

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00051

促肝细胞生长素部分逆转巨噬细胞趋化因子和马兜铃酸 I 诱导的人肾小管上皮细胞转分化

陈超^{1,3}, 蒋建伟^{2*}, 周序琬¹, 严玉霞², 陈涛², 张小鹰²

1. 暨南大学医学院基础部病理学教研室, 广州 510632

2. 暨南大学医学院基础部生物化学教研室, 广州 510632

3. 焦作市人民医院普通外科, 焦作 454002

[摘要] **目的** 观察促肝细胞生长素 (hepatocyte growth-promoting factor, pHGF) 对巨噬细胞趋化因子 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) 协同马兜铃酸 I (aristolochic acid I, AA I) 诱导的人肾小管上皮细胞 (HKC) 凋亡及上皮细胞-间质细胞转分化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的影响。**方法** 体外培养的 HKC 随机分为: 空白对照组、转分化模型组及不同浓度 pHGF (0.15、1.5、15、150、1 500 ng/ml) 处理组。转分化模型组采用 MCP-1 (0.1 μg/ml) 协同 AA I (10 μg/ml) 诱导 HKC 转分化模型; pHGF 处理组采用不同浓度 pHGF 对转分化模型 HKC 进行处理; 空白对照组常规培养。采用 WST-8 法和流式细胞术观察各组细胞增殖和凋亡情况; RT-PCR 检测各组细胞 α-SMA mRNA 表达; 免疫组化检测各组细胞 α-SMA、TGF-β₁、FN 蛋白的表达。**结果** 与空白对照组相比, 转分化模型组、不同浓度 pHGF 处理组 HKC 细胞增殖抑制率, 凋亡细胞所占比例, α-SMA mRNA 表达均明显升高 ($P < 0.01$), 提示转分化模型制备成功。与转分化模型组细胞相比, pHGF (150 ng/ml) 处理组 HKC 增殖抑制率明显降低 ($P < 0.01$), 各浓度 pHGF 处理组 HKC 凋亡细胞所占比例均明显降低 ($P < 0.01$), HKC 细胞 α-SMA mRNA 表达下调 (150 ng/ml pHGF 处理组尤明显); α-SMA、TGF-β₁、FN 蛋白表达下调。**结论** pHGF (150 ng/ml) 可部分逆转 MCP-1 协同 AA I 诱导的 HKC 增殖抑制、凋亡和 EMT。

[关键词] 促肝细胞生长素; 肾小管上皮细胞; 细胞凋亡; 上皮-间质细胞转分化

[中图分类号] R 692.33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)01-0051-04

Hepatocyte growth-promoting factor partially reverses monocyte chemotactic protein-1- and aristolochic acid I -induced epithelial-to-mesenchymal transition of human kidney epithelial cells

CHEN Chao^{1,3}, JIANG Jian-wei^{2*}, ZHOU Xu-long¹, YAN Yu-xia², CHEN Tao², ZHANG Xiao-ying²

1. Department of Pathology, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

2. Department of Biochemistry, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

3. Department of General Surgery, the People's Hospital of Jiaozuo City, Jiaozuo 454002, Henan, China

[Abstract] **Objective** To observe the influence of hepatocyte growth-promoting factor (pHGF) on monocyte chemotactic protein-1-(MCP-1) and aristolochic acid I (AA I)-induced epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and apoptosis of human kidney epithelial cell line (HKC). **Methods** The HKC cells were randomly divided into blank control group (control groups), epithelial-to-mesenchymal transition model group (model group), and pHGF inhibition group (pHGF groups) with pHGF at different concentrations (0.15, 1.5, 15, 150, and 1 500 ng/ml). The EMT model was established by exposing HKC cells to MCP-1 (0.1 μg/ml) and AA I (10 μg/ml). Cells in the pHGF groups were the model cells treated with different concentrations of pHGF. Cells in the control group were cultured routinely. WST-8 method and flow cytometry were used to observe the proliferation and apoptosis of HKC cells, respectively. The mRNA expression of α-smooth muscle actin (α-SMA) was determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), and the expression of α-SMA, fibronectin (FN), and transforming growth factor-β₁ (TGF-β₁) in HKC cells were assessed by indirect enzyme immunohistochemistry. **Results** The cell inhibitory rate, apoptotic rate, and expression of α-SMA mRNA were significantly increased in the model group and pHGF groups compared with those in the control group ($P < 0.01$), indicating the successful establishment of EMT model. Compared

