

Netrin-1 慢病毒表达载体的构建及延缓 TGF- β 诱导 HK-2 细胞上皮-间充质转化的初步研究*

白久旭 韩敬明 李 旭 王东辉 曹 宁 Δ

(沈阳军区总医院血液净化科 辽宁 沈阳 110015)

摘要 目的: 构建 netrin-1 基因的慢病毒表达载体, 初步研究 netrin-1 在肾小管纤维化的作用。方法: 将扩增的 netrin-1 表达片段克隆入 FUW 慢病毒表达载体, 鉴定重组质粒正确性。利用 HEK-293T 细胞包装慢病毒, 病毒感染人肾小管上皮 HK-2 细胞, Western blot 检测重组病毒 netrin-1 在真核细胞内表达表达; TGF- β 刺激过表达 netrin-1 的 HK-2 细胞, 利用 Western blot 检测其纤维化指标的变化。结果: FUW-netrin-1 慢病毒表达载体测序正确, 并在感染病毒的细胞中检测出特异性条带, TGF- β 刺激感染 netrin-1 慢病毒 HK-2 细胞的 E-cadherin 的下降水平比未感染病毒组低。结论: 成功构建了 netrin-1 的慢病毒表达载体, 发现 netrin-1 可能延缓肾小管上皮细胞发生纤维化。

关键词 Netrin-1; TGF- β ; 肾小管上皮细胞; 上皮-间充质转化

中图分类号 Q75, Q78, R692 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)27-5234-04

Construction of Lentiviral Vector with Netrin-1 Gene and Attenuates EMT of HK-2 Cells that is Induced by TGF- β *

BAI Jiu-xu, HAN Jing-ming, LI Xu, WANG Dong-hui, CAO Ning Δ

(Department of blood purification General Hospital of Shenyang Military Area Command, Shenyang, Liaoning, 110015, China)

ABSTRACT Objective: To construct a lentiviral vector expressing Netrin-1 gene, and to investigate the effect of netrin-1 on the process of renal tubule fibrosis. **Methods:** The gene fragment of netrin-1 was cloned into lentiviral vector FUW. Then the recombinant plasmid was confirmed by sequencing. The recombinant lentivirus was packaged in HEK-293T cells, and the expression of netrin-1 in HK-2 cells was determined by Western blotting. The expression of fibrosis markers in HK-2 cells treated with TGF- β was investigated. **Results:** The recombinant plasmid FUW-netrin-1 was constructed and identified. The expression of netrin-1 in HK-2 cells was detected by Western blotting. The loss of E-cadherin expression decreased significantly in the HK-2 cells infected by netrin-1 virus particle after TGF- β treatment compared with control group uninfected with netrin-1 virus. **Conclusion:** The lentivirus vector FUW-netrin-1 has been constructed successfully, and netrin-1 may attenuate the progression of renal tubule fibrosis.

Key words: Netrin-1; TGF- β ; HK-2 cell; EMT

Chinese Library Classification: Q75, Q78, R692 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)27-5234-04

前言

慢性肾脏病主要是由肾脏组织的纤维化进展而成, 肾纤维化是一个复杂的过程, 由多种类型的细胞和途径参与, 最终导致了结构和功能的改变。研究证实肾小管上皮间充质转变 (EMT) 是肾间质纤维化发生的关键事件^[1]。EMT 是指上皮细胞在特定的生理和病理情况下向间充质细胞转分化的现象。EMT 过程中的细胞失去了内皮细胞的特性获得了间充质细胞的特性, 包括波形蛋白改变和细胞形态的变化^[1,2]。转化生长因子 TGF- β 能够诱导正常细胞发生形态的改变以及 EMT 特征的出现, 近年来研究发现 TGF- β 参与包括肾小管恶化等 CKD 发展的多种进程^[3]。Netrin-1 是与层粘连蛋白相关的、高度保守的小分子分泌蛋白家族成员, netrin-1 在细胞迁移和轴突导向活动

中具有重要的作用^[4,5]。近年来通过体内和体外实验证实 netrin-1 在血管新生、细胞迁移、组织形态发生以及炎症反应调节等方面发挥了重要的作用^[6,7]。已经有研究发现 netrin-1 能够通过抑制凋亡来保护缺血再灌注损伤的肾脏组织^[8]。但是鲜有关于 netrin-1 能否延缓肾纤维化进展的报道。本研究首先构建 netrin-1 的慢病毒表达载体, 并且初步研究 netrin-1 延缓 TGF- β 诱导肾小管上皮细胞 EMT 的进展。

