

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.07.016 [http://www.crter.org]
陈豫闽, 熊祖应. 转化生长因子 $\beta 1$ 抑制人肾小管上皮细胞的增殖[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(7):1228-1232.

转化生长因子 $\beta 1$ 抑制人肾小管上皮细胞的增殖*

陈豫闽^{1,2}, 熊祖应¹

1 北京大学深圳医院肾内科, 广东省深圳市 518000

2 北京大学医学部, 北京市 100191

文章亮点:

聚焦于当前炎症的热点, 使用转化生长因子 $\beta 1$ 为诱导因子, 作用于人近端肾小管上皮细胞 HK-2, 观察到 HK-2 细胞形态逐渐失去上皮细胞特性, 向间充质细胞形态转化, 与国内大多数研究结果不同的是, 实验结果显示了转化生长因子 $\beta 1$ 抑制 HK-2 细胞的增殖。作者认为, 在慢性肾脏疾病进展过程中, 功能细胞的变性和缺失是引起疾病进展的主要原因。

关键词:

组织构建; 组织构建与生物活性因子; 人肾小管上皮细胞; 抑制增殖; 转化生长因子 $\beta 1$; 纤维化; HK-2 细胞; 细胞增殖; 细胞形态; 肾小管; 上皮细胞; 组织构建图片文章

摘要

背景: 慢性肾衰竭进展过程中的一个重要病理改变是炎症和纤维化, 主要包括肾小球和肾小管的炎症和纤维化。目前大多数研究主要集中于肾小球, 对于肾小管病变的研究相对较少。但实际上部分疾病的肾小管病变出现在肾小球病变之前, 其对于疾病预后更具有指导意义。

目的: 观察转化生长因子 $\beta 1$ 对人类肾小管上皮细胞 HK-2 增殖的影响, 探索转化生长因子 $\beta 1$ 在肾小管炎症和纤维化方面的作用。

方法: 将传代培养的 HK-2 细胞分成空白对照组和转化生长因子 $\beta 1$ 作用组, 分别使用 DMEM/F12 培养液, 以及含转化生长因子 $\beta 1$ (2, 5, 10 $\mu\text{g/L}$)的 DMEM/F12 培养液培养, 在倒置显微镜下观察各组细胞形态的改变, 并使用 MTT 法检测细胞增殖情况。

结果与结论: 转化生长因子 $\beta 1$ 能显著抑制人肾小管上皮细胞的增殖, 并促使细胞向纤维样改变, 与空白对照组相比差异有显著性意义($P < 0.05$), 其抑制增殖作用并不随转化生长因子 $\beta 1$ 质量浓度的增大而显著增强, 作用时间可持续至 72 h。结果可见转化生长因子 $\beta 1$ 能够抑制人肾小管上皮细胞的增殖, 并具有促进肾间质纤维化的作用。

Transforming growth factor beta 1 inhibits proliferation of human renal tubular epithelial cells

Chen Yu-min^{1,2}, Xiong Zu-ying¹

1 Department of Nephrology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China

2 Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China

Abstract

BACKGROUND: An important pathological change in the progression of chronic renal failure means inflammation and fibrosis, including glomerular and tubular inflammation and fibrosis. At present, most of the research has focused on the glomerulus rather than renal tubular lesions. But actually, for a part of diseases, renal tubular lesions appear before glomerular lesions, which is of more guiding significance for the prognosis of diseases.

陈豫闽★, 女, 1987年生, 河南省洛阳市人, 汉族, 2012年北京大学医学部毕业, 硕士, 主要从事肾小管间质细胞炎症的研究。

chengyumin1014@126.com

通讯作者: 熊祖应, 博士后, 主任医师, 北京大学深圳医院肾内科, 广东省深圳市 518000
xiongzy2005@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2013)07-01228-05

收稿日期: 2012-06-20
修回日期: 2012-07-11
(20120420009/M·W)

Chen Yu-min★, Master,
Department of Nephrology,
Peking University Shenzhen
Hospital, Shenzhen 518000,
Guangdong Province, China;
Peking University Health
Science Center, Beijing
100191, China
chenyumin1014@126.com

Corresponding author: Xiong
Zu-ying, Doctor, Chief
physician, Department of
Nephrology, Peking University
Shenzhen Hospital, Shenzhen
518000, Guangdong Province,
China
xiongz2005@163.com

Received: 2012-06-20
Accepted: 2012-07-11

OBJECTIVE: To observe the effect of transforming growth factor beta 1 on the cell proliferation of HK-cells and to explore the role of transforming growth factor beta 1 in renal tubular inflammation and fibrosis.

