

PEA3 在白蛋白诱导肾小管上皮细胞损伤中的作用

林加娟,白 咪,庄一波,宋瑞花,张园园,张爱华,黄松明,丁桂霞*

(南京医科大学附属南京儿童医院肾脏科,江苏 南京 210008)

[摘要] 目的:探讨 PEA3 在白蛋白诱导的肾近端小管上皮细胞损伤中的作用及机制。方法:体外培养小鼠近端肾小管上皮细胞,实验组分为对照组、空载对照组、PEA3 过表达组、白蛋白造模组和 PEA3 处理组。实时荧光定量 PCR 检测 PEA3 转染效率。应用 Annexin V-FITC/PI 双染和 Hoechst 染色检测细胞凋亡。Western blot 法和 RT-PCR 检测肾小管上皮细胞标志物 E-cadherin、 α -SMA 及 Vimentin 的蛋白和 mRNA 变化水平。结果:①PEA3 质粒转染后,过表达组的 PEA3 表达水平增高了 2.5 倍;②加入白蛋白刺激后,与对照组相比小管细胞凋亡增加,过表达 PEA3 显著抑制白蛋白诱导的小管细胞凋亡;③白蛋白刺激降低 E-cadherin 的表达,而增加了 α -SMA 和 Vimentin 的表达,PEA3 过表达阻断白蛋白对 E-cadherin 的抑制作用,并降低 α -SMA 和 Vimentin 的表达。结论:PEA3 可抑制白蛋白诱导的小管上皮细胞凋亡和上皮-间充质转分化。

[关键词] PEA3;白蛋白;肾近端小管上皮细胞;凋亡;上皮-间充质转分化

[中图分类号] Q813

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)08-923-05

doi:10.7655/NYDXBNS20160805

Role of PEA3 in the injury of renal proximal tubular cells induced by albumin

Lin Jiajuan, Bai Mi, Zhuang Yibo, Song Ruihua, Zhang Yuanyuan, Zhang Aihua, Huang Songming, Ding Guixia*

(Department of Nephrology, Nanjing Children's Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210008, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of PEA3 in albumin induced mouse proximal tubular cells (mPTCs) apoptosis and its underlying mechanism. **Methods:** The cells were cultured with albumin *in vitro*, and divided into the control group, the vehicle control group, the PEA3 overexpression group, the albumin model group and the PEA3 overexpression in albumin model group. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction was used to investigate the level of PEA3 gene transfection efficiency. Flow cytometry and Hoechst staining technique were performed to analyze the apoptosis of mPTCs. The mRNA and protein levels of E-cadherin, α -SMA and Vimentin were detected by RT-PCR and Western bolt. **Results:** Transfection of PEA3 over-expressed the mRNA level of PEA3 for 2.5 fold. The apoptosis of mPTCs treated with albumin was increased compared with the control group, and overexpression of PEA3 ameliorated albumin-induced apoptosis. Albumin treatment reduced the expression of E-cadherin and increased the expression of Vimentin and α -SMA. Overexpression of PEA3 reversed the reduction of E-cadherin and ameliorated the increase of Vimentin and α -SMA. **Conclusion:** Overexpression of PEA3 can protect mPTCs from apoptosis and epithelial-mesenchymal transition induced by albumin.

[Keywords] PEA3; albumin; renal proximal tubular cells; apoptosis; epithelial-mesenchymal transition

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(08):923-927]

蛋白尿作为一种肾脏疾病的标志物,同样也是肾小管上皮细胞及小管间质损伤的独立危险因素^[1-2]。目前认为蛋白尿首先损伤肾小管间质,进而导致肾小球功能障碍,促进肾脏疾病的进展^[3]。然而,白蛋白诱导肾脏损伤的具体机制尚不清楚,临床上对蛋白

