

达格列净对棕榈酸诱导的人肾小管上皮细胞损伤的保护机制研究

丁庭庭^{1,2}, 潘李萌³, 杨光⁴, 杨婧¹, 钟兴¹, 潘天荣¹

摘要 目的 探讨达格列净对棕榈酸诱导的人肾小管上皮细胞的保护作用及机制。方法 体外培养人肾小管上皮细胞(HK-2),分为正常对照(CON)组、棕榈酸(PA)组、棕榈酸+达格列净(PA+Dapa)组、单纯达格列净(Dapa)组,干预24 h后采用CCK-8法检测细胞增殖力,DCF免疫荧光检测细胞内活性氧(ROS)水平,JC-1荧光检测线粒体膜电位,试剂盒检测细胞内超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量,Western blot检测凋亡蛋白caspase3、Cleaved caspase3和细胞色素C(Cyto C)水平,Hoechst33258荧光检测细胞凋亡情况。结果 与CON组比较,PA组细胞增殖力降低,ROS水平升高,线粒体膜电位下降,SOD水平降低及MDA水平升高,凋亡蛋白caspase3和Cleaved caspase3水平升高以及Cyto C蛋白表达量增加,Hoechst33258检测凋亡水平增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$);Dapa组以上指标与CON组比较差异无统计学意义;与PA组比较,PA+Dapa组细胞增殖力升高,ROS水平降低,线粒体膜电位上升,SOD水平升高,MDA水平降低,凋亡蛋白caspase3、Cleaved caspase3及Cyto C蛋白表达量降低,Hoechst33258检测凋亡水平下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 达格列净对棕榈酸诱导的人肾小管上皮细胞具有保护作用,机制可能与改善线粒体功能及氧化应激水平有关。

关键词 人肾小管上皮细胞;糖尿病肾病;达格列净;棕榈酸;线粒体功能障碍;氧化应激

中图分类号 R 587.1;R 97

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)03-0390-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.03.010

2021-08-28 接收

基金项目:安徽省高校自然科学研究重点项目(编号:KJ2018A0202);安徽医科大学临床医学学科建设项目(编号:2021lexk024);慢病防控联合研究基金(编号:MBLHJJ202002)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院内分泌科,合肥 230601

²宣城市人民医院内分泌科,宣城 242099

³华中科技大学同济医学院附属同济医院内分泌科,武汉 430030

⁴昆山市中医医院神经内科,昆山 215399

作者简介:丁庭庭,女,硕士研究生;

潘天荣,男,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: ptr1968@163.com

全球糖尿病患病率在未来将继续增加,预计到2045年,全球糖尿病患者数将达到6.93亿^[1]。糖尿病常常伴有多种并发症,其中糖尿病肾病(diabetic kidney disease,DKD)是糖尿病最严重的并发症之一,与糖尿病患者的高发病率与死亡率相关,是终末期肾衰竭最常见的病因之一^[2]。DKD是一种以肾小球超滤及肾小球电荷和通透性改变为主的疾病,近来研究^[3-4]表明肾小管损伤机制可能在DKD的病理生理中起重要作用,DKD患者肾功能下降与肾小管结构改变包括肾小管萎缩、肾小管间质纤维化等有关。钠-葡萄糖共转运蛋白2(sodium-glucose cotransporter 2,SGLT2)抑制剂——达格列净可通过抑制肾脏对葡萄糖的重吸收、促进尿糖排泄降低血糖,并且对DKD有保护作用,但具体机制尚不清楚。该研究通过棕榈酸诱导肾小管上皮细胞线粒体功能障碍及氧化应激模型,使用达格列净干预后检测肾小管上皮细胞线粒体功能、氧化应激及凋亡情况的变化,探讨达格列净对DKD的保护机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人肾小管上皮细胞HK-2购自美国Actt公司;DMEM/F12培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司;PBS缓冲液购自美国Hyclone公司;0.25%含EDTA胰酶消化液购自上海源培公司;棕榈酸购自美国Sigma公司(批号:P0500);达格列净购自南京百鑫德诺生物科技公司(批号:BMS512148);CCK-8细胞活力检测试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技公司;Hoechst 33258染色细胞凋亡试剂盒购自上海贝博公司;JC-1染色线粒体膜电位检测试剂盒、DCFH-DA细胞活性氧(reactive oxygen species,ROS)检测试剂盒、细胞线粒体分离试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、丙二醛(malonaldehyde,MDA)检测试剂盒购自南京建成生物公司; β -actin购自美国Egibody公司;caspase3、Cleaved caspase3、Cytochrome C抗体购自英国Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 将 HK-2 细胞置于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液中,同时加 1% 青-链霉素,在 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度的恒温培养箱中,细胞呈贴壁生长,当细胞生长密度达 70% ~ 80% 时传代。选取生长状态良好处于对数生长期的细胞进行随机分组:正常对照 (CON) 组,含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液对 HK-2 细胞进行培养;棕榈酸 (PA) 组,使用棕榈酸浓度为 150 μmol/L 的培养液培养 HK-2 细胞^[5];棕榈酸 + 达格列净 (PA + Dapa) 组,使用棕榈酸浓度为 150 μmol/L 和达格列净浓度为 2 μmol/L 的培养液进行 HK-2 细胞培养;达格列净 (Dapa) 组,使用含 2 μmol/L 达格列净的培养液对 HK-2 细胞培养^[6]。