1 材料和方法

1.1 材料

E.coli DH5 α (本实验室保存)、高保真酶 PRIME STAR、T4 DNA 连接酶 (Takara 公司), 限制性内切酶 BamH I 和 EcoR I (TaKaRa 公司), 柱式质粒 (小量) 纯化试剂盒, 柱式胶回收试剂

* 基金项目 辽宁省科技攻关课题 (2010225036)

作者简介: 白久旭 (1985-) 男, 硕士, 医师, 主要研究方向: 肾脏纤维化的分子机制研究, 电话: 024-28851193, E-mail: baijiuxu@yahoo.com.cn

Δ 通讯作者: 曹宁, 电话: 024-28851193, E-mail: cn88860068@sohu.com

(收稿日期: 2012-04-05 接受日期: 2012-05-01)

盒(axygen 公司),脂质体 Lipofectamine2000(Invitrogen 公司), HEK-293T 细胞、人肾小管上皮细胞 HK-2 细胞(本实验室保存),DMEM 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(FBS)(杭州四季青生物工程材料有限公司)。PGNET1-netrin-1 质粒由法国 Patrick Mehlen 教授惠赠。FUW/ Δ 8.9/VSVG 质粒慢病毒表达载体购于美国 addgene。羊抗鸡 Netrin-1 多克隆抗体购自 R&D 公司,HRP 标记的兔抗羊 IgG 购自北京中杉金桥公司。TGF- β 购于 R&D 公司。

1.2 实验方法与步骤

1.2.1 引物设计和 PCR 扩增 Netrin-1 基因 根据 GenBank 数据库 netrin-1 (L34549.1) 序列设计上下游引物分别是: 5'-GGATCCATGCCGCGGAGGGGCGCGGA-3' 和 5'-GAATTCCTACGCTTCTCTACACTTC。以质粒 PGNET1-netrin-1 为模板扩增 Netrin-1 编码序列,反应条件为:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 2 min,共 30 个循环,72℃ 延伸 10 min。行 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,并对 PCR 产物回收纯化。扩增产物经 BamH I 和 EcoR I 双酶切后,在 1%琼脂糖凝胶上电泳,并用胶回收产物试剂盒回收,插入慢病毒表达载体 FUW 的相应位点。该质粒命名为 FUW-netrin-1,通过 BamH I 和 EcoR I 双酶切将鉴定正确的质粒送上海生工 DNA 测序。

1.2.2 netrin-1 慢病毒包装、病毒液的制备及滴度测定 取对数生长期 HEK-293T 细胞接种在 10 cm 板内,待细胞融合 70%时进行转染。分别将 FUW/ Δ 8.9/VSVG 质粒(5 μ g/3.75 μ g/2.5

μ g) 和 Lipofectamine 2000 脂质体试剂 30 μ L 分别稀释至 250 μ L Opti-MEM 培养基,轻轻混匀,室温 5 min 后将两管稀释液混合,室温静置 20 min,加入 10 cm 板内,37℃ 孵育 8 h 后更换成 DMEM 培养基。分别于 24 小时、48 小时后收取细胞培养液上清,离心收集病毒液。利用 NIH3T3 细胞测定病毒滴度。

1.2.3 免疫印迹分析 (Western blot) 用 RIPA 裂解液收取蛋白样品,加入 5 $\times$ loading buffer,煮沸 10 min,进行 SDS-PAGE 蛋白电泳,利用半干转膜仪将蛋白转移至 NC 膜,将 NC 膜用 5%的脱脂奶粉室温封闭 1 h, PBST 洗膜三次,每次 5 min,5%BSA 稀释 netrin-1 抗体,4℃ 孵育过夜, PBST 洗三次,每次 10 min;用 5%脱脂奶粉稀释二抗,室温孵育 1 h, PBST 洗三次,每次 10 min;加发光液体用 Multimage light cabinet alphascreen TM 1220 凝胶成像系统扫描成像。

2 结果

2.1 Netrin-1 DNA 表达片段的扩增

将带有鸡的 netrin-1 表达序列的质粒 PGNET1-netrin-1 为模板,PCR 扩增出大小约为 1800bp 左右的 DNA 片段,与预计的目的条带大小相符(图 1)。

