

网络出版时间: 2019-12-18 17:11 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20191217.1515.001.html>

◇基础医学研究◇

高糖刺激的巨噬细胞源外泌体对小鼠肾组织中 TGF- β 1/Smad3 通路的影响作用

黄小抗^{1,2} 朱启金¹ 吴永贵¹

摘要 目的 探讨高糖刺激的巨噬细胞源外泌体对 C57 小鼠肾组织中 TGF- β 1/Smad3 通路的影响作用。方法 动物分组为 NG-Exo 组(正常糖刺激的巨噬细胞外泌体组)、MC-Exo 组(甘露醇刺激的巨噬细胞外泌体组)、HG-Exo 组(高糖刺激的巨噬细胞外泌体组)。将不同糖刺激下巨噬细胞分泌的外泌体通过尾静脉注射到雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠体内,并于 8 周后收集尿液及肾脏标本,通过尿蛋白试剂盒检测尿蛋白排泄率,HE 染色和 PAS 染色观察肾小球系膜细胞增生和基质扩张程度,并计算系膜扩张指数。免疫组化检测小鼠肾脏内巨噬细胞 CD68 浸润及细胞外基质 IV 型胶原蛋白(Col-IV)与纤连蛋白(FN)的表达,Western blot 检测肾组织中炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和细胞外基质 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、Col-IV、FN 以及 TGF- β 1/Smad3 通路蛋白表达变化。结果 HE 染色和 PAS 染色显示 HG-Exo 组小鼠肾组织系膜增殖程度增高,系膜扩张评分明显高于 NG-Exo 组和 MC-Exo 组;免疫组化显示 HG-Exo 组小鼠肾组织中巨噬细胞 CD68 及细胞外基质 Col-IV 与 FN 表达高于 NG-Exo 组和 MC-Exo 组。Western blot 显示 HG-Exo 组小鼠肾组织中炎症因子 TNF- α 、pro-IL-1 β 、IL-1 β 与细胞外基质 α -SMA、Col-IV、FN 表达均高于 NG-Exo 组和 MC-Exo 组;且 TGF- β 1/Smad3 通路相关蛋白表达增加。结论 高糖刺激的巨噬细胞源外泌体可以引起小鼠肾组织中炎症及系膜细胞和基质的增加,其机制可能与 TGF- β 1/Smad3 信号通路激活有关。

关键词 TGF- β 1/Smad3 通路;巨噬细胞;系膜细胞;外泌体
中图分类号 R 392.11; R 334.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)01-0001-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.01.001

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最严重的并发症,并已成为终末期肾病重要的病

因之一^[1],其发病机制复杂,最主要的机制是机体内的血糖微环境导致肾小球的滤过功能受损,引起肾小球基底膜的增厚、系膜细胞的增殖以及细胞外基质的蓄积。近年越来越多的研究^[2-4]证明了炎症与 DN 的相关性,而巨噬细胞在其中起着至关重要的作用。除此之外,巨噬细胞是否具有其他的功能可以影响 DN 的发展已经成为研究热点^[5]。外泌体是一种新的细胞与细胞间交流的方式,其内包裹了蛋白、mRNA 和 microRNA(miRNA)等多种信息物质,可以通过细胞释放和细胞摄入的方式完成信息传递^[6]。已经有研究^[7]发现 DN 患者体液中的外泌体对于疾病的诊断和治疗都有着重要的作用。该研究前期在高糖共培养巨噬细胞和系膜细胞的微环境中,发现系膜细胞活化和增殖能力增加,这提示巨噬细胞可能通过某种方式影响了系膜细胞。另有文献^[8]表明,高糖环境下的肾小球内皮细胞和系膜细胞共培养体系中,内皮细胞分泌的外泌体可以通过 TGF- β 1/Smad3 信号通路促进系膜细胞的 α -平滑肌肌动蛋白(α -Smooth muscle actin, α -SMA)表达,从而促进肾小球系膜细胞增殖和细胞外基质蛋白的过度表达。在此基础上,现通过将外泌体注入小鼠体内的方法,来探究不同糖刺激条件下巨噬细胞释放的外泌体对小鼠肾组织中 TGF- β 1/Smad3 通路的影响,进一步阐明巨噬细胞对系膜细胞功能的影响作用和机制。

