文章编号:1000-5404(2008)22-2107-04

论著

AP-1活化在高糖诱导肾小管上皮细胞转分化中的作用

吕智美,邓华聪,诸葛福媛,刘金波,陈丹燕,南 静 (重庆医科大学附属第一医院内分泌科,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨转录活化蛋白-1(activator protein-1, AP-1)在高糖诱导的肾小管上皮细胞表型转化中的作用。**方法** 将体外培养的人肾小管上皮细胞(human kidney proximal tubular epithelial cell, HK2)分为正常对照组、高糖组、AP-1阻断组。光镜、透射电镜观察细胞形态的改变,免疫细胞化学法检测α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)和细胞角蛋白(cytokeratin,CK)的表达,用凝胶电泳迁移率改变分析法(electrophoretic mobility shift assay,EMSA)检测HK2细胞AP-1的改变,RT-PCR法检测CK mRNA的表达,Western blot检测α-SMA蛋白的表达。**结果** 高糖作用48 h后,HK2细胞由椭圆形贴壁生长变为长梭形,胞体拉长,透射电镜下,细胞表面微绒毛明显减少,胞质内粗面内质网丰富,而AP-1阻断组较高糖组明显减轻;EMSA结果分析表明,在高糖刺激下,AP-1结合活力较正常对照组增加79.22%($P<0.05$),而AP-1阻断剂可明显抑制AP-1的活化,较高糖组降低51.19%($P<0.05$);免疫细胞化学和RT-PCR检测显示,高糖组和AP-1阻断组CK mRNA和蛋白水平明显降低($P<0.05$),而AP-1阻断组显著高于高糖组($P<0.05$);免疫细胞化学和Western blot检测显示,高糖组和AP-1阻断组α-SMA蛋白表达明显高于正常组($P<0.05$),而AP-1阻断组显著低于高糖组($P<0.05$)。**结论** 高糖能够导致肾小管上皮细胞AP-1活化,诱导其表型转化。

关键词: 活化蛋白-1;肾小管上皮细胞;转分化
中图法分类号: R322.61;R329.25;R587.102 **文献标识码:** A

Effect of AP-1 on high glucose induced epithelial-mesenchymal-transition of human kidney proximal tubular epithelial cell

LU Zhi-mei, DENG Hua-cong, ZHUGE Fu-yuan, LIU Jin-bo, CHEN Dan-yan, NAN Jing (Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To examine the effect of AP-1 on high glucose induced epithelial-mesenchymal-transition in cultured human kidney proximal tubular epithelial cell (HK2). **Methods** The cultured HK2 cells were divided into three groups: normal glucose group (NG), high glucose group (HG), activator protein-1 (AP-1) inhibited group (AG). The morphological changes of HK2 cells were observed by inverted microscope and electron microscope. The proteins of α-smooth muscle actin (α-SMA) and cytokeratin (CK) were determined by immunocytochemistry. The activity of activator protein-1 (AP-1) was assessed with electrophoretic mobility shift assay (EMSA). RT-PCR was used to detect the mRNA expression of CK. Western blot was used to detect the protein expression of α-SMA. **Results** The HK2 cells stimulated with high glucose became elongated and the number of microvilli decreased, but the number of rough endoplasmic reticulum increased. The level of AP-1 binding activity was increased by 79.22% after high glucose treatment, compared with that of normal glucose group, but decreased by 51.19% after the treatment of AP-1 inhibitor, compared with that in high glucose group. Cultured with high glucose, the expressions of CK mRNA and protein significantly decreased ($P<0.05$), but they significantly increased in AP-1 inhibited group ($P<0.05$). Upon the stimulation of high glucose, the expression of α-SMA protein increased markedly ($P<0.05$), while it significantly decreased in

基金项目: 国家自然科学基金(30570414,30771038,30370670);教育部博士培养基金(20050631009);教育部第二批"春晖计划"(KJ050314);重庆市教委基金(2003-7)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570414, 30771038, 30370670), the Research Fund of Doctoral Program by Ministry of Education of China (20050631009), the "Sunshine in Spring" Project of Ministry of Education of China (KJ050314) and the Research Fund of Chongqing Municipal Education Committe (2003-7)

作者简介: 吕智美,女,山东省烟台市人,博士研究生,主要从事糖尿病及并发症方面的研究,E-mail:lvzhimei@126.com
通信作者: 邓华聪,E-mail: deng_huacong@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-01-18;**修回日期:** 2008-04-20

AP-1 inhibited group ($P<0.05$). **Conclusion** High glucose induces transdifferentiation of renal tubular cells probably through the activation of AP-1.