尿相关疾病也缺乏有效的治疗方案。因此研究蛋白尿导致肾脏损害的作用机制并找到控制肾小管上皮细胞损伤的方法,对保护肾功能、延缓肾脏疾病的发展具有重要意义。

PEA3 亚家族是 ETS 转录因子家族成员之一,参与了乳腺、唾液腺、肾脏等多种器官的形态发生,并与肿瘤的发生发展密切相关。本课题组前期研究也发现 PEA3 在肾脏的发育中有重要作用,在醛固

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81070551)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:bhgyuan@163.com

酮模型、阿霉素模型、UO 模型以及庆大霉素模型中表达显著增高,且表达位置主要集中于肾小管,结合本课题组前期研究结果,可以初步推测 PEA3 可能在肾脏纤维化中发挥作用,尤其以在小管病变中的作用较明显,但是介导了肾小管上皮细胞间充质转分化的过程,还是作为一种保护性机制阻断这一过程仍不清楚,因此有必要进一步探讨其发挥作用的具体机制。

本研究检测了白蛋白刺激肾小管近端上皮细胞的凋亡率,并在体外转染 PEA3 后观察其凋亡率的变化,探讨其对白蛋白诱导的肾小管上皮细胞凋亡和表皮间充质转分化(EMT)的作用,在细胞水平证实 PEA3 对白蛋白诱导的小鼠近端肾小管上皮细胞凋亡及 EMT 具有保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠永生代近端肾小管上皮细胞株(mPTECs, ATCC 公司,美国);胎牛血清、DMEM/F12 培养基、0.25%胰酶(Gibco 公司,美国);细胞培养瓶、细胞培养板(Corning 公司,美国);白蛋白(Sigma 公司,美国);转染试剂 Lipofectamine™ 2000、RNA 提取试剂 TRIzol(Invitrogen 公司,美国);AnnexinV-FITC/PI 双染料凋亡检测试剂盒(BD Bioscience 公司,美国);SYBR Green Master Mix(Roche 公司,瑞士),E-cadherin(R868)、 α -SMA 及 Vimentin 多克隆抗体(Abcam 公司,美国); β -actin 一抗以及 HRP 标记的抗山羊、抗兔、抗小鼠二抗(Cell Signaling Technology 公司,美国);Hoechst 33258(杭州碧云天生物研究所);PEA3 质粒及其空载(上海吉玛公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

mPTECs 常规培养于含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养基中,细胞置 37℃ 5%CO₂ 保湿恒温培养箱内培养,至 80%~90% 融合时,用 0.25% 胰酶+0.02% EDTA 消化后传代。将对数生长期细胞用 0.25%胰酶消化接种至 6 孔板,分为对照组(Cntl)、空载对照组(Vehi)、PEA3 过表达组(Pea3)、白蛋白造模组(Albumin)和 PEA3 处理组(Pea3+Albumin),其中空载对照组和 PEA3 过表达组分别在细胞融合达 70%~80% 时使用 Lipofectamine 2000 进行转染 PEA3 及其空载,白蛋白造模组(Albumin)和 PEA3 处理组(Pea3+Albumin)加 10 mg/mL 的白蛋白刺激诱导 24、48 h。

1.2.2 总 RNA 提取、逆转录及实时定量 PCR 检测 PEA3、E-cadherin、 α -SMA 的表达

采用 TRIzol 一步法抽提细胞总 RNA,使用 Onedrop 分光光度仪检测 RNA 浓度及纯度。取总 RNA 250 ng 逆转录成 cDNA,采用 SYBR Green real-time PCR 方法,置于 ABI PRISM 7500 荧光定量 PCR 仪中进行 PCR 扩增,采用参照基因的 $\Delta\Delta C_t$ 法计算目的基因 mRNA 的相对表达量,采用相对定量法计算各基因 mRNA 表达水平。PEA3:上游引物 5'-CCCTGAGAGGAGAAATGGTG-3',下游引物 5'-TGGGGGACAAGAGACAAAAG-3';E-cadherin:上游引物 5'-ACCCCCTGTTGGTGCTTT-3',下游引物 5'-TTCCGGCCTTGTGTCATTCT-3'; α -SMA:上游引物 5'-GACTCTCTTCCAGCCATCTTTC-3',下游引物 5'-TTCGTCGTATTTCCTGTTTGTCT-3';GAPDH:上游引物 5'-GTCTTCACTACCATGGAGAAGG-3',下游引物 5'-TCATGGATGACCTTGGCCAG-3'。

