAMME N, et al. Expression of SGLT1, Bcl-2 and p53 in primary pancreatic cancer related to survival[J]. *Cancer Invest*, 2008, 26(8): 852-859. DOI: 10.1080/07357900801956363.
- [16] LAI B, XIAO Y, PU H, et al. Overexpression of SGLT1 is correlated with tumor development and poor prognosis of ovarian carcinoma[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2012, 285(5): 1455-1461. DOI: 10.1007/s00404-011-2166-5.
- [17] HANABATA Y, NAKAJIMA Y, MORITA K I, et al. Coexpression of SGLT1 and EGFR is associated with tumor differentiation in oral squamous cell carcinoma[J]. *Odontology*, 2012, 100(2): 156-163. DOI: 10.1007/s10266-011-0033-2.
- [18] DASARI D, GOYAL S G, PENMETSA A, et al. Canagliflozin protects diabetic cardiomyopathy by mitigating fibrosis and preserving the myocardial integrity with improved mitochondrial function[J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 949: 175720. DOI: 10.1016/j.ejphar.2023.175720.
- [19] LIN N, LIN H, YANG Q, et al. SGLT1 inhibition attenuates apoptosis in diabetic cardiomyopathy via the JNK and p38 pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 598353. DOI: 10.3389/fphar.2020.598353.

[本文编辑] 尹 茶