2.2 慢病毒表达载体 FUW-netrin-1 的构建及鉴定

PCR 扩增产物经 BamH I 和 EcoR I 双酶切后克隆入 FUW 慢病毒表达载体。筛选阳性克隆。选取克隆提取质粒,质粒经 BamH I 和 EcoR I 双酶切,琼脂糖电泳后可见一条 1800bp 左右的 DNA 片段,与 PCR 产物大小相同(图 2)。质粒测序结果证实插入的片段为正确的 netrin-1 表达序列。

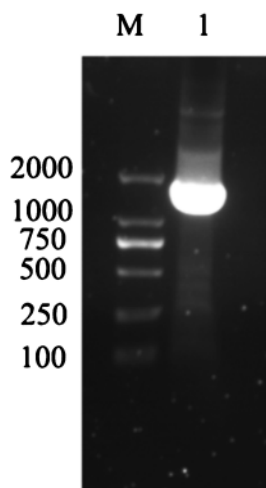


图 1 Netrin-1 基因表达序列 PCR 结果 M) DL2000 DNA Marker 1) netrin-1 基因表达序列 PCR 产物

Fig. 1 PCR result of netrin-1 CDS M)DL2000 DNA Marker ;1)Netrin-1 CDS sequence amplified by PCR

2.3 Netrin-1 慢病毒的包装、滴度测定及在真核细胞表达的鉴定

利用脂质体 Lipofectamine 2000 将构建好的慢病毒质粒 FUW-netrin-1 转染 HEK-293T 细胞,24 小时及 48 小时后收取细胞培养液上清。将培养上清离心纯化,将纯化的病毒液检测病毒滴度,测得病毒滴度为 8.5×10^4 CFU / mL。将包装好的病

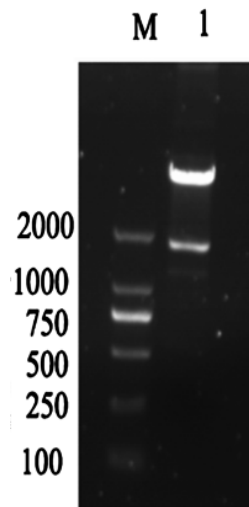


图 2 FUW-netrin-1 重组质粒经 BamH I 和 EcoR I 双酶切鉴定结果 M) DL2000Marker 1) FUW-netrin-1 重组质粒经 BamH I 和 EcoR I 双酶切

Fig. 2 BamH I and EcoR I enzyme identification of the recombinant plasmid FUW-netrin-1 M) DL2000Marker 1) Production of FUW-netrin-1 digested by BamH I and EcoR I

病毒感染 HK-2 细胞。通过 Westernblot 检测,病毒感染的细胞提取蛋白泳道可见特异性条带(图 3)。说明 Netrin-1 慢病毒在真核细胞内表达。

2.4 Netrin-1 延缓 TGF- β 诱导肾小管上皮细胞发生 EMT

将 TGF- β 刺激 HK-2 细胞,48 小时后检测 α -SMA 的蛋白表达水平,发现 TGF- β 能够上调 α -SMA 的表达(图 4)。将

Netrin-1 重组慢病毒感染 HK-2 细胞 48 小时后加入 TGF-β 刺激 ,48 小时后检测 E-cadherin 的 mRNA 和蛋白水平变化 ,发现感染 Netrin-1 病毒后 ,E-cadherin 的蛋白表达下降水平比对照组低(图 5)。

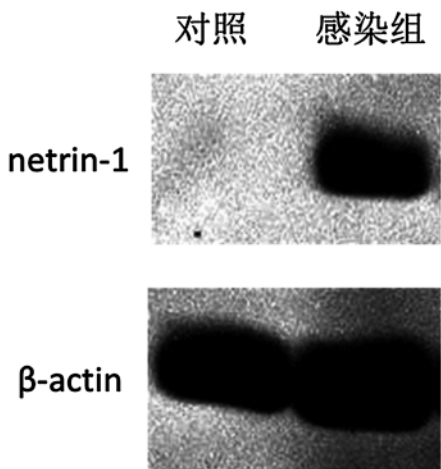


图 3 Western blot 检测 netrin-1 在 HK-2 细胞中的表达对照(Control) 未感染病毒组 感染(Infection) 感染 netrin-1 慢病毒组
Fig.3 Analyzed the expression of chicken netrin-1 protein in HK-2 cells by Western blot
Control: the group uninfected with netrin-1 virus Infection: the group infected with netrin-1 virus