1.2.3 Western blot 检测 E-cadherin、 α -SMA 及 Vimentin 蛋白水平

裂解液提取总蛋白,取等量蛋白样品,使用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳至溴酚蓝指示剂至分离胶底部,湿转至 PVDF 膜。50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别用抗 E-cadherin 一抗(1:1 000)、抗 α -SMA 一抗(1:1 000)、抗 Vimentin 一抗(1:1 000)、抗 β -actin 一抗(1:1 000)4℃ 孵育过夜,PBS 洗膜 10 min \times 3 次。以辣根过氧化物酶标记的二抗 IgG(1:4 000)室温孵育 1 h,PBST 洗膜 10 min \times 3 次,使用电化学发光剂法显色,紫外显影仪显影并定量分析条带的光密度值。

1.2.4 流式细胞检测凋亡

收集上述接种于 6 孔板的各组细胞上清于对应的 10 mL 离心管中,每孔加 1 mL PBS 洗涤后收集到对应的离心管中,加胰酶消化后每孔加 1 mL 完全培养基终止消化并吹下细胞加入对应的离心管。离心并收集细胞,加入缓冲液重悬细胞使其密度调整到约 1×10^6 个/mL,加入 5 μ L FITC-Annexin V 及 PI,混匀并于室温(25℃)避光反应 15 min,立即使用流式细胞仪(BD 公司,美国)检测细胞凋亡。

1.2.5 Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡

取洁净盖玻片在 70%乙醇中浸泡 5 min 或更长时间,无菌超净台内吹干后置于 6 孔板中种入细胞,按上述分组刺激细胞后,吸净培养基,加入 0.5 mL 固定液,固定 10 min,去除固定液,用 PBS 洗 3 min \times 2 次,加入 0.5 mL Hoechst 33258 染色液,染色 5 min,

用 PBS 洗 3 min×2 次,滴加抗荧光淬灭剂于载玻片上,盖上贴有细胞的盖玻片,让细胞接触封片液,尽量避免气泡。荧光显微镜观察,激发波长 350 nm,发射波长 460 nm。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件,两组样本比较采用 *t* 检验,多组样本比较采用单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 白蛋白诱导肾小管上皮细胞凋亡及间充质转分化

流式细胞术及 Hoechst 33258 染色检测肾小管上皮细胞凋亡,和对照组相比,白蛋白刺激(10 mg/mL)可使肾小管上皮细胞凋亡显著增多($P < 0.01$,图1)。白蛋白刺激组肾小管上皮细胞标志 E-cadherin mRNA 及蛋白表达均显著下降,成纤维细胞标志 α -SMA 及 Vimentin mRNA 及蛋白表达明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$,图 2、3)。

