

· 基础研究 ·

富含胱氨酸蛋白 61 对缺氧状态下
肾小管上皮细胞的保护作用

徐岩 国敏 董晖 刘雪梅 马瑞霞

【摘要】 目的 探讨富含胱氨酸蛋白 61 (cysteine-rich protein 61, Cyr61) 蛋白在缺氧缺血性急性肾损伤 (AKI) 中肾小管上皮细胞的表达, 对肾小管上皮细胞的保护作用及可能机制。

方法 以重组 Cyr61 慢病毒载体构建稳定表达 Cyr61 蛋白的人肾小管上皮细胞株 Cyr61-HK2。溴脱氧尿苷核素掺入法检测细胞增殖, 膜联蛋白 V 和碘化丙啶染色后流式细胞仪分析细胞凋亡, Western 印迹检测 BAD、Akt 和 ERK 蛋白水平。结果 (1) 与野生型 HK2 细胞相比, 缺氧状态下 Cyr61-HK2 细胞的增殖能力更强; (2) 缺氧状态下, 野生型 HK2 细胞和 Cyr61-HK2 细胞的凋亡都随时间延长而增加, 但与野生型 HK2 细胞相比, Cyr61-HK2 细胞的凋亡减少; (3) 与野生型 HK2 细胞相比, Cyr61-HK2 在细胞缺氧 0 h、0.5 h、1 h 时的磷酸化 BAD、磷酸化 Akt 和磷酸化 ERK 均增强, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。结论 缺氧状态下 Cyr61 蛋白能够促进肾小管上皮细胞增殖, 抑制凋亡, Akt/ERK 途径可能参与了 Cyr61 的抗凋亡作用。

【关键词】 缺氧; 细胞凋亡; 急性肾损伤; 富含胱氨酸蛋白 61

The protection effect of cysteine rich - protein 61 on renal tubular epithelial cells against apoptosis induced by hypoxia Xu Yan, Guo Min, Dong Hui, Liu Xuemei, Ma Ruixia. Department of Nephrology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, China
Corresponding author: Xu Yan, Email: xuyanqyfy@126.com

【Abstract】 **Objective** To observe the expression of cysteine rich-protein 61 (Cyr61) on renal tubular cells, to explore its effects against hypoxic induced kidney injury and the underlying mechanisms. **Methods** A stably Cyr61 expressed tubular cell line Cyr61-HK2 was established based on HK2 cells and recombinant Cyr61-lentivirus. BrdU incorporation assay was used for cell proliferation. The apoptosis of cells was analyzed by flow cytometry with Annexin V and propidium iodide staining. Western blotting was used to detect the protein expression of BAD, Akt and ERK. **Results** (1) Cyr61-HK2 cells displayed more proliferation ability than HK2 cells. (2) Under hypoxia condition, the apoptosis of both HK2 and Cyr61-HK2 cells increased, but the apoptosis of Cyr61-HK2 cells was lesser than HK2 cells. (3) The expression of Cyr61 led to the phosphorylation of BAD, Akt and ERK on 0 h, 0.5 h, 1 h (all $P < 0.05$). **Conclusion** The expression of Cyr61 can promote cell proliferation and dampen cell apoptosis induced by hypoxia, which may be involved in the Akt/ERK signal pathway.

【Key words】 Anoxia; Apoptosis; Acute kidney injury; Cysteine-rich 61

急性肾损伤 (AKI) 是临床常见的综合征, 缺血是 AKI 最常见的原因^[1]。富含胱氨酸蛋白 61

(cysteine rich-protein 61, Cyr61) 是一种富含半胱氨酸的具有肝素结合活性的分泌蛋白, 作为基质相关信号分子^[2], 它在细胞增殖、迁移和信号转导中发挥多种功能^[3-5]。最近有报道发现在乳腺癌细胞 MCF-7 中表达 Cyr61 可以使细胞抵抗紫杉醇诱导的细胞凋亡^[6]; 也有研究证实 Cyr61 通过激活 PI3K/Akt 通路和整合素/NF- κ B/XIAP 信号通路发

