结缔组织生长因子诱导肾成纤维细胞转为成肌纤维细胞

黄海长 李惊子 王海燕

(北京大学第一医院肾内科, 北京大学肾脏病研究所卫生部重点实验室, 北京 100034. E-mail: haichang@mail.bjmu.edu.cn)

摘要 结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是介导转化生长因子(TGF-β)促纤维化效应的蛋白, 但它能否诱导肾脏慢性纤维化中的关键细胞, 即间质成纤维细胞转化为成肌纤维细胞(myofibroblast), 目前尚无报道. 实验应用体外基因转染技术建立稳定表达 CTGF 蛋白的肾间质成纤维细胞系, 并观察在不同培养条件下成肌纤维细胞数量及其产生的生物学效应. 结果发现细胞表达出的 CTGF 蛋白能直接诱导成纤维细胞转化为成肌纤维细胞, 并增加细胞外基质胶原Ⅲ mRNA 水平, 提示 CTGF 可作为肾纤维化防治中的新靶位蛋白, 为临床延缓肾脏疾病慢性进展提供新思路.

关键词 结缔组织生长因子 成纤维细胞 成肌纤维细胞 纤维化

在慢性疾病状态或生理老化时, 多种组织脏器如皮肤、肺、肝、肾、心的纤维化严重影响人类健康. 肾脏纤维化是各种肾脏病慢性进展而最后导致慢性肾功能衰竭的共同机制, 而以肾间质细胞外基质沉积为主要表现的肾间质纤维化过程是影响肾脏功能的重要因素[1]. 关于肾间质细胞外基质的来源, 目前认为是肾小管细胞、间质成纤维细胞以及浸润的巨噬细胞分泌的, 但在病理状态下肾间质内存在的另一种细胞——成肌纤维细胞(myofibroblasts)是间质细胞外基质持续增加的主要来源细胞[2]. Ito 等人[3]观察到, 肾间质纤维化病变区内结缔组织生长因子(CTGF) mRNA 表达和成肌纤维细胞同步增加, 推测 CTGF 是参与肾间质纤维化的重要因子, 但 CTGF 和成肌纤维细胞形成是否有关联还不清楚. 本研究通过基因转染、Western blot 蛋白分析、逆转录-PCR 等技术, 研究 CTGF 能否诱导肾间质成纤维细胞转化为成肌纤维细胞, 以及对间质胶原Ⅲ mRNA 水平的影响, 以进一步探讨 CTGF 在肾间质纤维化中的作用机制.

1 材料与方法

(ⅰ) 主要试剂. 正常大鼠肾间质成纤维细胞系(NRK-49F)来自美国 ATCC 公司, pRc-CMV-*CTGF* 基因真核稳定表达质粒由 School of Medicine, University of Miami 的 Grotendorst 教授惠赠, TGF-β1 购自美国 R&D System 公司, 抗α-平滑肌肌动蛋白单克隆抗体购自美国 Sigma 公司.

(ⅱ) 基因转染. 采用 Lipofectin 基因转移方法. NRK-49F 细胞在 5% FBS DMEM 培养液中生长; 基因转移具体步骤参照 LipofectAmine Plus™ 试剂(GibcoBRL 公司)说明书.

(ⅲ) 阳性细胞克隆的筛选、扩增和鉴定. *CTGF* 基因经 Lipofectin 转染细胞后, 细胞在含 800 μg/mL G418 的 5% FBS DMEM 培养液筛选 3 ~ 4 周, 绝大部分细胞死亡, 再经 1 ~ 2 周筛选培养, 可以看见细胞克隆形成. 挑出细胞克隆, 经 96 孔→24 孔→6 孔扩增培养, 最后得到 *CTGF* 基因稳定表达细胞系, 并维持 200 μg/mL G418 培养液传代培养和实验研究. 裂解 *CTGF* 基因表达细胞, 以抗-CTGF 抗体经 Western blot 蛋白分析方法鉴定 *CTGF* 基因是否成功转入细胞并表达 CTGF 蛋白; 也检测转染空载体质粒(pRc-CMV)的细胞和正常 NRK-49F 细胞.

