

· 实验研究 ·

外源性结缔组织生长因子 对肾小管上皮细胞的转分化和胶原合成效应

钱明¹, 甘卫华², 陈荣华¹, 潘晓勤¹, 费莉¹

(1 南京医科大学儿科研究所, 江苏 南京 210029; 2 南京医科大学第二附属医院儿科, 江苏 南京 210011)

[摘要] 目的 大量研究表明内源性结缔组织生长因子(CTGF)在肾小管间质纤维化(TIF)进程中发挥了重要作用,为进一步阐明外源性CTGF的作用机制,该实验探讨了重组人结缔组织生长因子(rhCTGF)刺激对人肾小管上皮细胞(HK2)转分化和胶原合成的作用。方法 rhCTGF 5 ng/mL 刺激 HK2 细胞,用倒置显微镜观察细胞形态学变化,同时在刺激后 0, 3, 6, 12, 24, 48 h 各点收集细胞,RT-PCR 检测上皮细胞钙粘蛋白(E-cadherin)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、胶原 I α_1 (Col I α_1)和胶原 IV α_1 (Col IV α_1) mRNA 表达变化。结果 rhCTGF 5 ng/mL 刺激使 HK2 细胞形态由椭圆形转为梭形,下调 E-cadherin mRNA 表达,上调 α -SMA mRNA 表达,但对 Col I α_1 和 Col IV α_1 mRNA 表达没有影响。结论 外源性 CTGF 能导致 HK2 细胞转分化,但不能促进其胶原合成。

[中国当代儿科杂志, 2006, 8(2):144-146]

[关键词] 结缔组织生长因子;肾小管上皮细胞;转分化;胶原

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)02-0144-03

Transdifferentiation and collagen-synthesis effects of exogenous connective tissue growth factor on renal tubular epithelial cells *in vitro*

QIAN Ming, GAN Wei-Hua, CHEN Rong-Hua, PAN Xiao-Qin, FEI Li. Institute of Pediatrics, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China (Chen R-H, Email: rhchen@njmu.edu.cn)

Abstract: Objective To investigate the effects of recombinant human connective tissue growth factor (rhCTGF) stimulation on epithelial-myofibroblast transdifferentiation (EMT) and collagen-synthesis in human renal tubular epithelial cell line (HK2) *in vitro*. **Methods** The cultured HK2 cells were stimulated with rhCTGF of 5 ng/mL. The morphological changes were observed under an inverted microscope. The cells were collected at 0, 3, 6, 12, 24 and 48 hrs after rhCTGF stimulation. The expression of E-cadherin, α -smooth muscle actin (α -SMA), collagen I α_1 (Col I α_1) and collagen IV α_1 (Col IV α_1) mRNAs were detected by RT-PCR. **Results** rhCTGF stimulation changed the HK2 cell appearance from oval to fusiform, down-regulated the E-cadherin mRNA expression and up-regulated α -SMA mRNA expression, but had no effects the Col I α_1 and Col IV α_1 mRNA expression. **Conclusions** Exogenous CTGF can mediate the EMT but has no collagen-synthesis effects on HK2 cells.

[Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8(2):144-146]

Key words: Connective tissue growth factor; Renal tubular epithelial cell; Transdifferentiation; Collagen

肾小管间质纤维化(TIF)是各种慢性肾脏疾病发展成终末期肾衰(ESRD)的共同通路,也是肾脏损害进展的主要决定因素。TIF组织学特征包括小管上皮细胞转分化(EMT)和ECM蛋白(包括胶原I、III、IV)的聚集^[1]。既往大量研究已经表明转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)是肾小管上皮细胞EMT和胶原合成的最有效刺激因子。对于TGF- β_1 下游因子-结缔组织生长因子(CTGF)的研究,内源性CTGF作用机制方面已有大量文献报道,但外源性CTGF直接刺激对肾小管上

皮细胞EMT和胶原合成的研究至今国内外报道尚少。为此,我们直接采用rhCTGF进行刺激,通过观察HK2细胞的形态学变化及E-cadherin、 α -SMA、Col I α_1 和Col IV α_1 等基因mRNA表达水平的变化,探讨了rhCTGF和EMT、胶原合成之间的关系,以进一步明确CTGF在TGF- β_1 启动的TIF进程中的信号机制。