[收稿日期] 2009-06-24 **[接受日期]** 2009-12-09

[基金项目] 广州市科技计划项目 (2002 J1-C0361), 广东省医学科研基金 (A2002349). Supported by Sci-Tech Project Foundation of Guangzhou City (2002 J1-C0361) and Medical Science Research Foundation of Guangdong Province (A2002349).

[作者简介] 陈超, 硕士, 主治医师. E-mail: chenchaojnu@yahoo.cn

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 020-85220256, E-mail: jjw703@163.com

with the model group, pHGF at 150 ng/ml, but not at other concentrations, significantly decreased the inhibition rate of HKC cells ($P < 0.01$). The apoptotic rate of HKC cells in all the pHGF groups were significantly lower than that in the model group ($P < 0.01$). pHGF at 150 ng/ml also greatly decreased the expression of α -SMA mRNA, and significantly down-regulated the expression of α -SMA, TGF- β_1 , and FN protein. **Conclusion** pHGF at 150 ng/ml can partly reverse MCP-1- and AA I-induced HKC cell growth inhibition, apoptosis, and EMT.

[Key words] hepatocyte growth-promoting factor; kidney epithelial cells; apoptosis; epithelial-to-mesenchymal transition
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(1): 51-54]

促肝细胞生长素 (hepatocyte growth-promoting factor, pHGF) 是从乳猪新鲜肝脏中提取的相对分子质量约为 10 700 的活性多肽, 具有促进肝细胞分裂增殖、稳定肝细胞膜、改善肝纤维化等作用, 现已取得初步的临床疗效^[1-4], 与肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 效果相似^[5-6]。HGF 生理作用广泛, 可明显改善肾间质纤维化, 增加肾小管上皮细胞 DNA 合成, 促进肾小管分支形成^[7-8], 甚至逆转肾损伤模型的肾纤维化^[9]。而 pHGF 亦能明显改善大鼠肾小管上皮细胞 NRK-52E 的上皮-间质细胞转分化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 减少细胞外基质成分纤连蛋白 (fibronectin, FN) 的分泌^[10]; 改善大鼠单侧输尿管梗阻肾间质纤维化模型中的 EMT 作用, 抑制肾纤维化组织中转化生长因子 (TGF- β_1)、 α -SMA、FN 蛋白表达的增加程度^[11-12], 提示 pHGF 对大鼠肾组织纤维化具有一定的抑制作用。因此, 本研究进一步观察 pHGF 对巨噬细胞趋化因子 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) 协同马兜铃酸 I (aristolochic acid I, AA I) 诱导的人肾小管上皮细胞 (HKC) 凋亡及 EMT 的影响, 探讨 pHGF 对肾间质纤维化的可能疗效及机制, 为后续临床应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 HKC 细胞株 (中山大学医学院生物化学教研室惠赠), pHGF (山东威海赛洛金药业有限公司, 药品批号 0603019), CCK-8 细胞计数试剂盒 (日本同仁化学研究所), 新生牛血清 (天津灏洋生物制品科技有限责任公司), DMEM/F12 培养液 (Gibco 公司), TRIzol 试剂 (Invitrogen 公司), Model-450 酶标仪 (Bio-Rad 公司), Nikon Eclipse 80i 显微镜病理图像采集系统 (日本尼康公司), 兔抗人 TGF- β_1 多克隆抗体 (Santa Cruz 公司), 小鼠抗人 α -SMA 单克隆抗体、小鼠抗人 FN 单克隆抗体 (美国 NeoMakers 公司), 二抗 Elivision™ plus 抗小鼠第二代即用型非生物素法广谱试剂盒 (福州迈新生物技术开发有限公司), GDS 8000 凝胶成像系统 (美国 Ultra-violet Products 公司), PTC-196 型 PCR 扩增仪 (Bio-

