

· 基础论著 ·

转化生长因子 $\beta 1$ 诱导的肾小管上皮细胞
间质转分化过程对 twist 表达的影响

张勇 王丽萍 陈建

【摘要】 目的 探讨转化生长因子(transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)诱导的肾小管上皮细胞间质转分化过程中 twist 表达的改变及意义。方法 将人肾小管上皮细胞株(human kidney tubular epithelial cell line, HKCs)细胞分为正常对照组、10 ng/ml TGF- $\beta 1$ 组;48 h 后观察细胞形态,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR),免疫组织化学测定 E-钙黏素(E-cadherin)的表达,免疫印迹测定 twist 的表达;同时选取不同浓度 TGF- $\beta 1$ (0.5 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml)刺激 HKCs 细胞,48 h 后测定 twist 的表达。结果 正常体外培养的 HKCs 经 TGF- $\beta 1$ 培养 48 h 后 twist 蛋白表达明显增加($P < 0.05$),同时 E-cadherin 表达明显下降($P < 0.05$),同时 TGF- $\beta 1$ 对 twist 蛋白表达的影响呈浓度依赖性($P < 0.05$)。结论 TGF- $\beta 1$ 诱导肾小管上皮细胞间质转分化过程中存在 twist 的激活。

【关键词】 转化生长因子 $\beta 1$; Twist 转录因子; 上皮间质转分化

The change of twist protein expressions in epithelial-mesenchymal transdifferentiation of kidney tubular epithelial cells promoted by TGF- $\beta 1$

ZHANG Yong, WANG Li-ping, CHEN Jian. Department of Nephrology, Fuzhou General Hospital of The Nanjing Military Region, Fuzhou 350001, China

Corresponding author: ZHANG Yong, Email: zhangyong@medmail.com.cn

【Abstract】 Objective To observe the change of the twist protein expression in epithelial-mesenchymal transdifferentiation of HKCs promoted by transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). **Methods** The human kidney tubular epithelial cell line (HKCs) was cultured on plastic pates in the presence or absence of recombinant human TGF- $\beta 1$. After cultured for 48 hours, the expressions of E-cadherin were detected by cell immunocytochemistry and RT-PCR. Western blot was used to detect the expression of twist. **Results** Compared with control group, the expressions of E-cadherin were significantly decreased in TGF- $\beta 1$ group ($P < 0.05$). Conversely, a profound increase of twist protein expression was seen at 48 h after being induced by 10 ng/ml TGF- $\beta 1$ in HKCs ($P < 0.05$). The further study showed there was positive correlation between the expression of twist protein and the concentration of positive TGF- $\beta 1$ ($P < 0.05$). **Conclusions** The expressions of twist protein are induced in the epithelial-mesenchymal transdifferentiation of HKCs promoted by TGF- $\beta 1$.

【Key words】 Transforming growth factor- $\beta 1$; Twist transcription factor; Epithelial-mesenchymal transdifferentiation

Twist 基因是 80 年代发现的一种合子基因,大量研究发现 twist 与 E-钙黏素(E-cadherin)表达息息相关,高表达的 twist 蛋白可以导致 E-cadherin 表达下降,并引起肾小管上皮细胞发生间质转分化(epithelial-mesenchymal transdifferentiation, EMT),而 EMT 也是引起肾间质纤维化及导致肾功能逐渐恶化的重要因素^[1]。最近的报道及我们的前期研究都发现伴随着肾小管间质纤维化程度的加重, twist 蛋白的表达也逐渐升高,且与肾小管间质纤维化程度呈正相关,提示 twist 是影响肾

间质纤维化程度的重要因子之一^[2-3]。转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 是目前公认肾脏致纤维化因子,也是引起肾小管 EMT 的重要因子之一。那么在 TGF- $\beta 1$ 引起的肾小管 EMT 过程中 twist 蛋白的表达是否有改变,目前还鲜有报导。为此,我们利用体外实验考察 TGF- $\beta 1$ 诱导肾小管 EMT 中, twist 是否激活,其表达蛋白是否有改变,初步探讨其在肾小管 EMT 过程的意义。

材料与amp;方法

一、材料

1. 细胞:人肾小管上皮细胞株 HKCs(北京协和医科大学郑法雷教授惠赠)。

2. 主要试剂:DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公

司),新鲜特等优质胎牛血清(FBS,杭州四季青公司);重组人TGF- β 1(美国biosource公司);twist单克隆抗体(美国Santa Cruz公司)、E-cadherin单克隆抗体(美国Santa Cruz公司);HRP-标记的羊抗兔二抗(北京中杉公司)。Trizol RNA提取液,RT-PCR试剂盒(Takara);E-cadherin PCR引物,正义链:5'-ATCCAAAGCCTCAG-GTCATAAACA-3';反义链:5'-AAGAAACAGCAAGAG-CAGCAGAAT-3',扩增的cDNA片段377 bp;以上序列均由北京赛百胜生物公司合成。

