DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.19.008
第26卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 19
2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

文章编号:1000-5404(2004)19-1717-03

论著

转化生长因子β1诱导人肾小管上皮细胞表达结缔组织生长因子

卓文磊[1],张 璟[1],杨惠标[1],王 彦[2],黄云剑[1] (第三军医大学新桥医院:[1]肾内科,全军肾脏病中心,重庆市肾病研究所,[2]全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要:目的 研究转化生长因子β1(transforming growth factor β1, TGFβ1)对人肾小管上皮细胞(human proximal tubular epithelial cells, HTECs)表达结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)的影响。方法 体外培养的HTEC被根据随机数字表分为3组:对照组(C组):无血清培养基(free serum medium, FSM)培养;TGFβ1a和TGFβ1b组(T_a组和T_b组):分别用含不同浓度TGFβ1(T_a组:20 ng/ml,T_b组:40 ng/ml)的FSM培养,96 h后,分别用RT-PCR和免疫组化方法检测HTEC表达CTGFmRNA和蛋白。结果 ①C组:CTGFmRNA和蛋白表达为阴性;②T_b组和T_a组:CTGFmRNA和蛋白表达皆呈阳性。T_b组和T_a组相比,CTGF的mRNA和蛋白表达量皆显著增加($P<0.01$)。结论 TGFβ1能呈剂量依赖性地诱导HTEC合成CTGF。

关键词:肾小管上皮细胞;转化生长因子β1;结缔组织生长因子
中图法分类号:R322.61;R329.26;R392.11 文献标识码:A

Human proximal tubular epithelial cells express connective tissue growth factor induced by TGFβ1

ZHUO Wen-lei[1], ZHANG Jing[1], YANG Hui-biao[1], WANG Yan[2], HUANG Yun-Jian[1]([1]Renal Diseases Research Center, Department of Nephrology, [2]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of connective tissue growth factor (CTGF) in the human tubular epithelial cells (HTECs) induced by transforming growth factor β1 (TGFβ1). **Methods** HTECs cultured *in vitro* were divided into three groups: control group (C): cultured with free serum medium (FSM); TGFβ1 treatment groups (T_a and T_b): cultured with FSM containing different concentrations of TGFβ1 (T_a: 20 ng/ml, T_b: 40 ng/ml). After treatment for 96 hours, CTGF expression was examined by immunohistochemical staining and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** ① C group: Both CTGF mRNA by RT-PCR and CTGF protein by immunohistochemical staining in HTECs were negative. ② T_a and T_b groups: Both CTGF mRNA and protein expression were positive. Compared with those in T_a group, both CTGF mRNA and protein expression in T_b group were significantly increased ($P<0.01$). **Conclusion** TGFβ1 can induce CTGF expression in HTECs in a dose-depended way.

Key words: human renal tubular epithelial cell; transforming growth factor β1; connective tissue growth factor

结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是一种新发现的,具有诱导纤维组织生成作用的细胞因子,可能是转化生长因子β1(transforming growth factor β1, TGFβ1)发挥致肾纤维化作用的下游因子[1]。但是,尚不清楚TGFβ1能否诱导CTGF表达于人肾小管上皮细胞,亦不清楚CTGF在肾小管上皮细胞异常活化并导致肾纤维化的过程中有何意义。本研究以体外培养的人肾小管上皮细胞株(human proximal tubular epithelial cells, HTECs)为研究对象,研究TGFβ1对HTEC表达CTGF的影响,旨在为进一步研究CTGF在人肾小管上皮细胞异常活化以及肾纤维化中的作用提供线索。

1 材料和方法

1.1 材料

人近端肾小管上皮细胞株(HTEC)由北京协和医科大学郑法雷教授惠赠;山羊抗人CTGF抗体购于Santa Cruz公司;重组人TGFβ1细胞因子购于Strathmann biotec公司;SABC-AP免疫组

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100083)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30100083)
作者简介:卓文磊(1975-),男,贵州省贞丰县人,博士研究生,医师,主要从事肾间质纤维化等方面的研究。电话:(023)68755621
通信作者:张 璟,电话:(023)68755132
收稿日期:2003-12-18;修回日期:2004-04-21

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

化试剂盒购于博士德公司；RT-PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司；PCR 引物参考文献[2]由上海生物工程公司合成，CTGF 引物（344 bp）：上游 5′-GAC GGCTGCGGCTGCTGC-3′，下游 5′-CACACC-CACTCCTCGCAGCA-3′；GAPDH 引物（450 bp）：上游 5′-AC-CACAGTCCAT GCCATCAC-3′，下游 5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′。