(ⅳ) 细胞免疫组织化学染色. 细胞转种生长于盖玻片上, 收集细胞并以甲醇于–20℃固定 10 min, 然后以常规 ABC 法进行成肌纤维细胞标记α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)免疫组织化学染色. 以 PBS 代替一抗作阴性对照, 最后在显微镜下(×10)每张片随机计数 5 个不重叠视野下阳性细胞数, 每组计数 6 张片(n = 6). 细胞分组: (1) NRK-49F 细胞. 不加 TGF-β1 和加 5 ng/mL TGF-β1 分别刺激 24 和 48 h; (2) *CTGF* 基因转染细胞. 不加 TGF-β1 和加 5 ng/mL TGF-β1 分别刺激 24 和 48 h.

(Ⅴ) Western blot 蛋白分析. 根据免疫组织化学染色结果, 选择细胞分组: (1) NRK-49F 细胞. 不

加 TGF-β1 和加 5 ng/mL TGF-β1 刺激 48 h; (2) *CTGF* 基因转染细胞. 不加 TGF-β1 和加 5 ng/mL TGF-β1 刺激 48 h. 细胞裂解后, 取 50 μg 总蛋白以 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 电转移蛋白至 PVDF 膜上, 5% 无脂奶粉封闭, 与抗α-平滑肌肌动蛋白抗体孵育杂交, 最后以化学发光法(ECL, 英国 Amersham-Pharmacia 公司)显示结果.

(Ⅵ) 逆转录-PCR. 按 Trizol 试剂 (美国 Gibco BRL 公司) 说明书方法提取细胞总 RNA, 并按逆转录试剂盒(美国 Promega 公司)说明书方法先逆转录合成第 1 条 cDNA, 再以此 cDNA 为模板进行 PCR 反应. PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳分离, 应用凝胶成像系统 (electrophoresis documentation and analysis system 120, 美国 Kodak 公司)分析, 以目的胶原Ⅲ片段/内参照 GAPDH 片段的条带光密度的比值作比较. 引物序列和扩增片段分别为: 胶原蛋白Ⅲ, F(正链): 5′-CGAGGTAACAGAGGTGAAAGA-3′, R(负链): 5′-AACCCAGTATTCTCCGCTCTT-3′, 349 bp; GAPDH, F: 5′-AATGCATCCTGCACCACCAA-3′, R: 5′-GTAGCCATATTCATTGTCATA-3′, 515 bp. 至少重复 3 次独立的 RT-PCR 全过程.

(Ⅶ) 数据分析. 实验结果用平均值 ± 标准差 ($\bar{x}$ ± SD)表示, 统计学处理采用 *t* 检验.

2 实验结果

2.1 基因转染成功并稳定表达 CTGF 的细胞系的鉴定

转染 *CTGF* 基因的细胞有 CTGF 蛋白表达; 转染空载体质粒和正常 NRK-49F 细胞无 CTGF 蛋白表达(图 1(a)), 说明稳定表达 CTGF 的细胞系建立成功.

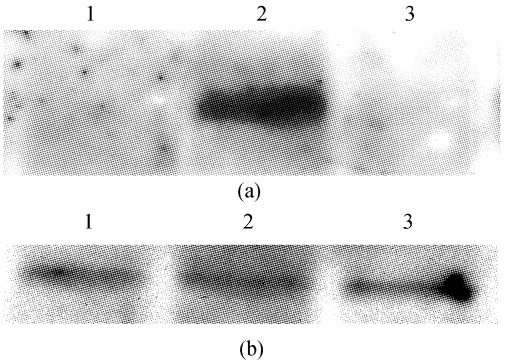


图 1 CTGF 蛋白在细胞表达的变化

(a) 基因转染细胞鉴定. 1 示空载体转染, 2 示 *CTGF* 基因转染, 3 示正常 NRK-49F 细胞. (b) 转染 *CTGF* 基因的细胞在不同培养液时 CTGF 蛋白表达的变化. 1 示 5% FBS, 2 示 5 mg/mL TGF-β1 刺激 24 h, 3 示 5 ng/mL TGF-β1 刺激 4 h

同时 CTGF 稳定表达细胞在 5% FBS DMEM 培养和含 5 ng/mL TGF-β1 的培养液中, CTGF 蛋白表达量无改变(图 1(b)).