METHODS: HK-2 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 or Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 containing different concentrations of transforming growth factor beta 1. HK-2 cells were divided into four groups, control group, 2 μg/L transforming growth factor beta 1 group, 5 μg/L transforming growth factor beta 1 group and 10 μg/L transforming growth factor beta 1 group. Morphological changes were assessed by inverted phase contrast microscopy and cellular proliferation was detected by MTT assay.

RESULTS AND CONCLUSION: The morphology of HK-2 cells changed from epithelial cobblestone to myofibroblast-like elongated and spindly and gap among cells also widened. The proliferation of HK-2 cells was inhibited significantly by transforming growth factor beta 1, but not in a dose-dependent manner. The inhibitory effect on the cellular proliferation lasted for 72 hours. These findings indicate that transforming growth factor beta 1 inhibits the cellular proliferation of HK-2 cells and promotes the occurrence of renal interstitial fibrosis.

Key Words: tissue construction; tissue construction and bioactive factors; human renal tubular epithelial cells; inhibition of proliferation; transforming growth factor beta 1; fibrosis; HK-2 cells; cell proliferation; cell morphology; renal tubule; epithelial cells; tissue construction photographs-containing paper

Chen YM, Xiong ZY. Transforming growth factor beta 1 inhibits proliferation of human renal tubular epithelial cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(7): 1228-1232.

0 引言

慢性肾脏疾病现在已逐渐成为世界范围的疾病^[1], 对慢性肾脏疾病的治疗需耗费大量的人力物力^[2]。慢性肾脏疾病的进展过程中炎症和纤维化是很重要的一個病理改变, 主要包括肾小球和肾小管的炎症和纤维化。目前大多数研究主要集中于肾小球, 对于肾小管病变的研究相对较少。但是实际上肾小管的病变出现在肾小球病变之前, 且对于疾病预后更具有指导意义^[3]。

在肾小管上皮病变慢性化过程中, 上皮-间充质转分化是炎症和纤维化的关键机制^[4-6], 而转化生长因子β1是最常见的诱导肾小管上皮细胞发生上皮-间充质转分化的细胞因子之一^[7-10]。转化生长因子β1过量能引起肾小管上皮细胞的形态和功能向间充质细胞转化, 细胞外基质沉积, 细胞基底膜破坏, 进而导致纤维化病变的发生和发展^[11]。鉴于转化生长因子β1在肾脏炎症和纤维化病变的重要作用, 实验以不同质量浓度转化生长因子β1作用于人肾小管上皮细胞HK-2, 观察其对细胞增殖的作用。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外对比观察实验。

时间及地点: 实验于2011年2至12月在北京大学深圳医院中心实验室完成。

材料:

细胞及试剂:

Cells and reagents:

细胞及试剂	来源
人近段肾小管上皮细胞 HK-2 细胞株	深圳市中医院肾内科实验室馈赠
DMEM/F12(1:1)、胎牛血清、青霉素/链霉素溶液、MTT、胰蛋白酶(含 EDTA)	Hyclone, USA
二甲基亚砜	Sigma, USA

药品: 人重组转化生长因子β1(R&D System, USA)的配制, 根据药品说明书, 取100 μL

浓HCl溶液(10 mol/L)加入高压灭菌的去离子水中, 配成浓度为4 mmol/L的稀HCl溶液。取40 mL稀HCl(4 mmol/L)放入50 mL离心管中, 称量40 mg牛血清白蛋白粉末加入离心管中, 振荡器振荡5 min使牛血清白蛋白粉末充分溶解, 配成转化生长因子β1专用稀释液。用2 mL的转化生长因子β1专用稀释液溶解2 μg的转化生长因子β1粉末, 配置为1 mg/L的储存液, 无菌EP管-70 °C储存, 使用时配成所需要的浓度。

实验方法:

实验分组: 使用3-20代HK-2细胞。将传代培养的HK-2细胞分成以下4组: ①空白对照组: DMEM/F12培养液。②2 μg/L转化生长因子β1组: DMEM/12培养液+2 μg/L转化生长因子β1。③5 μg/L转化生长因子β1组: DMEM/12培养液+5 μg/L转化生长因子β1。④10 μg/L转化生长因子β1组: DMEM/12培养液+10 μg/L转化生长因子β1。

