

Y-box 结合蛋白-1 促进大鼠系膜细胞增生及 TGF- β_1 分泌

郭一迪¹, 张国英¹, 张云霞¹, 钱婷婷¹, 何芳¹, 蔡峰¹, 端木传靖¹, 王希², 冯泉城^{3*}

(¹南京中医药大学附属南京市中西医结合医院检验科, 江苏 南京 210014; ²南京医科大学基础医学院微生物学与免疫学系, 江苏 南京 210029; ³南京医科大学附属南京儿童医院肾内科, 江苏 南京 210008)

[摘要] 目的: 观察 Y-box 结合蛋白-1(Y-box binding protein 1, YB-1)对体外培养的大鼠肾小球系膜细胞(MC)增生及分泌转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)的影响。方法: 体外培养大鼠肾小球系膜细胞株(HBZY-1), 构建 YB-1 真核表达载体, 转染系膜细胞, 应用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法及细胞计数法检测大鼠 MC 过表达 YB-1 后的增生情况, 双抗体夹心 ELISA 法检测细胞培养上清液中 TGF- β_1 分泌, real-time PCR 法测定细胞 TGF- β_1 基因相对表达量。结果: YB-1 过表达后 MC 增生和 TGF- β_1 基因表达增加, 同时 MC 分泌 TGF- β_1 增加。结论: YB-1 能促进 MC 增生及 TGF- β_1 分泌增加。

[关键词] YB-1; 系膜细胞; 细胞增生; 转化生长因子- β_1

[中图分类号] R692.6

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)10-1320-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20141006

Effects of YB-1 on rat mesangial cells proliferation and TGF- β_1 expression

Guo Yidi¹, Zhang Guoying¹, Zhang Yunxia¹, Qian Tingting¹, He Fang¹, Cai Feng¹, Duanmu Chuanjing¹, Wang Xi², Feng Quancheng^{3*}

(¹Department of Clinical Laboratory, Nanjing Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital Affiliated to Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210014; ²Department of Microbiology and Immunology, NJMU, Nanjing 210029; ³Department of Urology, Nanjing Children's Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210008, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of Y-box binding protein 1 (YB-1) on the proliferation and transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) secretion in rat mesangial cells (MC). **Methods:** Rat mesangial cells were cultured with or without YB-1 over-expression, and the supernatant and the cells were collected respectively. The proliferation of MC with YB-1 over-expression was determined by MTT and cell counting. The level of the TGF- β_1 protein in the supernatant was measured by ELISA, while the TGF- β_1 mRNA expression was detected by real-time PCR. **Results:** YB-1 over-expression stimulated the proliferation of MC, upregulated the expression of TGF- β_1 mRNA, and induced the TGF- β_1 protein secreting in rat MC. **Conclusion:** YB-1 triggered MC proliferation and increased TGF- β_1 secreting, and inhibiting YB-1 expression may be beneficial in retarding progressive development of glomerulonephritis.

[Key words] YB-1; mesangial cells; proliferation; transforming growth factor- β_1

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(10):1320-1323]

肾小球系膜细胞(mesangial cell, MC)的增生及细胞外基质(ECM)的异常分泌是多种肾小球疾病的共同病理改变,是引起肾小球疾病进展的主要因素之一。MC分泌的细胞因子如转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)在肾小球疾病进展过程中起了重要的作用^[1]。Y-box

结合蛋白-1(YB-1)作为转录因子首先从 MHC II 启动子 Y-box 中分离出来, YB-1 结合于 Y-box 序列 5'-CTGATTGG-3' 结构, 该序列包含有反义 CCAAT boxes(Y-boxes); YB-1 是高度保守的核酸结合蛋白, 是冷休克结构域(cold shock domain, CSD)蛋白超家族的一员, 它存在于哺乳动物细胞质和细胞核中, 具有多种细胞效能, 参与基因转录、翻译调控、DNA 损伤诱导修复、抗癌药耐药以及环境刺激的细胞增生

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金(2012NJMU064)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: williamvon@126.com

反应等^[2]。新近研究表明, YB-1 在体内外系膜细胞增生模型中表达均增加^[3], 但其具体作用机制尚不清楚。本实验通过体外培养大鼠 MC, 观察 YB-1 过表达对大鼠 MC 增生及分泌 TGF- β_1 的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