Rad 公司), 流式细胞仪 (美国 Coulter 公司)。

1.2 细胞培养及 HKC 转分化模型的建立 HKC 随机分为: 空白对照组、转分化模型组和不同浓度 (0.15、1.5、15、150、1 500 ng/ml) pHGF 处理组。所有细胞均在含 15% 血清的 DMEM/F12 培养液中, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 2~3 d 换液 1 次, 选用对数生长期、锥虫蓝拒染率 > 95% 的 HKC 细胞, 用 0.125% 胰蛋白酶消化并收集细胞, 15% 血清 DMEM/F12 培养液中贴壁 12 h 后, 空白对照组换用无血清 DMEM/F12 培养液继续培养 48 h; 后两组细胞参照文献 [13] 以终浓度为 0.1 μ g/ml 的 MCP-1 和终浓度为 10 μ g/ml 的 AA I 的无血清 DMEM/F12 培养液培养制备肾小管上皮细胞 EMT 模型; pHGF 处理组另外再分别加入不同浓度 (0.15、1.5、15、150、1 500 ng/ml) 的 pHGF 共同培养 48 h。

1.3 细胞增殖抑制率的测定 取对数生长期 HKC, 用含 10% 血清的 DMEM/F12 培养液调整细胞密度为 5×10^4 /ml, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μ l, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h, 去掉旧培养液, 加入 50 μ l 不含血清的 DMEM/F12 培养液, 随后加入不同浓度的药物, 每孔加入药物后终体积为 100 μ l, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h, 加入 20% 含血清的 DMEM/F12 培养液, 继续于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h 后, 吸出培养液, 每孔加入 DMEM/F12 培养液 100 μ l, CCK-8 试剂 10 μ l, 于 37℃ 温箱中避光 1 h, 用酶标仪检测各孔的光密度 (D) 值 (激发波长 450 nm, 参比波长 655 nm), 根据测得的 D 值计算药物对细胞增殖的抑制率。

1.4 细胞周期和凋亡情况分析 取对数生长期 HKC, 用含 10% 血清的 DMEM/F12 培养液调整细胞密度为 5×10^6 /ml, 接种于 6 孔板, 每孔 1 ml, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h, 加入不同浓度的药物, 继续培养。分别于 12、24 h 收集细胞, 用预冷的 pH 7.4 的 PBS 液洗涤 2 遍, 用 70% 预冷乙醇重悬细胞, 4℃ 固定过夜, pH 7.4 的 PBS 洗涤, 离心去上清, 加入碘化丙啶 (propidine iodide, PI) 染色液 (含 RNA 酶), 避光染色 30 min, 流式细胞仪检测, 分析 DNA 亚二倍体率的变化及细胞周期的变化。

1.5 RT-PCR 检测 α -SMA 基因的表达 TRIzol 法提取总 RNA, 于 -80°C 保存。RT-PCR 按反转录试剂盒方法反转录生成 cDNA, 在 PCR 体系中分别加入 α -SMA 和内参 GAPDH 的引物, PCR 产物琼脂

糖凝胶电泳, 用 UVP GDS8000 凝胶成像扫描分析系统进行扫描和光密度值分析。引物序列和扩增条件见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列和扩增条件

Tab 1 RT-PCR primers and condition

Primer	Primer sequence	Fragment length (bp)	Annealing temperature $t/^{\circ}\text{C}$
α -SMA	Upstream 5'-TGT GCT GGA CTC TGG AGA TG-3'	292	54
	Downstream 5'-GAT CAC CTG CCC ATC AGG-3'		
GAPDH	Upstream 5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA G-3'	377	53
	Downstream 5'-GGA TGC AGG GAT GAT GTT C-3'		