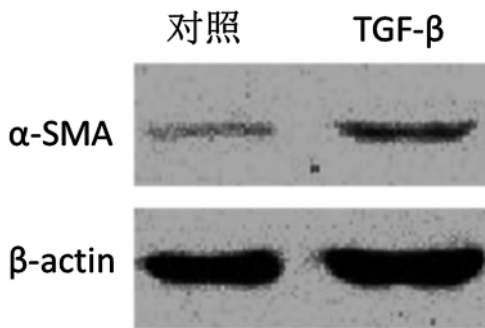


图 4 TGF-β 对 HK-2 细胞 α-SMA 蛋白表达水平的影响 对照(Control) : 未加入 TGF-β 刺激 TGF-β 加入 TGF-β 刺激
Fig. 4 Effect of TGF-β on protein expression of α-SMA in HK-2 cells
Control: untreated with TGF-β TGF-β: treated with TGF-β

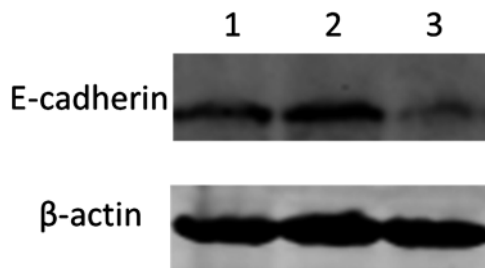


图 5 TGF-β 对感染 netrin-1 病毒 HK-2 细胞 E-cadherin 蛋白表达水平的影响 1:netrin-1 慢病毒 + TGF-β 2 对照 3:EGFP 慢病毒 +TGF-β
Fig. 5 Effect of TGF-β on protein expression of E-cadherin in HK-2 cells which were infected by netrin-1 lentivirus
1 netrin-1 lentivirus+ TGF-β 2 Control 3.TGF-β:EGFP lentivirus+TGF-β

3 讨论

肾小管 - 间质纤维化几乎是所有慢性肾脏疾病发展到后期的病理学特征 ,TGF-β、CTGF、AngII 等致纤维化作用的细胞因子和血管活性物质释放诱发了纤维化的发生^[9,10]。Strutz 等在抗小管基底膜疾病的小鼠模型中发现小管上皮细胞表达成纤维细胞特异蛋白 1(FSP1) ,因此推测 EMT 可能是肾脏纤维化形成中一个重要步骤^[11]。研究发现在单侧输尿管梗阻模型(unilateral ureteral obstruction, UUO) 中 ,有大量细胞共同表达 α-SMA 和小管标志蛋白 ,提示的确在纤维化形成过程中有小管和间质转变的存在^[12,13]。TGF-β 是公认的 EMT 诱导剂 ,它可以单独引起并完成整个 EMT 过程 ,从而导致纤维化的发生。在 EMT 过程中一些基因已经被证实能够特征的发生改变 ,转化后细胞的 α-SMA 和 Fsp1 水平会明显升高 ,这成为判断上皮细胞是否发生 EMT 的重要标志^[14,15]。研究表明 TGF-β 抑制肾小管上皮细胞 E-cadherin 的表达 ,使小管上皮细胞之间的黏附能力降低 ,小管上皮的整体结构失去了稳定性 ,进一步引起上皮细胞 α-SMA 和 MMP-2 的表达升高^[16]。Netrin-1 是对突变线虫缺陷 unc-6 基因进行基因分析而被发现 ,被命名为轴突导向因子(axon guidance factor) ,现称为神经导向因子。Netrin-1 能够调控轴突生长 ,在神经系统的发育和修复中启重要的作用。Netrin-1 在非神经组织中的作用主要表现影响上皮细胞的粘附、迁移、增殖、抗凋亡作用。它发挥不同的作用与其结合的不同受体密切相关。研究表明 netrin-1 在肾脏组织高表达 ,netrin-1 表达的缺失能够加剧急性肾损伤^[17]。如何延肾脏纤维化的发生成为近年来的研究热点。目前已发现了一些内源性抗肾脏纤维化的分子 ,能够延缓或者抑制肾脏纤维化的发生。体外培养的肾小管上皮细胞发现 BMP-7 能够中和 TGF-β 诱导的细胞信号作用 ,逆转肾脏组织 EMT 的发生 ,EMT 的逆转使肾小管的功能得到改善^[18]。研究发现 ERK 信号通路在 EMT 的进展过程中发挥重要的作用 ,应用干涉 ERK2 表达的腺病毒能够抑制肾小管上皮细胞发生 EMT ,减弱细胞的迁移能力 ,从而改善肾间质纤维化^[19]。