MTT 购自美国 Sigma 公司, 大鼠肾小球系膜细胞株 (HBZY-1) 购自中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), RPMI-1640 培养基、细胞培养瓶、96 孔培养板等购自美国 Gibco 公司, 胎牛血清购自杭州四季清公司, RNA 抽提试剂、M-MLV、Taq 酶等购自美国 Promega 公司, 大鼠 TGF- β_1 ELISA 试剂盒购自上海元象医疗器械有限公司。Real-time PCR 试剂: SYBR Green Master Mix、96 孔反应板、盖板膜购自美国 ABI 公司。

1.2 方法

1.2.1 系膜细胞培养

HBZY-1 常规培养于含 10% FCS 的 RPMI-1640 培养液中, 培养条件为 37°C, 饱和湿度 5% CO₂ 培养箱, 每 2~3 d 用 0.25% 胰酶消化传代。取贴壁长满瓶底 70%~80% 的单层细胞用于后续实验。

1.2.2 Lipofectamine™2000 转染系膜细胞

提取大鼠肾组织 mRNA, 反转录为大鼠肾组织 cDNA 作为模板, PCR 扩增 YB-1 全长序列, YB-1 基因上游引物 5'-TAACCCTATCATCGACGG-3', 下游引物 3'-GACCAAAAAGAGTTATGT-5'; 成功测序后, 构建 YB-1-T/A 克隆载体保种备用; 以 YB-1-T/A 克隆载体为模板, 选择相应限制性内切酶位点, PCR 扩增含酶切位点的 YB-1 全长序列, 上游选择 *Hind* III, 下游选择 *Bam*H I, 引物序列如下: 上游引物: 5'-TACAAGCTTGCCATGAGCAGCGAG-3', 下游引物: 5'-TAGGATCCCTCAGCCCCGCCCTGCTC-3'; 再次测序验证含酶切位点的 YB-1 全长序列无误后, 采用双酶切法, 构建 pcDNA3.1-YB-1 真核表达载体。转染前 24 h, 通过胰酶消化收集细胞并计数, 用含 10% 血清的培养基重悬细胞至浓度为 (0.5~2.0) × 10⁵ 个/ml, 将待转染细胞传代至 6 孔培养板, 每孔加入 2 ml, 置于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中, 经过 24 h 生长, 细胞长至 50%~80% 融合后用于转染。分别使用 100 μ l 无血清培养基, 稀释 1.0 μ g 质粒 DNA 及 4 μ l Lipofectamine™2000 (前期实验证实质粒与转染试剂 1:4 时, 转染效率最高, 通过计数表达 GFP 的细胞及总细胞比代表转染效率在 50%~60%), 混匀后室

温孵育 15 min; 在 6 孔板中加入预热的无血清培养基 800 μ l 每孔, 加入质粒和 Lipofectamine™2000 的混合液; 转染后 6 孔培养板置于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中 6 h, 换成含 10% 血清的培养液 2 ml/孔, 继续培养 24 h, 验证阳性克隆。

1.2.3 YB-1 过表达促进系膜细胞增生

应用 MTT 法测定细胞增生。取 4~8 代生长良好的系膜细胞接种于 96 孔板 (8 × 10³ 个/孔), 生长至 70%~80% 融合时, 转染 YB-1 真核表达载体, 实验设 3 组: Vehi: 转染试剂组, YB-1: YB-1 过表达组, Vector: 空载组, 各孔总体积 100 μ l, 每组设 6 个复孔。培养 24 h 后, 每孔加入 MTT 20 μ l, 继续培养 4 h, 弃上清, 每孔加入 150 μ l DMSO, 小心震荡使结晶完全溶解, 在 570 nm 波长下应用 DG-5032 型酶联免疫检测仪检测各孔的吸光度。