2.2 PEA3 过表达抑制白蛋白诱导的肾小管上皮细胞凋亡

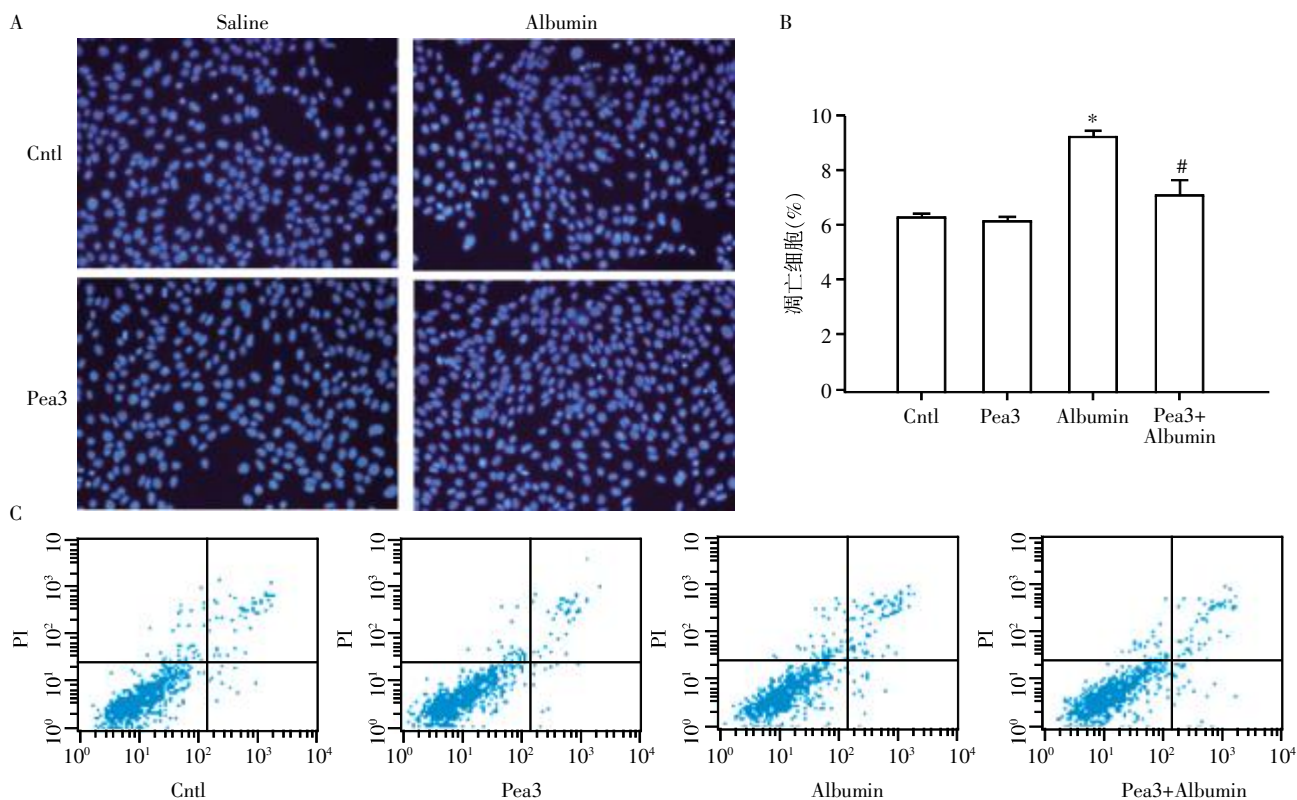
首先检测了肾小管上皮细胞转染 PEA3 后,PEA3 的表达水平。结果显示,转染 PEA3 后肾小管上皮细胞中 PEA3 表达显著增加,是对照组的 2.5 倍 ($P < 0.05$)。随后应用流式细胞术及 Hoechst 33258 染色检测肾小管上皮细胞凋亡。研究发现,白蛋白刺激显著增加肾小管上皮细胞凋亡,PEA3 过表达则显著抑制白蛋白诱导的肾小管上皮细胞凋亡(图 1)。

2.3 PEA3 过表达抑制白蛋白诱导的肾小管上皮细胞间充质转分化

应用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 EMT 相关指标,结果显示,白蛋白刺激后肾小管上皮细胞中 E-cadherin 表达显著下降而 α -SMA 和 Vimentin 显著增加,表明白蛋白诱导了肾小管上皮细胞表型转化。PEA3 过表达明显阻断了白蛋白对 E-cadherin 表达的抑制作用以及上调 α -SMA 及 Vimentin 表达的作用,表明 PEA3 可阻断白蛋白诱导的肾小管上皮细胞间充质转分化(图 2、3)。

