文章编号:1000-5404(2007)13-1301-04

论著

反义α肌动蛋白基因腺病毒载体对TGF-β1刺激的肾小管上皮细胞转分化的影响

干 磊,吴雄飞,吴 亿 (第三军医大学西南医院肾科,重庆 400038)

提 要: 目的 观察大鼠血管平滑肌α肌动蛋白基因反义腺病毒载体(pAdanti-α-SMA)转染对转化生长因子β1(TGF-β1)所诱导的肾小管上皮细胞-肌成纤维细胞转分化(TEMT)的影响。**方法** pAdanti-α-SMA载体构建并鉴定,转染肾小管上皮细胞(TEC)后免疫荧光染色和Western blot检测α-SMA水平。实验分为5组,A组:正常肾小管上皮细胞(TEC,对照组);B组:TEC+2 μl pAdanti-α-SMA;C组:TEC+1 μg天然TGF-β1;D组:TEC+1 μg天然TGF-β1+2 μl pAdanti-α-SMA;E组:TEC+1 μg天然TGF-β1+10 μl pAdanti-α-SMA。**结果** 成功构建pAdanti-α-SMA,pAdanti-α-SMA转染TEC后抑制了TGF-β1诱导的TEC的α-SMA水平并呈剂量依赖性。**结论** pAdanti-α-SMA可有效地抑制肾小管上皮细胞的肌成纤维细胞转分化。

关键词: 血管平滑肌α肌动蛋白基因反义腺病毒载体;转化生长因子β1;肾小管上皮细胞-肌成纤维细胞转分化
中图法分类号: R322.61; R329.24; R394.2 **文献标识码**: A

Inhibiting tubular epithelial myofibroblast transdifferentiation by transgene of antisense vascular smooth muscle alpha actin *in vitro*

GAN Lei, WU Xiong-fei, WU Yi (Department of Kidney, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To evaluate the inhibiting effect of antisense vascular smooth muscle alpha adenovirus vector on tubular epithelial myofibroblast transdifferentiation induced by TGF-β1. Methods The pAdanti-α-SMA was constructed and identified. The α-SMA expression in tubular epithelial cells (TEC) was detected by immunofluorescence and Western blot. Five groups were designed as control (A), TEC transfected by 2 μl pAdanti-α-SMA (B), TEC induced by TGF-β1 (C), TEC induced by TGF-β1 and transfected by 2 μl pAdanti-α-SMA (D), TEC induced by TGF-β1 and transfected by 10 μl pAdanti-α-SMA (E). Results The pAdanti-α-SMA was successfully constructed. The expression of α-SMA in TEC induced by TGF-β1 was inhibited by pAdanti-α-SMA. Conclusion Tubular epithelial myofibroblast transdifferentiation can be inhibited by pAdanti-α-SMA.

Key words: antisense vascular smooth muscle alpha adenovirus vector; transforming growth factor bete1; tubular epithelial myofibroblast transdifferentiation

血管平滑肌α肌动蛋白(vascular smooth muscle alpha actin,α-SMA)重塑是肾脏固有细胞转分化的必需环节[1],肾脏固有细胞转分化形成的肌成纤维细胞(myofibroblast,MF)或类MF细胞是各种原因导致的肾间质纤维化和肾小球硬化的病理基础[2,3],各种致/抑纤维化因子均需通过MF或类MF细胞最终实现其作用[4,5]。Fan等[6]发现体外肾小管上皮细胞在TGF-β1刺激下可从头合成α-SMA,使之表达α-SMA和波行蛋白,发生细胞形态和功能改变,并逐渐形成具有MF基本特性的细胞。本实验旨在探讨大鼠α-SMA反义腺病毒载体能否抑制模拟病理状态的TGF-β1诱导的TEMT,进而防治慢性肾病的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

pGEM T-Easy质粒和天然TGF-β1购自Promaga公司,质粒pShuttle-CMV、Adeasy-1、菌种BJ5183购自Stratagene公司,大肠

作者简介:干 磊(1974-),男,四川省乐山市人,硕士,主治医师,主要从事慢性肾炎方面的研究。电话:(023)68765335,E-mail: glsrzm@yahoo.com.cn
通讯作者:吴雄飞,电话:(023)68754188,E-mail: wuxfei@126.com
收稿日期:2006-06-12;修回日期:2006-11-12