1 材料与方法

1.1 细胞与动物 小鼠巨噬细胞系(RAW264.7)购自中科院上海细胞库。动物购自南京大学模型动物研究所。选取体质量 20~30 g,6~8 周龄的雄性 SPF 级 C57 小鼠 60 只。小鼠饮水、饲料和垫料均通过高压灭菌后使用。本研究已通过安徽医科大学动物研究伦理委员会审查。

1.2 主要试剂与耗材 外泌体提取试剂盒、CD63 单克隆抗体(美国 SBI 公司);DMEM 培养基(以色列 Biological industries 公司);免疫组化试剂盒(PV-

2019-10-08 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81770722)

作者单位:¹ 安徽医科大学第一附属医院肾脏内科,合肥 230022

² 安庆市立医院肾内科,安庆 246003

作者简介:黄小抗,男,硕士研究生;

吴永贵,男,博士,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,

E-mail: wuyonggui@medmail.com.cn

9000) (北京中杉金桥公司);内质网伴侣蛋白(Calnexin)、转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)、Smad3、p-Smad3 单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);尿白蛋白 ELISA 试剂盒、CD68、纤连蛋白(Fibronectin, FN)、IV 型胶原蛋白(collagen-IV, Col-IV)、TSG101、 α -SMA、单克隆抗体(英国 Abcam 公司);BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞分组与培养 小鼠巨噬细胞系分为 NG 组(培养基内含 5.5 mmol/L 葡萄糖)、MC 组(培养基内含 25 mmol/L 甘露醇)和 HG 组(培养基内含 25 mmol/L 葡萄糖)培养。培养于加入 10% 胎牛血清与 0.1% 双抗(青霉素和链霉素)的 DMEM 培养基,培养箱条件为 37 °C, 5% CO₂。

1.3.2 外泌体提取与鉴定 外泌体提取:细胞上清液以 3 000 r/min 离心 15 min 去除沉淀的细胞碎片,吸出上清液转移到新的 EP 管,按 Exo Quick: 上清液 = 1 : 5 加入试剂混匀,4 °C 冰箱静置保存 12 h 后以 1 500 r/min 离心 30 min 去除上清液,沉淀即为外泌体。最后使用 200 μ l 无菌磷酸缓冲液(PBS)重悬外泌体后于 -80 °C 保存。外泌体鉴定:取出外泌体置于冰上解冻,加液枪轻轻吹匀后滴加 10 μ l 在铜网正面,滤纸吸干边缘多余液体,室温晾干后滴加 30 μ l 醋酸双氧铀染色 3 min,随后 PBS 洗涤 3 次,室温晾干后将样品置于电子显微镜(H-7700,日本 Hitachi 公司)下进行观察。

1.3.3 外泌体蛋白提取 外泌体取出后冰上解冻,加入等体积的蛋白裂解液(RIPA : PMSF = 9 : 1),加液枪轻轻吹匀后迅速置于冰上裂解 15 min,以 12 000 r/min 离心 15 min 去除沉淀,上清液即为外泌体蛋白。

1.3.4 动物分组与处理 为保持实验条件一致性,依照 C57BL/6 小鼠大小、体质量、周龄等因素,最终选取一般条件相仿的 30 只小鼠分为三组,每组为 10 只。提取不同培养条件下的巨噬细胞培养基上清中的外泌体注射到小鼠体内,并按照外泌体分组将动物分为 NG-Exo 组(正常糖刺激外泌体注射组)、MC-Exo 组(甘露醇刺激外泌体注射组)、HG-Exo 组(高糖刺激外泌体注射组);处理方法为隔天 1 次尾静脉注射,持续 8 周。

1.3.5 标本收集 取材前 1 d 将小鼠放入代谢笼,收集 24 h 尿标本后快速以 4 000 r/min 离心 30 min 弃去尿液沉渣,重新分装后保存于 -80 °C 冰箱。使