2.2 成肌纤维细胞数和α-平滑肌肌动蛋白表达

正常 NRK-49F 细胞和转导空载体质粒的细胞不论是否加 TGF-β1 刺激及刺激时间长短, 均未见α-平滑肌肌动蛋白免疫染色阳性细胞. *CTGF* 基因转染细胞在 5%FBS DMEM 培养时可见阳性细胞(1.53 ± 0.23(高倍视野)), 在 5 ng/mL TGF-β1 刺激 24 h 阳性细胞增加(2.30 ± 0.14(高倍视野)), 与正常培养时阳性细胞数相比有显著差异($P < 0.01$); 刺激 48 h 阳性细胞显著增加(8.73 ± 0.90(高倍视野)), 与 5 ng/mL TGF-β1 刺激 24 h 时阳性细胞数相比有显著差异($P < 0.001$, 图版Ⅰ, 附本刊后).

CTGF 基因转染细胞在 5%FBS DMEM 培养时即有α-SMA 蛋白表达, 经 5 ng/mL TGF-β1 刺激 48 h 后表达明显增加; NRK-49F 细胞和转导空载体质粒的细胞在 5%FBS DMEM 和 5 ng/mL TGF-β1 刺激 48 h 均无α-SMA 蛋白表达(图 2).

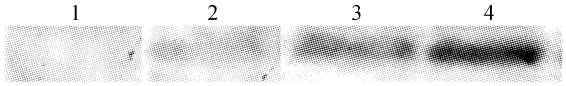


图 2 不同培养状况时细胞表达α-SMA 蛋白水平比较

1 示空载体转染细胞 5 ng/mL TGF-β1 刺激 48 h; 2 示 NRK-49F 细胞 5 ng/mL TGF-β1 刺激 48 h, 3 示 *CTGF* 基因转染细胞 5% FBS DMEM 48 h, 4 示 *CTGF* 基因转染细胞 5 ng/mL TGF-β1 刺激 48 h

2.3 细胞表达间质胶原Ⅲ mRNA 水平

NRK-49F 细胞在 5% FBS 正常培养时表达胶原Ⅲ mRNA, 经 5 ng/mL TGF-β1 刺激 24 h 后表达水平升高; *CTGF* 基因转染细胞的胶原Ⅲ mRNA 在经 5 ng/mL TGF-β1 刺激 24 h 后表达显著增加(图 3(a)). 空载体转染细胞和正常 NRK-49F 细胞的胶原Ⅲ mRNA 水平一致, 没有明显变化(未显示). 胶原Ⅲ片段/GAPDH 片段比值见图 3(b).

3 讨论

Grotendorst 等人[4]于 1991 年克隆了结缔组织生长因子(CTGF), 并发现它能刺激成纤维细胞增殖; 在 TGF-β1 刺激下成纤维细胞又能合成 CTGF, 而上皮细胞不具有此反应, 说明 CTGF 是调控成纤维细胞生长的重要蛋白[5]. 在肾脏纤维化过程的早期, 可