杆菌 JM109 和 AD293 细胞株由西南医院全军烧伤研究所惠赠，大鼠血管平滑肌细胞株由西南医院心血管内科唐波博士惠赠，大鼠肾小管上皮细胞株由我科刘宏博士惠赠。质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶片段回收试剂盒、PCR 产物回收试剂盒、DNA 快速连接试剂盒购自大连宝生物公司，RT-PCR 试剂盒、限制性内切酶、脂质体转染试剂盒购自 ROCHE 生物公司，平滑肌肌动蛋白单克隆抗体（mAb1 A4）购自北京中山公司，Cy3 红色免疫荧光试剂盒购自武汉博士德公司。

1.2 pAdanti-α-SMA 的构建

根据已知大鼠基因 α-SMA 用 Primer premir 5.0 程序设计引物 3 对：引物 1：P1：5′-CAGGGAGTGATGGTTGGA-3′，P2：5′-ATGATGGCATGAGGCAGA-3′；引物 2：P1：5′-ACTGGTATTGTGCTGGACTC-3′，P2：5′-TGATGCTGTTATAGGTGGTTT-3′；引物 3：P1：5′-CCTGGAGAAGAGCTACG-3′，P2：5′-GCATTTGCGGTGGA-3′。引物由上海生物化学工程公司合成。利用大鼠血管平滑肌细胞经 RT-PCR 提取 α-SMA cDNA 并进行产物鉴定。将 α-SMA cDNA 与 pGEM T-Easy 载体连接构建过渡质粒并行 *Eco*R Ⅰ酶切鉴定，酶切鉴定为反向插入的质粒送上海生物化学工程公司测序。*Not* Ⅰ分别单切 pShuttle-CMV 和过渡质粒后构建穿梭质粒并行 *Sal* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切鉴定。利用 Ad-Easy-1 腺病毒系统重组目的基因构建 pAdanti-α-SMA 并经 *Pac* Ⅰ酶切鉴定。利用 AD-293 细胞包装 pAdanti-α-SMA，病毒上清液在 0.8% 琼脂糖凝胶上进行 RT-PCR 鉴定。行 pAdanti-α-SMA 安全性检测、滴度测定并浓缩。

1.3 分组细胞培养

分为 5 组，A 组：正常肾小管上皮细胞（对照组，TEC）；B 组：TEC + 2 μl pAdanti-α-SMA；C 组：TEC + 1 μg 天然 TGF-β1；D 组：TEC + 1 μg 天然 TGF-β1 + 2 μl pAdanti-α-SMA；E 组：TEC + 1 μg 天然 TGF-β1 + 10 μl pAdanti-α-SMA。各组均在 12 孔板上细胞培养，常规消化传代，传代后仍按分组加入天然 TGF-β1 和 pAdanti-α-SMA，7 d 后收获细胞。

1.4 免疫荧光检测

以 mAb1 A4 为一抗行免疫荧光染色，荧光显微镜下观察，每组抽取 4 片，每张切片在 200 倍镜下用 SPOT-INSIGHT 图像分析软件分析其免疫荧光阳性细胞率，计算平均阳性细胞率。