Key words: activator protein-1; human kidney proximal tubular epithelial cell (HK2); epithelial-mesenchymal-transition

转录活化蛋白-1(activator protein-1, AP-1)是由Fos蛋白和Jun蛋白组成的同源或异源二聚体复合物,研究表明,高糖可刺激系膜细胞导致AP-1活化,诱导肾小球系膜细胞基质增生和纤连蛋白的分泌,由此可见,AP-1在糖尿病肾病中具有重要作用。但是关于AP-1在肾间质纤维化和肾小管上皮细胞转分化中的作用目前鲜见报道。我们通过研究AP-1在高糖诱导肾小管上皮细胞转分化中的作用,以探讨糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)肾间质纤维化的机制,为其防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人近端肾小管上皮细胞株(Human kidney proximal tubular epithelial cell,HK2,CRL-2190)购于美国组织培养物细胞库(ATCC)。

1.1.2 主要试剂 标准胎牛血清(美国HyClone公司),D-glucose(美国Sigma公司),6-Gingerol(日本Wako公司),鼠抗人α-SMA(美国Sant Cruz公司),鼠抗人CK抗体(北京中杉公司),鼠β-actin抗体(美国Novus Biologicals),SP-9002工作液试剂盒(北京中杉公司),抗小鼠IgG-HRP(美国Sigma公司),通用型RT-PCR试剂盒(日本TaKaRa公司),聚合酶链反应引物(上海生工公司),T_4多核苷酸激酶缓冲液(美国Promega公司),poly(dI-dC)(美国Sigma公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 HK2用含10% FCS的DMEM培养液传代培养,培养条件为37 ℃,5% CO_2以0.25%胰蛋白酶消化细胞后,用于HK2形态学观察和免疫细胞化学检测的细胞以1.0×10^6/孔接种于预置玻片的12孔培养板。用于RT-PCR、Western blot和EMSA检测的细胞以1.0×10^6/瓶接种于100 ml培养瓶。先以10% FCS-DMEM培养细胞12 h,后用无血清培养基培养24 h使其同步化,将HK2分为3组:①正常对照组:加10% FCS-DMEM培养液(含D-葡萄糖,5.6 mmol/L);②高糖组:在培养液中加D-glucose(终浓度为30 mmol/L);③AP-1阻断组:在培养液中加入D-glucose(终浓度为30 mmol/L)和AP-1化学阻断剂[6]-Gingerol(终浓度为100 μmol/L)。每组设3个复孔(瓶),作用48 h后收集细胞和培养液用于各项检测。

1.2.2 HK2形态学观察 加入各组试剂后,每6小时在相差显微镜下观察细胞形态1次,48 h后相差显微镜下观察。

1.2.3 透射电镜观察 HK2细胞接种于100 ml培养瓶中,生长到70%~80%融合时,加入无血清培养基24 h使同步化。分组同前述,每组2个平行细胞瓶。继续培养48 h后,终止培养。0.25%胰酶消化后,置于含4%戊二醛中,然后固定于1%四氧化锇,包埋,切片,透射电镜下观察。

1.2.4 免疫细胞化学法检测细胞角蛋白(cytokeratin, CK)和α-SMA表达 将HK2细胞种入12孔细胞培养板中,待细胞长至亚融合状态,以无血清培养基继续培养24 h使其同步化,分组如前述,48 h后终止培养,取出细胞爬片,以免疫细胞化学法分别检测CK、α-SMA的表达。一抗α-SMA、CK(1∶100)稀释,根据SP试剂盒所示方法检测其表达,DAB显色。苏木精复染,脱水、透明、封片。采用生物医学图像分析系统进行图像分析,用平均吸光度表示阳性物质的相对含量。