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2015.06.009

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81170688、81470973); 山东省自然科学基金 (ZR2011HM053)

作者单位: 266000 青岛, 青岛大学附属医院肾内科

通信作者: 徐岩, Email: xuyanqyfy@126.com

挥抑制化疗药物诱导的人乳腺癌 MCF-7 细胞的凋亡的作用^[7]。有研究显示在缺氧缺血性肾损伤中, Cyr61 在缺血肾脏组织中早期高表达^[8], 而正常组织中检测不到^[9]。因此, 我们拟通过构建稳定表达 Cyr61 的肾小管细胞株 Cyr61-HK2, 来研究 Cyr61 对缺氧性 AKI 肾小管细胞的保护作用及可能机制。

材料和方法

一、研究材料

肌动蛋白(actin)抗体、细胞外调节蛋白激酶(ERK)抗体和磷酸化 ERK(p-ERK)抗体购自美国 CST, BCL2 相关死亡促进因子(BAD)抗体、磷酸化 BAD(p-BAD)抗体、蛋白激酶 B(Akt)抗体和磷酸化 Akt(p-Akt)抗体购自美国 Abcam。质粒 pCDH-GFP、psPAX2 和 pMD2.G 购自美国 System Biosciences。

二、研究方法

1. 细胞培养: 人近端小管上皮细胞 HK2 细胞株购自美国 ATCC, 以含 10% 胎牛血清、 1×10^5 单位/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基培养。以 1% O₂、5% CO₂、94% N₂ 进行细胞的缺氧培养。

2. 重组慢病毒载体转染 HK2 细胞: 全长 Cyr61 基因通过 PCR 从 cDNA 文库中扩增(Cyr61 基因序列来自 NCBI, NM_001554), 克隆至 pCDH-GFP 质粒中, 构建 pCDH-Cyr61-GFP 重组载体。将 pCDH-Cyr61-GFP、psPAX2 和 pMD2.G 三种质粒混合(按 4:3:1 比例混合)转染 HK2 细胞, 在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白(GFP)表达情况。

3. 流式细胞仪检测细胞凋亡: 膜联蛋白 V(Annexin V)和碘化丙啶(PI)染色(美国 Invitrogen), 4℃ 预冷的 PBS 清洗, 重悬细胞, 调整细胞悬液浓度为 1×10^6 个/L。取 100 μ l 细胞悬液, 加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 1 μ l 0.1 g/L 的 PI, 室温孵育 15 min, 加入 400 μ l PBS, 进行流式细胞仪检测。

4. 溴脱氧尿苷(BrdU)核素掺入法检测细胞增殖: 细胞用 BrdU(美国 Sigma)孵育 2 h, 加入 BrdU 抗体(1:1000)4℃ 孵育过夜, 加入 Alexa Fluor[®]染料(美国 Invitrogen, 1:200), 激光共聚焦显微镜观察, 以 BrdU/DAPI 比值($\bar{x} \pm s$, $n=3$)半定量