1.5 Western blot 检测

以 mAb1 A4 为一抗经灌胶、电泳、转印蛋白及免疫检测后 X 线片感光、显影及定影并分析。

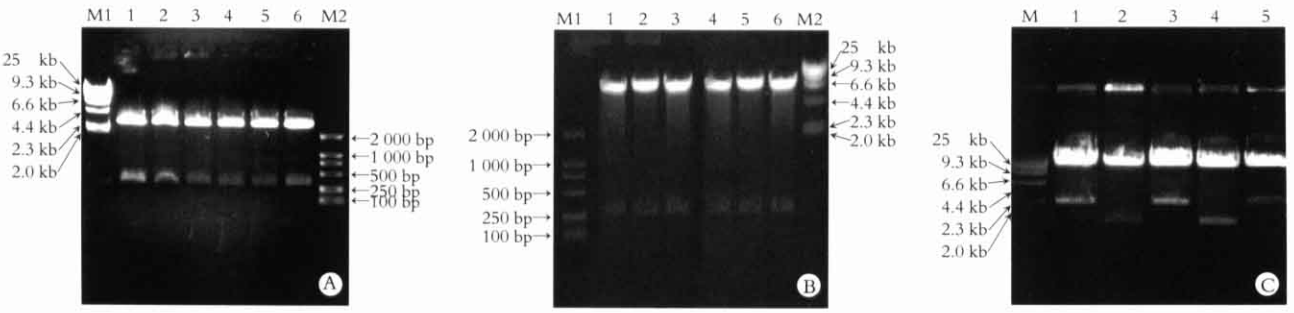
1.6 统计学处理

用 SPSS 10.0 统计软件，平均阳性细胞率以（$\bar{x} \pm s$）% 表示，组间比较为单因素方差分析。

2 结果

2.1 pAdanti-α-SMA 的构建和鉴定

RT-PCR 回收产物扩增后紫外灯下观察可见大小分别为 407、403 bp 和 418 bp 的片段，与预期相符。过渡质粒经 *Eco*R Ⅰ酶切，可见 407、403、418 bp 大小的目的片段和 2.6 kb 的 T 载体各 1 条（图 1A），酶切为反向插入的质粒送上海生物化学工程公司进行自动基因测序，结果显示克隆基因的核苷酸序列与推导的氨基酸序列一致，开放阅读框正确。穿梭质粒经 *Sal* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切后，凝胶电泳鉴定可见到 407、403、418 bp 和 7.5 kb 大小的片段各 1 条，其中 407、403、418 bp 为 anti-α-SMA 片段，7.5 kb 为 pShuttle-CMV 质粒（图 1B），与预期相符。同源重组的 pAdanti-α-SMA 腺病毒质粒经 *Pac* Ⅰ酶切后，根据同源重组的部位可见 4.5 kb 或 3.0 kb（如同源重组发生在同源左臂为 3.0 kb，发生在复制起点则为 4.5 kb）和 23 kb 带的电泳带各 1 条（图 1C）。利用 anti-α-SMA 引物，从提取的病毒上清液中分别扩增出了 407、403、418 bp 的特异性片段（图 2）。pAdanti-α-SMA 通过野生型病毒的检测和对 TEC 细胞存活影响实验，安全性较高。滴度测定可见 68 个阳性孔，其滴度为：$10^6 \times 3^{(68-4)/8} = 6.561 \times 10^9$ PFU/ml，经浓缩后获得浓缩 8 倍的工作液。

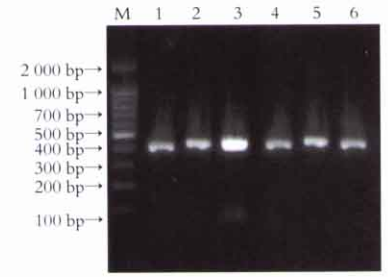


A：*Eco*R Ⅰ酶切 pGEM T-Easy-anti-α-SMA 产物　M1：λ/DNA + *Hind* Ⅲ 标准；1、2：pGEM-T-Easy-anti-α-SMA1；3、4：pGEM-T-Easy-anti-α-SMA2；5、6：pGEM-T-Easy-anti-α-SMA3；M2：标准（DL 2000）

B：*Sal* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切 pShuttle-CMV-anti-α-SMA 产物　M1：标准（DL 2000）；1、2：Pshuttle-CMV-anti-α-SMA1；3、4：Pshuttle-CMV-anti-α-SMA2；5、6：Pshuttle-CMV-anti-α-SMA3；M2：λ/DNA + *Hind* Ⅲ 标准

C：*Pac* Ⅰ酶切 pAdanti-α-SMA 产物　M：λ/DNA + *Hind* Ⅲ 标准；1、2：pAdanti-α-SMA1；3：pAdanti-α-SMA2；4、5：pAdanti-α-SMA3

