

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.22.005

乙醛对人肾小管上皮细胞合成分泌 TGF- β_1 的影响研究张林霞¹, 李晓东² Δ

(河北省唐山市工人医院; 1. 老年病三科; 2. 肾内科 063000)

[摘要] **目的** 通过研究乙醛对体外培养的人肾小管上皮细胞合成分泌转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 的影响, 以探讨乙醛导致肾小管间质纤维化的机制。**方法** 选取人肾小管上皮细胞(HK-2 细胞)培养于含 5% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液中。以不同浓度的乙醛(0、50、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$)刺激 HK-2 细胞 24 h。逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 HK-2 细胞中 TGF- β_1 的基因表达; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞中 TGF- β_1 的蛋白表达。酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测细胞培养上清液中 TGF- β_1 的水平。**结果** RT-PCR 和 Western blot 结果显示, 乙醛呈剂量依赖性地增加 HK-2 细胞中 TGF- β_1 基因和蛋白的表达; ELISA 法结果显示, 乙醛呈剂量依赖性地增加 HK-2 细胞培养上清液中 TGF- β_1 的水平。**结论** 乙醛能够促进体外培养的人肾小管上皮细胞合成分泌 TGF- β_1 , 从而促进肾小管间质纤维化的进展。

[关键词] 乙醛; 肾小管上皮细胞; 转化生长因子- β_1 ; 肾小管间质纤维化**[中图分类号]** R392.11**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)22-3038-02Effects of acetaldehyde on synthesis and secretion of TGF- β_1 in human renal tubular epithelial cellsZhang Linxia¹, Li Xiaodong² Δ

(1. Third Department of Geriatrics; 2. Department of Nephrology, Tangshan City Workers' Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of acetaldehyde on synthesis and secretion of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) in human renal tubular epithelial cells, and to explore the mechanism of alcohol induced renal tubulointerstitial fibrosis. **Methods** In vitro, the human renal tubular epithelial cells (HK-2 cell line) were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with 5% fetal bovine serum. The cells were exposed to acetaldehyde at various concentrations (0, 50, 100, 200 and 400 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h. The expression of TGF- β_1 gene in HK-2 cells was detected by RT-PCR; and the expression of TGF- β_1 protein was detected by Western blot; The content of TGF- β_1 in the supernatant of the cells was measured by ELISA assay. **Results** RT-PCR and Western blot results showed that acetaldehyde increased the expressions of TGF- β_1 gene and protein in HK-2 cells in a dose-dependent manner. The results of ELISA method showed that acetaldehyde increased the content of TGF- β_1 in the supernatant of HK-2 cells in a dose-dependent manner. **Conclusion** Acetaldehyde can promote the synthesis and secretion of TGF- β_1 in cultured human renal tubular epithelial cells in vitro, thus promoting the progress of renal tubulointerstitial fibrosis.

[Key words] acetaldehyde; renal tubular epithelial cells; transforming growth factor- β_1 ; renal tubulointerstitial fibrosis

众所周知, 长期大量饮酒会导致肝脏损害, 严重时可能造成酒精性肝硬化。机体摄入大量的乙醇后, 约 90% 在肝脏乙醇脱氢酶的作用下转化为乙醛, 并进入血液循环。肾脏是仅次于肝脏的乙醇排泄器官。乙醇及其代谢产物通过肾脏排泄到尿中, 尿中乙醇及代谢产物的水平高于肝脏及血液中的水平^[1]。因此, 长期过量饮酒也可导致乙醇性肾损害^[2]。动物实验表明, 乙醇性肾损伤病理表现为肾小管间质的炎症改变及纤维化^[3], 但其作用机制目前尚不清楚。转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 是目前公认的促进肾小管间质纤维化的关键性的细胞因子^[4]。本实验通过研究乙醇的代谢产物乙醛对体外培养的人肾小管上皮细胞合成分泌 TGF- β_1 的影响, 为明确乙醇导致肾小管间质纤维化的发病机制提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 人近端肾小管上皮细胞(HK-2 细胞株)由唐山市工人医院中心实验室保存。乙醛购自天津鼎盛鑫化工有限公司,

逆转录试剂盒、PCR 试剂盒为美国 Promega 公司产品, PCR 引物由上海生工合成。兔抗人 TGF- β_1 多克隆抗体、小鼠抗人 Tubulin 单克隆抗体购自美国 Santa Cruze 公司。碱性磷酸酶标记山羊抗兔、山羊抗小鼠二抗购自北京中杉金桥公司, BCIP/NBP 显色试剂盒购自上海碧云天。TGF- β_1 ELISA 试剂盒购自美国 R & D 公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 将 HK-2 细胞培养于含 5% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液中。实验前换成无血清培养液同步化 24 h。参照有关文献^[5], 分别加入含终浓度为 0、50、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$ 乙醛的培养液, 继续培养 24 h。收集细胞或培养上清液进行实验。