1.2.5 RT-PCR检测CK mRNA表达 实验各组按照TRIzol说明书在培养瓶中提取总RNA,紫外分光光度计鉴定,根据260 nm吸光度值计算RNA浓度。取总RNA 1 μg作逆转录,步骤参照试剂盒说明。以逆转录产物为模板,CK和β-actin同等条件扩增。CK引物正义链:5′-CCCAGAGCCTTGAGATAGAAC-3′,反义链:5′-CACGACCTTGCCATCCAC-3′。β-actin引物正义链5′-CACCAACTGGGACGACAT-3′,反义链:3′-GCAACGATAG-GTCCGACA-5′。反应参数如下:预变性94 ℃ 2 min,变性94 ℃ 30 s,退火55 ℃ 30 s,延伸72 ℃ 2 min,35个循环,最后72 ℃继续延伸2 min。取PCR产物物经1%琼脂糖凝胶电泳和凝胶成像系统分析后。计算待测指标与内参照β-actin吸光度A的比值。

1.2.6 Western blot检测α-SMA蛋白表达 收集各组细胞以细胞裂解液在冰上裂解后静置30 min,4 ℃ 12 000×g离心15 min,收集细胞,提取蛋白,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。10% SDS聚丙烯酰胺凝胶上样30 μl/孔,积层胶电压50V电泳,分离胶60~65 V电压电泳,继之50 V转膜2 h,5% BSA封闭1 h,一抗α-SMA(1∶200)孵育过夜,洗涤后加二抗(1∶2 500)室温反应1 h,曝光、显影。将检测过的PVDF膜放入抗体洗脱液,5% BSA封闭1 h,一抗β-actin(1∶2 000)孵育过夜,洗涤后加二抗(1∶5 000)室温反应1 h,洗涤、曝光、显影。凝胶成像和化学发光分析系统进行灰度分析。

1.2.7 EMSA检测AP-1结合活力 各组细胞胰酶消化后,收集于1.5 ml离心管,提取核蛋白,考马斯亮蓝法定量。用T_4多核苷酸激酶将γ-^{32}P-ATP标记在含有AP-1顺势作用元件的探针的末端,探针的顺序为5′-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3′。分别取提取的核蛋白6.8 μg(4 μl),依次加入DNA结合缓冲液15 μl,用去离子水补足至19 μl。然后加1 μl(1 ng)已标记探针,37 ℃孵育30 min,加上样缓冲液4 μl,混匀。另有探针冷竞争实验结合反应(加入含有100 ng未标记的AP-1探针1 μl及1 ng标记的探针1 μl)、阴性对照反应(加核蛋白提取物为0 μl)作为质量控制,其余步骤与实验各组样品处理相同。共同上样于4% 非变性丙烯酰胺凝胶中,按10~12 V/cm恒流电泳1~2 h。取出凝胶,密封后于暗室内压片,放射自显影,洗片,成像,比较各条带的光密度值。以高糖组光密度值定为1,其余各组与之比较后得出相对百分比。

1.2.8 统计学处理 实验数据用$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 11.0行单因素方差分析。

2 结果

2.1 细胞形态学改变

倒置显微镜下观察正常HK2细胞为椭圆形贴壁生长。培

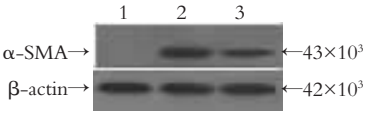
养液中加入 D-葡萄糖后可见 HK2 细胞部分细胞间隙增大并和附近的细胞脱离接触,细胞长短径比例增加,细胞呈梭形,失去鹅卵石样形态。AP-1 阻断组中部分细胞为椭圆形,但有部分转变为梭形细胞。

透射电镜下,正常对照组细胞表面微绒毛积聚,细胞内线粒体丰富,粗面内质网少。AP-1 阻断组细胞表面微绒毛较正常组减少,细胞内粗面内质网增多,线粒体减少。高糖组细胞表面微绒毛较 AP-1 阻断组明显减少,胞质内粗面内质网丰富,线粒体极少(图 1)。