3 讨 论

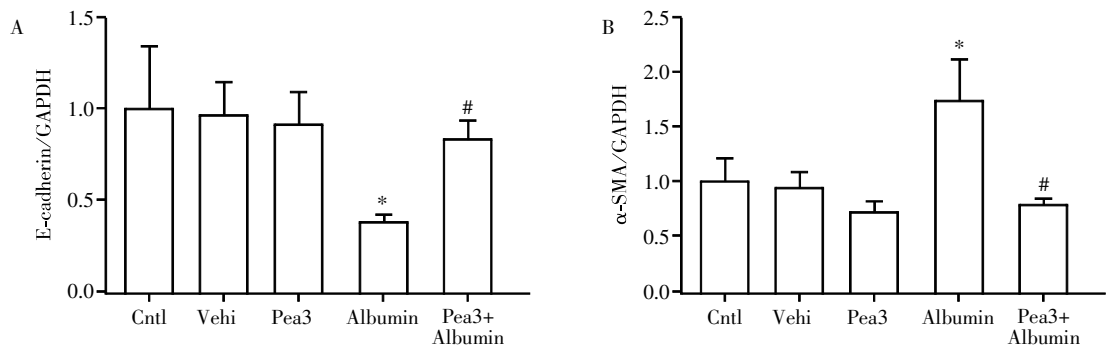
蛋白尿是多种肾脏疾病的共同临床表现,研究



A: Hoechst 33258 检测细胞凋亡($\times 200$)。B、C:流式细胞术检测凋亡水平,与 Cntl 组比较,* $P < 0.05$;与 Albumin 组比较,# $P < 0.05$ ($n=4$)。

图 1 PEA3 过表达阻断白蛋白诱导的近端肾小管上皮细胞凋亡

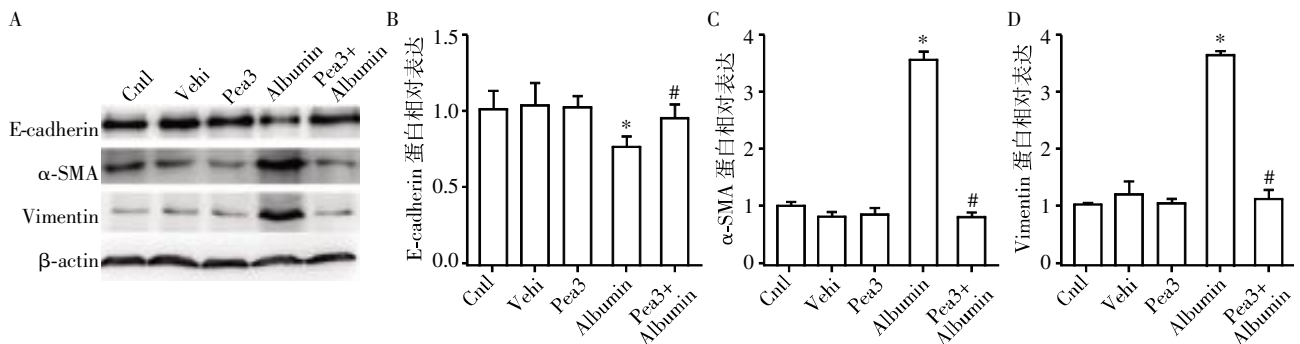
Figure 1 PEA3 overexpression inhibited albumin-induced apoptosis of mouse renal proximal tubular cells



与 Cntl 组比较, * $P < 0.05$; 与 Albumin 组比较, # $P < 0.05$ (n=4)。

图 2 PEA3 过表达对 E-cadherin(A) 和 α -SMA(B) mRNA 表达的影响

Figure 2 mRNA level of E-cadherin(A) and α -SMA(B) of mPTCs after PEA3 overexpression