1.2.2 CCK-8 实验检测细胞增殖力 在 96 孔板中接种细胞悬液 (100 μl/孔),每孔约 3 000 个细胞进行培养,待细胞培养生长至接近单层时,给与相应的刺激,处理结束后每孔加入 100 μl 含有 10% CCK-8 的工作液,在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中避光孵育 1 h,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光值。

1.2.3 细胞内活性氧的检测 HK-2 细胞呈对数生长时,将细胞悬液滴加到 6 孔板中,放置于细胞培养箱中培养至细胞接近长成单层并给与相应刺激,使用预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次,用无血清的 DMEM/F12 培养基稀释 DCFH-DA 荧光染料至终浓度为 10 μmol/L,将染料加入 6 孔板中,每孔 1 ml,均匀覆盖细胞表面,将 6 孔板放置于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中避光孵育 30 min,弃去染料,用无血清的 DMEM/F12 培养基洗涤细胞 3 次,然后在荧光显微镜下采集图像。

1.2.4 细胞线粒体膜电位的检测 将 HK-2 细胞接种于 6 孔板中培养,给与相应刺激后,吸出 6 孔板中的培养液,使用 PBS 冲洗 1 次,加入 1 ml 细胞培养液和 1 ml JC-1 染色工作液,充分混匀后放置于细胞培养箱里避光孵育 20 min,使用 JC-1 染色缓冲液 (1 ×) 洗涤 2 次,使用荧光显微镜采集图像。

1.2.5 Hoechst33258 检测细胞凋亡 将细胞玻片放置于 12 孔板中,将对数生长期的 HK-2 细胞以 1 × 10⁵ 个/孔的细胞密度接种于 12 孔板,给予相应药物干预后,按照 Hoechst33258 染色试剂盒说明书进行细胞凋亡的检测,最后使用荧光显微镜采集图像。

1.2.6 细胞氧化应激指标的检测 HK-2 细胞使用药物干预后,在 6 孔板中加入 100 μl/孔的裂解液冰上裂解 30 min,然后收集样品于 EP 管中,使用

BCA 蛋白浓度检测试剂盒测量样品的蛋白浓度用于计算,根据说明书检测细胞内 SOD、MDA 含量。

1.2.7 Western Blot 法检测细胞凋亡蛋白 细胞及线粒体成分中加入适量的裂解液,冰上裂解 30 min,4 ℃、13 200 r/min 离心 30 min,取上清用 BCA 蛋白定量检测试剂盒测量相应蛋白浓度。根据蛋白浓度加入适量的蛋白样品 (约 30 μg/泳道) 于 SDS-PAGE 进行电泳,将蛋白转膜至 PVDF 膜上,使用 5% 脱脂奶粉室温慢摇封闭 2 h,封闭结束后放置于提前使用一抗稀释液稀释的一抗中,4 ℃ 孵育过夜,次日使用 TBST 液快摇洗涤 10 min × 3 次,二抗孵育 1 h 后再用 TBST 快摇洗涤 10 min × 3 次,用 ECL 化学发光试剂盒显影,所有实验重复 3 次,并使用 Image J 软件对条带进行灰度值分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 25.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组资料之间比较采用单因素方差分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 达格列净对棕榈酸诱导的 HK-2 细胞的增殖力的影响 CCK-8 实验结果显示:四组间细胞活力水平比较差异有统计学意义 ($F = 22.87, P < 0.01$);与 CON 组比较,PA 组 HK-2 细胞的活力下降 ($P < 0.05$),而 Dapa 组细胞活力差异无统计学意义 ($P > 0.05$);与 PA 组比较,PA + Dapa 组细胞活力增强,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