2.2　高糖对细胞 α-SMA 蛋白表达的影响

免疫细胞化学结果显示正常对照组细胞细胞质未见有棕黄色颗粒出现,α-SMA 为阴性表达,AP-1 阻断组及高糖组细胞细胞质内均可见棕黄色颗粒;其中高糖组 α-SMA 的表达较 AP-1 阻断组增强,差异有统计学意义[(0.570 ±0.036) *vs* (0.263 ±0.042),$P<0.05$,图 2]。

免疫印迹结果显示高糖组和 AP-1 阻断组在 43×10^3 可见 α-SMA 蛋白表达,其中 AP-1 阻断组 α-SMA 蛋白表达水平较高糖组显著降低[(0.550 3 ±0.039 3) *vs* (0.969 0 ±0.019 3),$P<0.05$],而正常对照组未见 α-SMA 表达,与 AP-1 阻断组比较差异有统计学意义[(0.014 0 ±0.007 2) *vs* (0.550 3 ±0.039 3),$P<0.05$)。实验各组于 42×10^3 可见 β-actin 蛋白表达(图 3)。

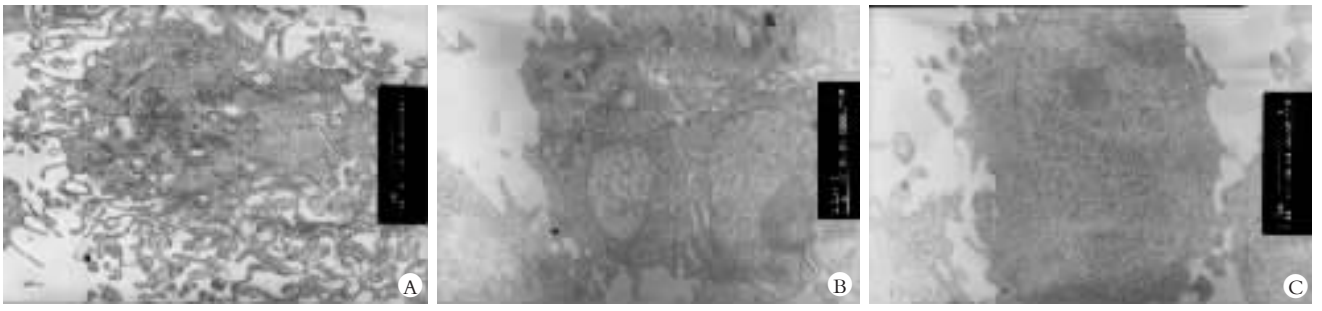


1: 正常对照组; 2: 高糖组; 3: AP-1 阻断组

图 3　高糖对 HK2 细胞 α-SMA 表达的影响

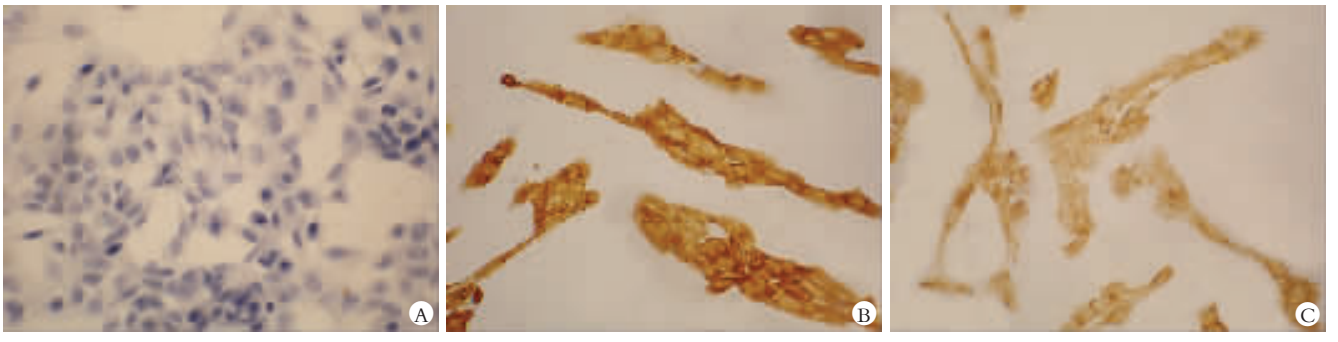
2.3　高糖对 CK 蛋白及 mRNA 表达的影响

