

• 短篇论著 •

SSTR1 基因介导继发性甲状旁腺功能亢进的分子机制研究*

陈 娣, 吴甫民, 雷京红
北京航天总医院肾内科, 北京 100076

摘要:目的 探讨继发性甲状旁腺功能亢进(sHPT)模型中生长抑素受体 1(SSTR1)基因表达的作用机制研究。方法 建立 sHPT, 慢病毒包装 SSTR1, 分为对照组、sHPT 组和 SSTR1 组。实时定量荧光 PCR (qPCR) 和蛋白质印迹法测量在大鼠的整个喉部区域中 SSTR1 和甲状旁腺激素(PTH)水平;免疫印迹法检测 PTH 水平。蛋白质印迹法在大鼠喉部区域中检测经细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)水平。结果 与对照组比较, sHPT 组 SSTR1 mRNA 和蛋白水平降低, PTH 水平升高($P < 0.05$)。与 sHPT 组比较, SSTR1 组 SSTR1 mRNA 和蛋白水平升高, PTH mRNA 和蛋白降低($P < 0.05$), 此外, 免疫组化结果显示与 sHPT 组比较, SSTR1 组的 PTH 水平降低($P < 0.05$)。与对照组比较, sHPT 组 ERK1/2 水平升高, 而过水平降低 ERK1/2 的水平。结论 过表达 SSTR1 后 PTH 水平降低, 抑制 ERK1/2 水平, 对 sHPT 的发展具有保护作用。

关键词:继发性甲状旁腺功能亢进模型; 生长抑素受体 1; 甲状旁腺激素; 细胞外信号调节激酶 1/2

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2024.21.023

中图法分类号:R653

文章编号:1673-4130(2024)21-2681-04

文献标志码:A

甲状旁腺激素(PTH)可调节血清钙和磷酸盐水平以及骨骼强度, PTH 基因表达, PTH 分泌和甲状旁腺细胞增殖由血清钙和磷酸盐决定^[1]。膳食缺钙和实验性慢性肾脏病(CKD)可导致继发性甲状旁腺功能亢进(sHPT), 其特征是 PTH mRNA 水平升高、血清 PTH 和甲状旁腺细胞增殖。钙的消耗和 CKD 会导致 PTH mRNA 水平的变化, 影响其稳定性^[2]。

生长抑素(SST)是一种神经肽, 以两种生物活性形式存在(SST-14 和 SST-28), 它广泛分布在整个神经系统和外周内分泌组织中, 充当神经递质和神经激素^[3]。SST 也称为生长激素释放抑制因子(SRIF), 是一种在整个中枢神经系统中高度表达的神经调节剂, 并被证明在神经退行性疾病的病理学中起着至关重要的作用。SST 的作用由 5 种受体亚型介导, 这些受体由 5 条不同染色体上的 5 个基因编码, 并且是 G 蛋白偶联受体的一部分, 通过其发挥其生物学作用, 调节生长抑素受体亚型(SSTR1-5)影响运动、行为、感觉、自主神经和认知功能^[4]。有研究显示在恶性甲状腺疾病中, SSTR1、3 和 5 已被证明是可表达的, 放射性标记的类似物已被证明可以评估恶性疾病的存在和程度, 在显示受累的亚临床淋巴结方面特别有用^[4]。SSTR1 在介导抗增殖作用方面起着主导作用, SSTR1 激活抑制激素分泌和细胞活力^[5]。但有关于 SSTR1 在 sHPT 中作用尚未清楚。本研究旨在探讨 sHPT 模型中 SSTR1 基因表达的作用机制研究。