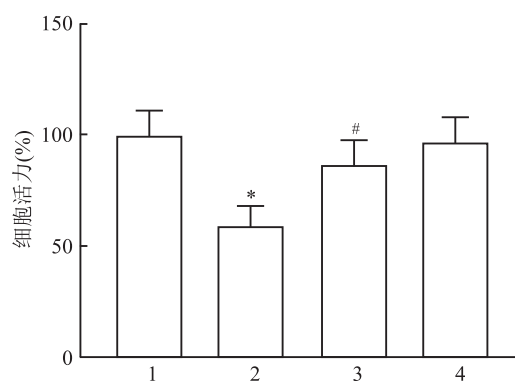


图 1 各组 HK-2 细胞增殖力的情况

1: CON 组; 2: PA 组; 3: PA + Dapa 组; 4: Dapa 组; 与 CON 组比较: * $P < 0.05$; 与 PA 组比较: # $P < 0.05$

2.2 达格列净对棕榈酸诱导的 HK-2 细胞内 ROS 表达的影响 DCF 免疫荧光结果显示:四组间 ROS

水平差异有统计学意义 ($F = 405.4, P < 0.01$); 与 CON 组比较, PA 组绿色荧光增强, 提示 ROS 水平增强, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 Dapa 组 HK-2 细胞绿色荧光强度差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 PA 组比较, PA + Dapa 组 HK-2 细胞绿色荧光强度减弱, 提示 ROS 水平降低 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 达格列净对棕榈酸诱导的 HK-2 细胞线粒体膜电位的影响 JC-1 荧光染色结果显示: 四组间线粒体膜电位水平比较差异有统计学意义 ($F = 16.05, P < 0.01$); 与 CON 组比较, PA 组红色荧光强度与绿色荧光强度的比值降低 ($P < 0.05$), 提示线粒体膜电位降低, 而 Dapa 组红色荧光强度与绿色荧光强度比值差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 PA 组比较, PA + Dapa 组红色荧光强度与绿色荧光强度的比值升高 ($P < 0.05$), 提示膜电位水平升高。见

图 3。

2.4 HK-2 细胞氧化应激指标的变化 SOD、MDA 检测试剂盒检测结果显示: 四组间 SOD、MDA 水平比较差异均有统计学意义 ($F = 41.0, 26.02$, 均 $P < 0.01$); 与 CON 组 SOD、MDA 水平比较 [(154.40 ± 6.43) U/mgprot、 (0.63 ± 0.13) nmol/mgprot], PA 组细胞内 SOD 水平 (109.97 ± 3.37) U/mgprot 降低, MDA 水平 (2.01 ± 0.31) nmol/mgprot 升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 Dapa 组 SOD 及 MDA 水平 [(141.75 ± 5.08) U/mgprot、 (0.93 ± 0.15) nmol/mgprot] 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 PA 组比较, PA + Dapa 组 SOD 水平 (125.32 ± 5.58) U/mgprot 上升, MDA 水平 (1.33 ± 0.17) nmol/mgprot 下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。

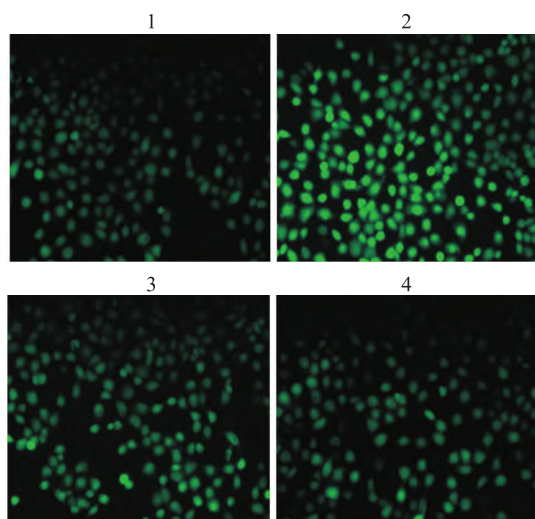


图 2 各组 HK-2 细胞内 ROS 水平的情况 $\times 200$

1: CON 组; 2: PA 组; 3: PA + Dapa 组; 4: Dapa 组; 与 CON 组比较: * $P < 0.05$; 与 PA 组比较: # $P < 0.05$