A: E-cadherin, α -SMA 和 Vimentin 的蛋白表达。B、C、D: 定量分析条带的光密度值, 与 Cntl 组比较, * $P < 0.05$; 与 Albumin 组比较, # $P < 0.05$ (n=4)。

图 3 PEA3 过表达对 E-cadherin、 α -SMA 和 Vimentin 蛋白表达的影响

Figure 3 Protein level of E-cadherin, α -SMA and Vimentin after PEA3 overexpression

证实不管肾脏疾病的类型, 蛋白尿都是影响其病情进展和预后的重要危险因素^[4-5]。在过去几十年中, 已有众多文献报道蛋白尿损伤肾脏的机制, 如白蛋白可引起肾小管上皮细胞表型转变以及白蛋白可通过 PKC- δ 调控细胞凋亡^[6]。目前认为蛋白尿首先损伤肾小管间质, 进而导致肾小球功能障碍, 促进肾脏疾病的进展。白蛋白是尿蛋白中的最主要成分, 研究发现, 大量白蛋白对肾小管上皮细胞具有直接损害作用, 使用含大量白蛋白的培养基进行体外肾小管上皮细胞的培养, 可诱导肾小管上皮细胞的增殖或凋亡^[7]。因此研究蛋白尿导致肾脏损害的作用机制对保护肾功能、延缓肾脏疾病的发展具有重要意义。本研究观察到, 白蛋白刺激在 mRNA 水平以及蛋白水平均能显著下调肾小管上皮细胞 E-cadherin 的表达, 上调 α -SMA 和 Vimentin 的表达, 促进肾小管上皮细胞的间充质转分化, 使其具有成纤维细胞特征, 同时白蛋白处理后肾小管上皮细胞的凋亡率显著增加。验证了文献报道的白蛋白可以诱导肾小管上皮细胞间充质转分化和凋亡, 并且在白蛋白诱导肾小管上皮细胞损伤过程中凋亡

与表型改变并存, 再次说明蛋白尿不但是肾小球损伤的结果, 而且是肾损伤进展的重要因素。

间充质转分化是导致肾小管间质纤维化的中心环节^[8], 文献报道白蛋白可以诱导肾小管上皮细胞间充质转分化^[9]和凋亡^[6], 并且在白蛋白诱导肾小管上皮细胞损伤过程中凋亡与表型改变并存, 因此探索间充质转分化在肾脏疾病中发挥的作用及机制非常有必要。本研究从体外细胞模型检测了白蛋白刺激后的 EMT 相关指标, 发现白蛋白可刺激肾小管上皮细胞发生表型转变, 由上皮表型分化为间充质表型, 引起小管上皮细胞凋亡率增加, 因此推测白蛋白可通过诱导肾小管上皮细胞间充质转分化和凋亡而造成肾小管间质损伤, 最终导致肾小管间质纤维化的发生。肾间质纤维化是肾脏疾病进展到终末期肾病的共同途径和主要病理改变, 充分了解其发生的原因及机制, 找到控制纤维化的方法, 对于改善肾脏疾病患者的生存质量并延长其生存期具有重要意义。

PEA3 作为 Ets 癌基因家族成员, 在不同生物体内具有调控生长、转录、T 细胞活化和器官发育等多

种基因表达的作用^[10],Ets 家族基因与肾脏的发展以及功能有关,在组织构型、细胞分化和增殖等过程中发挥作用^[11-12],本课题组前期研究也发现其在肾脏发育以及多种肾脏病模型中有重要作用,在醛固酮模型、阿霉素模型、UUO 模型以及庆大霉素模型中表达显著增高,且表达位置主要集中于肾小管^[13-15]。结合本课题组前期研究结果,可以初步推测 PEA3 可能在肾脏纤维化中发挥作用,尤其以在小管病变中的作用较明显,但是介导了肾小管上皮细胞间充质转分化的过程,还是作为一种保护性机制阻断这一过程仍不清楚,因此本研究考察 PEA3 在肾小管上皮细胞 EMT 中的作用,通过体外转染 PEA3 上调肾小管上皮细胞中 PEA3 的表达,观察其对白蛋白诱导的小管上皮细胞间充质转分化的作用。发现高表达 PEA3 对白蛋白诱导的小鼠近端肾小管上皮细胞 EMT 具有保护作用,具体表现在与空白组相比,转染 PEA3 组 E-cadherin 的表达增高、 α -SMA 和 Vimentin 表达降低,并且显著降低了白蛋白诱导的细胞凋亡,对肾小管上皮细胞发挥保护作用。