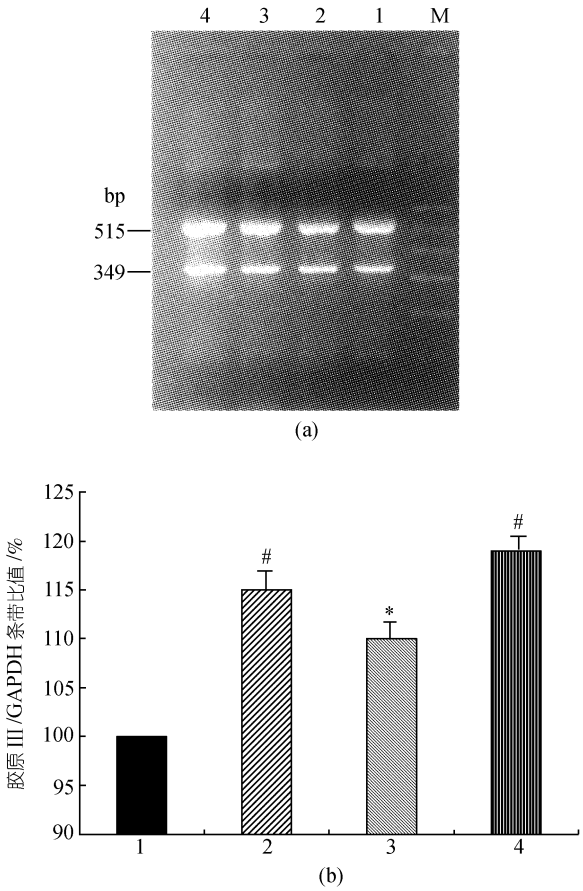


图 3 细胞表达胶原Ⅲ mRNA 水平变化

(a) 胶原Ⅲ mRNA 的 RT-PCR 电泳结果. (b) 胶原Ⅲ/GAPDH 条带的光密度比值. M 示 DNA 分子量标准(600, 500, 400, 300, 200 bp), 1 示对照即培养 24 h 的 NRK-49F 细胞, 2 示含 5 ng/mL 的 TGF-β1 刺激 24 h 的 NRK-49F 细胞, 3 示培养 24 h 的 CTGF 转染细胞, 4 示含 5 ng/mL 的 TGF-β1 刺激 24 h 的 CTGF 转染细胞. #示 $P < 0.01$, *示 $P < 0.05$, 与对照比较

以观察到肾间质区存在一种表达骨架蛋白——α-平滑肌肌动蛋白的细胞，称为成肌纤维细胞. 它是介于成纤维细胞和平滑肌细胞之间的终末分化细胞，这类细胞是肾间质细胞外基质的主要来源，其数量的多少与间质纤维化轻重程度密切相关[6,7]，可以作为判断长期预后的一个很好的指标[2,6]. 正常肾脏几乎没有成肌纤维细胞，疾病状态下这种细胞的来源还不能肯定，有研究表明[8]多种细胞生长因子如 TGF-β, PDGF, IL-1 能刺激肾小球系膜细胞、肾小管上皮细胞发生表型转化，但迄今没有在体外细胞实验上直接显示肾间质成纤维细胞能被活化转为成肌纤维细胞. 尽管 Ito 等人[3]在不同肾病患者肾穿刺标本中，发现表达 CTGF mRNA 的细胞均呈 α-平滑肌肌动蛋白免疫染色阳性，但 CTGF 对成肌纤维细胞的形成有何影响尚不清楚. 我们成功地把 *CTGF* 基因转入肾间质成纤维细胞，得到稳定高表达 CTGF 蛋白的细胞株，并直接观察 *CTGF* 基因对此细胞的生物效应. 发现 CTGF 能够诱导成纤维细胞转化为成肌纤维细胞，在有 TGF-β1 存在时，成肌纤维细胞数明显增多，其表面标记蛋白α-平滑肌肌动蛋白水平亦显著增加，这是首次发现 CTGF 具有这样的生物学效应. 因为正常 NRK-49F 细胞和空载体转导细胞在 TGF-β1 刺激后没有观察到成肌纤维细胞，也未检测到α-平滑肌肌动蛋白表达，因此可以排除 TGF-β1 对细胞的直接刺激作用. 转染 CTGF 的细胞是过表达(over-express) CTGF 蛋白，所以 CTGF 稳定表达细胞内 CTGF 蛋白水平不受 TGF-β1 刺激的影响；TGF-β1 不能直接诱导成纤维细胞表型转化，却能增强 CTGF 诱导肌成纤维细胞生成的效应，更进一步证实了 CTGF 是 TGF-β1 的下游作用蛋白因子[9,10]，但是 CTGF 和 TGF-β1 之间的这种调控机制尚不清楚. 本研究也观察到 CTGF 诱导细胞表型转化后细胞内胶原Ⅲ mRNA 水平增加，说明成肌纤维细胞增加后，细胞外基质合成也增多，进一步从细胞水平证实了以往在肾病患者的肾组织[3]和 5/6 肾切除肾病、糖尿病肾病动物模型[11,12]上的观察发现，即在慢性肾纤维化晚期，肾间质内 CTGF mRNA 水平高低与间质细胞外基质沉积程度呈正相关的现象. 因此，肾间质损伤后肾细胞和浸润的炎症细胞产生细胞因子 TGF-β1，作用于成纤维细胞使之合成分泌 CTGF, CTGF 既能介导 TGF-β的促纤维化效应，又能诱发成肌纤维细胞的生成，从而在肾间质纤维化慢性进展中起重要的作用.