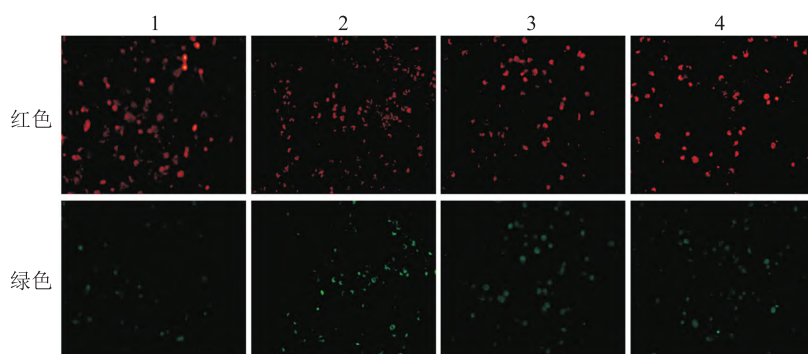
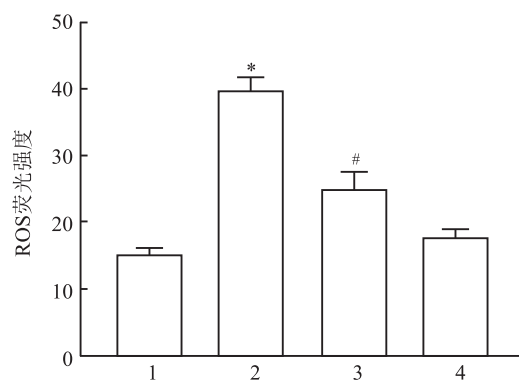
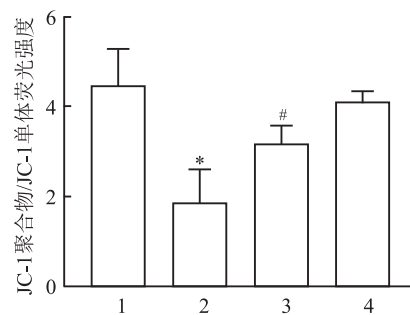


图 3 各组 HK-2 细胞内线粒体膜电位的变化 $\times 200$

1: CON 组; 2: PA 组; 3: PA + Dapa 组; 4: Dapa 组; 与 CON 组比较: * $P < 0.05$; 与 PA 组比较: # $P < 0.05$



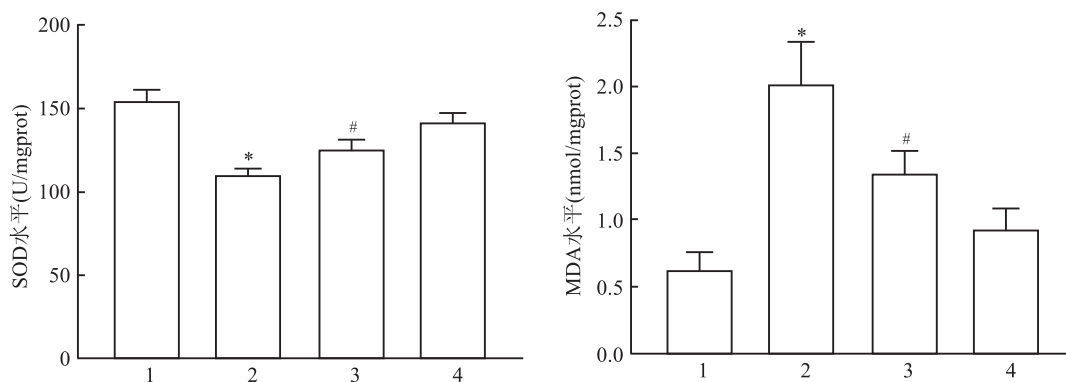


图4 各组 HK-2 细胞内 SOD、MDA 水平变化

1: CON 组; 2: PA 组; 3: PA + Dapa 组; 4: Dapa 组; 与 CON 组比较: * $P < 0.05$; 与 PA 组比较: # $P < 0.05$

2.5 HK-2 细胞内凋亡水平的变化 Hoechst33258 凋亡染色结果显示:四组间凋亡水平比较差异有统计学意义 ($F = 244.0, P < 0.01$); 与 CON 组比较, PA 组凋亡染色荧光强度增加, 细胞凋亡水平增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 PA 组比较, PA + Dapa 组凋亡染色荧光强度降低, 细胞凋亡水平下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 5。