分析荧光强度。

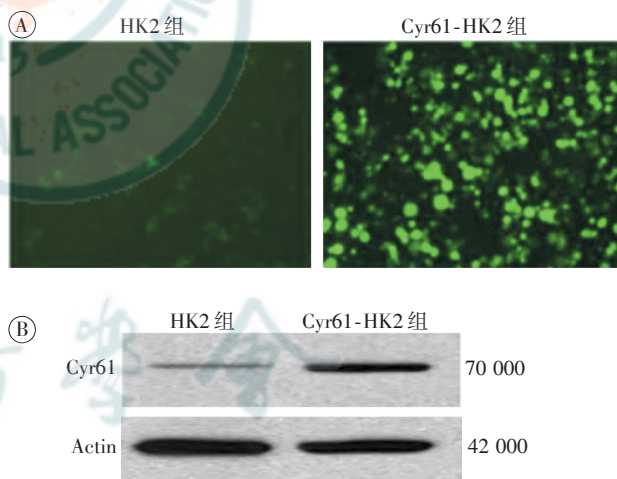
5. Western 印迹检测蛋白表达: 收集细胞, 用含蛋白酶抑制剂的裂解液裂解, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将蛋白转移至硝酸纤维素膜, 用 5% 脱脂牛奶封闭 30 min, 一抗(1:1000 稀释)4℃ 孵育过夜, 辣根过氧化物酶标记的二抗孵育, 化学发光试剂盒(美国 Pierce)显影。凝胶图像处理系统(上海鸥翔科学仪器有限公司)检测 Western 印迹条带, 计算其灰度值。

三、统计分析

用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

结 果

1. Cyr61-HK2 细胞株构建成功: 重组慢病毒载体转染 HK2 细胞后, GFP 表达显示, 超过 95% 的 Cyr61-HK2 细胞表达 Cyr61; Western 印迹结果也显示 Cyr61 在 Cyr61-HK2 细胞中高表达, 见图 1。

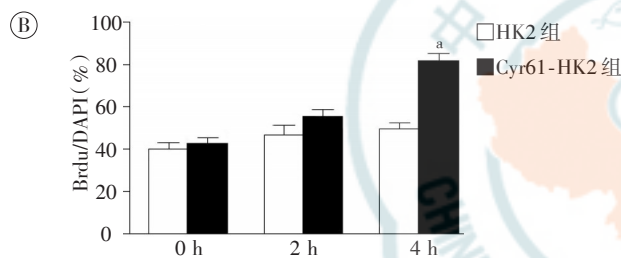
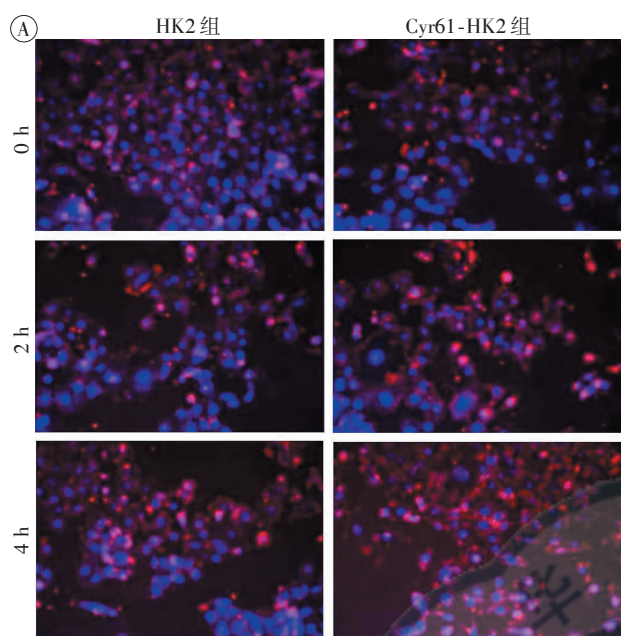


注: A: GFP 标记的 Cyr61 蛋白的表达(细胞荧光 $\times 400$); B: Cyr61 蛋白水平(Western 印迹)

图 1 Cyr61-HK2 细胞株的构建

2. Cyr61 表达促进缺氧状态下肾小管上皮细胞增殖: BrdU 核素掺入法检测细胞增殖结果显示, 与不表达 Cyr61 的 HK2 细胞相比, 表达 Cyr61 的 Cyr61-HK2 细胞增殖能力更强($P < 0.05$), 见图 2。

