

· 实验研究 ·

# 外源性结缔组织生长因子对人肾小管上皮细胞胶原Ⅲ合成的影响

张爱青,甘卫华,丁桂霞,龚晶

(南京医科大学第二附属医院儿肾科,江苏 南京 210011)

**[摘要]** **目的** 结缔组织生长因子(CTGF)是一种重要的参与肾纤维化的细胞因子,为了进一步阐明外源性CTGF的作用机制,该文探讨了外源性CTGF对人肾小管上皮细胞胶原Ⅲ合成中的作用。**方法** 将体外培养的人肾小管上皮细胞HK<sub>2</sub>分为3组:①对照组;②CTGF小剂量组(终浓度为2.5 ng/mL);③CTGF大剂量组(终浓度为20 ng/mL)。用倒置显微镜观察细胞形态变化,RT-PCR检测HK<sub>2</sub>细胞胶原Ⅲα mRNA水平的变化,免疫组织化学方法观察HK<sub>2</sub>细胞胶原Ⅲα的表达。**结果** 不同浓度的CTGF作用于HK<sub>2</sub>细胞48 h后,均可使HK<sub>2</sub>细胞由椭圆形变为梭形。大剂量CTGF刺激HK<sub>2</sub>细胞48 h后胶原Ⅲα mRNA水平显著升高( $P < 0.05$ ),大剂量CTGF组HK<sub>2</sub>细胞胞浆表达胶原Ⅲα也显著增加( $P < 0.05$ )。**结论** CTGF在体外能够诱导人肾小管上皮细胞发生形态改变,大剂量的CTGF刺激可以增加人肾小管上皮细胞胶原Ⅲ的合成。 [中国当代儿科杂志,2008,10(2):188-190]

**[关键词]** 结缔组织生长因子;胶原;肾小管上皮细胞

**[中图分类号]** R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)02-0188-03

## Effects of exogenous connective tissue growth factor on collagen III synthesis of human renal tubular epithelial cells

ZHANG Ai-Qing, GAN Wei-Hua, DING Gui-Xia, GONG Jing. Department of Pediatric Nephrology, Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, China (Gan W-H, Email: weihuagan@yahoo.com.cn)

**Abstract: Objective** To explore the role of exogenous connective tissue growth factor (CTGF) in the collagen III synthesis of human renal tubular epithelial cell line HK<sub>2</sub> *in vitro*. **Methods** Cultured HK<sub>2</sub> cells were randomly assigned to three groups: placebo-control, low-dose CTGF-treated (2.5 ng/mL) and high-dose CTGF-treated groups (20 ng/mL). Cell morphological changes were observed under an inverted microscope. Collagen III α mRNA expression was detected using RT-PCR. Immunohistochemistry staining was used to assess the levels of intracellular collagen III α protein. **Results** After 48 hrs of low- or high- dose CTGF treatment, the appearances of HK<sub>2</sub> cells were changed from oval to fusiform. High-dose CTGF treatment increased collagen III α mRNA expression ( $0.4461 \pm 0.0274$  vs  $0.2999 \pm 0.0115$ ;  $P < 0.05$ ) as well as the protein expression of collagen III α ( $0.4075 \pm 0.0071$  vs  $0.3503 \pm 0.0136$ ;  $P < 0.05$ ) compared with the placebo-control group. **Conclusions** CTGF can induce morphological changes of human renal tubular epithelial cells *in vitro*. High concentration of CTGF may increase the synthesis of collagen III α.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10 (2):188-190]

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

Ⅲ型胶原是细胞外基质的主要成分,其合成和降解的失衡是引起间质纤维化的直接原因之一。目前已经在多种肾脏疾病中发现外源性结缔组织生长因子(CTGF)作为一种重要的致损伤性的因子在肾脏疾病的发生发展中起关键性的作用<sup>[1,2]</sup>。内源性CTGF已经明确作为转化生长因子-β(TGF-β)的下游因子参与其诱导的人肾小管上皮细胞转分化(EMT)和细胞外基质的合成<sup>[3,4]</sup>。但关于外源性CTGF对人肾小管上皮细胞细胞外基质合成的作用了解较少。本实验以体外培养的人肾小管上皮细胞

为研究对象,应用RT-PCR和免疫组化的方法观察外源性CTGF对人肾小管上皮细胞Ⅲ型胶原合成的影响,以便进一步阐明CTGF与肾间质纤维化的关系。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 细胞 正常人肾小管上皮细胞(HK<sub>2</sub>)购自中国典型培养物保藏中心。