细胞培养: HK-2细胞用含体积分数为10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素的DMEM/F12(1:1)培养液, 置于37 °C、体积分数为5%CO₂培养箱中。待细胞生长至铺满培养瓶底部70%以上, 用含0.25%EDTA的胰蛋白酶消化液消化, 显微镜下观察到细胞浮起后, 用新鲜的完全培养液终止消化, 离心5 min(1 000 r/min, 离心半径10 cm), 用新鲜培养液将细胞重悬后进行传代。细胞进行实验前用不含血清的培养液同步化培养24 h, 实验重复3次。

主要观察指标:

倒置显微镜下观察细胞形态: 将贴壁生长的细胞用含0.25%EDTA的胰蛋白酶消化液消化后, 转移至15 mL离心管中, 离心机中离心5 min(1 000 r/min, 离心半径10 cm), 吸弃上清后, 用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12(1:1)重新悬浮, 于细胞计数板上计数, 调整细胞浓度为 $1.5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 按此浓度接种于6孔板, 每孔2 mL, 每组设2个复孔。在37 °C、体积分数为5%CO₂细胞培养箱中过夜。隔日在显微镜下观察细胞贴壁情况, 若细胞贴壁良好, 吸弃细胞上清, 加入无血清培养液2 mL, 继续放入培养箱中孵育24 h。24 h后取出6孔板, 吸弃细胞上清, 按分组加入含不同质量浓度转化生长因子β1的培养液2 mL, 对照组直接加入新鲜的含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液2 mL。孵育24 h后倒置显微镜下观察细胞形态。

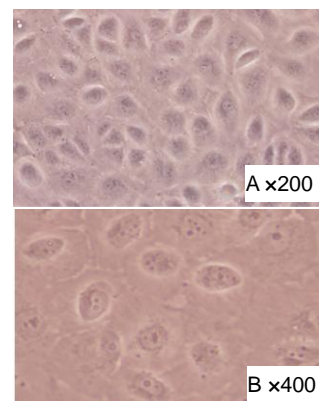
MTT法检测细胞增殖: 将贴壁生长的细胞用含0.25%EDTA的胰蛋白酶消化液消化后, 转移至15 mL离心管中, 离心机中离心5 min(1 000 r/min, 离心半径

10 cm), 吸弃上清后, 用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12(1:1)重新悬浮, 于细胞计数板上计数, 调整细胞浓度为 $5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 按此浓度接种于96孔板, 每孔100 μL, 每组设5个复孔。在37 °C、体积分数为5%CO₂培养箱中过夜。隔日显微镜下观察细胞贴壁情况, 若贴壁良好, 吸弃细胞上清, 加入无血清培养液100 μL/孔同步化24 h。24 h取出96孔板, 吸弃细胞上清, 按分组加入含不同浓度转化生长因子β1的培养液100 μL, 对照组直接加入新鲜的含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液100 μL继续培养。在24, 48, 72 h时各取出1板, 吸弃上清, 每孔加入100 μL质量浓度为1 g/L的MTT(PBS配制), 继续放入培养箱中孵育。4 h后取出96孔板, 恒温离心机中离心5 min(1 000 r/min, 离心半径10 cm), 吸弃各孔上清, 并加入100 μL二甲基亚砜溶液, 左上角孔中直接加入100 μL二甲基亚砜作为调零孔, 置于振荡器上振荡10 min, 振荡过程中注意避光。10 min后96孔板中紫色结晶完全溶解, 在酶标仪上490 nm处测定吸光度值。

统计学分析: 数据采用SPSS 15.0统计软件处理, 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 转化生长因子β1诱导的HK-2细胞形态 倒置显微镜下观察, 正常的HK-2细胞呈立方形鹅卵石样贴壁生长, 细胞间隙小, 见图1。