1 材料与方法

1.1 动物和分组 SD 雄性大鼠(100~120 g)随机分为对照组、sHPT 组和 SSTR1 组, 对照组: 饲喂日常饲料, sHPT 组和 SSTR1 组: 0.75% 腺嘌呤、高磷(3.0%) 7 d 诱导 CKD, 并低钙的消耗导致 sHPT 模型(sHPT 组)。SSTR1 组为 sHPT 的基础上慢病毒包装 SSTR1; 第 7 天使用 QuantiChrom 钙磷酸盐测定试剂盒(生物测定系统)测定血清中钙、磷和肌酐的生化指标, sHPT 组和 SSTR1 组: 血清肌酐升高, 血清磷酸盐无变化, 血清甲状旁腺素增加。SSTR1 组为 sHPT 的基础上慢病毒包装 SSTR1; 对照组血清钙、血清磷、血清甲状旁腺素、血肌酐分别为(10.5 ± 0.4) mg/dL、(10.9 ± 0.25) mg/dL、(66 ± 22) pg/mL、(0.28 ± 0.02) μ mol/L; sHPT 组为(4.8 ± 0.5) mg/dL、(9.9 ± 0.3) mg/dL、(338 ± 113) pg/mL、(0.72 ± 0.09) μ mol/L; SSTR1 组分别为(4.9 ± 0.6) mg/dL、(9.8 ± 0.4) mg/dL、(339 ± 112) pg/mL、(0.71 ± 0.08) μ mol/L 所有动物实验都得到了动物保护和使用权机构委员会的批准(STD-20221209)。

1.2 慢病毒包装 SSTR1 将大鼠 SSTR1 基因序列(GenBank: NM 009216.3)克隆到 PCDH-MSC-T2A-copGFP-MSCV 质粒表达载体中, 构建 PCDH-SSTR1-T2A-copGFP-MSCV 重组表达载体。后将序列正确的 PCDH-SSTR1-T2A-copGFP-MSCV 重组质粒包装成慢病毒, 重组质粒与包装系统 pPACK 混

合,将含有高浓度慢病毒(108 PG/p24)和聚苯乙烯(4 $\mu\text{g/mL}$)的混合物以 0.25 mL/min 的速度腹腔注射于大鼠,每天 1 次,连续 7 d。对照组小鼠注射等量的无菌生理盐水(0.9%),连续注射 7 d。

1.3 实时定量荧光 PCR(qPCR) 切除大鼠的整个喉部区域,并在液氮中快速冷冻以进行 RNA 提取,使用 RNAiso Plus 试剂提取总 RNA,通过 PrimeScript RT Master Mix 试剂盒反转录为 cDNA,GAPDH 作为内参,每个样本 3 个复孔。引物通过生工生物工程(上海)股份有限公司合成,数据处理根据公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算两组间目的基因相对表达含量的变化。

1.4 蛋白质印迹法分析 使用 BCA 蛋白质测定试剂盒(中国上海 Sangon Biotech)测定蛋白质浓度。使用 SDS-PAGE 分离等量的样品蛋白(20 μg)并转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。用 5%脱脂牛奶试剂封闭膜,后与一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 12 h。通过与辣根过氧化物酶偶联二抗(中国上海 Sangon Biotech)孵育来检测蛋白质条带,并用增强型化学发光试剂(中国江苏 Beyotime)可视化。

1.5 免疫组化 切除大鼠的整个喉部区域,并在液氮中快速冷冻固定在 4%多聚甲醛过夜,在 PBS 缓冲液中洗涤两次后,将组织包埋在石蜡中,并在 Microm HM360 切片机上的喉横平面上切割 50~80 个 5 μm 厚的连续切片。切片进行脱蜡,再水化,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 HCl 中孵育 30 min,以待 DNA 变性。在 PBS 缓冲液