2.6 HK-2 细胞内凋亡蛋白和 Cyto C 蛋白的变化

Western Blot 结果显示:四组间 caspase3、Cleaved caspase3、Cyto C 蛋白水平比较差异有统计学意义 ($F = 78.51, 179.8, 132.3$, 均 $P < 0.01$); 与 CON 组比较, PA 组凋亡蛋白 caspase3、Cleaved caspase3 水平上升, 胞浆 Cyto C 蛋白表达量升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 PA 组比较, PA + Dapa 组 caspase3、Cleaved caspase3 及 Cyto C 水平下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 6。

3 讨论

DKD 是慢性高血糖所致的慢性肾脏损害, 临床上以持续白蛋白尿和肾小球滤过率进行性下降为主要特征, 进而发展为终末期肾病。DKD 的治疗主要包括控制体质量、血压和血糖等, 以延缓终末期肾病的发展。达格列净是属于 SGLT2 抑制剂的新型降糖药物, SGLT 在体内以主动转运的形式逆浓度梯度转运葡萄糖, 参与肾脏对葡萄糖的重吸收。SGLT2 表达于肾脏近曲小管, 具有低亲和力、高转运能力, 在肾脏重吸收约 90% 的葡萄糖。研究^[7]表明, SGLT2 抑制剂每天增加尿葡萄糖排泄约 70 ~ 80 g, 降低 HbA1c 约 0.5% ~ 0.8%。临床研究^[7]结果显示, 达格列净治疗降低了白蛋白尿, 并且其降低白蛋白尿的作用很大程度上与血糖、血压及体质量的降低无关, 这表明达格列净具有降糖之外的肾脏保护

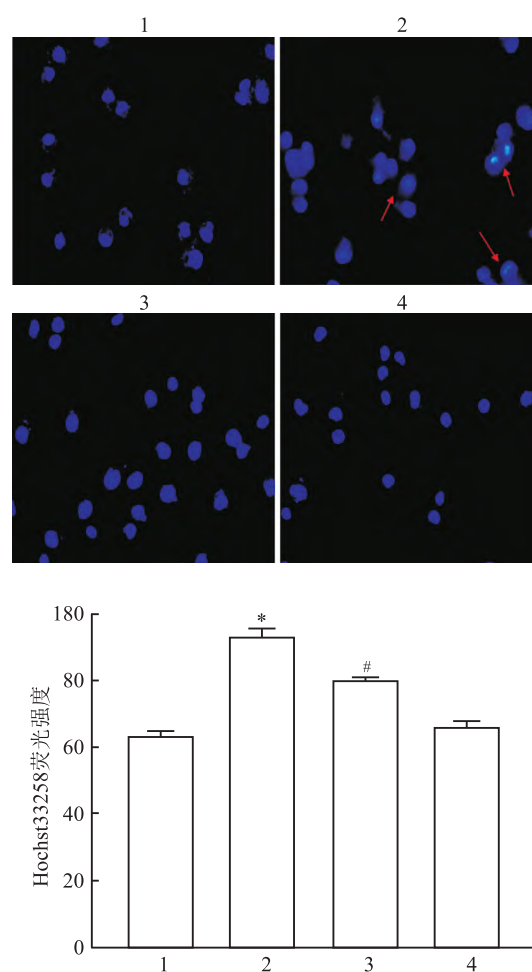


图5 各组 HK-2 细胞内细胞凋亡水平的变化 ×200

1: CON 组; 2: PA 组; 3: PA + Dapa 组; 4: Dapa 组; 与 CON 组比较: * $P < 0.05$; 与 PA 组比较: # $P < 0.05$

作用。另一项随机交叉实验的事后分析发现达格列净降低了白蛋白尿, 并且使肾小管损伤标志物 Kim 和炎症因子 IL-6 排泄减少, 达格列净降低蛋白尿的作用可能是由于肾小球内压力或肾小管细胞损伤减少所致^[8]。本研究使用棕榈酸刺激体外培养的