[收稿日期]2005-09-03;[修回日期]2005-10-31

[作者简介]钱明,男,硕士研究生,医师。主攻方向:小儿肾脏病。

[通讯作者]陈荣华,教授,南京医科大学儿科研究所,210029

1 材料与方法

1.1 材料

正常人肾小管上皮细胞(HK2)购自中国典型培养物保藏中心。主要试剂:重组人 CTGF 蛋白(美国 pep-rotech),DMEM F12 培养基(美国 Gibco),胎牛血清(四季青),RNA 抽提试剂 Tri Reagent(美国 MRC),逆转录试剂盒(美国 promega),PCR 试剂盒(天为时代)。引物由 invitrogen 公司合成,见表 1^[2]。

表 1 引物序列

项目	序列	备注
E-cadherin 正义	5-GGG GTC TTG CTA TGT TGC C-3	产物 439 bp
E-cadherin 反义	5-AGT TCC GCT CTG TCT TTG G-3	
α -SMA 正义	5-GCT CAC GGA GGC ACC CCT GAA-3	产物 589 bp
α -SMA 反义	5-CTG ATA GGA CAT TGT TAG CAT-3	
Col I α_1 正义	5-GGC GGC CAG GGC TCC GAC CC-3	产物 347 bp
Col I α_1 反义	5-AAT TCC TGG TCT GGG GCA CC-3	
Col IV α_1 正义	5-CAA TGC CCT TCC TGT TCT GC-3	产物 452 bp
Col IV α_1 反义	5-GTG GAC GGC GTA GGC TTC TT-3	
GAPDH 正义	5-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3	产物 452 bp
GAPDH 反义	5-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3	

1.2 方法

1.2.1 细胞处理 HK2 细胞培养于 37℃,5% CO₂ 培养箱。培养基成分包括 DMEM F12 培养基、10% 胎牛血清(FBS)、2.5 g/L HEPES、1.8 g/L 碳酸氢钠、青霉素 1 × 10⁵ U/L、链霉素 100 mg/L。0.05% 胰酶 + 0.02% EDTA 消化后,2 × 10⁶ 细胞接种于 50 mL 塑料培养瓶。70% ~ 80% 融合时改为无血清 DMEM 培养 24 h 使其生长同步化后进行 rhCTGF 刺激,在含有 0.5% FBS DMEM 中培养 0,3,6,12,24,48 h 后收集细胞。各组细胞数及培养液体积均相等。

1.2.2 细胞形态学 将培养细胞在倒置显微镜下观察,比较刺激后各时间点形态并照相记录。

1.2.3 RT-PCR 检测相关基因表达水平的变化 按 Tri Reagent 说明书提取细胞总 RNA,A260/A280 比值在 1.8 ~ 2.0 之间,提示 RNA 纯度高。琼脂糖电泳显示 28S,18S 条带清晰,前者荧光强度约为后者两倍,无其他杂带,提示 RNA 完整无降解。按逆转录试剂说明书逆转录合成第一条 cDNA 链,并以等量 cDNA 为模板进行 PCR 扩增反应。反应条件:94℃ 变性 5 min,然后进入循环,94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 30 s;最后 72℃ 延伸 7 min。内参 GAPDH 为 28 循环,而 CTGF、E-cadherin、 α -SMA、Col I α_1 和 Col IV α_1 均为 32 循环。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳、凝胶成像系统成像后,用图像分析处理系统(美国 UVP 公司)进行灰度扫描,以密度代

表其表达量。用 GAPDH 量校正,将两者吸光度值的相对量进行分析。重复 3 次独立的 RT-PCR 全过程。

1.3 统计学分析

结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 12.0 软件进行统计学分析, $P < 0.05$ 示差异具有显著性。

2 结果

2.1 HK2 细胞形态学改变

正常对照组细胞为椭圆形,rhCTGF 5 ng/mL 刺激 24 h 后细胞拉长呈梭形。

2.2 HK2 细胞 E-cadherin, α -SMA, Col I α_1 和 Col IV α_1 mRNA 表达

rhCTGF 5 ng/mL 刺激使 HK2 细胞 E-cadherin mRNA 表达呈时间依赖性持续下降; α -SMA mRNA 表达呈时间依赖性持续增高;而 Col I α_1 和 Col IV α_1 mRNA 表达则在 rhCTGF 刺激前后没有明显变化(见图 1 ~ 3)。