用水合氯醛腹腔注射麻醉小鼠后,使用 4 °C 预冷的生理盐水经腹主动脉插管进行灌流,观察到肾脏增大后剪断肾静脉,用纱布轻轻按摩肾脏以促进灌注完全,待肾脏颜色变白后快速取材处理。左侧肾脏置于 10% 中性福尔马林溶液中固定 24 h 后脱水包埋制成蜡块,并制成 3 μ m 的石蜡切片留作后续病理及免疫组化染色。右侧肾脏于冰上迅速分割成小块后放置冻存管内,并冻存于液氮中用作后续 Western blot 检测相关蛋白。

1.3.6 尿白蛋白排泄率(urinary albumin excretion rate, UAER)检测 ELISA 法检测小鼠尿白蛋白含量,UAER 值为尿白蛋白含量测定值与 24 h 尿量乘积。

1.3.7 病理染色 石蜡切片常规脱蜡至水后行 HE 染色和 PAS 染色并在光镜下观察。在高倍镜视野($\times 400$)下每张切片随机拍摄 10 个肾小球,依据系膜扩张与肾小球总体面积比例进行评分,并计算平均值,进行统计学处理。评分标准为:0 分(0%)、1 分(>0% ~ $\leq 25\%$)、2 分(>25% ~ $\leq 50\%$)、3 分(>50% ~ $\leq 75\%$)、4 分(>75%)。

1.3.8 免疫组化 石蜡切片常规脱蜡至水,冲洗后依次滴加 3% 的甲醇过氧化氢消除组织内源性过氧化氢酶(甲醇 : 过氧化氢 = 9 : 1),室温孵育 30 min 后冲洗,高压法修复抗原(修复液为 0.1% 柠檬酸盐缓冲液),冷却至室温后滴加 10% 山羊血清 37 °C 温箱中孵育 30 min(甩去血清即可,无需冲洗),滴加一抗孵育 CD68(1 : 200)、Col-IV(1 : 100)、FN(1 : 100),于 37 °C 温箱中 1 h,冲洗后滴加二抗孵育(辣根酶标记的山羊抗兔/小鼠 IgG),于 37 °C 温箱中 30 min,冲洗后进行 DAB 显色。在高倍镜视野($\times 400$)下每张切片随机选择 10 个肾小球,通过 ImageJ 软件分析肾小球阳性细胞数及阳性百分比,并进行统计学处理。

1.3.9 Western blot 取出适量肾组织置于冰上,迅速使用 4 °C 预冷的生理盐水进行冲洗,随后加入适量裂解液超声匀浆裂解,4 °C 离心 30 min 后去除沉淀保存上清液。留取少许上清液,通过 BCA 法检测蛋白浓度,并计算蛋白上样量。取适量蛋白,经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后电转移至 NC 膜上。转膜结束后,通过丽春红染色观察条带分布,将膜洗净后用 5% 脱脂奶粉(TBST 配置)室温封闭 2 h,洗膜后放入一抗孵育 CD63(1 : 1 000)、TSG101(1 : 1 000)、Calnexin(1 : 1 000)、FN(1 : 5 000)、Col-IV(1 : 5 000)、 α -SMA(1 : 20 000)、TGF- $\beta 1$ (1 : 1 000)、Smad3(1 : 5 000)、p-Smad3(1 : 5 000)、 β -

actin(1:3 500) 4℃孵育12 h,洗膜后放入HRP标记的二抗孵育(1:2 000),室温下孵育1 h,洗膜后用滤纸吸干多余水分,滴加ECL发光试剂,通过化学发光凝胶成像系统显影。