1.6 细胞免疫化学染色检测 调整细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$, 接种于预置 $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ 玻片的 6 孔板, 终体积每孔 2 ml, 其中 pHGF 治疗组 pHGF 终浓度为 150 ng/ml。培养 48 h 后, 4% 多聚甲醛 4°C 固定过夜, 滴加兔抗大鼠 TGF- β_1 多克隆抗体 (1:500) 或小鼠抗大鼠 α -SMA 单克隆抗体或小鼠抗大鼠 FN 单克隆抗体 (1:1000), 一抗 4°C 过夜, 滴加 ElivisionTM plus 二抗聚合物增强剂, 室温孵育 20 min, 滴加二抗, 室温孵育 30 min, 每步都用 pH 7.2 的 PBS 反复冲洗, 3,3-二氨基联苯胺 (3,3-diaminobenzidine, DAB) 显色, 苏木精复染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件, 行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用 S-N-K 检验法。

2 结果

2.1 细胞增殖抑制率 共培养 48 h, 空白对照组 HKC 增殖抑制率为 $(0 \pm 1.63)\%$, 转分化模型组为 $(26.99 \pm 1.31)\%$, 0.15、1.5、15、150、1500 ng/ml pHGF 处理组为 $(31.14 \pm 0.87)\%$ 、 $(30.70 \pm 0.95)\%$ 、 $(29.85 \pm 1.58)\%$ 、 $(21.44 \pm 1.98)\%$ 、 $(40.05 \pm 1.71)\%$ 。与转分化模型组相比, 仅 150 ng/ml pHGF 处理组 HKC 增殖抑制率明显降低 ($P < 0.01$), 但仍高于空白对照组 ($P < 0.01$)。

2.2 细胞周期及凋亡指标 共培养 12 h, 空白对照组 HKC 亚二倍体率为 0.8%; 转分化模型组为 1.8%; 不同浓度 (15、150、1500 ng/ml) pHGF 处理组为 3.1%~3.6%, 组间差异无统计学意义。共培养 24 h, 空白对照组 HKC 亚二倍体率为 1.7%; 转分化模型组为 9.1%; 15、150、1500 ng/ml pHGF 处

理组为 3.3%、3.3%、4.4%, 高于空白对照组 ($P < 0.01$), 但低于转分化模型组 ($P < 0.01$)。

2.3 细胞 α -SMA mRNA 表达的比较 结果 (图 1) 表明: 与空白对照组相比, 转分化模型组、不同浓度 (1.5、15、150、1500 ng/ml) pHGF 处理组 HKC 的 α -SMA mRNA 表达均明显升高 ($P < 0.01$); 与转分化模型组 HKC 相比, 各浓度 pHGF 处理组 α -SMA mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$)。

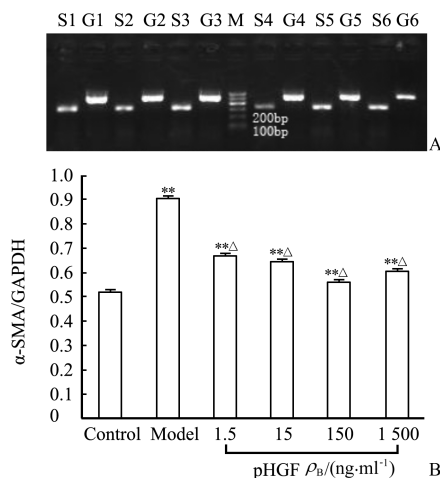


图 1 各组细胞 α -SMA mRNA 的表达

Fig 1 Expression of α -SMA mRNA in different groups

A: RT-PCR results. G: GAPDH, S: α -SMA; M: Marker. 1-4: 1500, 150, 15, 1.5 ng/ml pHGF; 5: Control; 6: Model. B: Semiquantitative analysis results. ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs model group; $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.4 细胞免疫化学染色 结果 (图 2) 表明: 空白对照组 HKC 细胞 α -SMA、TGF- β_1 无阳性表达, 转分化模型组强阳性表达, pHGF (150 ng/ml) 处理组弱阳性表达; 空白对照组及 pHGF (150 ng/ml) 处理组细胞 FN 均弱阳性表达, 转分化模型组强阳性表达。