图 1　pAdanti-α-SMA 构建的多步骤酶切鉴定

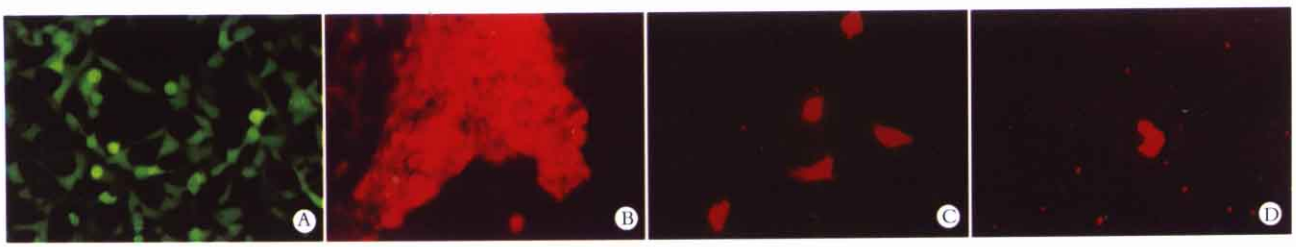


M：标准；1、2：引物 + anti-α-SMA1 扩增；3、4：引物 + anti-α-SMA2 扩增；5、6：引物 + anti-α-SMA3 扩增

图 2　重组 anti-α-SMA 腺病毒 DNA RT-PCR 鉴定

2.2　pAdanti-α-SMA 转染对 TEC 细胞及 TGF-β1 转分化中表达 α-SMA 的影响

B、D、E 组培养板在荧光显微镜下发明亮的 Adeasy-1 腺病毒载体自带的绿色标记荧光可见肾小管上皮细胞（图 3A），而 A、C 组未见。α-SMA 免疫荧光检测发现肾小管上皮细胞几乎无荧光阳性细胞出现，而 TGF-β1 转分化组可见满视野 α-SMA 阳性细胞（图 3B），2 μl pAdanti-α-SMA 转染的 TEC TGF-β1 转分化组可见少量阳性细胞（图 3C），10 μl pAdanti-α-SMA 转染的 TEC TGF-β1 转分化组偶见荧光阳性细胞（图 3D）。SPOT-INSIGHT 图像分析软件分析，各组平均免疫荧光阳性细胞率分别为 A 组：(1.02 ± 0.34)%，B 组：(1.21 ± 0.31)%，C 组：(54.25 ± 9.39)%，D 组：(4.93 ± 1.01)%，E 组：(1.67 ± 0.47)%，B 和 C、C 和 D 及 D 和 E 组间均存在显著统计学差异（$P<0.01$）。Western blot 检测各组 α-SMA 蛋白，TGF-β1 转分化组在 43×10^3 附近见明显的蛋白条带，2 μl pAdanti-α-SMA 转染的 TEC TGF-β1 转分化组在同样的位置见到较浅的蛋白条带，其余各组均未见蛋白条带。见图 4。



A：pAdanti-α-SMA 转染组　（×100）；B：TGF-β1 转分化组　（×200）；C：2 μl pAdanti-α-SMA 转染的 TEC TGF-β1 转分化组（×200）；D：10 μl pAdanti-α-SMA 转染的 TEC TGF-β1 转分化组　（×200）

图 3　pAdanti-α-SMA 转染对 TEC 细胞及 TGF-β1 转分化中表达 α-SMA 的影响　（荧光显微镜）



1：正常肾小管上皮细胞（对照组，TEC）；2：TEC + 2 μl pAdanti-α-SMA 转染组；3：TEC + 1 μg 天然 TGF-β1 转染组；4：TEC + 1 μg 天然 TGF-β1 + 2 μl pAdanti-α-SMA 转染组；5：TEC + 1 μg 天然 TGF-β1 + 10 μl pAdanti-α-SMA 转染组