1.2.4 细胞计数法测定 YB-1 对大鼠 MC 增生的影响

应用细胞计数法测定细胞增生。取 4~8 代生长良好的系膜细胞接种于 6 孔板 (1 × 10⁵ 个/孔), 生长至 70%~80% 融合时, 转染 YB-1 真核表达载体后再培养 24 h, 实验设 Vehi: 转染试剂组, YB-1: YB-1 过表达组, Vector: 空载组, 各孔总体积 2 ml, 每组设 6 个复孔。培养 24 h 后, 胰酶消化, PBS 将细胞吹打均匀, 细胞计数器手工计数。

1.2.5 YB-1 对大鼠系膜细胞 TGF- β_1 mRNA 表达的影响

取 4~8 代生长良好的系膜细胞, 生长至 70%~80% 融合时, 转染 YB-1 真核表达载体后再培养 24 h, 实验设正常组、YB-1 转染组、空载组, 收集细胞及上清液。TRIzol 一步法提取细胞总 RNA, 经电泳显示 28S、18S 条带清晰, $D(260 \text{ nm})/D(280 \text{ nm})$ 比值在 1.8~2.0 之间。取 1 μ g 总 RNA, 以随机引物和 M-MLV 逆转录酶进行逆转录, 逆转录体系 20 μ l。取逆转录产物 2 μ l 为模板进行 PCR 扩增, PCR 体系 20 μ l。探针和引物的设计与合成, 使用 Primer Express 3.0 软件辅助设计跨外显子的引物和探针, 引物序列见表 1; 使用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪进行实验, 反应条件设定为: 50°C, 2 min; 95°C, 10 min; 95°C, 15 s, 60°C, 1 min, 循环 40 次。用循环阈值 (circle threshold, CT) 表示各基因相对表达水平, 以 GADPH 作为内参, 计算各样本相对表达水平 ΔC_T , 以 Vehi 组系膜细胞 ΔC_T 为参照因子, 计算 $2^{-\Delta\Delta C_T}$, 即为各组大鼠系膜细胞相对 Vehi 组各基因表达的数量倍数关系。

1.2.6 YB-1 对大鼠 MC 分泌 TGF- β_1 的影响

采用双抗体夹心 ELISA 法检测培养上清中

表 1 GAPDH、TGF-β₁ 及 YB-1 基因引物序列及产物大小
Table 1 Primer and product size of GAPDH, TGF-β₁ and YB-1

基因名称	序列号	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	产物大小(bp)
YB-1	NM_031563	GACAAGAAGGTCATCGCAAC	TTCAACAACATCAAACCTCCACA	195
TGF-β ₁	NM_021578	TCAGACATTGGGAAGCAGT	ACCAAGGTAACGCCAGGAAT	138
GAPDH	NM_017008	CAAGTTCAACGGCAGTCAA	TGGTGAAGACGCCAGTAGACTC	149

TGF-β₁ 的蛋白含量,具体操作步骤按试剂盒说明书进行。细胞处理及实验分组同前。每孔加入不同浓度的标准品及待测样品各 100 μl,样品稀释液作空白对照,并以 RPMI-1640 培养液作本底对照。混匀后将反应板置 37°C 2 h,倾去液体,洗涤液充分洗板后,再分别加入一抗工作液及酶标抗体工作液 100 μl,37°C 各反应 1 h,每次均以洗涤液充分洗板。最后加入底物工作液 100 μl,置 37°C 暗处反应 15 min 后,加入 50 μl 终止液,在 492 nm 处测吸光值。TGF-β₁ 检测前需先将样品以适量盐酸激活。每个样品设 3 个复孔,取吸光度均值,绘制标准曲线,根据标准曲线计算上清液 TGF-β₁ 的含量。去除本底对照后,得出 TGF-β₁ 的实际分泌量。

1.3 统计学分析

计量数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS11.5 统计软件进行统计学分析。组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),并用 LSD 法进行组间两两比较。 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 YB-1 转染系膜细胞后阳性克隆的验证