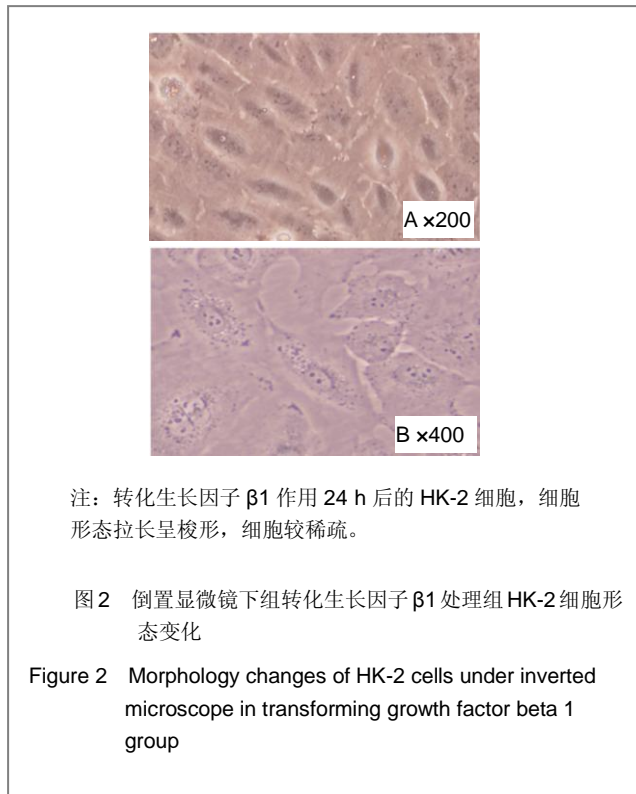


注: 空白对照组 HK-2 细胞, 细胞形态成圆形或椭圆形, 细胞较密集。

图 1 倒置显微镜下空白对照组 HK-2 细胞形态变化

Figure 1 Morphology changes of HK-2 cells under inverted microscope in the control group

培养液中加入转化生长因子β1后, 细胞形态拉长成长梭形, 细胞间隙增宽, 具有纤维细胞特征, 见图2。



2.2 不同质量浓度转化生长因子β1对HK-2细胞增殖的影响 MTT实验结果提示: 转化生长因子β1对HK-2细胞均有抑制增殖的作用, 见表1。与空白对照组相比, 差异均有显著性意义($P < 0.05$), 抑制作用的强弱不随质量浓度的增大而增大。

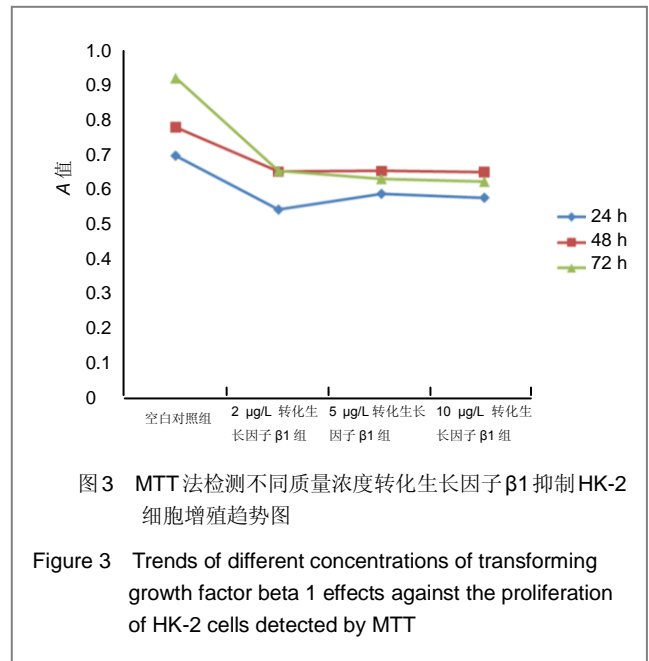
表1 MTT法检测不同质量浓度转化生长因子β1对HK-2细胞增殖的影响

Table 1 Effect of different concentration of transforming growth factor beta 1 on the proliferation of HK-2 cells detected by MTT ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0.704±0.052	0.787±0.022	0.925±0.076
2 μg/L 转化生长因子β1组	0.550±0.088 ^a	0.658±0.013 ^a	0.660±0.019 ^a
5 μg/L 转化生长因子β1组	0.595±0.035 ^a	0.660±0.014 ^a	0.637±0.041 ^a
10 μg/L 转化生长因子β1组	0.584±0.033 ^a	0.657±0.025 ^a	0.629±0.035 ^a

与空白对照组相比, ^a $P < 0.05$ 。

转化生长因子β1质量浓度的改变对抑制作用强弱的影响不大, 见图3。



3 讨论

MTT通常用于检测细胞增殖及细胞活性, 检测原理是只有活细胞内的线粒体琥珀酸脱氢酶才能将外源性MTT还原并沉积在细胞内, 形成的结晶为不溶于水的紫蓝色结晶甲瓩, 而没有活性的细胞没有这样的功能。正是有了这样的特性, MTT就可以将96孔板中的活细胞显色, 与无活性的细胞区分开, 然后使用二甲基亚砷溶解细胞中的紫蓝色结晶, 之后在酶标仪490 nm波长处测定每孔的光吸收值, 这样紫蓝色结晶的量与活细胞数成正比。根据在490 nm波长处测得的吸光度值, 来判断活细胞数量的多少。在一定范围内, 吸光度值越大, 细胞活性越强^[12]。这种方法操作简便, 准确度好, 目前在科研领域已得到广泛使用。实验中MTT法得出的数据平行性较好, 说明实验数据较可靠。