1.1.2 主要试剂 重组人CTGF蛋白(rhCTGF,

[收稿日期]2007-05-08;[修回日期]2007-07-19  
[作者简介]张爱青,男,硕士,医师。主攻方向:小儿肾脏病。  
[通讯作者]甘卫华,主任医师,南京医科大学第二附属医院儿肾科,邮编:210011。

peprotech), DMEM/F12 培养基、HEPES (Gibco), 胎牛血清 (杭州四季青), RNA 抽提试剂 TRIzol (Invitrogen), 逆转录试剂盒 (promega), Taq 酶, DNA maker (TaKaRa), 羊抗人胶原Ⅲα 多克隆抗体 (1:200, Santa Cruz), HRP 标记兔抗羊二抗 (1:200, 武汉博士德), DAB 显色液 (武汉博士德)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 HK<sub>2</sub> 细胞用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液传代培养, 培养条件为 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>。0.5 g/L 胰酶 + 0.2 g/L EDTA 消化细胞后, 1 × 10<sup>5</sup>/mL 细胞接种于 50 mL 塑料培养瓶。先以 100 mL/L FBS-DMEM/F12 培养细胞, 70% ~ 80% 融合时改用无血清培养基培养 24 h, 使细胞生长同步化。弃去培养液, 将 HK<sub>2</sub> 细胞分为 3 组: ①对照组: 加无血清 DMEM/F12 培养液。②小剂量 CTGF 组: 在无血清 DMEM/F12 培养液中加入 CTGF (终浓度为 2.5 ng/mL)。③大剂量 CTGF 组: 在无血清 DMEM/F12 培养液中加入 CTGF (终浓度为 20 ng/mL)。每组设 3 个复瓶, 作用 48 h 后收集细胞。

1.2.2 HK<sub>2</sub> 细胞形态学观察 加入各组试剂后, 每 6 h 在倒置显微镜下观察细胞形态变化, 48 h 后倒置显微镜下照相。

1.2.3 RT-PCR 加入 CTGF 48 h 后, 提取总的 RNA, 经紫外分光光度计鉴定, 取总 RNA 2 μg 作逆转录, 步骤参照逆转录试剂盒说明书。取 1 μL 逆转录产物为模板, 进行 PCR 扩增反应。GAPDH 引物大小 452 bp, 引物正义链 5-ACCACAGTCCATGC-CATCAC-3, 反义链 5-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3; 胶原Ⅲα 引物大小 230 bp, 引物正义链 5-GCTTC-CCAGAACATCACA-3, 反义链 5-GGTAGTCTCA-CAGCCTTGC-3。GAPDH 反应参数: 预变性 94℃ 5 min, 变性 94℃ 30 s, 退火 54℃ 40 s, 延伸 72℃ 30 s, 28 个循环后, 72℃ 延伸 7 min。胶原Ⅲα 反应参数: 预变性 94℃ 5 min, 变性 94℃ 30 s, 退火 57℃ 40 s, 延伸 72℃ 30 s, 32 个循环后, 72℃ 延伸 7 min。取 PCR 产物 5 μL 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 凝胶成像系统成像后, 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, 计算出胶原Ⅲα 的相对表达量。重复 3 次独立的 RT-PCR 全过程。

1.2.4 免疫组织化学 ①细胞爬片制作: 将 HK<sub>2</sub> 细胞, 按 1 × 10<sup>5</sup>/mL 接种于置有玻片的 6 孔板中。培养条件、细胞分组和处理方法同前。48 h 后收集玻片。②免疫组化染色: 玻片冰丙酮固定 15 min, PBS 冲洗后 Triton X-100 孵育 20 min, PBS 清洗, 滴

加 0.03% 双氧水孵育 15 min, PBS 清洗, 再用兔血清 37℃ 封闭 20 min, 加一抗于 37℃ 孵育 1 h, PBS 清洗后加二抗 37℃ 30 min, PBS 清洗加 SABC 液孵育 30 min, 最后 DAB 显色, 苏木素复染。PBS 代替一抗做阴性对照。③结果观察: 以细胞胞浆出现棕黄色颗粒为阳性细胞, 采用捷达病理图像分析软件分析, 各组细胞爬片随机取 6 个视野, 分别测定其平均光密度 A 值。