免疫细胞化学结果显示正常对照组胞质有大量棕黄色颗粒,CK 呈阳性表达。AP-1 阻断组胞质少许棕黄色颗粒,较正常对照组显著降低[(0.267 ±0.015) *vs* (0.577 ±0.025),$P<0.05$]。高糖组胞质未见棕黄色颗粒,与 AP-1 阻断组相比差异有统计学意义[(0.060 ±0.010) *vs* (0.267 ±0.015),$P<0.05$,图 4]。



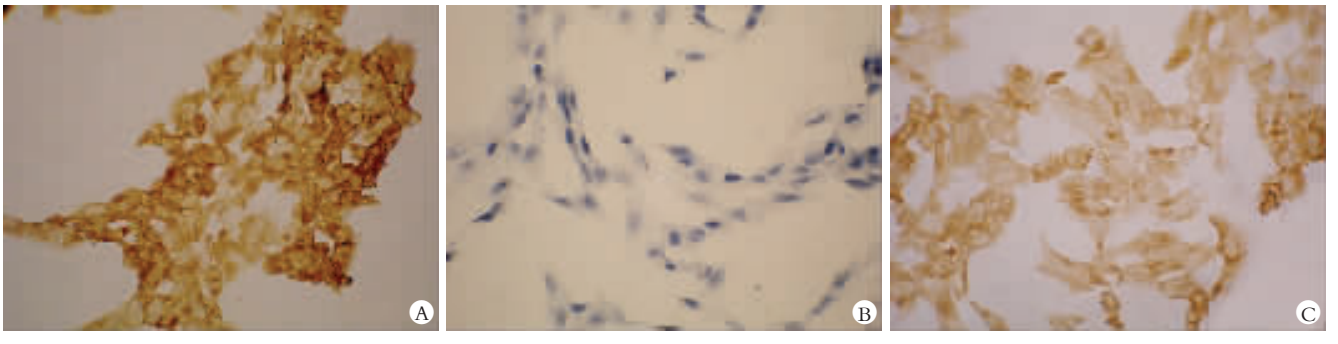
A:正常对照组;B:高糖组;C:AP-1 阻断组

图 1　各组 HK2 细胞超微结构改变　(TEM ×7 000)



A: 正常对照组; B:高糖组; C:AP-1 阻断组

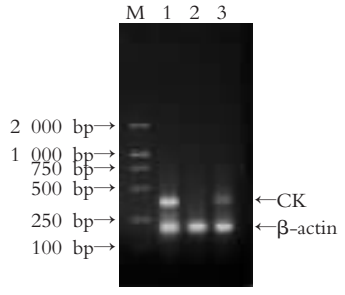
图 2　各组 HK2 细胞 α-SMA 的表达　(S-P ×400)



A:正常对照组 B:高糖组 C:AP-1 阻断组

图 4　各组 HK2 细胞 CK 的表达　(S-P ×400)

RT-PCR 结果显示正常对照组和 AP-1 阻断组表达 CK mRNA，在 189 bp 和 362 bp 处可见 β-actin 及 CK mRNA 扩增带，其中 AP-1 阻断组 CK mRNA 水平低于正常对照组，差异有统计学意义[(0.537 3 ± 0.026 5) *vs* (0.963 3 ± 0.001 07)，$P < 0.05$]。高糖组(0.027 3 ± 0.001 5)在 189 bp 处可见 β-actin 扩增带，362 bp 处 CK mRNA 扩增带不明显，与正常对照组(0.963 3 ± 0.001 1)和 AP-1 阻断组(0.5 373 ± 0.0 265)相比，差异有统计学意义($P < 0.05$，图 5)。