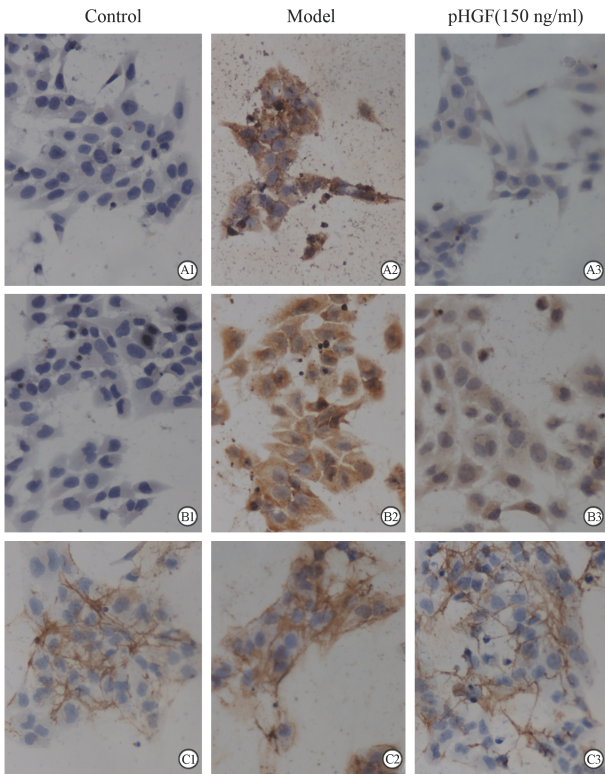


图 2 HKC 细胞免疫化学染色结果

Fig 2 Immunohistochemistry staining results of HKC cells

A1, A2, A3: α -SMA expression; B1, B2, B3: TGF- β_1 expression; C1, C2, C3: FN expression. Original magnification: $\times 400$

3 讨论

本研究发现 MCP-1 协同 AA 可使 HKC 增殖受到抑制, 150 ng/ml 的 pHGF 可以部分逆转此过程, 提示 pHGF 改善 MCP-1 协同 AA 诱导的 HKC 细胞增殖抑制仅在 150 ng/ml 左右的狭窄浓度范围内。细胞凋亡分析发现, 不同浓度 pHGF 处理组细胞凋亡均较转分化模型组少, 这提示 pHGF 可以对抗 MCP-1 协同 AA 诱导的 HKC 细胞凋亡。

细胞免疫化学染色发现, 空白对照组 HKC α -SMA 无阳性表达, 转分化模型组则呈强阳性表达, 提示上皮细胞发生了转分化; 而 pHGF 处理组呈弱阳性表达, 提示 pHGF (150 ng/ml) 可下调 α -SMA 表达, 对抗上皮细胞的转分化; α -SMA mRNA 表达结果也证实了这一点。但本研究中转分化模型组细胞并不呈典型的上皮-间质细胞转分化梭形改变, 可能与细胞部分标志性蛋白表达的改变早于细胞形态的改变有关。FN 是细胞间质成分的组成部分, 是细胞纤维化的重要指标之一; TGF- β_1 则是最重要的促纤维化因子^[14-16]。本研究结果发现转分化模型组细胞 FN、TGF- β_1 强阳性表达, 而 pHGF 处理组表达降低, 提示 pHGF 可能通过降低 TGF- β_1 表达来抑制基质 FN 的产生, 进而发挥抗纤维化作用。

综上所述, 150 ng/ml 的 pHGF 可以部分逆转 MCP-1 协同 AA 诱导的 HKC 增殖抑制、细胞凋亡, 对抗 HKC 的转分化作用, 可以有利于改善肾间质纤维化, 值得进一步深入研究以应用于临床。