3 讨论

肾小管间质的细胞包括小管上皮细胞和成纤维细胞,小管上皮细胞是间质主要细胞,而成纤维细胞通常情况下数目很少,但成纤维细胞是 ECM 基质主要生成者。TIF 时,小管上皮细胞可通过 EMT 转分化为成纤维细胞/肌成纤维细胞,从而大量产生胶原蛋白。除了通过转分化效应间接增加胶原蛋白合成外,小管上皮细胞也直接参与了 ECM 过量沉积^[3]。

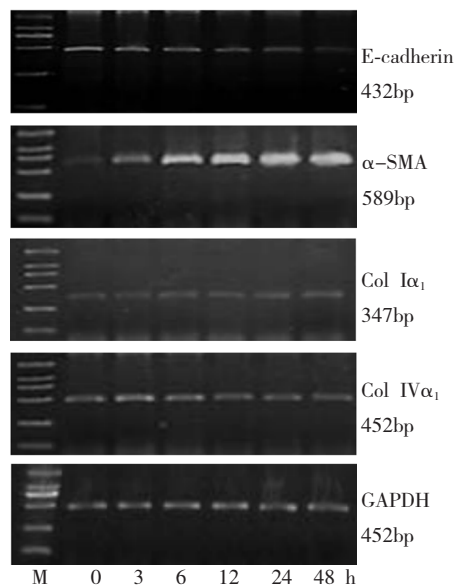


图 1 rhCTGF5 ng/mL 刺激 HK2 细胞 0,3,6,12,24,48 h 后 E-cadherin、 α -SMA、Col I α_1 和 Col IV α_1 mRNA 表达。M(marker,从下到上条带大小依次为 100 bp、250 bp、500 bp、750 bp、1 000 bp、2 000 bp)

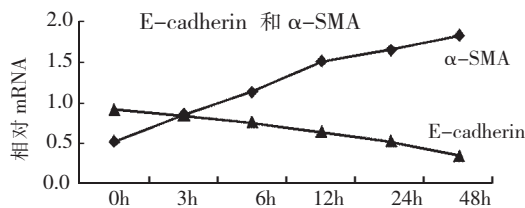


图2 E-cadherin、α-SMA mRNA 表达趋势

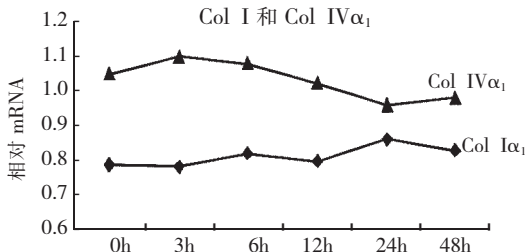


图2 Col Iα₁、Col IVα₁ mRNA 表达趋势

TGF-β₁ 作为 TIF 最重要促发因子的观点已经得到公认,CTGF 作为 TGF-β₁ 下游因子也被广泛证实。Ito 等^[4]对肾病患者进行活检发现人类新月体肾小球肾炎、IgA 肾病、局灶节段性肾小球硬化以及糖尿病肾病的肾活检标本中都有 CTGF mRNA 高表达,CTGF 分布与增生性损伤有很大关系,TIF 病例 CTGF mRNA 表达很强烈。最近 Okada 等^[5]在次全肾切除动物模型,证实 CTGF 反义 ODN 干预能在各组织学水平减轻肾间质纤维化的病变程度,以上结果均提示 CTGF 是 TGF-β 下游因子。

我们研究发现,rhCTGF 能使 HK2 细胞形态发生变化,由上皮样的椭圆形变为成纤维样的长梭形,同时下调 E-cadherin mRNA 表达,上调 α-SMA mRNA 表达,表明 rhCTGF 体外直接刺激 HK2 细胞可以使其发生转分化。EMT 时四个关键步骤依次为:①上皮黏附特性消失;②α-SMA 表达和肌动蛋白重组;③突破基底膜;④细胞迁移和入侵增强。E-cadherin 是上皮细胞特征性标志,在 EMT 时首先消失;α-SMA 是肌成纤维细胞标志性蛋白,正常情况下肾小管上皮细胞无 α-SMA 表达,因而是发生 EMT 的重要标志^[6]。rhCTGF 刺激 HK2 细胞转分化的机制可能为 rhCTGF 通过与细胞膜上特定配体结合,启动细胞内信号转导,促进了 α-SMA 等相关基因的转录而启动^[7]。