本研究结果提示 PEA3 在白蛋白诱导的肾小管上皮细胞凋亡和间充质转分化中发挥作用,进而缓解肾脏纤维化的进展,可能是通过抑制肾小管上皮细胞凋亡和间充质转分化来实现的。虽然具体机制有待深入研究,但已能为肾脏纤维化治疗的研究提供新思路,为后续研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Eddy AA. Proteinuria and interstitial injury [J]. *Nephrol Dial Transplant*,2004,19(2):277-281
- [2] Burton C,Harris KP. The role of proteinuria in the progression of chronic renal failure [J]. *Am J Kidney Dis*,1996,27(6):765-775
- [3] D'Amico G,Bazzi C. Pathophysiology of proteinuria [J]. *Kidney Int*,2003,63(3):809-825
- [4] Brunskill NJ. Albumin signals the coming of age of proteinuric nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*,2004,15(2):504-505
- [5] Zandi-Nejad K,Eddy AA,Glasscock RJ,et al. Why is proteinuria an ominous biomarker of progressive kidney disease? [J]. *Kidney Int*,2004,66(92):S76-S89
- [6] Li X,Pabla N,W ei Q,et al. PKC-delta promotes renal tubular cell apoptosis associated with proteinuria [J]. *J Am Soc Nephrol*,2010,21(7):1115-1124
- [7] Zhuang Y,Ding G,Zhao M,et al. NLRP3 inflammasome mediates albumin-induced renal tubular injury through impaired mitochondrial function [J]. *J Biol Chem*,2014,289(36):25101-25111
- [8] 蔡闫闫,黄松明,丁 巍,等. 迷迭香酸对醛固酮诱导的人肾小管上皮细胞转分化的影响及机制研究 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2010,30(3):356-361
- [9] Yuan Y,Chen Y,Zhang P,et al. Mitochondrial dysfunction accounts for aldosterone-induced epithelial-to-mesenchymal transition of renal proximal tubular epithelial cells [J]. *Free Radic Biol Med*,2012,53(1):30-43
- [10] Kurpios NA,Sabolic NA,Shepherd TG,et al. Function of PEA3 Ets transcription factors in mammary gland development and oncogenesis [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*,2003,8(2):177-190
- [11] de Launoit Y,Baert JL,Chotteau-Lelievre A,et al. The Ets transcription factors of the PEA3 group; transcriptional regulators in metastasis [J]. *Biochim Biophys Acta*,2006,1766(1):79-87
- [12] Oh S,Shin S,Janknecht R. ETV1,4 and 5; an oncogenic subfamily of ETS transcription factors [J]. *Biochim Biophys Acta*,2012,1826(1):1-12
- [13] Chen Q,Huang S,Zhao Q,et al. Expression and function of the Ets transcription factor *pea3* during formation of zebrafish pronephros [J]. *Pediatr Nephrol*,2011,26(3):391-400
- [14] Chen Q,Xu S,Huang S,et al. Suppression subtractive hybridization analysis of gene expression during late kidney development identifies the developmentally regulated gene *rPEA3* [J]. *Nephron Exp Nephrol*,2009,111(4):e103-115
- [15] 徐颂周,黄松明,郭锡熔,等. PEA3 基因在大鼠肾脏组织不同发育时期的表达 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2006,26(2):93-95

[收稿日期] 2016-02-13