1.2 方法

1.2.1 HTEC 的培养和分组

HTEC 用含 10% 胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）的 DMEM/F12 1∶1 培养基传代培养于 37 ℃，5% CO_2 条件下。取对数生长期的细胞，以 1×10^4/ml 传代于 24 孔板（预先放入小盖玻片，准备进行免疫组化）或培养瓶中（准备进行 RT-PCR），继续培养至 50%～60% 融合后，换无血清培养基（free serum medium，FSM）同步 24 h，弃 FSM，分别加入不同试剂，分为以下 3 组，每组 5 个样本：① 正常对照组（C 组）：用 FSM 培养细胞。② $TGF\beta_1$ 组（T_a 组）：用含 $TGF\beta_1$ 20 ng/ml 的 FSM 培养细胞。③ $TGF\beta_1$ 组（T_b 组）：用含 $TGF\beta_1$ 40 ng/ml 的 FSM 培养细胞。

继续培养，48 h 后换同组培养液 1 次。96 h 后取出细胞，进行以下检测。

1.2.2 半定量 RT-PCR

以 tripure 提取细胞总 RNA，用紫外分光光度计测定 A_{260}、A_{280}=1.8～2.0。cDNA 合成和预变性条件为：42 ℃ 1 h→99 ℃ 55 min→4 ℃ 5 min→95 ℃ 4 min。PCR 扩增条件为：95 ℃ 1 min→57 ℃ 1 min→72 ℃ 2 min→CTGF 35 个循环，GAPDH 30 个循环，最后 72 ℃ 5 min 终止。CTGF 和 GAPDH 的扩增片段分别为 344 bp 和 450 bp。取 PCR 扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳后，用 Chemilnager™ 550 型凝胶成像分析仪成像并进行图像分析，得代表各电泳条带产量的光密度（optical density，OD）值。CTGF 和 GAPDH 电泳条带 OD 值的比值为 CTGF 相对光密度（relative optical density，ROD）值，用以表示 CTGFmRNA 的相对表达量。

1.2.3 免疫组化

取出细胞爬片，4% 多聚甲醛固定 15 min，根据免疫组化试剂盒说明书，用 SABC-AP 法检测细胞内 CTGF 蛋白的表达，BCIP/NBT 显色剂显色。阳性部分染成紫黑色。染色结果用 Image-pro-plus 生物图像分析系统进行光密度分析，用平均光密度（average optical density，AOD）值代表 CTGF 蛋白表达量。

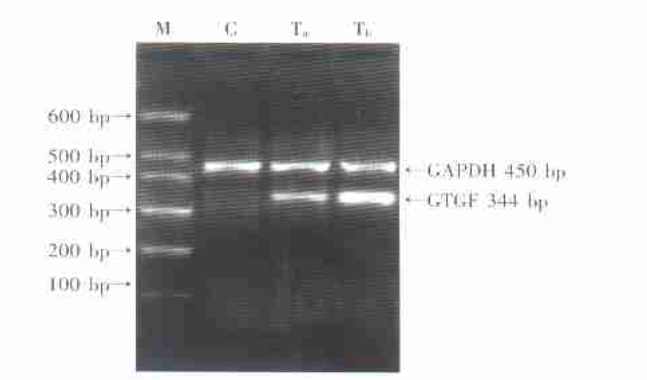
1.3 统计学方法

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPSS 10.0 统计软件采用单因素方差分析及各组间比较。

2 结果

2.1 $TGF\beta_1$ 对 HTEC 表达 CTGFmRNA 的影响（图 1）

C 组：只见 450 bp GAPDH 扩增带，未见 344 bp CTGF 扩增带，$ROD_{C组}$=0.664±0.023，相当于凝胶背景值，提示 CTGFmRNA 表达阴性。T_a 组和 T_b 组：皆见 450 bp GAPDH 扩增带和 344 bp CTGF 扩增带。提示 CTGFmRNA 阳性。$ROD_{T_a组}$=0.976±0.037，$ROD_{T_b组}$=1.263±0.033，$ROD_{T_a组}$ 和 $ROD_{T_b组}$ 皆显著高于 $ROD_{C组}$（$P<0.01$），且 $ROD_{T_b组}$ 显著高于 $ROD_{T_a组}$（$P<0.01$），提示 $TGF\beta_1$ 能呈剂量依赖性地诱导 CTGFmRNA 表达。