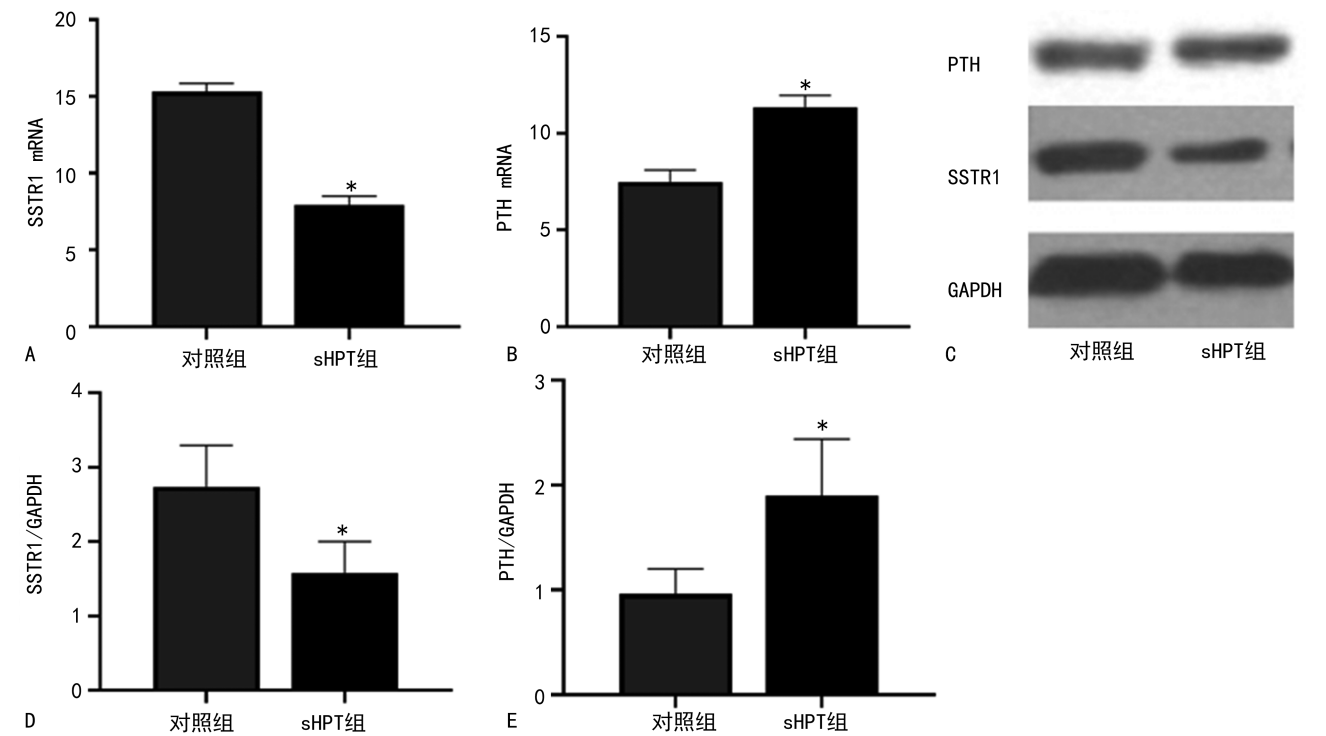
中洗涤后,用 0.01%胰蛋白酶在 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理 3 min,用 20.00%兔血清阻断后,用 1:50 稀释的大鼠单克隆抗体室温孵育 2 h。用生物素化兔抗大鼠血清(1:200);在室温下放置 30 min 切片在碱性磷酸酶结合亲和素生物素复合物(Vector)中孵育 30 min。以 NBT/BCIP (Sigma)为酶底物进行抗 brdu 染色。最后,切片用核速红反染,脱水,裱片。

1.6 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件进行数据分析,计数资料以百分率表示,数据比较采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据比较采用 t 检验。多组间差异通过单因素方差分析,数据表示为来自 3 个独立实验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

