文章编号:1000-5404(2013)13-1327-04

论著

Klotho对FGF2诱导的肾小管上皮细胞上皮-间充质转分化的抑制作用

管 旭,杨 可,肖堂利,李 艺,何 婷,徐新丽,赵景宏 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院肾内科)

[摘要] **目的** 探讨Klotho抑制成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor2,FGF2)诱导的肾小管上皮细胞(HK-2)上皮-间充质转分化(epithelia-mesenchymal transition,EMT)的作用及机制。**方法** 重组人Klotho蛋白预孵育前后,倒置显微镜观察FGF2对HK-2细胞形态的影响,免疫荧光检测上皮细胞标志物cytokeratin和间充质细胞标志物vimentin的表达变化,Western blot检测α-SMA、E-cadherin和ERK1/2的表达变化。**结果** 100 ng/mL的FGF2作用于HK-2细胞48 h后,HK-2细胞变成长梭形,细胞间隙明显增大,上皮细胞标志物E-cadherin的表达明显下降,间充质细胞标志物α-SMA表达明显升高($P<0.05$),提示FGF2可以诱导HK-2细胞发生EMT。而Klotho蛋白预孵育可以显著抑制FGF2诱导的EMT,并且FGF2/FGFR(FGFs受体)下游信号分子pERK1/2的表达明显减弱($P<0.05$)。**结论** Klotho可以通过减弱FGF2信号通路活化抑制FGF2诱导的HK-2细胞EMT,Klotho可能参与了肾间质纤维化的发生和发展。

[关键词] Klotho;FGF2;上皮-间充质转分化
[中图法分类号] R322.61; R329.24; R394.2 [文献标志码] A

Inhibition of Klotho on epithelia-mesenchymal transition of renal tubule epithelial cells induced by FGF2

Guan Xu, Yang Ke, Xiao Tangli, Li Yi, He Ting, Xu Xinli, Zhao Jinghong (Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect and mechanism of Klotho on the epithelia-mesenchymal transition (EMT) of HK-2 cells induced by fibroblast growth factor 2 (FGF2). **Methods** The effect of FGF2 on HK-2 cells morphology with and without pre-incubation of Klotho was observed. The expression levels of epithelial marker cytokeratin and mesenchymal marker vimentin were detected by immunofluorescence, and the expression levels of α-smooth muscle actin (α-SMA), E-cadherin and ERK1/2 were detected by Western blotting. **Results** After incubated with FGF2 (100 ng/mL) for 48 h, HK-2 cells turned into long-spindled shape, and the intercellular space markedly increased. The expression of epithelial marker E-cadherin significantly decreased ($P<0.05$), while the mesenchymal marker α-SMA increased ($P<0.05$), indicating that FGF2 could induce EMT in HK-2 cells. The pre-incubation of Klotho could markedly inhibit the EMT induced by FGF2 and the expression of pERK1/2 in HK-2 cells ($P<0.05$). **Conclusion** Klotho can inhibit FGF2-induced EMT *via* attenuating the activation of FGF2 signaling pathway, and may participate in the development of renal interstitial fibrosis.

[**Key words**] Klotho; FGF2; epithelia-mesenchymal transition

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81270290, 30700316). Corresponding author: Zhao Jinghong, Tel: 86-23-68774321, E-mail: zhaojh@tmmu.edu.cn

肾小管-间质纤维化是各种慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)发展为终末期肾功能衰竭的共同途径。研究发现导致肾间质纤维化的间充质细胞约有36%来源于肾小管上皮细胞[1],说明肾小管细胞上皮-间充质转分化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在肾间质纤维化过程中发挥着关键作用。成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor 2,FGF2)是一种具有显著促增殖、分化作用的细胞因子,研究发现它是肾小管上皮细胞发生EMT的重要刺激因素[2]。Klotho基因是新近发现的与抗衰老有关的基因[3],仅在肾脏组织中高表达,并主要定位于肾小管上皮细胞。我们前期的研究结果表明,在尿毒症实验动物模型中,

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81270290,30700316)
[通信作者] 赵景宏,电话:(023)68774321,E-mail:zhaojh@tmmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130131.1706.009.html(2013-01-31)