转化生长因子β1是转化生长因子β超家族的成员之一, 是一种分泌蛋白质, 对细胞生长、增殖、分化和凋亡都有调控作用^[13]。研究发现, 转化生长因子β1的上调是所有人类和实验动物肾间质纤维化的特征^[14], 并且转化生长因子β1能抑制基质降解酶, 吸引成纤维细胞和单核细胞等, 并且能使肾小管上皮细胞发生上皮-间充质转分化过程, 促使正常的肾小管上皮细胞转化为不能行使肾小管功能的成纤维细胞^[15]。同时抑制肾小管上皮细胞的增殖, 进一步使肾脏丧失功能, 从而引发一系列炎症和纤维化的活动。

实验研究发现,不同质量浓度的转化生长因子 $\beta 1$ 对HK-2细胞均有抑制增殖的作用,与空白对照组有显著差异,且在作用24 h就体现出抑制增殖作用,随着时间增加持续存在,可作用至72 h。结果提示,转化生长因子 $\beta 1$ 在低质量浓度(2 $\mu\text{g/L}$)时就有比较明显的抑制增殖作用,且抑制增殖作用并不随质量浓度的增大而显著增强,但作用时间较持久。其具体的分子生物学机制有待进一步研究。

作者贡献: 实验设计为陈豫闽、熊祖应,实验实施为陈豫闽,实验评估为熊祖应,资料收集为陈豫闽、熊祖应。陈豫闽成文,熊祖应审校,陈豫闽、熊祖应对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

作者声明: 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

4 参考文献

- [1] Bandara JM, Wijewardena HV, Liyanage J, et al. Chronic renal failure in Sri Lanka caused by elevated dietary cadmium: Trojan horse of the green revolution. *Toxicol Lett.* 2010;198(1): 33-39.
- [2] Feest T. Epidemiology and causes of chronic renal failure. *Medicine.* 2007;35(8):438-441.
- [3] Li DQ, Wang Y, Zhou GL, et al. *Zhonghua Tangniaobing Zazhi.* 2004;12(3): 219-224.
李丹清,王颖,周桂玲,等. 糖尿病肾病大鼠肾小管与肾小球病变的顺序及其意义[J]. *中华糖尿病杂志*, 2004, 12(3): 219-224.
- [4] Hertig A. Epithelial-mesenchymal transition of the renal graft. *Nephrol Ther.* 2008;4 Suppl 1:S25-S28.
- [5] Ding Z, Chen Z, Chen X, et al. Adenovirus-mediated anti-sense ERK2 gene therapy inhibits tubular epithelial-mesenchymal transition and ameliorates renal allograft fibrosis. *Transpl Immunol.* 2011;25(1):34-41.
- [6] Yoshino J, Monkawa T, Tsuji M, et al. Snail is involved in the renal epithelial-mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;362(1):63-68.
- [7] Margetts PJ, Bonniaud P, Liu L, et al. Transient overexpression of TGF- $\beta 1$ induces epithelial mesenchymal transition in the rodent peritoneum. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(2): 425-436.
- [8] Thiery JP, Acloque H, Huang RY, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009;139(5):871-890.
- [9] Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 2009;19(2):156-172.
- [10] Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1420-1428.
- [11] Wang W, Koka V, Lan HY. Transforming growth factor- β and Smad signalling in kidney diseases. *Nephrology (Carlton).* 2005;10(1):48-56.
- [12] Lü L, Zhang L, Wai MS, et al. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. *Toxicol In Vitro.* 2012;26(4): 636-644.
- [13] Kutz SM, Higgins CE, Samarakoon R, et al. TGF- β 1-induced PAI-1 expression is E box/USF-dependent and requires EGFR signaling. *Exp Cell Res.* 2006;312(7): 1093-1105.
- [14] Yang LX, Li Y, Wang Q, et al. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi.* 2008;9(12): 1040-1043.
杨丽霞,李彧,王谦,等. 姜黄素对TGF- $\beta 1$ 诱导人肾小管上皮细胞转分化及分泌细胞外基质成分的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2008, 9(12): 1040-1043.
- [15] Dudas PL, Argentieri RL, Farrell FX. BMP-7 fails to attenuate TGF- $\beta 1$ -induced epithelial-to-mesenchymal transition in human proximal tubule epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(5):1406-1416.