基因治疗有望成为治疗遗传病、肿瘤、病毒感染及其它难治性疾病的有效手段 ,以 HIV-1 为基础构建的慢病毒载体具有可感染非分裂细胞、整合目的基因至靶细胞基因长期表达、免疫反应小等优点 ,适于体内基因治疗^[20]。本研究通过构建 netrin-1 慢病毒表达载体 ,发现 netrin-1 在 TGF-β 诱导肾小管上皮细胞发生 EMT 的模型中能够减少 E-cadherin 的丢失 ,可能起到抑制肾小管上皮细胞发生 EMT 的作用。

本研究成功构建了 netrin-1 慢病毒载体 ,并且对 netrin-1 抗纤维化的功能进行了初步的研究 ,为下一步 netrin-1 的研究工作奠定了基础。

参考文献(References)

[1] Vuoriluoto K, Haugen H, Kiviluoto S, et al. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer[J]. Oncogene,2011,30(12):1436-1448
[2] Sarrio D, Rodriguez-Pinilla S M, Hardisson D, et al. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype [J]. Cancer Res,2008,68(4):989-997
[3] Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition[J]. Cell Res,2009,19(2):156-172

- [4] Murray A, Nacem A, Barnes S H, et al. Slit and Netrin-1 guide cranial motor axon pathfinding via Rho-kinase, myosin light chain kinase and myosin II[J]. *Neural Dev*,2010,5:16
- [5] Lee H K, Seo I A, Seo E, et al. Netrin-1 induces proliferation of Schwann cells through Unc5b receptor[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007,362(4):1057-1062
- [6] Wang W, Reeves W B, Ramesh G. Netrin-1 increases proliferation and migration of renal proximal tubular epithelial cells via the UNC5B receptor[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*,2009,296(4):723-729
- [7] Ly N P, Komatsuzaki K, Fraser I P, et al. Netrin-1 inhibits leukocyte migration in vitro and in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2005,102(41):14729-14734
- [8] Wang W, Reeves W B, Pays L, et al. Netrin-1 overexpression protects kidney from ischemia reperfusion injury by suppressing apoptosis[J]. *Am J Pathol*,2009,175(3):1010-1018
- [9] Chen X M, Qi W, Pollock C A. CTGF and chronic kidney fibrosis[J]. *Front Biosci (Schol Ed)*,2009,1:132-141
- [10] Zhong J, Guo D, Chen C B, et al. Prevention of angiotensin II-mediated renal oxidative stress, inflammation, and fibrosis by angiotensin-converting enzyme 2[J]. *Hypertension*,2011,57(2):314-322
- [11] Strutz F, Okada H, Lo C W, et al. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1[J]. *J Cell Biol*,1995,130(2):393-405
- [12] Liu B C, Xia H L, Wu J N, et al. Influence of irbesartan on expression of ILK and its relationship with epithelial-mesenchymal transition in mice with unilateral ureteral obstruction [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007,28(11):1810-1818
- [13] Abraham A P, Ma F Y, Mulley W R, et al. Macrophage infiltration and renal damage are independent of matrix metalloproteinase 12 in the obstructed kidney[J]. *Nephrology (Carlton)*,2012,17(4):322-329
- [14] Shin H W, Cho K, Kim D W, et al. Hypoxia-inducible Factor 1 Mediates Nasal Polypogenesis by Inducing Epithelial-to-Mesenchymal Transition[J]. *Am J Respir Crit Care Med*,2012,185(9):944-954
- [15] Samejima K, Nakatani K, Suzuki D, et al. Clinical significance of fibroblast-specific protein-1 expression on podocytes in patients with focal segmental glomerulosclerosis [J]. *Nephron Clin Pract*,2011,120(1):c1-7
- [16] Xiong M, Jiang L, Zhou Y, et al. The miR-200 family regulates TGF-beta1-induced renal tubular epithelial to mesenchymal transition through Smad pathway by targeting ZEB1 and ZEB2 expression[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*,2012,302(3):F369-379
- [17] Grenz A, Dalton J H, Bauerle J D, et al. Partial netrin-1 deficiency aggravates acute kidney injury[J]. *PLoS One*,2011,6(5):e14812
- [18] Xu Y, Wan J, Jiang D, et al. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells[J]. *J Nephrol*,2009,22(3):403-410
- [19] 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 [J]. *Transpl Immunol*,2011,25(1):34-41
- [20] Cartier N, Haccin-Bey-Abina S, Von Kalle C, et al. Gene therapy of x-linked adrenoleukodystrophy using hematopoietic stem cells and a lentiviral vector [J]. *Bull Acad Natl Med*,2010,194(2):255-264; discussion 264-258