M：PCR marker；C：Normal control；T_a：HTECs treated with 20 ng/ml $TGF\beta_1$；T_b：HTECs treated with 40 ng/ml $TGF\beta_1$

图 1 $TGF\beta_1$ 对 HTECs 表达 CTGFmRNA 的影响

Fig 1 Effects of HTECs on the expression of CTGFmRNA after $TGF\beta_1$ treatment

2.2 $TGF\beta_1$ 对 HTEC 表达 CTGF 蛋白的影响（图 2）

C 组：HTEC 呈卵石样紧密排列生长模式，其中 CTGF 蛋白表达呈阴性，AOD_C 组=0.0796±0.0048，相当于背景值。T_a 组和 T_b 组：CTGF 蛋白表达皆呈阳性。BICP/NBT 染色显示 CTGF 为紫黑色颗粒，主要表达于细胞浆，尤其在部分新出现的呈梭形生长的细胞内表达强烈。$AOD_{T_a组}$=0.2176±0.0168，$AOD_{T_b组}$=0.3878±0.0169，皆显著高于 AODC 组（$P<0.01$），$AOD_{T_b组}$ 显著高于 $AOD_{T_a组}$（$P<0.01$），提示 $TGF\beta_1$ 能呈剂量依赖性地诱导 CTGF 表达。



图 2 $TGF\beta_1$（40 ng/ml）处理 96 h 后 HTECs 的 CTGF 蛋白染色，可见细胞浆呈紫黑色 （SABC-AP×200）

Fig 2 Indigo in the cytoplasm of HTECs at 96 h after treatment of $TGF\beta_1$（40 ng/ml），indicating the expression of CTGF（SABC-AP×200）

3 讨论

CTGF 属于 CCN（CTGF、cyr61、nov）家族，正常情况下 CTGF 表达很低或无。在器官纤维化、伤口愈合等病理条件下，或在 $TGF\beta_1$ 等因素的诱导下，多种细胞可表达 CTGF[3]。在 CTGF 基因启动子－162～128 bp 处有一个

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

特异性的 TGFβ_1 反应元件, 提示 TGFβ_1 诱导 CTGF 表达具有特异性, 其它刺激因素能通过诱导 TGFβ_1 表达上升从而间接诱导 CTGF 表达增高[4]。CTGF 具有调控细胞增殖、粘附和迁移、诱导 ECM 产生等功能[5]。

在多种慢性肾衰动物模型[6]以及多种人类肾脏疾病[7]中均发现, 在肾脏组织纤维增生的过程中, 其毛细血管外系膜增生病损区、肾小球周围纤维化区、肾间质纤维化区均有 CTGF 的强烈表达。肾间质的成纤维细胞、肌成纤维细胞、肾小管上皮细胞等都可分泌 CTGF, 表达 CTGF 的细胞数量和肾间质纤维化程度呈正相关[7]。提示 CTGF 可能和肾组织内 ECM 的过度沉积并导致纤维化发展有重要关系[8]。

有研究表明, 在 TGFβ_1、FGF 等因素的作用下, 肾小管上皮细胞可异常活化, 进而发生肾小管上皮-肌成纤维细胞转分化, 表现在细胞形态由鹅卵石样紧密排列生长模式转化为梭形相互分离生长模式, 而且表达 ECM 及 α-平滑肌肌动蛋白, 导致肾纤维化的进展[8,9]。我们观察了在不同浓度 TGFβ_1 作用下, HTEC 的形态变化和 CTGF 的表达规律, 以及同正常培养条件下的对比。结果显示, 在正常情况下, HTEC 呈正常卵石状形态, 不表达 CTGF, 在浓度为 20 ng/ml 及 40 ng/ml 的 TGFβ_1 的作用 96 h 后, 有部分 HTEC 形态呈梭形, 用 RT-PCR 及免疫组化方法检测到 HTEC 表达 CTGF 阳性, 而且随 TGFβ_1 作用浓度的增高, CTGF 表达亦增高。CTGF 表达主要是在细胞浆, 细胞核内也有少许表达。在部分新出现的呈梭形生长的细胞内 CTGF 的表达更为强烈。