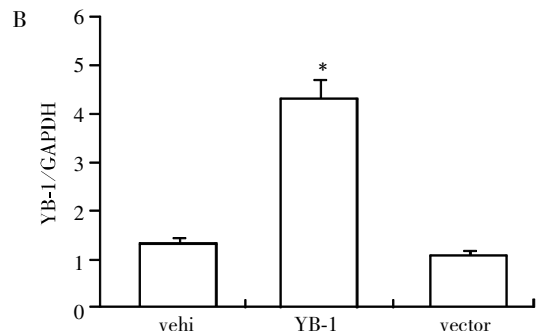
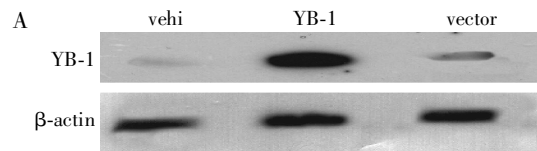
YB-1 真核表达载体构建成功,并转染了系膜细胞。系膜细胞转染 YB-1 后,利用 RT-PCR、Western blot 分别检测了阳性克隆 YB-1 核酸及蛋白表达情况,由图 1 可见系膜细胞转染 YB-1 真核表达载体后,YB-1 mRNA 及蛋白表达较对照组均明显增高。

2.2 YB-1 促系膜细胞增生作用

系膜细胞过表达 YB-1 后,MTT 示吸光度值较对照组明显增加(图 2A),提示转染 YB-1 的系膜细胞 DNA 合成增加,细胞处于增生状态;细胞计数亦提示,转染 YB-1 后,细胞数(图 2B)增多,较对照组相比有统计学意义。提示 YB-1 有促系膜细胞增生作用。

2.3 YB-1 大鼠 MC TGF-β₁ mRNA 表达的影响

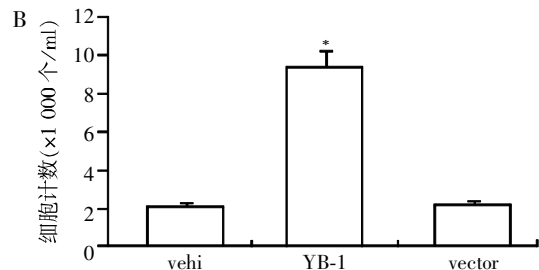
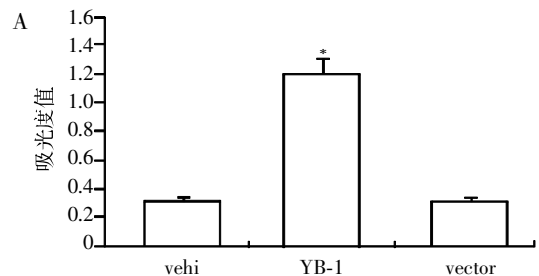
基础状态下,系膜细胞表达一定量的 TGF-β₁ mRNA,系膜细胞过表达 YB-1 后,TGF-β₁ mRNA 的表达量显著上调,为对照组的 9.3 倍($P < 0.05$,图 3)。



A: Western blot; B: RT-PCR; 与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 1 阳性克隆验证

Figure 1 Certification of positive clone



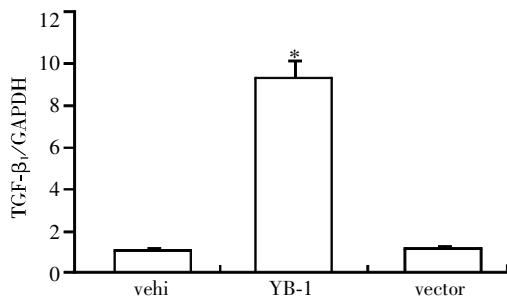
A: 系膜细胞过表达 YB-1 后,MTT 示吸光度值明显增加;B: 细胞计数显示 YB-1 过表达能增加系膜细胞数目;与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 2 YB-1 促系膜细胞增生作用

Figure 2 YB-1 over-expression promoted mesangial cell proliferation

2.4 YB-1 大鼠 MC 分泌 TGF-β₁ 的影响

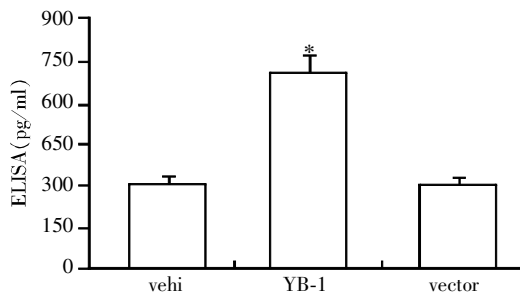
基础状态下,MC 分泌少量的 TGF-β₁,系膜细胞过表达 YB-1 后,TGF-β₁ 分泌显著增加,为转染试剂组的 2.39 倍($P < 0.05$,图 4)。