1.2.2 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 TGF- β_1 基因表达 应用 0.25% 胰酶和 0.02% EDTA 消化收集细胞, 应用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, 测定 $A_{260}/A_{280} = 1.8 \sim 2.0$, 计算其水平。取 1 μg 总 RNA 反转录为 cDNA。引物设计参考

有关文献^[6]。TGF- β_1 (306 bp): 上游引物 5'- AGG TCA CCC GCG TGC TAA T -3', 下游引物 5'- TCA ACC ACT GCC GCA CAA CT -3'。 β -actin (202 bp): 上游引物 5'-CCT TCC TGG GCA TGG AGT CCT G-3', 下游引物 5'-GGA GCA ATG ATC TTG ATC TTC-3'。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 28 个循环后, 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 在 Bio-Rad 凝胶成像系统中观察结果, 应用 Bio-Rad 联机专用软件分析电泳条带灰度值。

1.2.3 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 TGF- β_1 蛋白表达 应用 0.25% 胰酶和 0.02% EDTA 消化收集细胞, 加入含 PMSF 的细胞裂解液, 冰上放置 30 min, 4 °C 12 000 g/min 离心 5 min 提取总蛋白。BCA 法检测蛋白水平。取 20 μ g 总蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 分别加入兔抗人 TGF- β_1 多克隆抗体 (1 : 800) 和小鼠抗人 Tubulin 单克隆抗体 (1 : 1 000), 4 °C 过夜。洗膜后分别加入碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 (1 : 1 000)、山羊抗小鼠二抗 (1 : 1 000), BCIP/NBT 显色。应用 Image J 图像分析软件分析 TGF- β_1 及 Tubulin 条带的灰度值。

1.2.4 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测细胞培养上清液中 TGF- β_1 的水平 收集细胞培养上清液, 严格按照 ELISA 试剂盒说明书检测细胞培养上清液中 TGF- β_1 的水平。

1.3 统计学处理 应用 SAS 8.1 统计软件进行分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 各组与对照组比较采用 Dunnett-*t* 检验, 各组之间两两比较采用 SNK 法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 乙醛对细胞中 TGF- β_1 基因表达的影响 正常 HK-2 细胞中有少量的 TGF- β_1 的基因表达, 50 μ mol/L 乙醛刺激 HK-2 细胞 24 h 后 TGF- β_1 的基因表达较对照组比较明显增强 ($P < 0.05$); 随着乙醛浓度的升高, TGF- β_1 的基因表达量明显增加, 并具有一定的浓度依赖性。见图 1。

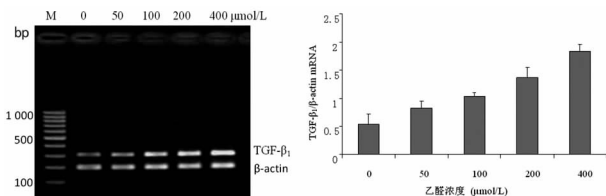


图 1 乙醛对 TGF- β_1 基因表达的影响

2.2 乙醛对细胞中 TGF- β_1 蛋白表达的影响 正常 HK-2 细胞中有少量的 TGF- β_1 的蛋白表达, 50 μ mol/L 乙醛刺激 HK-2 细胞 24 h 后 TGF- β_1 的蛋白表达量没有显著增加 ($P > 0.05$), 但 100 μ mol/L 乙醛刺激 HK-2 细胞 24 h 后 TGF- β_1 的蛋白表达较对照组比较明显增加 ($P < 0.05$); 随着乙醛浓度的升高, TGF- β_1 的蛋白表达量明显增加, 具有一定的浓度依赖性。见图 2。

2.3 乙醛对细胞培养上清液中 TGF- β_1 的水平的影响 正常 HK-2 细胞培养上清液中 TGF- β_1 的水平很低 (216.42 \pm 60.75) μ g/L, 100 μ mol/L 乙醛刺激 HK-2 细胞 24 h 后培养上清液中 TGF- β_1 的水平开始增加 (325.72 \pm 74.52) μ g/L, 较对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 随着乙醛浓度的升

高, 培养上清液中 TGF- β_1 的水平明显增加, 分别为 (515.72 \pm 49.08) μ g/L、(585.08 \pm 78.03) μ g/L, 具有一定的浓度依赖性。