二、方法

1. HKCs的体外培养及扩增:采用含10%胎牛血清的DMEM/F12(1:1),培养条件为5% CO₂、37℃恒温培养。

2. 实验分组:将HKCs按 1×10^6 接种于50 cm²培养瓶中,待细胞亚融合后改用无血清的DMEM/F12培养液同步化饥饿12 h,依实验要求分以下几组:(1)加入10 ng/ml TGF- β 1的0.5% FBS DMEM/F12培养液分别作用48 h测twist蛋白水平、E-cadherin表达;(2)分别加入不同浓度(0、5 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml) TGF- β 1刺激48 h后测定twist蛋白水平表达。

3. 免疫细胞化学染色:取生长良好的HKC细胞,以 1.0×10^4 /ml接种于预置小玻片的24孔板中,每孔1 ml,常规培养,酌情换液。长到约60%融合时,吸弃旧培养基,加入无血清培养基1 ml同步12 h,然后弃培养基,分成2组,每组5个样本:正常对照组(C组):即无血清培养组;10 ng/ml TGF- β 1组(TGF- β 1组)。继续培养48 h后,取出细胞爬片,以间接免疫细胞化学法检测E-cadherin的表达,以PBS代替一抗为阴性对照。免疫细胞化学染色完成后,利用Image-Pro-Plus 5.0 生物医学图像分析系统进行图像分析:每张细胞爬片随机测5个区域,计算平均光密度值(AOD)。

4. 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR):用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤各组细胞,在培养瓶中加入Trizol RNA提取液,按说明书步骤提取。用紫外分光光度计测260 nm、280 nm吸光度值,重复3次,计算A260/A280比值。按RT-PCR试剂盒操作,总反应体积50 μ l。反应条件为:预变性94℃ 1 min,57℃ 1 min,72℃ 2 min,E-cadherin 35个循环,GAPDH 30个循环,最后72℃延伸5 min。取E-cadherin的PCR产物分别和GAPDH的PCR产物各5 μ l,1.0%的琼脂糖凝胶电泳、凝胶成像系统扫描分析,以积分光密度代表其表达量。用GAPDH的量校正,将二者吸光度的相对量(relative optical density, ROD)进行分析。

5. Western-blot:细胞按实验分组条件处理后,收集细胞,用预冷PBS洗涤2次,加入细胞蛋白裂解液

200 μ l,冰浴裂解30 min,4℃,20 000 $\times g$ 离心30 min,收集上清液。Bradford法测定蛋白含量。取相同总量总蛋白(2 μ g)的各样本,加入适量体积的5 \times 上样缓冲液,100℃变性5 min,然后进行10% SDS-PAGE电泳,PVDF膜转印1 h,行Western免疫印迹。以5%脱脂奶粉封闭1 h,分别加入一抗(1:500)4℃过夜,二抗为辣根过氧化物标记的山羊抗兔抗体(1:2000),采用DAB显色法显色;凝胶成像系统上扫描分析,蛋白含量以条带的AOD值表示。实验重复3次。

三、统计学分析

定量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验。采用SPSS 13.0进行统计学处理。认为差异有统计学意义。

结 果

1. HKCs细胞形态的改变:正常组细胞为卵石样排列生长;加入TGF- β 1后,HKCs细胞逐渐拉长,细胞连接较正常组松散,细胞形态呈现长梭形,见图1A。

2. TGF- β 1对E-cadherin表达的影响:免疫细胞化学显示:加入10 ng/ml TGF- β 1后HKC细胞E-cadherin染色明显下降(AOD值分别为 0.451 ± 0.052 、 0.192 ± 0.031),差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图1B。

同时RT-PCR结果显示:正常对照组HKC细胞高表达E-cadherin,在正常C组中可见450 bp GAPDH扩增带及377 bp E-cadherin扩增带,ROD = 0.976 ± 0.015 ;加入10 ng/ml TGF- β 1作用48 h后,E-cadherin mRNA表达显著下降,只能见450 bp GAPDH扩增带,未见到377 bp E-cadherin扩增带,ROD = 0.368 ± 0.019 ,与正常对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图2。