1.4 统计学处理 所有数据均通过SPSS 16.0软件进行统计。数据资料采用 $\bar{x} \pm s$ 的形式。方差齐性应用Levene法检验。统计学处理应用单因素方差分析(One-way ANOVA)。组间差异显著性检验应用LSD组间差异分析 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外泌体电镜及蛋白鉴定 外泌体形态:图1A可以观察到透射电镜下,外泌体表现为直径分布在50~150 nm的圆形双层膜状结构。图1B说明各组蛋白均可以表达外泌体标志物CD63与TSG101,并且不含有Calnexin,提示各组细胞上清液中提取出的外泌体中均不含有细胞成分。图1C表明标准化细胞数下,通过BCA定量法可以检测外泌体相对总蛋白含量。并且结果显示,与NG-Exo组和MC-Exo组相比,HG-Exo组中总外泌体蛋白含量增加($F = 652.843, P < 0.05$)。

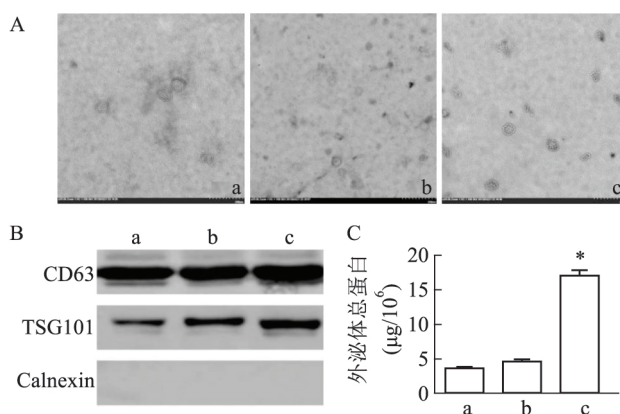


图1 外泌体电镜鉴定、外泌体蛋白

分析及标准化细胞数的BCA外泌体蛋白定量

A: 外泌体电镜鉴定 $\times 20\ 000$; B: 外泌体蛋白分析; C: 外泌体BCA定量; a: NG-Exo组; b: MC-Exo组; c: HG-Exo组; 与NG-Exo组和MC-Exo组比较: * $P < 0.05$

2.2 各组小鼠UAER比较 HG-Exo组小鼠UAER高于NG-Exo组和MC-Exo组,差异有统计学意义($F = 91.581, P < 0.05$)。见图2。

2.3 各组小鼠肾组织病理与免疫组化染色 HE染色和PAS染色结果显示,HG-Exo组中肾小球体积大于NG-Exo组与MC-Exo组,并且系膜扩张和增殖及系膜增生指数增加,差异有统计学意义($F =$

233.538, $P < 0.05$);免疫组化结果显示HG-Exo组中巨噬细胞CD68浸润多于NG-Exo组与MC-Exo组($F = 294.709, P < 0.05$);同时HG-Exo组中Col-IV与FN表达同样升高,差异有统计学意义($F_{\text{Col-IV}} = 466.773, F_{\text{FN}} = 186.358, P < 0.05$)。见图3、表1。