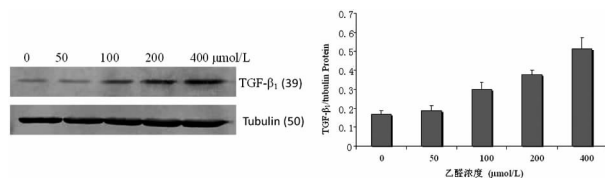


图 2 乙醛对 TGF- β_1 蛋白表达的影响

3 讨 论

长期大量饮酒可导致全身多脏器损害。机体摄入乙醇后约 90% 在肝脏代谢, 摄入的乙醇在肝脏乙醇脱氢酶的作用下转化为乙醛并进入血液循环。肝脏是乙醇代谢的主要器官, 也是最容易损伤的器官。乙醛能够刺激肝星状细胞活化、增殖, α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、I 型胶原及 TGF- β_1 的表达明显增加, 是形成乙醇性肝硬化的中心环节^[7-8]。由于肾脏的血供丰富, 过量饮酒后, 超过肝脏的代谢能力, 容易导致过量的乙醇、乙醛在肾脏蓄积, 从而引起肾脏损害。乙醇灌胃导致的大鼠肾损伤模型, 病理表现为肾小管间质性细胞浸润, α -SMA 表达阳性^[9], 促纤维化的细胞因子 TGF- β_1 的表达明显增强^[10], 最终导致肾小管间质纤维化。

TGF- β_1 是目前公认的导致肾小管间质纤维化作用最强的细胞因子。本课题建立了乙醇的代谢产物乙醛导致肾小管上皮细胞损伤的体外模型。进一步研究证实, 乙醛能够促进体外培养的人肾小管上皮细胞合成分泌 TGF- β_1 。TGF- β_1 可能通过自分泌或旁分泌的方式, 导致肾小管上皮细胞凋亡、转分化为肌成纤维细胞、促进致炎性细胞因子的释放等环节^[11-13], 促进肾小管间质纤维化的发生、发展。采取措施阻断乙醛对肾小管上皮细胞内 TGF- β_1 的合成及分泌, 对减轻乙醛对肾小管上皮细胞的损伤, 保护肾小管上皮细胞功能, 延缓肾小管间质纤维化的进展具有一定的临床意义。

参考文献

- [1] Tominaga Y. Use of acetaldehyde and methanol as markers of alcohol abuse and their measurement [J]. Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi, 2009, 44(1): 26-37.
- [2] Harris PS, Roy SR, Coughlan C, et al. Chronic ethanol consumption induces mitochondrial protein acetylation and oxidative stress in the kidney [J]. Redox Biol, 2015, 6(12): 33-40.
- [3] 胡晓琴, 邱皓, 吕晓云, 等. 康肾合剂对酒精性肾损害大鼠肾组织 NF- κ B 活化及 IL-6 水平的影响 [J]. 西部中医药, 2015, 28(3): 11-13.
- [4] Kim D, Lee AS, Jung YJ, et al. Tamoxifen ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis by modulation of estrogen receptor α -mediated transforming growth factor- β_1 /Smad signaling pathway [J]. Nephrol Dial Transplant, 2014, 29(11): 2043-2053.
- [5] Wang H, Guan W, Yang W, et al. Caffeine inhibits the activation of hepatic stellate cells induced by acetaldehyde via adenosine A2A receptor mediated (下转第 3042 页)

和外标,所有标本同时检测,以减少激光衰减,芯片类型等对检测结果的影响。

原发性肝癌的病因与诱因多种多样如环境、饮食和水源、吸烟饮酒等生活习惯,细菌、病毒和寄生虫感染亦是诱发肝癌的可能因素,在不同病因或诱因的情况下可能会导致不同细胞类型的肝癌,在体内表达的微量蛋白谱也许有差异^[9],而本研究仅仅是作了一株肝癌细胞,在后续工作中还需用不同肝癌细胞株建模,研究体内蛋白表达情况,综合分析肝癌相关标志物,有利于提高肝癌早期诊断率。

本研究肝癌细胞在动物造模中采用的是皮下异位造膜,如果用肝癌细胞原位接种动物构建模型,其体内蛋白表达是否与皮下接种造模有差异,是否可用影像学的方法来观察原位接种动物模型的肿瘤生长情况及效果,还需进一步研究。