图 4　各组 α-SMA 蛋白 Western blot 检测结果

3　讨论

α-SMA 是 MF 和类 MF 细胞的主要细胞骨架蛋白，α-SMA 重塑是 MF 和类 MF 细胞形成中不可或缺的关键步骤，α-SMA 同时也是 MF 和类 MF 细胞最主要的检测标志物。正常肾小球中 MF 和类 MF 极少，它们的出现往往与肾间质纤维化有关，是预后不良的标志[7]。慢性肾衰发生主要病理过程大致是致病因素→细胞损伤→促纤维化细胞因子→肾固有细胞转分化→MF/类 MF 形成→ECM 沉积→瘢痕形成。肾小球中 MF 和类 MF 主要来源于肾脏固有细胞的转分化，肾小管上皮细胞是主要细胞之一。促纤维化因子包括转移生长因子 β、血小板衍生生长因子、成纤维细胞生长因子-1、血管紧张素 Ⅱ、内皮素-1、晚期糖基化终产物、细胞间黏附分子-1、结缔组织生长因子等，TGF-β1 是最重要的促纤维化因子，这些因子通过不同途径诱导和影响肾脏固有细胞转分化形成 MF 和类 MF，并调节 MF 和类 MF 功能[4,5,8,9]。MF 和类 MF 是肾脏细胞外基质（ECM）的主要来源；能合成、分泌金属蛋白酶抑制物 1，下调金属蛋白酶活性，抑制 ECM 降解[10]；可通过 α-SMA 重塑使 Ⅰ 型胶原纤维重新排列，导致 ECM 收缩[11]；MF 还通过 α-SMA 和整合素 Smad 家族结合这一主要的信号通道接受体液、ECM 和周边细胞的信息，不断调整 ECM 合成和分泌，最终导致 ECM 不断堆积[12]，造成肾纤维化和慢性肾衰发生。因此 MF 和类 MF 的形成是慢性肾衰发生、发展中最关键的单一因素环节，不可逾越。本实验构建 pAdanti-α-SMA 拟抑制 MF 和类 MF 基本细胞骨架形成，从而达到抑制 MF 和类 MF 形成的目的。

实验结果表明，我们成功提取了提取了大鼠血管

平滑肌 α 肌动蛋白 cDNA，并将目的基因反向连接入 pGEM T-Easy 载体中，通过穿梭质粒的构建，最终成功构建了 pAdanti-α-SMA，经反复酶切和测序鉴定正确。该载体有较高的安全性和病毒滴度。Fan 等[6]发现在体外肾小管上皮细胞在 TGF-β1 刺激下可从头合成 α-SMA，使之表达 α-SMA 和波行蛋白，发生细胞形态和功能改变，并逐渐形成具有 MF 基本特性的细胞，本实验使用相似实验条件得到类似结果(C 组)。B 组可见肾小管上皮细胞发明亮的 Adeasy-1 腺病毒载体自带的绿色标记荧光，表明载体转染成功。单纯 pAdanti-α-SMA 转染对 TEC 生长和细胞性状无影响(B 组)。使用小剂量 pAdanti-α-SMA 转染可以使在 TGF-β1 刺激下由 TEC 转分化而成的 α-SMA 免疫荧光阳性细胞显著减少，Western blot 检测细胞表达 α-SMA 也明显减少(D 组)。使用大剂量 pAdanti-α-SMA 转染可以使 α-SMA 免疫荧光阳性细胞进一步减少，Western blot 检测几乎不能检测到细胞表达 α-SMA(E 组)。B、C、D、E 各组间免疫荧光阳性细胞率存在明显统计学差异。说明 pAdanti-α-SMA 在体外可以抑制由 TGF-β1 诱导的 TEC-类 MF 细胞转分化过程，并与剂量相关。

pAdanti-α-SMA 的成功构建和体外对 TEMT 的抑制作用为我们将来体内抑制肾脏内 MF 和类 MF 的形成奠定了基础，为控制慢性肾衰发生、发展提供了一种新的可能途径。

参考文献：

[1] Boukhalfa G, Desmouliere A, Rondeau E, *et al*. Relationship between alpha-smooth muscle actin expression and fibrotic changes in human kidney[J]. Exp Nephrol, 1996, 4(4): 241-247.

[2] Badid C, Vincent M, Fouque D, *et al*. Myofibroblast: a prognostic marker and target cell in progressive renal disease[J]. Ren Fail, 2001, 23(3-4): 543-549.

[3] 王 玉，李晓玫. 肾脏固有细胞的表型转化特征及其病理生理意义[J]. 中国病理生理杂志，2002, 18(10): 1303-1307.

[4] Goumenos D S, Tsamandas A C, Oldroyd S, *et al*. Transforming growth factor-beta(1) and myofibroblasts: a potential pathway towards renal scarring in human glomerular disease[J]. Nephron, 2001, 87(3): 240-248.