[参考文献]

- [1] 张宜俊, 陈光明, 孔祥平, 郑国池, 杨富强, 胡肇椿. 肝细胞生长素的研制及临床应用[J]. 临床肝胆病杂志, 1991, 7: 15-19.
- [2] LaBrecque D R. Hepatic stimulator substance. Discovery, characteristics and mechanism of action[J]. Dig Dis Sci, 1991, 36: 669-673.
- [3] 张宜俊, 孔祥平, 郑国池, 陈光明, 杨富强. 促肝细胞生长素治疗慢性病毒性肝炎 1668 例疗效观察[J]. 临床肝胆病杂志, 1995, 11: 137-140.
- [4] Zhang Y, Kong X, Zheng G, Chen G, Yang E. Evaluation of hepatocyte growth-promoting factors in treating 1687 cases of fulminant hepatitis[J]. Chin Med J (Engl), 1995, 108: 928-929.
- [5] Liu X L, Sato S, Dai W, Yamanaka N. The protective effect of hepatocyte growth-promoting factor (pHGF) against hydrogen peroxide-induced acute lung injury in rats[J]. Med Electron Microsc, 2001, 34: 92-102.
- [6] Funakoshi H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications[J]. Clin Chim Acta, 2003, 327 (1-2): 1-23.
- [7] Mou S, Wang Q, Shi B, Gu L, Ni Z. Hepatocyte growth factor suppresses transforming growth factor-beta-1 and type III collagen in human primary renal fibroblasts[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2009, 25: 577-587.
- [8] Tanaka H, Nagaike K, Takeda N, Itoh H, Kohama K, Fukushima T, et al. Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) is required for branching morphogenesis in the chorio-allantoic placenta[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25: 5687-5698.
- [9] Franquesa M, Riera M, Herrero-Fresnedo I, Sola A, Hotter G, Lloberas N, et al. Tubular epithelial cells transfected with hHGF counteracts monocyte chemotactic protein-1 up-regulation after hypoxia/reoxygenation insult[J]. Transplant Proc, 2009, 41: 2069-2072.
- [10] 刘欣颖, 罗海, 王宓, 陈辉珍, 苏白海, 李孜, 等. 肝细胞生长因子对 IL-1 α 刺激肾小管上皮细胞肌纤维母细胞转分化的作用[J]. 四川大学学报: 医学版, 2005, 36: 9-12.
- [11] 陈超, 蒋建伟, 周序琰, 严玉霞, 吴颜晖, 陈涛, 等. 促肝细胞生长素改善单侧输尿管梗阻大鼠肾脏纤维化的研究[J]. 暨南大学学报: 医学版, 2007, 28: 365-370.
- [12] 陈丽平, 叶凡, 王保兴. 促肝细胞生长素对单侧输尿管结扎大鼠肾间质纤维化的干预作用[J]. 中国血液净化, 2009, 8: 260-263.
- [13] 郑法雷, 文晓彦, 李雪梅, 高瑞通, 张晓明. 单个核细胞趋化蛋白-1 和马兜铃酸 I 在诱导人类肾小管上皮细胞转分化中的协同作用[J]. 中华内科杂志, 2000, 39: 831-834.
- [14] Sato S, Dai W, Liu X L, Asano G. The protective effect of hepatocyte growth-promoting factor (pHGF) against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats: an ultrastructural study[J]. Med Electron Microsc, 1999, 32: 184-192.
- [15] 薛痕, 樊均明, 陈亮, 李孜, 胡章学, 刘先蓉. 肝细胞生长因子负性调控细胞转分化在肾间质纤维化中的作用[J]. 中华肾脏病杂志, 2005, 21: 458-463.
- [16] 岳屹因, 蒋红雨. 促肝细胞生长素对肾缺血-再灌注损伤大鼠 NO 及肾脏病理学的影响[J]. 济宁医学院学报, 2006, 29: 15-18.

[本文编辑] 贾泽军