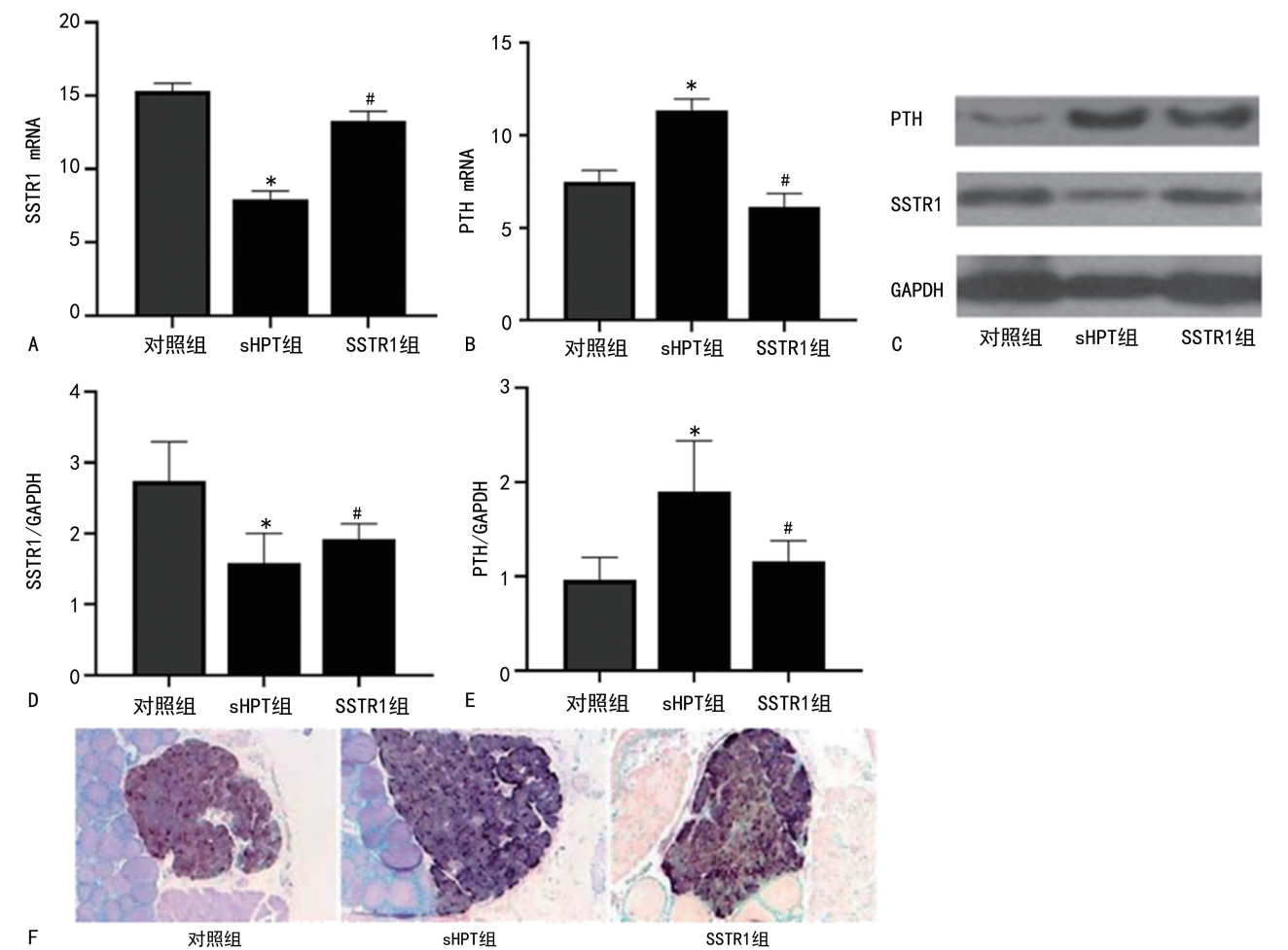
2.1 SSTR1 在 sHPT 模型中的表达 为了研究 SSTR1 在 sHPT 模型中表达,与对照组比较,结果显示 sHPT 组 SSTR1 mRNA 和蛋白表达降低,以及与对照组比较,sHPT 组 PTH mRNA 和蛋白升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1。

2.2 过表达 SSTR1 对 sHPT 模型中 PTH 的作用 本研究探究了过表达 SSTR1 对 sHPT 模型中 PTH 的作用。与 sHPT 组比较,SSTR1 组 SSTR1 mRNA 和蛋白表达升高,以及与 sHPT 组比较,SSTR1 组 PTH mRNA 和蛋白降低,此外,免疫组化结果显示与 sHPT 组比较,SSTR1 组的 PTH 表达降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。



注:A~B为qPCR检测sHPT模型中表达SSTR1及PTH表达。C~E为蛋白印迹法检测sHPT模型中表达SSTR1及PTH表达。与对照组比较,* $P<0.05$ 。

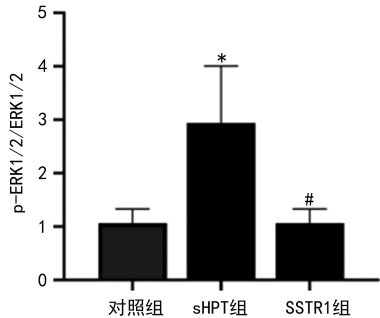
图1 SSTR1在sHPT模型中的表达



注：A~B 为 qPCR 检测 sHPT 模型中表达 SSTR1 及 PTH 表达。C~E 为蛋白印迹，检测 sHPT 模型中 SSTR1 及 PTH 表达。F 为免疫组化检测 sHPT 模型中 SSTR1 及 PTH 表达。与对照组比较，* $P < 0.05$ ；# $P < 0.05$ 。