但在胶原合成方面,我们发现 HK2 细胞在 rhCTGF 刺激后 Col Iα₁ 和 Col IVα₁ mRNA 表达均没有增加,这个结果和 Wang^[8]、Gore-Hyer^[9]研究一致。Wang 等发现 MCT(小鼠近端小管上皮)细胞在 rhCTGF 1nmol/L 刺激后,其 Col Iα₂、Col IIIα₁ mRNA 表达并不增加;Gore-Hyer 等用 rhCTGF 5 ng/mL 刺激 HTEC(人近端小管上皮)细胞,发现 Col IV mRNA 表达亦没有增加。但

最近 Qi 等^[10]报道 rhCTGF 20 ng/mL 刺激 PTC(人近端小管上皮)细胞 48 h,其蛋白水平 Col IV 含量适度升高,与 Wang^[8]、Gore-Hyer^[9]及我们实验结果不一致,考虑以下原因:①rhCTGF 刺激量差异;②转录后变化。

本研究结果提示:小剂量外源性 CTGF 刺激能使 HK2 细胞发生转分化但不能促进其胶原合成。这也印证了 Gore-Hyer 的观点:在肾纤维化过程中,CTGF 对于转分化作用较引起胶原合成作用更为重要^[9]。而内源性 CTGF 已被证实在 HKC(人肾小管上皮)细胞介导 TGF-β₁ 刺激引起的转分化效应^[2],在 NRK52E(大鼠肾小管上皮)细胞介导 TGF-β₁ 刺激引起的 I 型胶原合成^[11]。可见内外源性 CTGF 存在效应差异,其原因有待于进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Li JH, Zhu HJ, Huang XR, Lai KN, Johnson RJ, Lan HY. Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF-Beta on renal tubular epithelial cells by blocking Smad2 activation[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(6):1464-1472.
- [2] Zhang C, Meng X, Zhu Z, Yang X, Deng A. Role of connective tissue growth factor in renal tubular epithelial-myofibroblast trans-differentiation and extracellular matrix accumulation in vitro[J]. Life Sci, 2004, 4, 75(3):367-379.
- [3] Lam S, van der Geest RN, Verhagen NA, Daha MR, van Kooten C. Secretion of collagen type IV by human renal fibroblasts is increased by high glucose via a TGF-beta-independent pathway[J]. Nephrol Dial Transplant, 2004, 19(7):1694-1701.
- [4] Ito Y, Aten J, Bende RJ, Oemar BS, Rabelink TJ, Weening JJ, et al. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis[J]. Kidney Int, 1998, 53(4):853-861.
- [5] Okada H, Kikuta T, Kobayashi T, Inoue T, Kanno Y, Takigawa M, et al. Connective tissue growth factor expressed in tubular epithelium plays a pivotal role in renal fibrogenesis[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(1):133-143.
- [6] Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis[J]. Am J Pathol, 2001, 159(4):1465-1475.
- [7] 张春,朱忠华,邓安国. 结缔组织生长因子对人肾小管上皮细胞转分化影响的研究[J]. 中华肾脏病杂志, 2003, 19(6):374-377.
- [8] Wang S, Denichilo M, Brubaker C, Hirschberg R. Connective tissue growth factor in tubulointerstitial injury of diabetic nephropathy[J]. Kidney Int, 2001, 60(1):96-105.
- [9] Gore-Hyer E, Shegogue D, Markiewicz M, Lo S, Hazen-Martin D, Greene EL, et al. TGF-beta and CTGF have overlapping and distinct fibrogenic effects on human renal cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002, 283(4):F707-F716.
- [10] Qi W, Twigg S, Chen X, Polhill TS, Poronnik P, Gilbert RE, et al. Integrated actions of transforming growth factor-beta1 and connective tissue growth factor in renal fibrosis[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2005, 288(4):F800-F809.
- [11] 张海燕,李幼姬,杜勇,梁鸣,李晓艳,余学清,等. 结缔组织生长因子反义寡核苷酸对肾小管上皮细胞胶原分泌的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2004, 2:122-126.

(本文编辑:吉耕中)