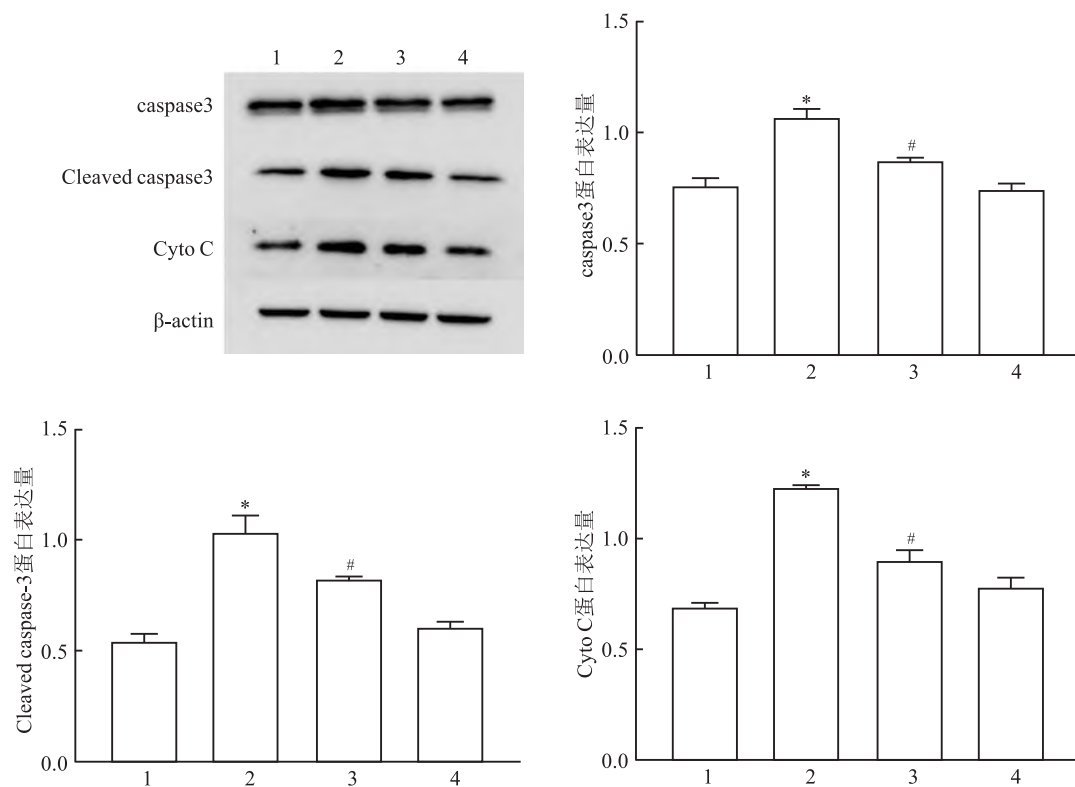


图6 各组 HK-2 细胞内凋亡蛋白、Cyto C 蛋白表达量情况

1: CON 组; 2: PA 组; 3: PA + Dapa 组; 4: Dapa 组; 与 CON 组比较: * $P < 0.05$; 与 PA 组比较: # $P < 0.05$

HK-2 细胞, 结果示棕榈酸可导致体外培养的 HK-2 细胞增殖力降低, 检测凋亡水平增加, 达格列净干预后细胞凋亡明显改善, 提示达格列净可改善棕榈酸诱导的 HK-2 细胞增殖力, 降低细胞凋亡。

糖脂代谢异常是糖尿病最主要的疾病特征, 近年来研究^[9-10]认为 2 型糖尿病的发病机制与脂肪酸代谢紊乱导致的机体胰岛素抵抗、胰岛素分泌异常、糖代谢受损关系密切, 游离脂肪酸升高被认为是诱发 2 型糖尿病的重要原因。同时, 异位脂质(脂质在非脂肪组织中的积累)与系膜细胞、足细胞和近端肾小管上皮细胞的结构和功能变化有关, 是导致肾脏损害的重要原因^[11]。目前 DKD 的发病机制尚不完全清楚, 可能与高血糖、微循环障碍、糖代谢异常、脂代谢异常及氧化应激有关。近来研究^[12]表明, DKD 的发生可能与线粒体功能障碍有关。而氧化磷酸化系统在线粒体内膜上发生, 若内膜一旦被破坏, 磷酸化解偶联和电子传递系统完全失去运作平衡, 导致氧化应激的发生; 同时, 发生氧化应激时, 可引起线粒体功能损伤加重。实验研究^[13]发现高糖使得体外培养的 HK-2 细胞线粒体断裂, 线粒体膜电位降低, 同时伴有线粒体蛋白 Drp1 和 Fis1 的

表达增加, 融合蛋白 Mfn2 表达降低。以上研究提示, 在糖尿病模型中存在线粒体功能障碍。本研究通过体外培养人肾小管上皮 HK-2 细胞, 使用棕榈酸处理后结果显示 HK-2 细胞凋亡增加, 表现为线粒体膜电位下降, 产生过量的 ROS 导致氧化应激的发生; 同时胞浆 Cyto C 蛋白表达量增加, 提示线粒体损伤膜通透性增加, 从而使 Cyto C 从线粒体释放至胞浆, 激活 caspase 引起凋亡。