图 2 过表达 SSTR1 对 sHPT 模型中 PTH 的作用

2.3 SSTR1 对 sHPT 模型中细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2) 的作用 结果显示，与对照组比较，sHPT 组 ERK1/2 表达升高，而 SSTR1 组降低 ERK1/2 的表达，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，见图 3。



注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ；# $P < 0.05$ 。

图 3 SSTR1 对 sHPT 模型中 ERK1/2 的作用

3 讨论

sHPT 以钙磷代谢异常、甲状旁腺增生和 PTH 分泌增加为特征，CKD 常见于维生素 D 缺乏症的 sHPT 患者以及怀孕和哺乳期的 sHPT 患者，随着病情进展，CKD 患者血钙、磷和完整甲状旁腺激素

(iPTH) 水平异常的发生率增加，iPTH 水平的显著升高与死亡率、住院率和自发性骨折发生率的增加显著相关^[6]。研究显示钙耗竭或 CKD 导致的 sHPT 患者 PTH mRNA 水平升高^[7]。SST 是一种多肽，广泛分布在神经系统、胃肠道和内分泌细胞中，SST 可以调节各种生理过程，如促吸收、反分泌和抗增殖^[8]。生长抑素通过与其受体 (SSTRs) 的相互作用触发其下游生物反应，多个 SSTR 在各种细胞中异质表达，不同的受体激活具有不同的作用^[9]。本研究结果显示 SSTR1 在 sHPT 中表达降低，过表达 SSTR1 后 PTH 表达降低，SSTR1 处理抑制 ERK1/2 表达，对 sHPT 的发展具有保护作用。SST 还可从中枢神经系统、炎症和免疫细胞、胰腺、视网膜神经元和上皮细胞中释放，SST 具有抗炎、抗分泌和抗增殖作用，生长抑素抑制垂体生长激素释放的主要作用归因于 SSTR1，SSTR 亚型存在于垂体，甚至存在于单个垂体细胞中，最近，有研究表明 SSTR1 特异性生长抑素-14 (SST-14) 类似物介导电压操作钙通道的抑制，这表明 SSTR1 很可能参与抑制激素释放^[5]。在甲状腺癌中，最常表达的 SSTR 是 SSTR5，表达最强的是 SSTR1。生长抑素至少有两种受体依赖性机制通过 SSTRs 引

起抗增殖作用,一种是通过抑制生长因子受体激酶的有丝分裂信号传导,由于细胞周期进展的停滞而引起生长迟缓,其次,形态学和流式细胞术研究证实了凋亡细胞死亡的诱导^[10]。SSTR1 的活化导致视网膜母细胞瘤抑制蛋白 Rb, p21 和 G1 细胞周期停滞,另一组已经表明,生长抑素与 SSTR-1 的结合会上调 p27,从而导致 G 中的细胞周期停滞 0-G1 阶段,随后是细胞凋亡^[11]。人内分泌肿瘤通常以不同的强度表达生长抑素受体 SSTR1~5,研究显示 SSTR 1~5 在垂体腺瘤、脑肿瘤、肾上腺肿瘤和胃肠道(NET)神经内分泌肿瘤中分布^[12]。此外,研究还涉及甲状腺肿瘤中 SSTR 的表达,但它们主要局限于滤泡旁 C 细胞衍生的甲状腺髓样癌(MTC)^[13]。SSTR1 检测在 sHPT 中的研究仍然很少。本研究结果显示 SSTR 1 在 sHPT 中表达降低,过表达 SSTR1 后 PTH 表达降低。这提示生长抑素多配体类似物或选择性 SSTR1 激动剂可用于甲状腺肿瘤治疗。此外,有研究表明 SSTR1 抑制细胞生长,其相关途径涉及 SHP1/2、ERK1/2 和 p27/p21 信号传导^[14]。有研究表明,小鼠 SSTR1 与 SHP-1/2 相互作用,并通过 Ras、Rap-1 和 B-Raf 依赖性信号通路刺激 ERK1/2 激活,激活的 ERK1/2 导致 p27 的诱导基序 1、抑制细胞周期蛋白 E-cdk2 激酶活性和细胞周期停滞^[15]。有研究确定 SST/SSTR1 的配对调节器通过 ERK1/2 轴起作用,在胶质瘤中,SST 被证明能够通过破坏 ERK1/2 磷酸化来抑制神经胶质瘤细胞的增殖^[16]。此外,有研究发现 SSTR1 通过抑制 ERK1/2 在癌细胞中发挥细胞抑制作用,SSTR1 可以通过抑制 ERK1/2 轴来对抗退行性神经系统疾病的运动障碍^[17]。本研究结果发现过表达 SSTR1 时,ERK1/2 显著降低。这表明 SSTR1 对 sHPT 的发展具有保护作用。综上所述,SSTR1 在 sHPT 中表达降低,过表达 SSTR1 后 PTH 表达降低,SSTR1 处理抑制 ERK1/2 表达,对 sHPT 的发展具有保护作用。