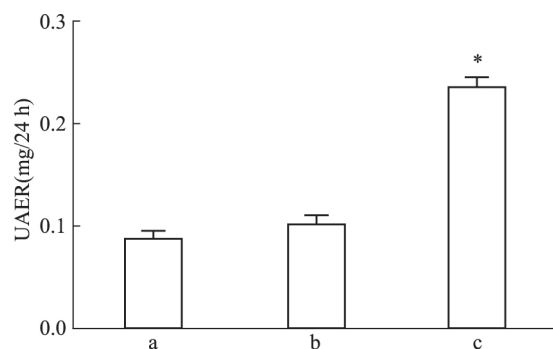


图2 各组小鼠UAER比较

a: NG-Exo组; b: MC-Exo组; c: HG-Exo组; 与NG-Exo组和MC-Exo组比较: * $P < 0.05$

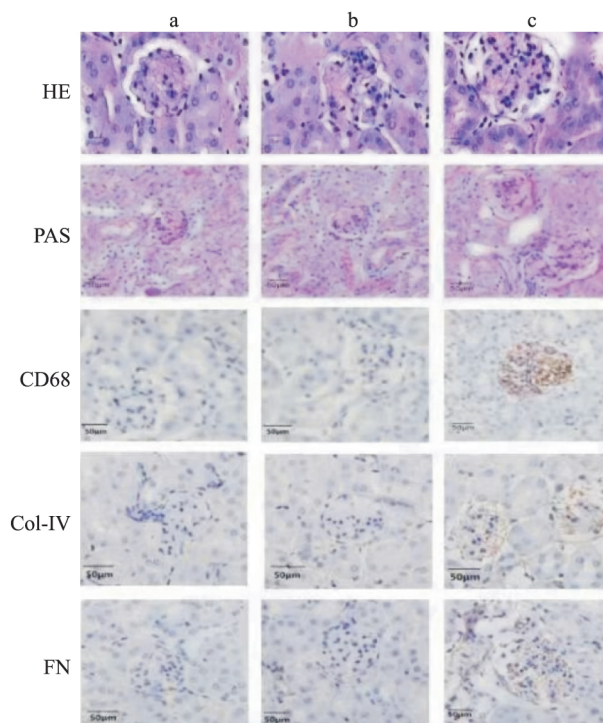


图3 各组小鼠肾组织HE、PAS染色及肾组织CD68、

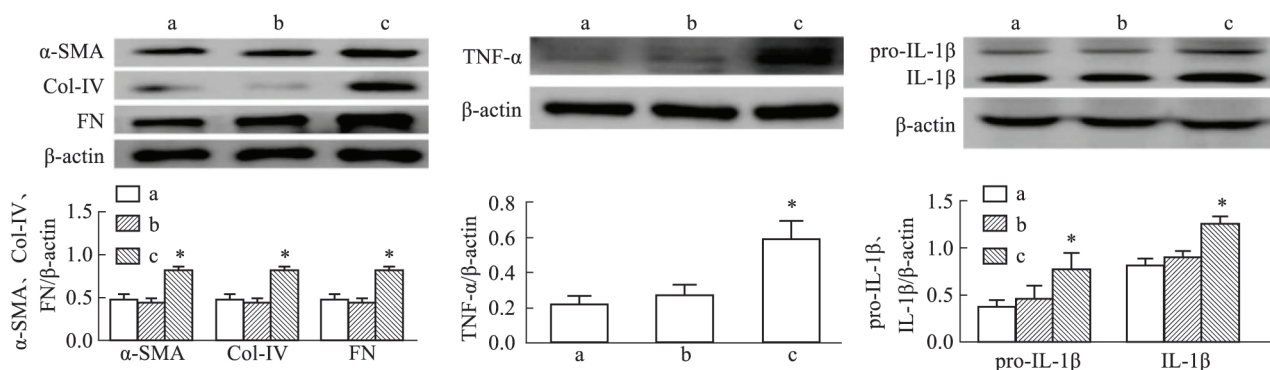
Col-IV、FN免疫组化染色 $\times 400$

a: NG-Exo组; b: MC-Exo组; c: HG-Exo组

2.4 各组小鼠肾组织TNF- α 、pro-IL-1 β 、IL-1 β 、 α -SMA、Col-IV、FN蛋白表达 Western blot结果显示,与NG-Exo组和MC-Exo组相比,HG-Exo组小鼠肾组织中炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、pro-IL-1 β 与细胞外基质 α -SMA、Col-IV、FN表达升高,并且差异有统计学意义

表1 各组小鼠系膜扩张指数及肾组织内 CD68、Col-IV 和 FN 免疫组化($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

组别	系膜扩张指数	CD68(个/球)	Col-IV(%/球)	FN(%/球)
NG-Exo 组	0.163 ± 0.119	0.500 ± 0.527	0.900 ± 0.316	0.700 ± 0.483
MC-Exo 组	0.250 ± 0.160	0.400 ± 0.516	0.900 ± 0.568	0.600 ± 0.516
HG-Exo 组	1.688 ± 0.189*	7.800 ± 1.135*	6.700 ± 0.675*	5.400 ± 0.843*

与 NG-Exo 组和 MC-Exo 组比较: * $P < 0.05$ 图4 各组小鼠肾组织 α -SMA、Col-IV、FN、TNF- α 、pro-IL-1 β 、IL-1 β 蛋白变化a: NG-Exo 组; b: MC-Exo 组; c: HG-Exo 组; 与 NG-Exo 组和 MC-Exo 组比较: * $P < 0.05$