肾组织 Klotho 的表达水平显著降低[4]，而且 Klotho 敲除后可以引起肾脏内皮细胞功能障碍、肾脏上皮细胞功能和结构异常[5]，提示它与肾脏疾病关系密切。进一步研究发现，Klotho 可以通过竞争结合 FGFR，抑制 FGF2 信号通路的活性[6]。因此，我们推测 Klotho 或许能够通过抑制 FGF2/FGFR（FGFs 受体）信号通路活性，干预 EMT 的发生和发展。为此，本研究以人肾小管上皮细胞株（HK-2）为研究对象，探讨 Klotho 对 FGF2 诱导 EMT 的影响及机制，以进一步揭示肾间质纤维化的发生机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人肾小管上皮细胞 HK-2 由本研究室保存。DMEM/F12 培养基、胰酶（HyClone 公司）；胎牛血清（fetal bovine serum，FBS，Gbico 公司）；FGF2（PEPROTECH 公司）；Tris 配制母浓度为 10 μg/mL，－80 ℃保存，使用时用含血清培养基进行稀释；Klotho（R&D 公司），无菌 PBS 配制母浓度为 20 mmol/L，－80 ℃保存，使用时用含血清培养基进行稀释；α 平滑肌肌动蛋白（α-SMA）抗体（北京博奥森公司）；E-钙黏着糖蛋白（E-cadherin）抗体和 ERK1/2 抗体（北京中杉金桥公司）；波形蛋白（vimentin）抗体和角蛋白（cytoketin）抗体（武汉博士德公司）；pERK1/2 抗体（Cell Signaling 公司）；β-actin 抗体（碧云天生物技术研究所）。

1.2 HK-2 细胞培养与传代

HK-2 细胞复苏后，培养于含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液中，置于 5% CO_2，37 ℃恒温培养箱培养，观察细胞状态，每 2～3 天用 0.25% 胰酶进行消化传代。

1.3 细胞形态观察

HK-2 细胞融合至 80%～90%，0.25% 胰酶消化后离心，培养液重悬。细胞计数后，稀释为 1×10^5/mL，接种于 6 孔板中，每孔 2 mL，置于 5% CO_2，37 ℃恒温孵箱培养。细胞贴壁后，弃掉含血清培养液并用 PBS 清洗 2 次后，更换为每孔 2 mL 无血清培养基，继续培养 12 h。之后分别加入含 FGF2（终浓度分别为 0、100 ng/mL）有血清培养基，继续培养 48 h。普通光学显微镜下观察细胞形态学变化并照相。

1.4 免疫荧光染色

将洁净灭菌盖玻片置于 6 孔板中，HK-2 细胞按上述步骤接种于 6 孔板培养 24 h，加入 400 pmol/L 的重组人 Klotho 蛋白预孵育 1 h，然后加入 100 ng/mL 的 FGF2 继续孵育 48 h。细胞经 4% 中性甲醛固定 30 min，0.1% Triton X-100 通透 10 min 后染色。滴加 vimentin（1∶100）和 cytokeratin（1∶100）抗体，4 ℃过夜。经 PBS 清洗 2 次后，滴加二抗，PBS 清洗后经 DAPI 染核后封片。共聚焦显微镜下观察并照相。

1.5 Western blot 检测

HK-2 细胞按上述步骤处理，分别于 FGF2 作用 10 min 和 48 h 后收集细胞，按文献[7]方法提取细胞总蛋白并行浓度检测及变性处理。取等量样本 40 μg 上样于 10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳，然后进行转膜。取出转印好的 PVDF 膜，5% 脱脂奶粉 37 ℃封闭 1 h，加入 α-SMA（1∶100）、E-cadherin（1∶200）、ERK1/2（1∶1 000）、pERK1/2（1∶1 000）和 β-actin（1∶1 000）抗体，4 ℃过夜。0.1% PBST 清洗 3 次，加入二抗（1∶1 000），37 ℃摇床 1 h，化学发光显影。用 Image J 分析软件测定蛋白印迹条带净灰度值，以 ERK1/2 和 β-actin 为内参，计算两者比值即为蛋白相对表达水平。