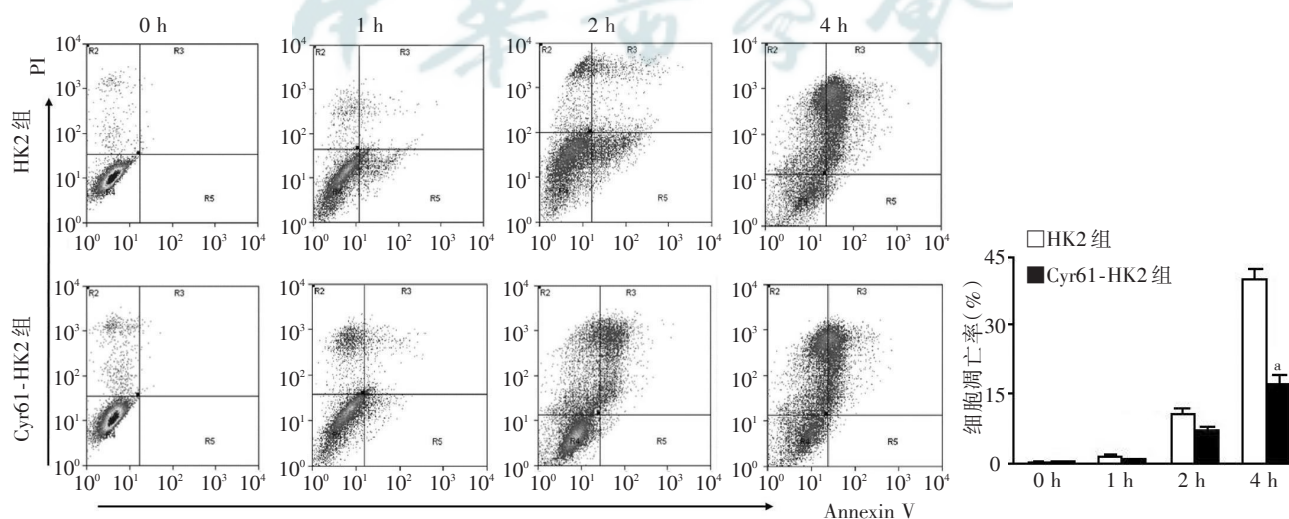
3. Cyr61 抑制缺氧状态下肾小管上皮细胞的凋亡: 在缺氧状态下, HK2 细胞和 Cyr61-HK2 细



注: A: 红色荧光为 BrdU; 蓝色荧光为 DAPI (细胞免疫荧光 $\times 400$); B: 荧光强度的半定量分析; 与 HK2 组比较, ^a $P < 0.05$; $n=3$

图2 缺氧对肾小管上皮细胞增殖的影响(BrdU核素掺入法)

胞凋亡都随时间延长而增加。缺氧培养4 h后, HK2细胞凋亡程度高达50%。但Cyr61-HK2细胞与HK2细胞相比,细胞凋亡率较低,第4 h差异有统计学意义($P < 0.05$),见图3。



注: 与 HK2 组比较, ^a $P < 0.05$; $n=3$

图3 缺氧对肾小管上皮细胞凋亡的影响(流式细胞术)

4. Cyr61 对肾小管上皮细胞信号转导的调节: 与 HK2 细胞相比, 缺氧状态下 Cyr61-HK2 细胞中 BAD 和 p-BAD 在 0 h、0.5 h、1 h 蛋白表达量增加($P < 0.01$); p-Akt 和 p-ERK 在 0h、0.5h、1h 表达显著增加($P < 0.01$), 而 Akt 和 ERK 仅分别在 1 h 和 0.5 h 表达有所增加($P < 0.05$), 见图4。而在 4 h 时与 HK2 组相比, Cyr61-HK2 组 BAD、p-BAD、Akt、p-Akt、ERK 和 p-ERK 的蛋白表达量均降低($P < 0.05$), 见图4。