与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 3 YB-1 促系膜细胞表达 TGF-β₁mRNA 增加

Figure 3 YB-1 over-expression increased TGF-β₁ mRNA expression in mesangial cell



与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 4 YB-1 促系膜细胞分泌 TGF-β₁ 增加

Figure 4 YB-1 over-expression increased TGF-β₁ secretion in mesangial cell

3 讨论

MC 增生及细胞外基质的异常积聚在肾小球硬化的发生发展中起了重要作用,是肾小球疾病慢性进展的共同病理过程。已经证明细胞因子在这一过程中发挥着重要作用。这些细胞因子主要来源于肾内固有细胞尤其是 MC,而 TGF-β₁ 作为其中重要的炎性介质之一,与细胞外基质的沉积密切相关^[4],在人类多种原发及继发性肾疾病中,均检测到 TGF-β₁ 的表达增加^[5],证实 TGF-β₁ 在肾脏疾病的发生发展中发挥了关键作用。因此,阐明系膜细胞增生及分泌细胞因子的可能机制,为临床有效阻止疾病进展提供方向就显得尤为重要。

YB-1 蛋白可作为多效调控因子调控着细胞生长、程序性死亡、耐药作用、DNA 修复、转录翻译等。人类 YB-1 蛋白可作为细胞周期重要的正向调控因子,控制细胞增生进程。在许多处于增生状态下的细胞中,都可见到 YB-1 表达的上调,例如在一些胚

胎组织、胎儿肝脏组织、肝脏损伤后再生时,以及在结肠直肠的增生层^[6]。Roeyen 等^[7]研究认为 YB-1 上调能导致肾损害。前期实验也发现,YB-1 在体内外系膜细胞增生模型中表达均增高,但是,导致系膜细胞增生的确切机制尚有待阐明。本研究中系膜细胞过表达 YB-1 后,MC 增生明显,系膜细胞 TGF-β₁ 基因表达上调,同时引起系膜细胞分泌 TGF-β₁ 蛋白明显增多,证实 YB-1 过表达可引起肾小球 MC 的异常增生和分泌。

有研究显示,YB-1 可作为 Ras 的转录调控子^[8],后者为 ERK 信号通路的上游,而 ERK 的活化与细胞增生密切相关,YB-1 是否是通过作用于该信号通路发挥其促系膜细胞增生效应还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Zhu L,Zhang Q,Shi S,et al. Synergistic effect of mesangial cell-induced CXCL1 and TGF-beta1 in promoting podocyte loss in IgA nephropathy [J]. PLoS One,2013,8 (8):e73425
- [2] Eliseeva IA,Kim ER,Guryanov SG,et al. Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions[J]. Biochemistry, 2011,76(13):1402-1433
- [3] 冯泉城,黄松明,张爱华,等. YB-1 蛋白在大鼠系膜增殖性肾小球肾炎及体外培养大鼠肾小球系膜细胞中的表达及其意义[J]. 中华肾脏病杂志,2009,25(11):875-877
- [4] Huang XZ,Wen D,Zhang M,et al. Sirt1 activation ameliorates renal fibrosis by inhibiting the TGF-beta/Smad3 pathway[J]. J Cell Biochem,2014,115(5):996-1005
- [5] Yamamoto T,Noble NA,Cohen AH,et al. Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular diseases [J]. Kidney Int,1996,49(2):461-469
- [6] Kosnopfel C,Sinnberg T,Schitteck B. Y-box binding protein 1-A prognostic marker and target in tumour therapy [J]. Eur J Cell Biol,2014,93(1-2):61-70
- [7] van Roeyen CR,Eitner F,Martinkus S,et al. Y-box protein 1 mediates PDGF-B effects in mesangioproliferative glomerular disease[J]. J Am Soc Nephrol,2005,16(10):2985-2996
- [8] Pearson G,Robinson F,Beers Gibson T,et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways:regulation and physiological functions [J]. Endocr Rev,2001,22(2):153-183

[收稿日期] 2014-05-24