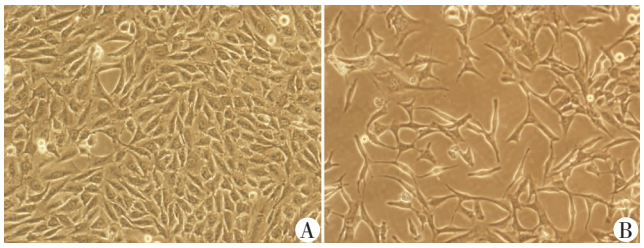
1.6 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 17.0 统计软件，两组比较用两样本 t 检验，多组比较用单因素方差分析。

2 结果

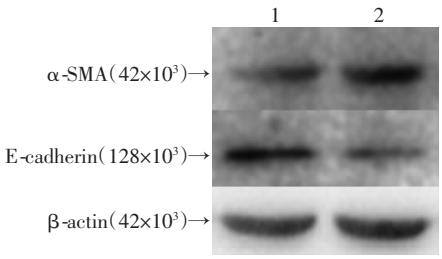
2.1 FGF2 对 HK-2 细胞形态、α-SMA 和 E-cadherin 表达的影响

观察细胞形态可发现，正常 HK-2 细胞贴壁生长，形状为铺路石样，排列整齐且较紧密（图 1A）；在 FGF2（100 ng/mL）诱导 48 h 后，HK-2 细胞变成长梭形，间隙明显增大，与正常细胞形态差异明显，部分细胞形态已类似于成纤维细胞（图 1B），提示 FGF2 可以诱导 HK-2 细胞发生 EMT。Western blot 检测示，FGF2 作用于 HK-2 细胞 48 h 后，与对照组相比，上皮细胞标志物 E-cadherin 表达明显下降［（0.165±0.03）*vs*（0.576±0.08），而间充质细胞标志物 α-SMA 表达明显上升（0.099±0.02）*vs*（0.027±0.01），$P<0.05$，图 2］，进一步证实 FGF2 可以诱导 HK-2 细胞发生 EMT。