TGF-β是组织纤维化病变中最重要的促发因子之一已经得到公认，曾有许多研究显示阻断 TGF-β的表达或活性，可以减轻组织纤维化；但是由于 TGF-β对多种细胞类型具有广泛的生物学活性，如抑制细胞生长、免疫抑制、细胞凋亡等，因此在获得抗组织纤维化效应时，也不可避免地带来诸如细胞生长失控、免疫失调、严重炎症甚至死亡等副反应[13]，限制了其在防治肾脏纤维化中的应用. 我们的研究结果阐明了 CTGF 可以作为防治肾纤维化的新的靶位蛋白，它具有独特的促肾间质成纤维细胞增殖、细胞外基质增加和成纤维细胞表型转化，即促肾间质纤维化效应，所以采取抑制或干预 CTGF 生物学效应的药物或措施，不会产生像干预 TGF-β后存在的副反应，这为临床上找到安全、有效延缓肾脏纤维化途径提供了新的思路.

致谢 本实验得到屈磊技术员的大力帮助，作者对此深表感谢. 本工作为北京大学“985”行动计划、教育部留学回国人员科学研究启动基金和北京大学第一医院留学归国科学研究启动基金资助项目.

参 考 文 献

1 Eddy A A. Molecular basis of renal fibrosis. Pediatri Nephrol, 2000, 15: 290~302

2 Badid C, Vincent M, Fouque D, et al. Myofibroblast: a prognostic marker and target cell in progressive renal disease. Renal Fail, 2001, 23: 543~549

3 Ito Y, Aten J, Bende R J, et al. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis. Kidney Int, 1998, 53: 853 ~ 861

4 Bradham D M, Igarashi A, Grotendorst G R. Connective tissue growth factor: a cystein-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. J Cell Biol, 1991, 114: 1285~1294

5 Goldschmeding R, Aten J, Ito Y, et al. Connective tissue growth factor: just another factor in renal fibrosis? Nephrol Dial Transplant, 2000, 15: 296~299

6 Boukhalfa G, Desmouliere A, Rondeau E, et al. Relationship between alpha-smooth muscle actin expression and fibrosis changes in human kidney. Exp Nephrol, 1996, 4: 241~247

7 王玉，李晓玫，邹万忠，等. 人类肾小球肾炎中肾小管及间质细胞表型转化的研究. 中华肾脏病杂志, 2000, 16: 7~10

8 Gupta S, Clarkson M R, Duggan J, et al. Connective tissue growth factor: potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. Kidney Int, 2000, 58: 1389~1399

9 Blom I E, van Dijk A J, Wieten L, et al. In vitro evidence for differential involvement of CTGF, TGFβ, and PDGF-BB in mesangial response to injury. Nephrol Dial Transplant, 2001, 16: 1139 ~ 1148