3. TGF- β 1对twist蛋白表达的影响:Western印迹结果显示,正常HKCs细胞蛋白水平的twist蛋白表达很弱,加入10 ng/ml TGF- β 1刺激48 h后,twist蛋白表达即显著增加($P < 0.05$),见图3。另外TGF- β 1浓度梯度实验也显示,随着TGF- β 1浓度升高,人肾小管上皮细胞中twist蛋白水平也逐渐升高,与正常对照组比较均具有统计学差异($P < 0.05$),见图4。

讨 论

肾间质纤维化是多种慢性肾脏病发展至终末期肾功能衰竭的共同通路,是决定肾脏疾病走向终末期肾功能衰竭的重要因素。研究证实,肾间质中成纤维细胞来源有两种^[4-5]:少量由FSP(+),CD34(-)的骨髓成纤维细胞经血液途径迁移而来;大部分由肾小管上皮细胞通过EMT而来。由此可见,EMT是引起肾小管

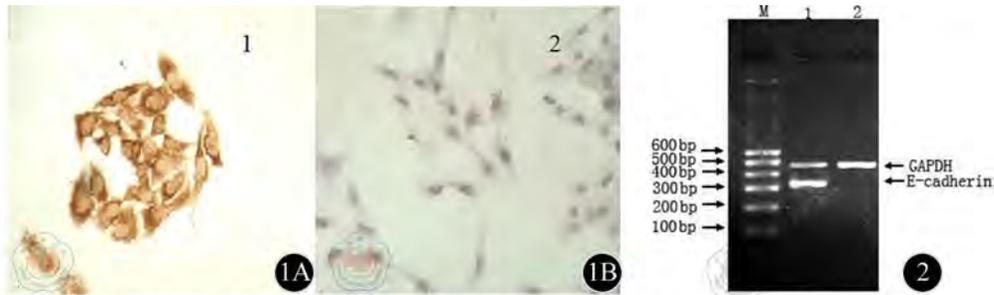


图1 免疫细胞化学染色测定E-cadherin (DAB染色 ×400)。1A: 正常对照组; 1B: 10 ng/ml TGF-β1组 图2 RT-PCR检测到E-cadherin表达。1: 正常对照组; 2: 10 ng/ml TGF-β1组; M: marker

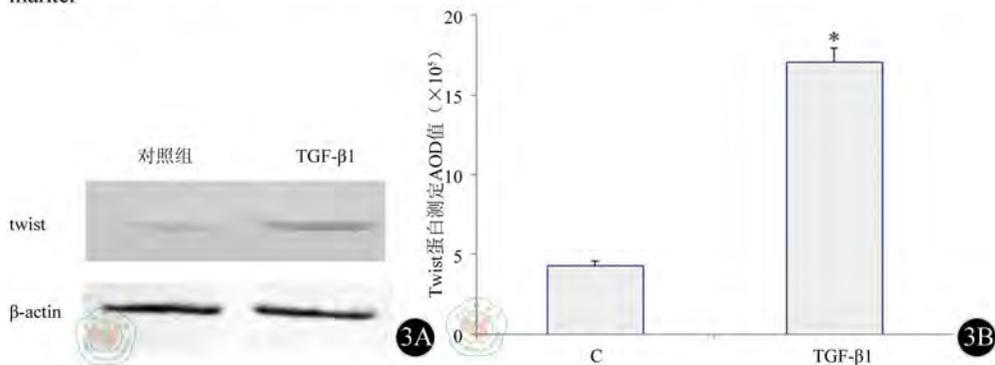


图3 10 ng/ml TGF-β1对twist蛋白水平的影响。与对照组比较, * $P < 0.05$

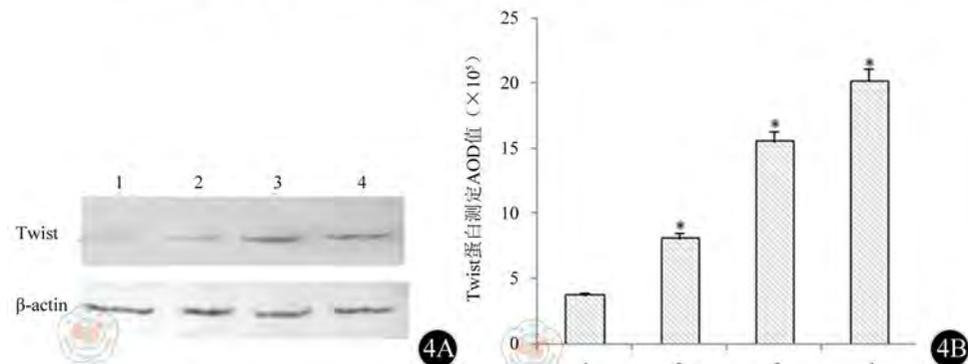


图4 Twist蛋白水平在不同浓度TGF-β1的变化。1-4分别为0、5 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml TGF-β1。与对照组比较, * $P < 0.05$