A：空白对照组；B：FGF2 组

图 1 普通光学显微镜观察 HK-2 细胞形态变化（×200）

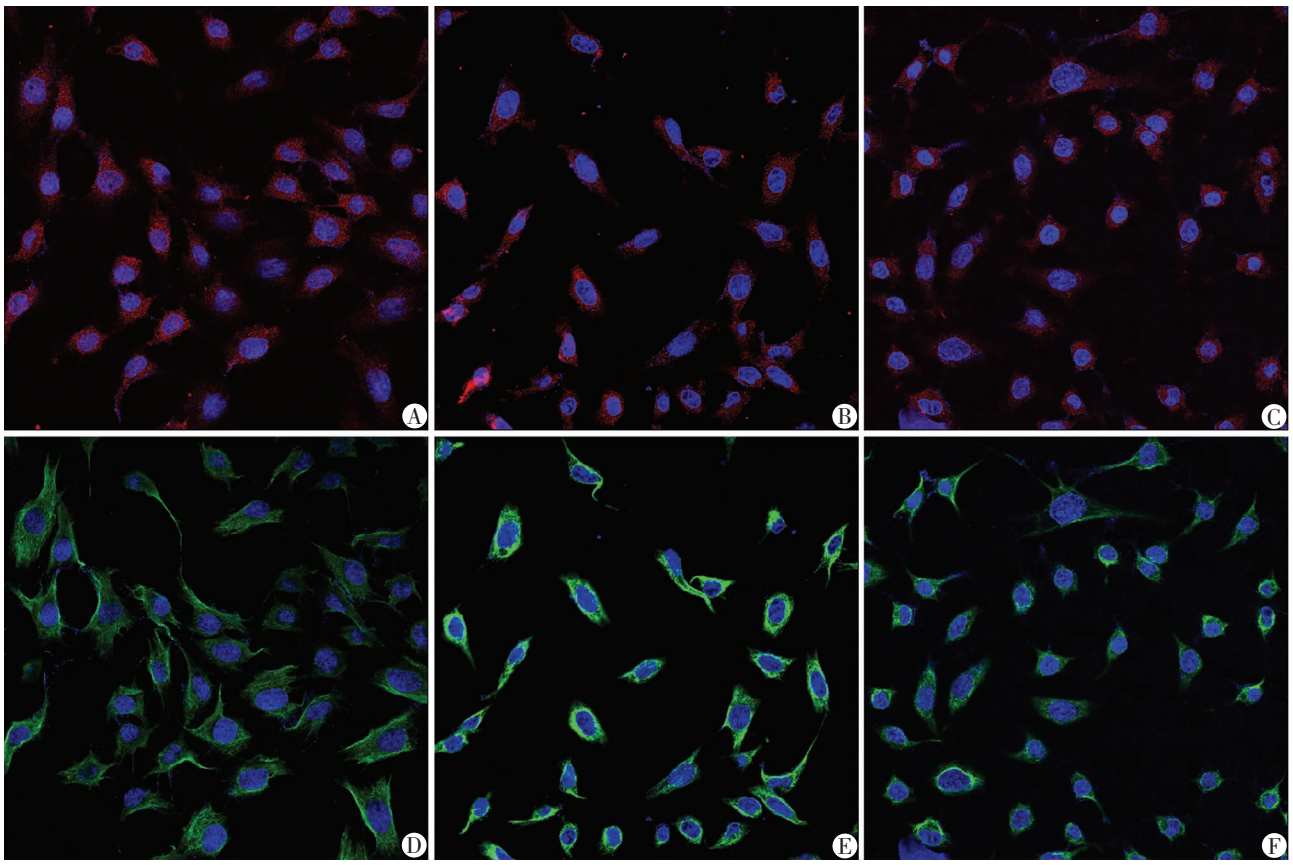


1：空白对照组；2：FGF2 组

图 2 Western blot 检测 HK-2 细胞 α-SMA、E-cadherin 表达

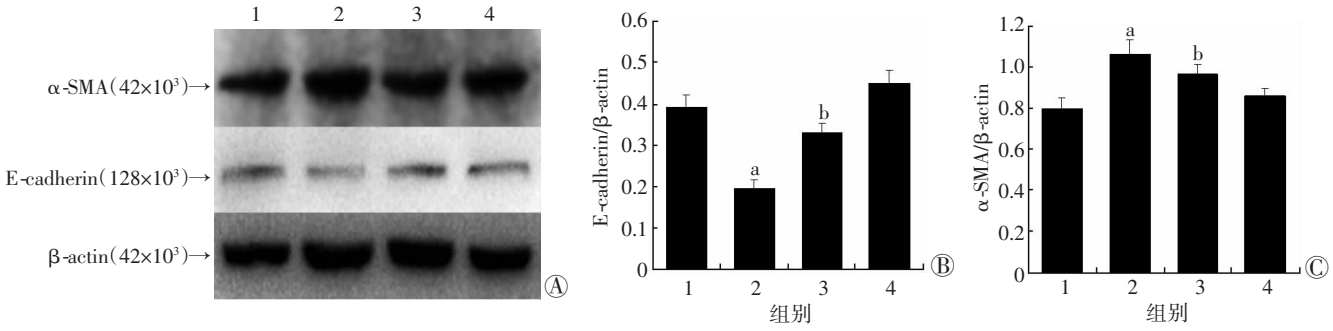
2.2 Klotho 对 FGF2 诱导 HK-2 细胞 EMT 的影响

免疫荧光检测显示，与对照组相比，FGF2 组间充质细胞标志物 vimentin 表达增加，上皮细胞标志物 cytokeratin 表达下降；与 FGF2 组相比，Klotho 预孵育组 vimentin 表达下降，cytokeratin 表达增加（图 3），提示 Klotho 可逆转 FGF2 诱导的 EMT。Western blot 检测显示，与对照组相比，FGF2 组 α-SMA 表达上调，E-cadherin 表达下降（$P<0.05$）；而 Klotho 预孵育可以显著抑制 FGF2 诱导的 α-SMA 和 E-cadherin 的表达变化（$P<0.05$，图 4），提示 Klotho 可以抑制 FGF2 诱导的 EMT。