### 1.3 统计学处理

数据以均数 ± 标准差表示 ( $\bar{x} \pm s$ ), 计量数据的比较采用单因素方差分析和 *q* 检验。P < 0.05 示差异有统计学意义。数据由 SPSS11.0 统计软件分析。

## 2 结果

### 2.1 CTGF 对 HK<sub>2</sub> 细胞形态的影响

倒置显微镜下观察, 正常 HK<sub>2</sub> 细胞为不规则椭圆形贴壁细胞, 培养液中加入 CTGF (2.5 ng/mL) 48 h 后, 可见部分 HK<sub>2</sub> 细胞由椭圆形变为长梭形。增加培养液中 CTGF 浓度, 梭形化细胞的数量增加, 且细胞形态的梭形化更加明显。

### 2.2 CTGF 对 HK<sub>2</sub> 细胞胶原Ⅲα mRNA 水平的影响

RT-PCR 结果显示, 正常 HK<sub>2</sub> 细胞少量胶原Ⅲα。小剂量 CTGF (2.5 ng/mL) 作用 48 h 后, 胶原Ⅲα mRNA 的表达 (0.2984 ± 0.0225) 较对照组 (0.2999 ± 0.0115) 无明显变化; 大剂量 CTGF (20 ng/mL) 刺激 48 h 后, 胶原Ⅲα mRNA 的表达 (0.4461 ± 0.0274) 较对照组显著增加 (P < 0.05; 图 1)。

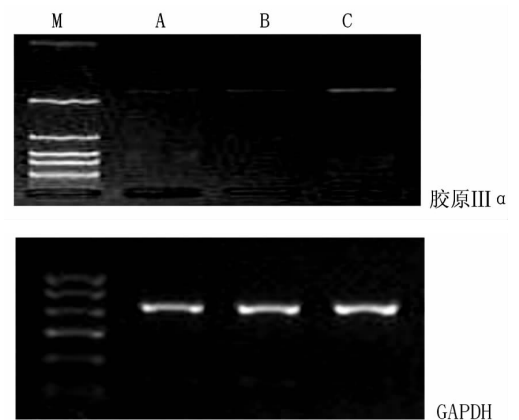


图1 CTGF 对 HK<sub>2</sub> 细胞胶原Ⅲα mRNA 水平的影响 M: marker (从上到下依次为 100, 250, 500, 750, 1 000, 2 000 bp); A: 对照组; B: CTGF 2.5 ng/mL; C: CTGF 20 ng/mL。

### 2.3 CTGF 对 HK<sub>2</sub> 细胞胞浆胶原Ⅲα 表达的影响

免疫组化结果显示, 小剂量 CTGF (2.5 ng/mL) 作用 48 h 后, HK<sub>2</sub> 细胞胞浆胶原Ⅲα 的蛋白表达

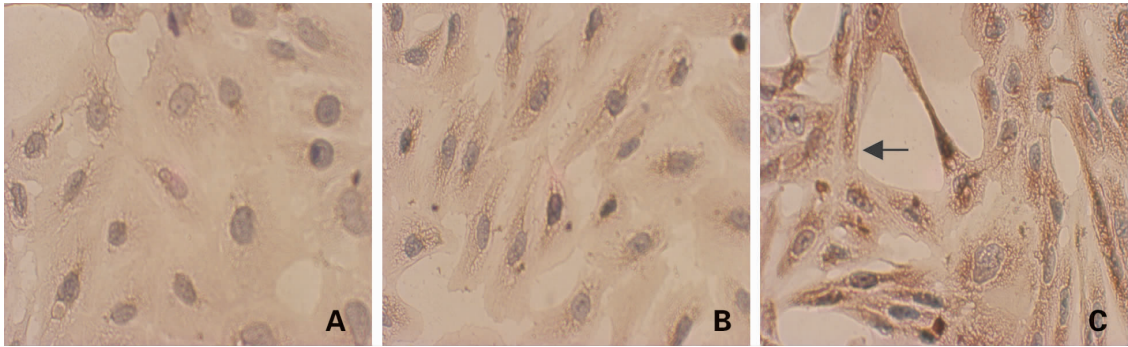


图 2 CTGF 对 HK<sub>2</sub> 细胞胞浆胶原Ⅲα 表达的影响 (×200) A: 对照组; B: CTGF 2.5 ng/mL 组; C: CTGF 20 ng/mL 组箭头标识为表达胶原Ⅲα 的阳性细胞, 细胞胞浆中有大量棕色颗粒表达。