(上接第 5323 页)

- [8] 边爱平, 赵倩. 腹腔镜筋膜内子宫切除术对卵巢内分泌功能的影响 [J]. *中国妇幼保健* 2005 20(24) 3272-3275
Bian Ai-ping, Zhao Qian. Intrafascial hysterectomy on ovarian endocrine function [J]. *China Maternal and Child Health*,2005,20(24): 3272-3275
- [9] 金爱红, 周霞平, 周凤珍, 等. 腹腔镜下两种手术方式子宫肌瘤剔除的比较[J]. *浙江临床医学* 2011 13(3) 271-273
Jin Ai-hong, Zhou Xia-ping, Zhou Feng-zhen, et al. Laparoscopic myomectomy two surgical methods comparison[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,2011,13(3):271-273
- [10] 孙琳, 盛修贵. 腹腔镜子宫肌瘤切除术中阻断子宫动脉对卵巢功能的影响[J]. *济宁医学院学报* 2008 31(2) :136-137
Sun Lin, Sheng Xiu-gui. Laparoscopic myomectomy in uterine artery blocking effect on ovarian function [J]. *Jining Medical College*,2008, 31(2):136-137
- [11] 石继红, 张庆, 凌开建, 等. 单、双极电凝联合应用于腹腔镜全子宫切除 136 例[J]. *中国微创外科杂志* 2011 11(3) 202-203
Shi Ji-hong, Zhang Qing, Ling Kai-jian, et al. Single, joint applied bipolar coagulation 136 cases of laparoscopic hysterectomy [J]. *Chinese Journal of Minimally Invasive Surgery*,2011,11(3):202-203
- [12] 何玉琴. 双极电凝在腹腔镜子宫切除术中的应用 [J]. *基层医学论坛* 2011 15(7) 227-228
- He Yu-qin. Bipolar coagulation in laparoscopic hysterectomy application [J]. *Medical Forum*,2011,15(7):227-228
- [13] Tulikangas PK, Smith T, Falcone T, et al. Gross and histologic characteristics of laparoscopic injuries with four different energy sources[J]. *Fertil Steril*,2011,95(4):806-810
- [14] Hemminki-Johansen R. Techniques for performing caesarean section[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*,2011,15(1):17-47
- [15] Sumiada S, Tuominen J, Irjala K, et al. Luteal function declines after laparoscopic sterilization by Hulka or Flips[J]. *Contraception*,2010,62(4):177-180
- [16] Westhof C. Tubal sterilization-safe and effective [J]. *NEJ Med*, 2000,343(24):1724-1726
- [17] Harlow BL, Missmer SA, Cramer DW, et al. Does tubal sterilization influence the subsequent risk of menorrhagia or menorrhea [J]. *Fertile Steril*, 2008,77(4):754-760
- [18] Cooper GS, Thorp JM Jr. FSH levels in relation to hysterectomy and to unilateral oophorectomy[J]. *Obstet Gynecol*,2009,94(6):969-972
- [19] Keleci S, Yilmaz B, Yasar L, et al. Ovarian reserve and ovarian stromal blood supply after tubal ligation by the Pomemy technique: comparison with controls[J]. *Gynecol Endocrinol*,2005,20(5):279-283
- [20] Gan TJ, Meyer T, Apfel CC, et al. Consensus guidelines for managing postoperative nausea and vomiting [J]. *Anesth Analg*,2008,97:62-71