讨 论

Cyr61 和结缔组织生长因子(CTGF)一样, 属于 Cyr61/CTGF/Nov (CCN) 蛋白家族, 与分泌性基质细胞蛋白结构上相关, 具有促进黏附、迁移、增殖、细胞外基质合成等多种功能^[10-11]。此外, Cyr61 能与多种整合素和硫酸类肝素蛋白多糖相互作用, 参与广泛的生物活动, 例如, Cyr61 可能通过激活胞内信号分子黏附激酶(FAK)和 p42/44 MAPKs 等刺激软骨细胞生长和分化^[5, 12]。研究显示 Cyr61 在肿瘤(如前列腺癌、乳腺癌、胃癌)发生中具有多种作用, 涉及癌细胞的存活、侵袭和转移过程^[13-17], 因此对 Cyr61 进行调节可能成为干预癌肿生长的途径。Cyr61 可能通过多种胞内信号分子如 TGF- β /Smad2/3, NF- κ B 或 MAPK 发挥作用, 提示其可能有复杂的胞内信号网络, 并与其他信号分子有广泛的相互作用。

本课题组此前研究发现缺氧可引起肾小管细胞 Cyr61 表达增加, 而氧分压正常时 HK2 细胞检

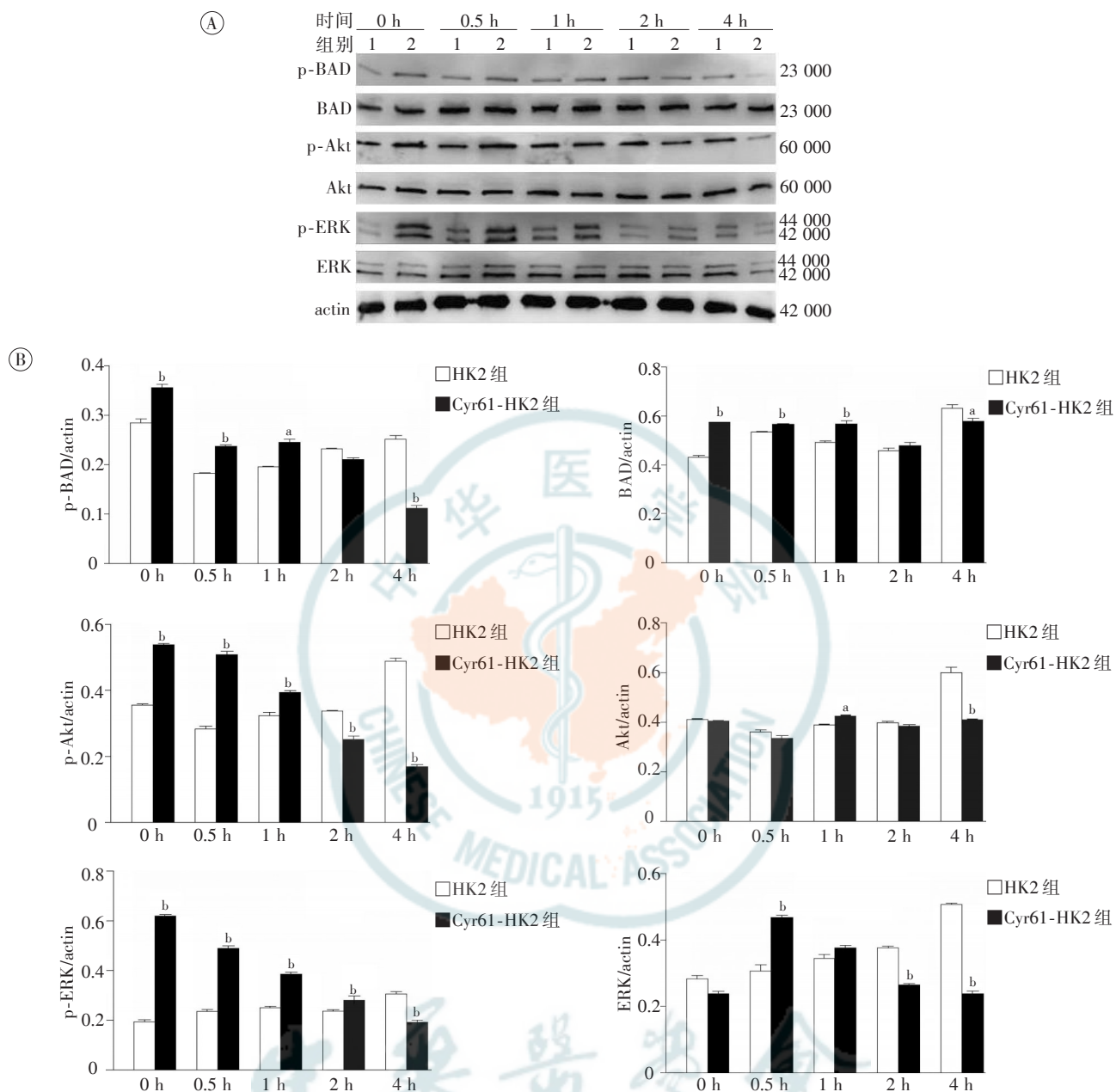


图4 缺氧状态对Akt/ERK信号通路及BAD蛋白表达的影响(Western印迹)

测不到Cyr61,与既往的国内外研究结果一致^[18,19]。

我们的研究还显示Cyr61在HK2细胞中的过表达不仅促进肾小管上皮细胞增殖,也能抑制其凋亡,提示Cyr61可能是缺氧刺激的一种保护性反馈。

在缺氧损伤诱导的细胞凋亡中,线粒体功能异常是重要的通路,而该通路与Bcl-2家族蛋白(包括BAD、Bcl-xL和Bcl-2等)有着密切关系。BAD是Bcl-2蛋白家族中的促凋亡蛋白的一员,正常生理状态下p-BAD与其分子伴侣蛋白结合