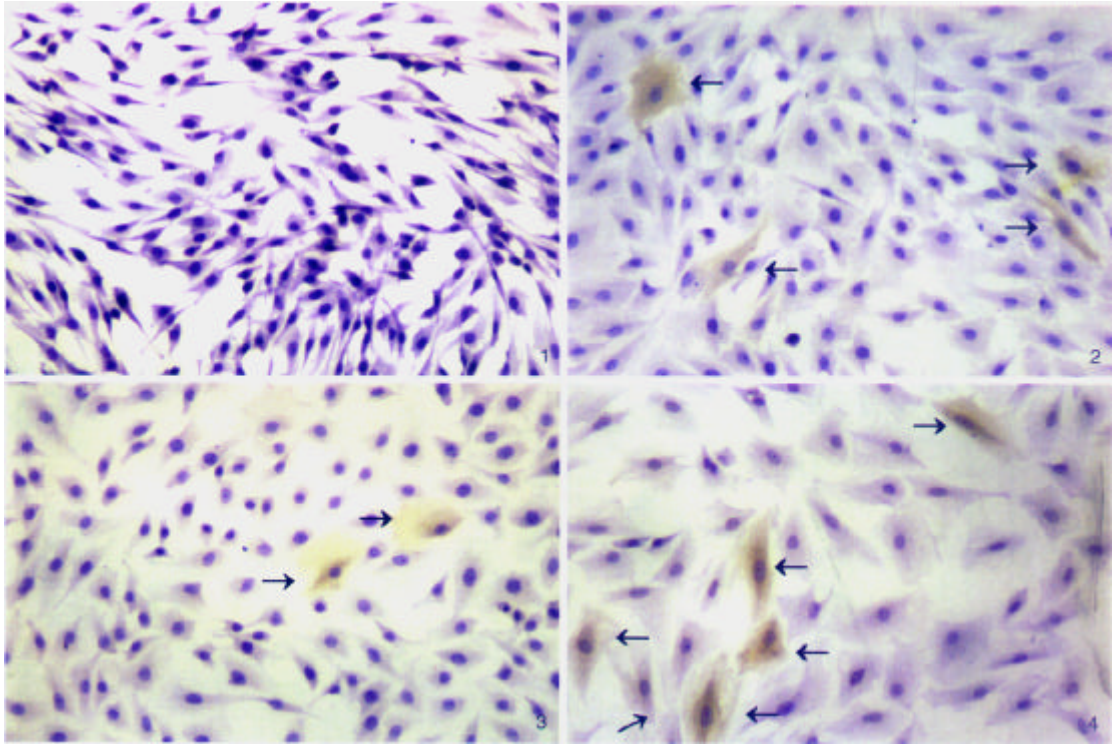
10 Grotendorst G R. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. Cytokine Growth Factor Rev, 1997, 8: 171~179

11 Gore E, Foster S, Hazen-Martin D, et al. Immunohistochemical analysis of CTGF, TGFβ & TGFβ receptor in the remnant kidney model of chronic renal failure. J Am Soc Nephrol (Abs), 2000, 11: 528

12 Wang S N, Denichilo M, Brubaker C, et al. Connective tissue growth factor in tubulointerstitial injury of diabetic nephropathy. Kidney Int, 2001, 60: 96~105

13 Gorelik L, Flarell R A. Abrogation of TGFβ signaling in T cells leads to spontaneous T cells differentiation and autoimmunal disease. Immunity, 2000, 12: 171~181

(2001-09-05 收稿, 2001-11-23 收修改稿)



α-平滑肌肌动蛋白免疫组织化学染色(ABC 法)

1 示 NRK-49F 细胞以 5 ng/mL TGF-β1 刺激 48 h; 2 示 *CTGF* 基因转染细胞在 5% FBS DMEM 培养 24 h; 3 示 *CTGF* 基因转染细胞以 5 ng/mL TGF-β1 刺激 24 h; 4 示 *CTGF* 基因转染细胞以 5 ng/mL TGF-β1 刺激 48 h. 箭头示胞浆棕黄色染色为阳性细胞，苏木素复染细胞核，×10