参考文献

- [1] 杨军,张小莉. 蛋白质组学的发展以及在医学中的应用概况[J]. 中国民族民间医药, 2012, 23(1): 19-20.
- [2] 周玲丽,曹骥,李薇,等. RNA 干扰 FABP5 基因对人肝癌 HepG2 细胞裸鼠移植瘤生长的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(4): 603-608.
- [3] Xia HJ, Chen CS. Progress of non-human primate animal models of cancers[J]. Dongwuxue Yanjiu, 2011, 32(1): 70-80.
- [4] 李薇,曹骥,周玲丽,等. RNAi 沉默 CDC25a 基因对人肝癌细胞 HepG2 裸鼠移植瘤的影响[J]. 实用医学杂志, 2015, 31(3): 348-352.
- [5] Liu C. The application of SELDI-TOF-MS in clinical diagnosis of cancers[J]. J Biomed Biotechnol, 2011, 2011: 245821.
- [6] 张建忠,朱建云,包海燕,等. 血清 MMP-13 及 TIMP-1 检

测对原发性肝癌的早期诊断价值[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(2): 293-295.

- [7] 张铁序,张朝霞,黄东龙,等. HSP27 在人不同转移性前列腺癌细胞株比较蛋白质组学的初步研究[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(35): 19-25.
- [8] Larkin SE, Zeidan B, Taylor MG, et al. Proteomics in prostate cancer biomarker discovery[J]. Expert Rev Proteomics, 2010, 7(1): 93-102.
- [9] 杨素芳,邱颂平,刘清华. 不同中医证型原发性肝癌患者介入治疗前后血清蛋白指纹图谱的观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(10): 1352-1355.
- [10] 安黎,周红光. 蛋白质组学在原发性肝癌中的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(9): 1306-1310.
- [11] 李华成,王建刚,费新应,等. 膈下逐瘀汤加减方作用人肝癌细胞 SMMC-7721 蛋白质组学研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2015, 25(3): 156-158.
- [12] 张英剑,王萍,郭虹,等. 肝病良恶性腹腔积液前期处理后差异蛋白质组学分析[J]. 中国医药, 2014, 9(4): 509-511.
- [13] Wang Z, Gou W, Liu M, et al. Expression of P53 and HSP70 in chronic hepatitis, liver cirrhosis, and early and advanced hepatocellular carcinoma tissues and their diagnostic value in hepatocellular carcinoma: An immunohistochemical study[J]. Met Sci Monit, 2015, 23(11): 3209-3215.
- [14] Wang L, Yao M, Dong ZZ, et al. Circulating specific biomarkers in diagnosis of hepatocellular carcinoma and its metastasis monitoring[J]. Tumour Biol, 2014, 35(1): 9-20.

(收稿日期:2016-02-26 修回日期:2016-04-02)

(上接第 3039 页)

- by the cAMP/PKA/SRC/ERK1/2/P38 MAPK signal pathway [J]. PLoS One, 2014, 9(3): e92482.
- [6] 李晓东,李英,丁新国,等. 1, 25(OH)2D3 对甲状旁腺素诱导的肾小管上皮细胞转分化和 TGF- β_1 的表达的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(2): 156-159.
 - [7] Szuster-Ciesielska A, Mizerska-Dudka M, Daniluk J, et al. Butein inhibits ethanol-induced activation of liver stellate cells through TGF- β , NF κ B, p38, and JNK signaling pathways and inhibition of oxidative stress[J]. J Gastroenterol, 2013, 48(2): 222-237.
 - [8] Reyes-Gordillo K, Shah R, Arellanes-Robledo J, et al. Mechanisms of action of acetaldehyde in the up-regulation of the human α 2(I) collagen gene in hepatic stellate cells; key roles of Ski, SMAD3, SMAD4, and SMAD7 [J]. Am J Pathol, 2014, 184(5): 1458-1467.
 - [9] 张健,王炳元. 酒精性肾损害时 α -SMA 的表达及复方中药的干预作用[J]. 中国实用乡村医生杂志, 2012, 17

(12): 69-70.

- [10] 邱皓,滕玉莲,刘文,等. 中药康肾合剂对酒精性肾损伤大鼠尿酶变化及肾脏 TGF- β_1 mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(12): 3714-3716.
- [11] Zheng RP, Bai T, Zhou XG, et al. Lefty A protein inhibits TGF- β_1 -mediated apoptosis in human renal tubular epithelial cells[J]. Mol Med Rep, 2013, 8(2): 621-625.
- [12] Yang L, Ma X, Cheng T, et al. Effect of tangnaikang on TGF-beta1-induced transdifferentiation of human renal tubular epithelial HK-2 cells [J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33(3): 388-393.
- [13] Sarközi R, Flucher K, Haller VM, et al. Oncostatin M inhibits TGF- β_1 -induced CTGF expression via STAT3 in human proximal tubular cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 424(4): 801-806.

(收稿日期:2016-02-25 修回日期:2016-04-11)