1：正常对照组；2：高糖组 3：AP-1 阻断组

图 5 高糖对 HK2 细胞 cytokeratin mRNA 表达的影响

2.4 AP-1 的 DNA 结合活性变化

用 EMSA 法检测 HK2 细胞的 AP-1 活化水平，高糖组和 AP-1 阻断组 AP-1 活性较正常对照组分别增加了 79.22% 和 28.03%($P < 0.05$)，而 AP-1 阻断组活性明显低于高糖组，较高糖组降低 51.19%($P < 0.05$，图 6)。



1：探针性竞争；2：阴性对照；3：正常对照组；4：高糖组；5：AP-1 阻断组

图 6 高糖对 HK2 细胞 AP-1 活性的影响

3 讨论

研究表明肾小管上皮细胞转分化(epithelial-to-mesenchymal transition，EMT)的发生，即细胞丧失上皮细胞标志蛋白 CK，继而获得肌成纤维细胞的特性 vimentin 及 α-SMA，最后转分化为肌成纤维细胞，分泌细胞外基质，参与肾间质纤维化[1]。正常 HK2 细胞表达 CK，不表达 α-SMA，α-SMA 可作为检测肾小管上皮细胞表型转化的指标。α-SMA 是肌成纤维细胞的标志性蛋白，肌成纤维细胞是活化的成纤维细胞，具有很高的合成细胞外基质的作用，是引起肾间质纤维化的主要原因。本研究表明吸高糖可以刺激 HK2 细胞发生形态学改变，细胞逐渐由卵圆形拉长成梭形，微绒毛明显减少，粗面内质网明显增多，提示细胞丧失原来极性，细胞骨架构成发生改变，失去了上皮特性而表现为成纤维细胞特性。同时，正常对照组几乎无 α-SMA 的表达，但高糖作用下 α-SMA 高表达，而 HK2 的标志蛋白 CK 的表达明显下调，提示高糖诱导肾小管上皮细胞表型转化，这可能是糖尿病肾病肾间质纤维化的重要机制之一。

AP-1 通过亮氨酸拉链与 DNA 结合。血清、生长因子、紫外线等均可导致 c-fos 和 c-jun 基因的瞬时转录激活，从而活化 AP-1，调节基因转录[2]。AP-1 参与多种病理和病理生理过程的调控，可调节细胞增殖、分化及体内免疫反应等。已证实高糖和外源性过氧化氢可活化肾系膜细胞 AP-1，而 AP-1 的活化可增加纤维连接蛋白的转录活性，诱导纤维连接蛋白的分泌，参与糖尿病肾损伤。研究表明[6]-Gingerol 是 AP-1 化学阻断剂，可以特异性阻断 AP-1 的活化[3]。实验中 AP-1 阻断组[6]-Gingerol 干预后，HK2 细胞 α-SMA 的表达明显低于高糖组，而 HK2 的标志蛋白 CK 的表达较高糖组明显增加。同时形态学检查显示，AP-1 阻断组细胞形态介于对照组与高糖组之间，部分细胞为椭圆形，但有部分转变为梭形，同时细胞表面微绒毛较高脂组明显增多，胞质内粗面内质网较高脂组减少。提示高糖可通过 AP-1 活化诱导肾小管上皮细胞表型转分化，参与糖尿病肾病的纤维化进程。

本研究表明高糖能够导致肾小管上皮细胞 AP-1 活化，诱导其表型转化，AP-1 在肾间质纤维化时的 EMT 过程中可能起了重要的调控作用。

参考文献：

[1] 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.

[2] Arnott C H, Scott K A, Moore R J, *et al*. Tumour necrosis factor-alpha mediates tumour promotion via a PKC alpha- and AP-1-dependent pathway[J]. Oncogene, 2002, 21(31): 4728 - 4738.

[3] Bode A M, Ma W Y, Surh Y J, *et al*. Inhibition of epidermal growth factor-induced cell transformation and activator protein 1 activation by [6]-gingerol[J]. Cancer Res, 2001, 61(3): 850 - 853.

(编辑 邓强庭)