组成无活性的复合物,发挥抗凋亡效应。接受凋亡刺激后,BAD去磷酸化,并与分子伴侣蛋白解离,游离BAD从Bcl-xL-Bax二聚体中置换并释放促凋亡的Bax,促使线粒体释放CytC,引起Caspase级联反应导致细胞凋亡。我们的研究发现,缺氧0 h、0.5 h、1 h时Cyr61过表达引起p-BAD及BAD同时增强。此前我们研究显示,Cyr61对缺氧时HK2中促凋亡的Bax和抗凋亡的Bcl-2没有明显影响,说明BAD的增加没有引起Bax介导的细胞凋亡,Cyr61也不是通过诱导Bcl-2而抑制细胞凋

亡的。

进一步的研究显示,在缺氧 0 h、0.5 h、1 h 时 Cyr61-HK2 细胞中 p-Akt 及 p-ERK 表达增加, p-Akt 和 p-ERK 是强有力的 BAD 激酶, p-Akt 可以使 BAD 的 Ser136 位点磷酸化, p-ERK 可以磷酸化 BAD 的 Ser112 位点,有效阻断 BAD 诱导的细胞凋亡。以上结果提示 Cyr61 可能通过磷酸化 Akt/ERK 途径促进 BAD 磷酸化,抑制细胞凋亡,发挥缺氧早期细胞保护作用。在实验中,我们也观察到在缺氧 4 h, Cyr61-HK2 细胞中以上信号分子都较 HK2 细胞有所下降,而增殖细胞数目总量却明显更多,细胞凋亡数目总量显著减少,可能是在 4 h 之前,尤其是缺氧 0 h、0.5 h、1 h 时 Cyr61 的抑制凋亡效应显著,虽有缺氧刺激,但细胞损伤较轻,这种保护作用得以延续,出现细胞水平与信号分子水平变化不一致。

本文发现表达 Cyr61 的 HK2 细胞在缺氧时,细胞增殖能力增强而细胞凋亡率降低,证实了 Cyr61 对缺氧性 AKI 肾小管细胞具保护作用。提示 Cyr61 可作为一种 AKI 早期干预治疗靶点, Akt/ERK 通路的激动剂可能会影响 AKI 的病程进展。