A、D：空白对照组；B、E：FGF2 组；C、F：FGF2 + Klotho 组

图 3　免疫荧光观察 HK-2 细胞 cytokeratin（A ~ C）、vimentin（D ~ F）表达　（×200）



1：空白对照组；2：FGF2 组；3：FGF2 + Klotho 组；4：Klotho 组　A：Western blot 检测结果；B、C：E-cadherin、α-SMA 半定量分析结果　a：$P<0.05$，与空白对照组比较；b：$P<0.05$，与 FGF2 组比较

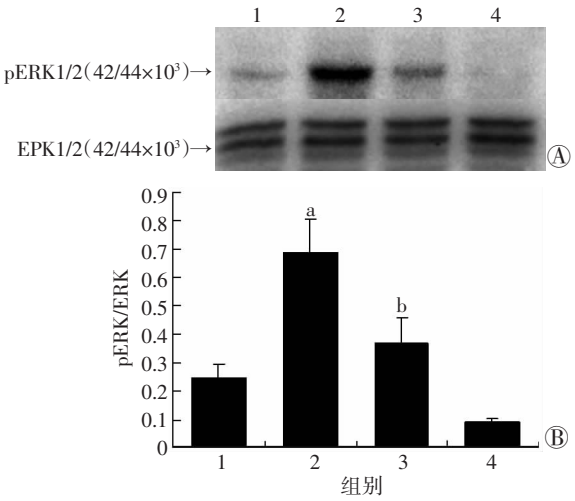
图 4　Western blot 检测 HK-2 细胞 E-cadherin、α-SMA 表达

2.3　Klotho 对 FGF2/FGFR 信号通路活性的影响

Western blot 结果提示，FGF2 组 HK-2 细胞 pERK1/2 表达较对照组明显增加（$P<0.05$），而 Klotho 预孵育可以显著抑制 FGF2 的上述作用（$P<0.05$，图 5）。这说明 Klotho 对 FGF2 诱导 EMT 的抑制作用可能与其降低了 FGF2/FGFR 信号通路活性有关。

3　讨论

FGF2 是一种具有显著促增殖、分化作用的细胞因子，其生物学功能的发挥由细胞表面受体-FGFR 介导完成，FGF2/FGFR 信号通路在多种组织细胞向成纤维细胞的转分化过程中都发挥了重要作用[8]。由于肾小管上皮细胞能够生成 FGF2，同时其细胞表面又广泛存在 FGFR，因此许多研究关注并证实 FGF2/FGFR 信号通路在肾小管上皮细胞 EMT 中也扮演着重要角色[9]。Klotho 是一个新近发现的与衰老相关的基因，其编码的 Klotho 蛋白与 FGF 家族关系密切[10]，它可以与细胞表面所有 1 ~4 型的 FGFR 进行结合，并发挥调节 FGFs 信号通路的作用[11]。对于内分泌型 FGF（eFGFs，如 FGF23、19 等），Klotho 可以显著促进 eFGFs



1：空白对照组；2：FGF2 组；3：FGF2 + Klotho 组；4：Klotho 组 A：Western blot 检测结果；B：半定量分析结果 a：$P<0.05$，与空白对照组比较；b：$P<0.05$，与 FGF2 组比较

图5 Western blot 检测 HK-2 细胞 pERK1/2 表达

与 FGFR 的结合，具有协同增强 eFGFs 信号通路活性的作用[12]；对于碱性 FGF（FGF2），Klotho 则是通过竞争结合 FGFR，抑制 FGF2 信号通路的活性[6]。因此，慢性肾功能衰竭时，肾小管上皮细胞 Klotho 的表达下降则可能会引起 FGF2 信号通路异常激活，由此促进 EMT 的发生，进而导致肾间质纤维化。