达格列净对肾脏保护作用的潜在机制可能是多方面的。有研究^[14]报道, 使用达格列净干预胰岛素抵抗的代谢综合征大鼠模型后, 大鼠心肌细胞线粒体膜电位升高、ROS 减少及 Ca^{2+} 稳态得到良好控制, 提示达格列净通过改善线粒体功能及氧化应激对代谢综合征大鼠的心脏进行保护作用。另一项体外研究^[15]表明, 达格列净可以降低高葡萄糖所致的肾小管上皮细胞内 ROS、IL-8、TGF- β 水平及对高葡萄糖触发的细胞凋亡发挥保护作用, 提示达格列净可改善肾小管氧化应激、炎症和纤维化。Takagi et al^[5]研究发现, 在高脂喂养的小鼠中, 近端肾小管出现空泡化、扩张和上皮细胞脱离, 同时体外培养 HK-2 细胞, 在高糖和棕榈酸刺激下表现为线粒体明显

损伤,使用伊格列净改善了上述症状。本研究结果同样显示,达格列净可以提高棕榈酸诱导的 HK-2 细胞线粒体膜电位,降低 ROS 水平及氧化应激水平,使 HK-2 细胞内凋亡蛋白水平降低,对棕榈酸干预的 HK-2 细胞具有保护作用。

综上所述,达格列净使棕榈酸干预的 HK-2 细胞线粒体功能及氧化应激水平得到改善,提示达格列净可能通过改善线粒体功能障碍及氧化应激水平对 DKD 进行保护作用。

参考文献

- [1] Cho N H, Shaw J E, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2018, 138: 271 – 81.
- [2] Shi G J, Shi G R, Zhou J Y, et al. Involvement of growth factors in diabetes mellitus and its complications: A general review [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 101: 510 – 27.
- [3] Marshall C B. Rethinking glomerular basement membrane thickening in diabetic nephropathy: Adaptive or pathogenic? [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2016, 311 (5): F831 – 43.
- [4] Gilbert R E. Proximal tubulopathy: Prime mover and key therapeutic target in diabetic kidney disease [J]. Diabetes, 2017, 66 (4): 791 – 800.
- [5] Takagi S, Li J, Takagaki Y, et al. Ipragliflozin improves mitochondrial abnormalities in renal tubules induced by a high-fat diet [J]. J Diabetes Investig, 2018, 9 (5): 1025 – 32.
- [6] Shibusawa R, Yamada E, Okada S, et al. Dapagliflozin rescues endoplasmic reticulum stress-mediated cell death [J]. Sci Rep, 2019, 9 (1): 9887.
- [7] Yang W, Han P, Min K W, et al. Efficacy and safety of dapagliflozin in Asian patients with type 2 diabetes after metformin failure: A randomized controlled trial [J]. J Diabetes, 2016, 8 (6): 796 – 808.
- [8] Dekkers C, Petrykiv S, Laverman G D, et al. Effects of the SGLT-2 inhibitor dapagliflozin on glomerular and tubular injury markers [J]. Diabetes Obes Metab, 2018, 20 (8): 1988 – 93.
- [9] Lopaschuk G D. Fatty acid oxidation and its relation with insulin resistance and associated disorders [J]. Ann Nutr Metab, 2016, 68 (Suppl 3): 15 – 20.
- [10] Wondmunkun Y T. Obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes: Associations and therapeutic implications [J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2020, 13: 3611 – 6.
- [11] Opazo-Rios L, Mas S, Marin-Royo G, et al. Lipotoxicity and diabetic nephropathy: Novel mechanistic insights and therapeutic opportunities [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21 (7): 2632.
- [12] Xiao L, Zhu X, Yang S, et al. Rap1 ameliorates renal tubular injury in diabetic nephropathy [J]. Diabetes, 2014, 63 (4): 1366 – 80.
- [13] Lee W C, Chau Y Y, Ng H Y, et al. Empagliflozin protects HK-2 cells from high glucose-mediated injuries via a mitochondrial mechanism [J]. Cells, 2019, 8 (9): 1085.
- [14] Durak A, Olgar Y, Degirmenci S, et al. A SGLT2 inhibitor dapagliflozin suppresses prolonged ventricular-repolarization through augmentation of mitochondrial function in insulin-resistant metabolic syndrome rats [J]. Cardiovasc Diabetol, 2018, 17 (1): 144.
- [15] Eleftheriadis T, Pissas G, Tsogka K, et al. A unifying model of glucotoxicity in human renal proximal tubular epithelial cells and the effect of the SGLT2 inhibitor dapagliflozin [J]. Int Urol Nephrol, 2020, 52 (6): 1179 – 89.