参考文献

[1] CHÁVEZ KV, MÁRQUEZ-GONZÁLEZ H, CHAVEZ-TOSTADO M. The usefulness of intraoperative PTH as a predictor for successful parathyroidectomy in secondary hyperparathyroidism[J]. *Front Surg*, 2021, 8: 696469.

[2] WANG L, TANG R, ZHANG Y, et al. PTH-induced EndMT via miR-29a-5p/GSAP/Notch1 pathway contributed to valvular calcification in rats with CKD[J]. *Cell Prolif*, 2021, 54(6): e13018.

[3] AMPOFO E, NALBACH L, MENGER MD, et al. Regulatory mechanisms of somatostatin expression[J]. *Int J*

Mol Sci, 2020, 21(11): 4170.

[4] HARDA K, SZABO Z, JUHASZ E, et al. Expression of Somatostatin Receptor Subtypes (SSTR-1-SSTR-5) in pediatric hematological and oncological disorders[J]. *Molecules*, 2020, 25(23): 5775.

[5] 韩雨辛, 王春晖. 肾性继发性甲状旁腺功能亢进患者甲状旁腺切除术后复发的预测模型[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外快杂志*, 2023, 37(4): 282-287.

[6] GONG W, LIN Y, XIE Y, et al. Predictors of early post-operative hypocalcemia in patients with secondary hyperparathyroidism undergoing total parathyroidectomy[J]. *J Int Med Res*, 2021, 49(5): 3000605211015018.

[7] STEINL G K, KUO J H. Surgical management of secondary hyperparathyroidism[J]. *Kidney Int Rep*, 2020, 6(2): 254-264.

[8] ROGOZA O, MEGNIS K, KUDRJAVCEVA M, et al. Role of somatostatin signalling in neuroendocrine tumours[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1447.

[9] KUMAR U. Somatostatin and somatostatin receptors in tumour biology[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 25(1): 436.

[10] VÖRÖS I, SÁGHY É, POHÓCZKY K, et al. Somatostatin and its receptors in myocardial ischemia/reperfusion injury and cardioprotection[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 663655.

[11] LI M, WANG X, LI W, et al. Somatostatin receptor-1 induces cell cycle arrest and inhibits tumor growth in pancreatic cancer[J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(11): 2218-23.

[12] Evaluation of the expression of somatostatin receptors by immunohistochemistry in neuroendocrine tumors of the small intestine[J]. *Pol J Pathol*, 2020, 71(1): 30-37.

[13] PISAREK H, STEPIEŃ T, KUBIAK R, et al. Expression of somatostatin receptor subtypes in human thyroid tumors; the immunohistochemical and molecular biology (RT-PCR) investigation[J]. *Thyroid Res*, 2009, 2(1): 1.

[14] KRUG S, MORDHORST J P, MOSER F, et al. Interaction between somatostatin analogues and targeted therapies in neuroendocrine tumor cells[J]. *PLoS One*, 2019, 14(6): e0218953.

[15] LUCAS R M, LUO L, STOW J L. ERK1/2 in immune signalling[J]. *Biochem Soc Trans*, 2022, 50(5): 1341-1352.

[16] NIU Y, JI H. Current developments in extracellular-regulated protein kinase (ERK1/2) inhibitors[J]. *Drug Discov Today*, 2022, 27(5): 1464-1473.

[17] CAI L, TU L, YANG X, et al. HOTAIR Accelerates dyskinesia in a MPTP-Lesioned mouse model of PD via SSTR1 methylation-mediated ERK1/2 axis[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 22: 140-152.