间质纤维化的关键因素。当EMT发生时,受损的上皮细胞间黏连消失,细胞骨架发生改变,迁徙能力增强,使得其可以从已经破坏的肾小管基底膜脱离出来到达间质;与此同时上皮细胞的表型也发生相应改变,上皮细胞特征如E-cadherin逐渐消失。正如在本实验中所观察的,通过TGF-β1的刺激,HKC细胞形态逐渐发生改变,E-cadherin逐渐消失。

E-cadherin是调节上皮细胞与细胞之间,细胞与基质之间黏附反应的重要媒介,对维持组织结构形态及上皮细胞的表型起决定性作用。临床病理及肾小管间质纤维化动物模型中,E-cadherin表达下降与肾间质纤维化程度呈正相关^[4]。

Twist基因是一种合子基因,其编码蛋白的特征是

含有一种碱性螺旋-环-螺旋结构域(a basic helix-loop-helix,bHLH),主要负责调控原肠胚及中胚层的形成,目前已经在多个物种中(包括人、鼠、青蛙、文昌鱼等)证实有twist基因的存在,其同源性在59%~85%之间。在人体中,twist转录因子主要分布在人的胎盘、成人心脏、肾脏以及胰腺中^[6]。Sun等^[7]发现高表达的twist蛋白可引起肾小管上皮细胞E-cadherin的表达下调,并引起肾小管EMT。在本实验中,我们也发现TGF-β1诱导的EMT过程中twist表达是升高的,且成浓度依赖性,说明的TGF-β1诱导的EMT过程中确实可以激活twist表达。

既往大量研究已经发现许多与EMT有密切关系的细胞因子^[4],如血管紧张素II^[8]、TGF-β1、骨成形蛋

白-7(BMP-7)^[9]、结缔组织生长因子(CTGF)^[10]等,其诱导或阻止 EMT 过程均与 E-cadherin 表达相关。然而有研究显示在多种因素存在的情况下单一阻断任何一个因子并不能有效地阻止转分化过程的发生^[11],那么在细胞核中是否存在着各条信号转导途径的共同作用因子? 肿瘤的研究显示 twist 蛋白是多种因子如 FGF、HIF、BMP 作用的共因子^[12]。在本实验中也已证实 TGF-β1 诱导的 EMT 过程中存在 twist 激活,但 TGF-β1 激活 twist 的途径如何, twist 是否可以作为肾脏纤维化治疗过程中的一个共同靶点还需进一步实验研究。

参 考 文 献

[1] Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 2004, 117:927-939.

[2] Sun S, Du R, Xia L, Sun W, et al. Twist is a new prognostic marker for renal survival in patients with chronic kidney disease. *Am J Nephrol*, 2012, 35:141-151.

[3] 张勇,王丽萍,陈建. Twist 蛋白在肾间质纤维化中的表达及其意义. *临床内科杂志*, 2012, 29:87-89.

[4] Kriz W, Kaissling B, Le HM. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: factor fantasy. *J Clin Invest*, 2011, 121:468-

474.

[5] Carew RM, Wang B, Kantharidis P. The role of EMT in renal fibrosis. *Cell Tissue Res*, 2012, 347:103-116.

[6] Castanon I, Baylies MK. A Twist in fate; evolutionary comparison of Twist structure and function. *Gene*, 2002, 287:11-22.

[7] Sun S, Ning X, Zhang Y, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha induces Twist expression in tubular epithelial cells subjected to hypoxia, leading to epithelial-to-mesenchymal transition. *Kidney Int*, 2009, 75:1278-1287.

[8] Ruster C, Wolf G. Angiotensin II as a morphogenic cytokine stimulating renal fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22:1189-1199.

[9] Xu Y, Wan J, Jiang D, et al. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells. *J Nephrol*, 2009, 22:403-410.

[10] Dai HY, Zheng M, Lv LL, et al. The roles of connective tissue growth factor and integrin-linked kinase in high glucose-induced phenotypic alterations of podocytes. *J Cell Biochem*, 2012, 113:293-301.

[11] Farris AB, Colvin RB. Renal interstitial fibrosis: mechanisms and evaluation. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2012, 21:289-300.

[12] Hornik C, Brand-Saberi B, Rudloff S, et al. Twist is an integrator of SHH, FGF, and BMP signaling. *Anat Embryol*, 2004, 209:31.

(收稿日期:2012-12-12)

(本文编辑:张志巍)

张勇,王丽萍,陈建. 转化生长因子 β1 诱导的肾小管上皮细胞间质转分化过程对 twist 表达的影响[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2013, 7(5):2069-2072.