( $0.3567 \pm 0.0103$ ) 较对照组 ( $0.3503 \pm 0.0136$ ) 无明显变化; 大剂量 CTGF (20 ng/mL) 刺激 48 h 后, HK<sub>2</sub> 细胞胞浆胶原Ⅲα 的蛋白表达 ( $0.4075 \pm 0.0071$ ) 较对照组显著增加 ( $P < 0.05$ ; 图 2)。

可以增加其胶原Ⅲ的表达, 促进肾间质纤维化的形成, 因此有效的阻断 CTGF 的方法有可能成为临床防治肾纤维化的重要手段。

[参 考 文 献]

3 讨论

肾间质纤维化的发生大致可以分为 3 个阶段: 诱导阶段; 炎症基质合成阶段; 炎症后基质合成阶段<sup>[5]</sup>。肾间质纤维化的本质就是细胞外基质 (ECM) 成分的异常沉积<sup>[6]</sup>。胶原是细胞外基质的骨架结构, 肾脏的固有细胞都可以分泌少量的胶原成分, 包括 I, II, III, IV 型胶原等。在病理状态下, 肾脏活化的成纤维细胞是产生胶原最主要的细胞<sup>[7]</sup>, 而肾小管上皮细胞已经被证实是活化的肾成纤维细胞的主要来源之一<sup>[8]</sup>。

TGF-β 是目前发现最为有效的致纤维化的细胞因子, 内源性 CTGF 作为其下游致纤维化的关键因子也被诸多实验证实<sup>[9]</sup>。我们使用外源性的 CTGF 直接刺激人肾小管上皮细胞 48 h, 结果发现肾小管上皮细胞发生了形态的改变, 由不规则的椭圆形向长梭形转化, 随着 CTGF 刺激浓度的增加, 发生变化的细胞数量也增加。这些同我们先前的实验发现相同<sup>[10]</sup>。可见在 CTGF 作用下细胞的表型发生了改变。2.5 ng/mL CTGF 刺激人肾小管上皮细胞不能增加胶原Ⅲα 基因的转录; 增加 CTGF 浓度至 20 ng/mL, 可见人肾小管上皮细胞胶原Ⅲα 基因的转录明显增加。免疫组织化学的结果进一步显示不同浓度 CTGF 刺激人肾小管上皮细胞胶原Ⅲα 蛋白表达情况同其基因转录情况一致。Qi 等<sup>[11]</sup>报道 CTGF 20 ng/mL 刺激 PTC (人近端小管上皮) 细胞 48 h, 其 IV 型胶原含量适度升高。其变化趋势和本研究一致。综上所述, 外源性 CTGF 可以促使人肾小管上皮细胞发生形态改变, 大剂量的 CTGF 刺激

[1] de las Heras N, Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Sanz-Rosa D, Miana M, Aragoncillo P, et al. Role of connective tissue growth factor in vascular and renal damage associated with hypertension in rats [J]. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2006, 7(4): 192 - 200.

[2] Umezono T, Toyoda M, Kato M, Miyauchi M, Kimura M, Maruyama M, et al. Glomerular expression of CTGF, TGF-beta 1 and type IV collagen in diabetic nephropathy [J]. J Nephrol, 2006, 19(6): 751-757.

[3] 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.

[4] 张春, 朱忠华, 刘建社, 杨晓, 邓安国. 结缔组织生长因子对肾小管上皮细胞转分化的调节机制 [J]. 中华医学杂志, 2005, 85(41): 2920-2925.

[5] Kuncio GS, Neilson EG, Haverly T. Mechanism of tubular interstitial fibrosis [J]. Kidney Int, 1991, 39(3): 550-556.

[6] Becker GJ, Hewitson TD. The role of tubulointerstitial injury in chronic renal failure [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2000, 9(2): 133-138.

[7] Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implication for fibrosis [J]. J Clin Invest, 2003, 112(12): 1176-1784.

[8] Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention [J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(1): 1-12.

[9] Yokoi H, Mukoyama M, Sugawara A, Mori K, Nagae T, Makino H, et al. Role of connective tissue growth factor in fibronectin expression and tubulointerstitial fibrosis [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002, 282(5): 933-942.

[10] 钱明, 甘卫华, 陈荣华, 潘晓勤, 费莉. 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 [J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(2): 144-146.

[11] 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): F800-809.

(本文编辑: 吉耕中)