国外研究表明, CTGF 的表达在肾间质成纤维细胞和肾小球系膜细胞活化并导致肾纤维化的过程中有重要作用[10]。在 CTGF 和肾小管上皮细胞异常活化的关系研究方面, 研究表明一水化草酸钙晶体能在猴肾上皮细胞(BSC-1)刺激 CTGF 表达, 认为这和高草酸尿情况下肾纤维化的发展有关, 糖尿病大鼠的肾小球超滤液能诱导肾小管细胞表达 CTGF, CTGF 能诱导人近端肾小管上皮细胞(HTEC)合成 tenascin-C (TN-C)。但是, 作为重要的致肾纤维化因子, TGFβ_1 在诱导肾小管上皮细胞的异常活化过程中, CTGF 的表达规律和作用如何, 相关报道甚少。本研究表明, TGFβ_1 能呈剂量依赖性地诱导地诱导 HTEC 表达 CTGF, 而且在呈梭形生长的细胞内表达更高, 提示 CTGF 可能参与了肾小管上皮细胞的异常活化。但具体而言, CTGF 的表达有什么意义, 是否是 TGFβ_1 诱导肾小管上皮-肌成纤维细胞转分化所必需, 值得进一步的研究。

肾纤维化过程是不同病因导致肾脏功能进行性丧失的终末共同通路。过去认为 TGFβ_1 在肾纤维化进程中有重要作用[11]。但 TGFβ_1 生物学功能广泛, 对 TGFβ_1 的长期阻滞有可能带来严重的副作用。而 CTGF 作为 TGFβ_1 的致纤维化作用的下游因子, 正常情况下体内表达水平低, 生物学作用相对特异, 拮抗 CTGF 的致纤维化作用时不影响 TGFβ_1 的其它功能。CTGF 有望成为治疗肾纤维化疾病的靶目标。国外研究表明, 伊洛前列素、维生素 E、他汀类药物、血管紧张素转化酶抑制剂等药物都能间接降低 CTGF 的水平, 但特异性不强。用 CTGF 反义核酸或抗 CTGF 中和抗体能特异性阻滞 CTGF 的作用, 抗纤维化效果明显, 但距实用尚有距离。进一步研究 CTGF 的表达规律、活化方式和作用特点。探索特异且实用的阻滞 CTGF 效应的治疗方案, 可能起到有效的抗肾纤维化作用, 从而延缓肾纤维化进展。

参考文献:

[1] Leask A, Abraham D J. The role of connective tissue growth factor, a multifunctional matricellular protein, in fibroblast biology[J]. Biochem Cell Biol, 2003, 81(6): 355—363.

[2] Nakanishi T, Nishida T, Shimo T, *et al*. Effects of CTGF/Hcs24, a product of a hypertrophic chondrocyte-specific gene, on the proliferation and differentiation of chondrocytes in culture[J]. Endocrinology, 2000, 141(1): 264—273.

[3] Brigstock D R. The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family[J]. Endocr Rev, 1999, 20(2): 189—206.

[4] Daniels J T, Schultz G S, Blalock T D, *et al*. Mediation of transforming growth factor-beta(1)-stimulated matrix contraction by fibroblasts: a role for connective tissue growth factor in contractile scarring[J]. Am J Pathol, 2003, 163(5): 2043—2052.

[5] Brigstock D R. The CCN family: a new stimulus package[J]. J Endocrinol, 2003, 178(2): 169—175.

[6] Frazier K S, Paredes A, Dube P, *et al*. Connective tissue growth factor expression in the rat remnant kidney model and association with tubular epithelial cells undergoing transdifferentiation[J]. Vet Pathol, 2000, 37(4): 328—335.

[7] Yokoi H, Mukoyama M, Sugawara A, *et al*. Role of connective tissue growth factor in fibronectin expression and tubulointerstitial fibrosis[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002, 282(5): F933—942.

[8] Yang J, Liu Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(1): 96—107.

[9] 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.

[10] Yokoi H, Sugawara A, Mukoyama M. *et al*. Role of connective tissue growth factor in profibrotic action of transforming growth factor-beta: a potential target for preventing renal fibrosis[J]. Am J Kidney Dis, 2001, 38(4 Suppl 1): S134—138.

[11] 黄云剑, 梅煜明, 王沂芹, 等. Smads7 基因转染拮抗 TGF-β_1 对培养肾小管细胞的影响[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(12), 1049—1052.

(编辑　王　红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net