参 考 文 献

- [1] Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury[J]. Lancet, 2012, 380(9843): 756-766.
- [2] Lin MT, Chang CC, Chen ST, et al. Cyr61 expression confers resistance to apoptosis in breast cancer MCF-7 cells by a mechanism of NF-kappaB-dependent XIAP up-regulation[J]. J Biol Chem, 2004, 279(23): 24015-24023.
- [3] Kireeva ML, MO FE, Yang GP, et al. Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion[J]. Mol Cell Biol, 1996, 16(4): 1326-1334.
- [4] Wong M, Kireeva ML, Kolesnikova TV, et al. Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate-early gene, regulates chondrogenesis in mouse limb bud mesenchymal cells[J]. Dev Biol, 1997, 192(2): 492-508.
- [5] Chen CC, Chen N, Lau LF. The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts[J]. J Biol Chem, 2001, 276(13): 10443-10452.
- [6] Menéndez JA, Mehmi I, Griggs DW, et al. The angiogenic factor Cyr61 in breast cancer: molecular pathology and therapeutic perspectives[J]. Endocr Relat Cancer, 2003, 10(2): 141-152.
- [7] Noiri E, Doi K, Negishi K, et al. Urinary fatty acid-binding protein 1: an early predictive biomarker of kidney injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 296(4): F669-F679.
- [8] Muramatsu Y, Tsujie M, Kohda Y, et al. Early detection of cysteine rich protein 61 (CYR61, CCN1) in urine following renal ischemic reperfusion injury[J]. Kidney Int, 2002, 62(5): 1601-1610.
- [9] Kolesnikova TV, Lau LF. Human CYR61-mediated enhancement of bFGF-induced DNA synthesis in human umbilical vein endothelial cells[J]. Oncogene, 1998, 16(6): 747-754.
- [10] Chaqour B, Goppelt-Strube M. Mechanical regulation of the Cyr61/CCN1 and CTGF/CCN2 proteins[J]. FEBS J, 2006, 273(16): 3639-3649.
- [11] Lau LF. CCN1/CYR61: the very model of a modern matricellular protein[J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(19): 3149-3163.
- [12] Wong M, Kireeva ML, Kolesnikova TV, et al. Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate-early gene, regulates chondrogenesis in mouse limb bud mesenchymal cells[J]. Dev Biol, 1997, 192(2): 492-508.
- [13] Ahmad SS, Glatzle J, Bajaeifer K, et al. Phosphoglycerate kinase 1 as a promoter of metastasis in colon cancer[J]. Int J Oncol, 2013, 43(2): 586-590.
- [14] Schmitz P1, Gerber U, Jüngel E, et al. Cyr61/CCN1 affects the integrin-mediated migration of prostate cancer cells (PC-3) in vitro[J]. Int J Clin Pharmacol Ther, 2013, 51(1): 47-50.
- [15] Lee YJ, Lee DM, Lee SH. Production of Cyr61 protein is modulated by extracellular acidification and PI3K/Akt signaling in prostate carcinoma PC-3 cells[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 58: 169-176.
- [16] Xie H, Zhao Y, Caramuta S, et al. miR-205 expression promotes cell proliferation and migration of human cervical cancer cells[J]. PloS one, 2012, 7(10): e46990.
- [17] Eisenreich A, Zakrzewicz A, Huber K, et al. Regulation of pro-angiogenic tissue factor expression in hypoxia-induced human lung cancer cells[J]. Oncol Rep, 2013, 30(1): 462-470.
- [18] 徐岩, 梅长林, 沈学飞, 等. 缺氧时丝裂原激活蛋白激酶类对人肾小管上皮细胞富含半胱氨酸蛋白 61 基因转录活性的调控[J]. 中华肾脏病杂志, 2007, 23(3): 178-183.

(收稿日期: 2015-01-04)

(本文编辑: 王欣)