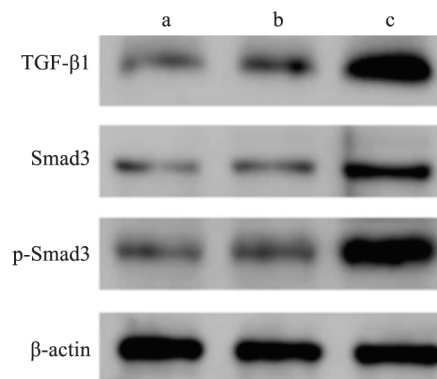
($F_{\text{TNF-}\alpha} = 28.114$, $F_{\text{IL-1}\beta} = 37.124$, $F_{\text{pro-IL-1}\beta} = 7.383$, $F_{\alpha\text{-SMA}} = 43.996$, $F_{\text{Col-IV}} = 41.624$, $F_{\text{FN}} = 54.844$, 均 $P < 0.05$)。见图4。

2.5 各组小鼠肾组织 TGF- β 1、Smad3 和 p-Smad3 蛋白表达 结果显示 HG-Exo 组小鼠肾组织中 TGF- β 1、Smad3 和 p-Smad3 的表达高于 NG-Exo 组和 MC-Exo 组 并且差异有统计学意义($F_{\text{TGF-}\beta 1} = 124.536$, $F_{\text{Smad3}} = 61.012$, $F_{\text{p-Smad3}} = 144.991$, 均 $P < 0.05$)。见图5。

3 讨论

近年来发现 TGF- β 对细胞免疫功能及在细胞生长和分化过程都具有重要的调节作用^[9]。在 TGF- β 超家族的 38 个家族成员中, TGF- β 在慢性肾脏病的发生发展中最为重要^[10]。TGF- β 具有多种亚型, 其中 TGF- β 1 与炎症的联系紧密。TGF- β 1 与受体结合后, 磷酸化下游效应因子 Smad2/3, 从而发挥相应的生物学活性, 而 TGF- β 1/Smad3 信号通路的激活与肾小球系膜细胞的活化有着密切的联系^[11]。

有文献^[12]表明, 糖尿病机体在高血糖的微环境中, 肾小球系膜细胞可以被诱导发生活化, 产生过量的 α -SMA, 进而产生过量的细胞外基质。更有研究^[13]表明, 高糖环境下共培养的巨噬细胞和系膜细胞存在相互作用, 巨噬细胞通过这种作用促进系膜细胞分泌炎症因子和细胞外基质。

图5 各组小鼠肾组织 TGF- β 1、Smad3 和 p-Smad3 蛋白水平变化a: NG-Exo 组; b: MC-Exo 组; c: HG-Exo 组; 与 NG-Exo 组和 MC-Exo 组比较: * $P < 0.05$

近年来研究^[7]发现外泌体与 DN 之间有着紧密联系。有文献^[14]提出, 高糖刺激下的系膜细胞可以释放出更多的外泌体。还有文献发现间充质干细胞可以改善糖尿病肾脏功能, 其机制可能是通过分泌外泌体来抑制炎症因子 TNF- α 表达, 从而减少系膜

基质的产生并同时改善小管间质的纤维化^[15]。因此,巨噬细胞释放的外泌体在 DN 肾组织中的作用将是另一个重要的研究方向。本研究结果显示 HG-Exo 组外泌体蛋白含量更高,这意味着高糖环境下的巨噬细胞可以释放更多的外泌体,可能携带更多的信息介质。为了进一步观察外泌体在小鼠肾组织内的影响,本研究通过尾静脉注射的方式将外泌体注入小鼠体内,检测小鼠肾组织病理学改变以及相关信号通路的表达变化,结果显示 HG-Exo 组小鼠 UAER 增加,并且可以观察到系膜细胞及基质增生以及肾组织内巨噬细胞的浸润增加,这提示高糖刺激的巨噬细胞源外泌体可以引起小鼠肾组织的病理学改变。通过进一步研究显示 HG-Exo 组小鼠肾组织内 TNF- α 、pro-IL-1 β 、IL-1 β 、 α -SMA、Col-IV、FN、TGF- β 1/Smad3 和 p-Smad3 均表达增加,提示高糖刺激巨噬细胞产生的外泌体可以引起小鼠肾组织内炎症增加、系膜细胞的活化以及细胞外基质的增加,其发生与 TGF- β 1/Smad3 通路的激活有着极其密切的联系。