[5] Oldfield M D, Bach L A, Forbes J M, *et al*. Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation *via* the receptor for advanced glycation end products (RAGE)[J]. J Clin Invest, 2001, 108(12): 1853-1863.

[6] Fan J M, Ng Y Y, Hill P A, *et al*. Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation *in vitro*[J]. Kidney Int, 1999, 56(4): 1455-1467.

[7] Gonlusen G, Ergin M, Paydas S, *et al*. The expression of cytoskeletal proteins (alpha-SMA, vimentin, desmin) in kidney tissue: a comparison of fetal, normal kidneys, and glomerulonephritis[J]. Int Urol Nephrol, 2001, 33(2): 299-305.

[8] 叶自林，何作云. 血管紧张素-(1-7)对二肾-夹高血压大鼠肾纤维化和功能的影响[J]. 第三军医大学学报，2004, 26(15): 1336-1338.

[9] 丁涵露，吴雄飞，高闻达，等. 重组 AdPD-L1 腺病毒的构建表达及鉴定[J]. 第三军医大学学报，2005, 27(12): 1190-1193.

[10] Norman J T, Lewis M P. Matrix metalloproteinases (MMPs) in renal fibrosis[J]. Kidney Int Suppl, 1996, 54: S61-S63.

[11] Kelynack K J, Hewitson T D, Pedagogos E, *et al*. Renal myofibroblasts contract collagen I matrix lattices *in vitro*[J]. Am J Nephrol, 1999, 19(6): 694-701.

[12] You L, Kruse F E. Differential effect of activin A and BMP-7 on myofibroblast differentiation and the role of the Smad signaling pathway[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(1): 72-81.

(编辑 王 红)

(上接 1292 页)

ICU 治疗。术后 2 d 内腹腔引流出血性液体 2 000 ml。经大量输入新鲜血、血浆、白蛋白及保肝治疗，患者肝功在术后 10 d 完全恢复正常，于 2 月 2 日痊愈出院。

2 讨论

肝功能衰竭是多种因素引起的严重肝脏损害，导致其合成、解毒、排泄和生物转化等功能发生严重障碍或失代偿，出现以凝血机制障碍和黄疸、肝性脑病、腹水等为主要表现的一组临床症候群[1]。在我国，引起肝衰竭的主要病因是肝炎病毒(主要是 HBV)，其次是药物及肝毒性物质。妊娠合并肝炎患者，由于妊娠期间肝脏负担明显加重，在原有肝病的基础上易诱发重症肝炎，病情凶险、病死率高达 80%，是我国孕产妇死亡的主要原因。本例患者急性肝功能衰竭的原因考虑与 EB 病毒感染引起的亚急性重症肝炎，妊娠期肝内胆汁淤积症，妊娠加重肝脏负担有关。由于分娩创伤与出血会增加肝脏负担，母儿耐受力差，产后病情多数恶化，治疗上应先给予综合治疗，稳定病情后再终止妊娠。本例患者因合并前置胎盘，发生阴道大量出血，被迫急诊手术。妊娠合并重症肝炎患者常发生凝血功能障碍，经短期缝合及止血治疗无效后宜果断行子宫次全切除术。本例患者因急诊手术，术前凝血功能障碍未能纠正，子宫次全切除术后腹腔内渗血近 2 000 ml，经大量输入新鲜血、血浆、白蛋白、血小板及止血药物治疗后渗出停止。术中可用无醇型安尔碘冲洗腹腔及手术切口，减少术后感染机会。术中放置腹腔引流管，有利于腹水排出减轻腹压，并利于胆红素排泄。术后可根据引流液的性状、颜色的深浅和量的多少，来判断有无腹腔内出血，及时调整治疗方案，并可用来腹腔内冲洗，减少术后感染的发生。术后一般放置 3～5 d 取出。术后检测生命体征、尿量、中心静脉压，维持水、电解质平衡，纠正凝血功能障碍，保肝治疗，加强抗感染治疗，积极防治并发症。

关键词：妊娠；急性肝功能衰竭

中图法分类号：R714.25 文献标识码：B

参考文献：

[1] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组，中华医学会肝病学分会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭治疗指南[J]. 国际流行病学传染病学杂志，2006, 33(4): 217-221.

(编辑 龙 亮)