本研究首先观察到人肾小管上皮细胞 HK-2 在 FGF2 的诱导下产生了典型的 EMT，包括形态学改变，以及间充质标志物 α-SMA 表达增加和上皮标志物 E-cadherin 的表达下降。在此基础上进一步研究 Klotho 对 FGF2 诱导 EMT 的影响发现，Klotho 可明显抑制 FGF2 诱导的 EMT，包括下调 α-SMA 及上调 E-cadherin 的表达，同时免疫荧光染色也进一步证实，FGF2 可以诱导 HK-2 细胞间充质标志物 vimentin 表达增加和上皮标志物 cytokeratin 表达下降，而 Klotho 预孵育却可以逆转 FGF2 的上述作用。说明，Klotho 的确可以抑制 FGF2 诱导的肾小管上皮细胞 EMT。

研究表明，FGF2 介导的 EMT 与其结合 FGFR 后激活 FRS2α-Ras-ERK1/2 相关[13]。因此本研究选择磷酸化 ERK1/2 的表达变化作为 FGF2/FGFR 活化的观察指标，明确 Klotho 抑制 FGF2 诱导肾小管上皮细胞 EMT 的信号通路机制。结果表明，HK-2 细胞加入 FGF2 孵育 10 min 后，其下游信号分子 pERK1/2 表达明显增强，提示 FGF2/FGFR 信号通路活化，而 Klotho 预孵育可显著抑制 pERK1/2 的表达，说明 Klotho 对 FGF2 诱导肾小管上皮细胞 EMT 的抑制作用可能正是通过调控FGF2/FGFR信号通路的活性而实现的。这也从另一个角度说明，上调 Klotho 表达，可能会通过抑制 FGF2 信号通路的过度激活，防治 EMT 和肾间质纤维化的发生和发展。

参考文献：

[1] Iwano M, Plieth D, Danoff T M, *et al*. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis[J]. J Clin Invest, 2002, 110(3): 341－350.

[2] Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh F N, *et al*. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation[J]. Kidney Int, 2002, 61(5): 1714－1728.

[3] Aizawa H, Saito Y, Nakamura T, *et al*. Downregulation of the Klotho gene in the kidney under sustained circulatory stress in rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 249(3): 865－871.

[4] Yu J, Deng M, Zhao J, *et al*. Decreased expression of klotho gene in uremic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 391(1): 261－266.

[5] Nagai R, Saito Y, Ohyama Y, *et al*. Endothelial dysfunction in the klotho mouse and downregulation of klotho gene expression in various animal models of vascular and metabolic diseases[J]. Cell Mol Life Sci, 2000, 57(5): 738－746.

[6] Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, *et al*. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23[J]. Nature, 2006, 444(7120): 770－774.

[7] Zhou B, Liu Y, Kahn M, *et al*. Interactions between β-catenin and transforming growth factor-β signaling pathways mediate epithelial-mesenchymal transition and are dependent on the transcriptional co-activator cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP)[J]. J Biol Chem, 2012, 287(10): 7026－7038.

[8] Lee J G, Ko M K, Kay E P. Endothelial mesenchymal transformation mediated by IL-1β-induced FGF-2 in corneal endothelial cells[J]. Exp Eye Res, 2012, 95(1): 35－39.

[9] Masola V, Gambaro G, Tibaldi E, *et al*. Heparanase and syndecan-1 interplay orchestrates fibroblast growth factor-2-induced epithelial-mesenchymal transition in renal tubular cells[J]. J Biol Chem, 2012, 287(2): 1478－1488.

[10] Kuro-o, M. Klotho in health and disease[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2012, 21(4): 362－368.

[11] Kuro-o M. Klotho as a regulator of fibroblast growth factor signaling and phosphate/calcium metabolism[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2006, 15(4): 437－441.

[12] Razzaque M S. The FGF23-Klotho axis: endocrine regulation of phosphate homeostasis[J]. Nat Rev Endocrinol, 2009, 5(11): 611－619.

[13] Xiao L, Du Y, Shen Y, *et al*. TGF-beta 1 induced fibroblast proliferation is mediated by the FGF-2/ERK pathway[J]. Front Biosci, 2012, 17: 2667－2674.

（收稿：2012-11-27；修回：2013-01-18）

（编辑 龙 亮）