The protective mechanism of dapagliflozin on palmitic acid-induced injury of human renal tubular epithelial cells

Ding Tingting^{1,2}, Pan Limeng³, Yang Guang⁴, Yang Jing¹, Zhong Xing¹, Pan Tianrong¹

(¹Dept of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

²Dept of Endocrinology, The People's Hospital of Xuancheng, Xuancheng 242099; ³Dept of Endocrinology, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030;

⁴Dept of Neurology, Traditional Chinese Medicine Hospital of Kunshan, Kunshan 215399)

Abstract Objective To explore the protective effect and mechanism of dapagliflozin on palmitic acid-induced human renal tubular epithelial cells. **Methods** Human renal tubular epithelial cells were cultured *in vitro* and divided into normal control (CON) group, palmitic acid (PA) group, palmitic acid + dapagliflozin (PA + Dapa) group, and dapagliflozin (Dapa) group. After 24 hours of intervention, CCK-8 method was used to detect cell proliferation, DCF immunofluorescence was used to detect intracellular reactive oxygen species (ROS), JC-1 fluorescence was used to detect mitochondrial membrane potential, the kit detected the levels of superoxide dismutase (SOD) and malonaldehyde (MDA) in cells, Western blot detected the levels of apoptotic proteins caspase3, Cleaved caspase3 and cytochrome C (Cyto C), and Hoechst33258 fluorescence detection apoptosis. **Results** Compared with CON,

(下转第 401 页)

[11] Lu E, Su J, Zhou Y, et al. CCL20/CCR6 promotes cell proliferation and metastasis in laryngeal cancer by activating p38 pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85:486–92.

[12] Muscella A, Vetrugno C, Marsigliante S. CCL20 promotes migration and invasiveness of human cancerous breast epithelial cells in primary culture[J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56 (11):2461–73.

CCL20 promotes esophageal squamous cell carcinoma cells migration and invasion through ERK pathway

Nan Hongxing¹, Yu Liuli², Wang Lianghai¹

(¹Dept of Pathology, The First Affiliated Hospital of Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832000; ²Dept of Pathology and Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832000)

Abstract Objective To investigate the influence of C-C motif chemokine ligand 20 (CCL20) on migration, invasion and proliferation of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells, and to preliminarily research its molecular mechanism. **Methods** The CCL20 expression plasmid and interference plasmid was transfected into ESCC cells, and the stably transfected cells was selected with G418, Western blot or qRT-PCR assay was used to assess the effects of over-expression and interference. The influence of CCL20 in migration, invasion and proliferation of ESCC cells was detected by Transwell and CCK8 assays, pathway inhibitors was used to seek the downstream signaling pathway of CCL20. **Results** CCL20 overexpressing and interfering cell lines was successfully established, CCL20 overexpression promoted ESCC cells migration and invasion, and increased the activation level of ERK1/2. Interfering CCL20 expression reduced the ability of migration and invasion in ESCC cells, and the activation level of ERK1/2 decreased. Moreover, ERK1/2 specific inhibitor treatment reversed the migration and invasion induced by CCL20. **Conclusion** CCL20 promotes ESCC cells migration and invasion by activating ERK pathway. CCL20 may be a potential target for the treatment of ESCC.

Key words esophageal squamous cell carcinoma; CCL20; metastasis; migration; invasion

(上接第 395 页)

the PA group decreased cell proliferation, increased ROS level, decreased mitochondrial membrane potential, decreased SOD level and increased MDA level, increased levels of apoptotic proteins caspase3 and Cleaved caspase3, and increased expression of Cyto C, the apoptosis level detected by Hoechst33258 increased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$); the above indicators in the Dapa group were not significantly different from those in the CON group; compared with the PA group, the cell proliferation in the PA + Dapa group increased. The level of ROS decreased, the level of mitochondrial membrane potential increased, the level of SOD increased, the level of MDA decreased, the expression of apoptotic proteins caspase3, Cleaved caspase3, and Cyto C decreased, and the level of apoptosis detected by Hoechst33258 decreased. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Dapagliflozin has a protective effect on human renal tubular epithelial cells induced by palmitic acid. The mechanism may be related to the improvement of mitochondrial function and the level of oxidative stress.

Key words human renal tubular epithelial cells; diabetic kidney disease; dapagliflozin; palmitic acid; mitochondrial dysfunction; oxidative stress