综上所述,本研究结果阐述了高糖环境下巨噬细胞释放的外泌体在小鼠肾脏中的作用。在 DN 的发生发展中,巨噬细胞除了释放损伤介质导致炎症反应外,还可以通过释放更多外泌体来激活 TGF- β 1/Smad3 通路从而介导系膜细胞的活化,导致系膜细胞的增殖以及细胞外基质的累积,这项发现具有重要的临床意义,可以为 DN 的治疗提供新的思路。但本研究中外泌体作用 TGF- β 1/Smad3 通路的具体机制尚不明确,有待进一步的研究。

参考文献

- [1] Steffes M W, Osterby R, Chavers B, et al. Mesangial expansion as a central mechanism for loss of kidney function in diabetic patients[J]. *Diabetes*, 1989, 38(9): 1077-81.
- [2] Vikram A, Tripathi D N, Kumar A, et al. Oxidative stress and inflammation in diabetic complications[J]. *Int J Endocrinol*, 2014, 2014: 679754.
- [3] Tesch G H. Diabetic nephropathy is this an immune disorder[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131(16): 2183-99.
- [4] Nobuta H, Katagi M, Kume S, et al. A role for bone marrow-derived cells in diabetic nephropathy[J]. *FASEB J*, 2019, 33(3): 4067.
- [5] You H, Gao T, Cooper T K, et al. Macrophages directly mediate diabetic renal injury[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 305(12): F1719-27.
- [6] Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles[J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(6): 364-72.
- [7] Zhang W, Zhou X, Zhang H, et al. Extracellular vesicles in diagnosis and therapy of kidney diseases[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2016, 311(5): F844-51.
- [8] Wu X M, Gao Y B, Cui F Q, et al. Exosomes from high glucose-treated glomerular endothelial cells activate mesangial cells to promote renal fibrosis[J]. *Biol Open*, 2016, 5(4): 484-91.
- [9] Li M O, Flavell R A. TGF- β : a master of all T cell trades[J]. *Cell*, 2008, 134(3): 392-404.
- [10] 孟晓明, 蓝辉耀. 转化生长因子- β 与肾脏纤维化的研究进展[J]. *生理学报*, 2018, 70(6): 612-22.
- [11] Derynck R, Zhang Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signaling[J]. *Nature*, 2003, 425(6958): 577-84.
- [12] Liu H F, Liu H, Lv L L, et al. CCN3 suppresses TGF- β 1-induced extracellular matrix accumulation in human mesangial cells? in vitro[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(2): 222-9.
- [13] Fan Z, Xu X, Qi X, et al. Role of TGF- β activated kinase-1 inhibitor on the interaction between macrophages and mesangial cells on the condition of high glucose[J]. *Immunol Invest*, 2018, 47(3): 303-14.
- [14] Da Silva Novaes A, Borges F T, Maquigussa E, et al. Influence of high glucose on mesangial cell-derived exosome composition, secretion and cell communication[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 6270.
- [15] Nagaishi K, Mizue Y, Chikenji T, et al. Mesenchymal stem cell therapy ameliorates diabetic nephropathy via the paracrine effect of renal trophic factors including exosomes[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 34842.

Effect of high glucose-stimulated macrophage-derived exosomes on TGF- β 1/Smad3 pathway in mice kidney

Huang Xiaokang^{1,2}, Zhu Qijin¹, Wu Yonggui¹

(¹Dept of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Nephrology, Anqing Municipal Hospital, Anqing 246003)

Abstract Objective To investigate the effects of high glucose-stimulated macrophage-derived exosomes on TGF- β 1/Smad3 pathway in kidney tissues of C57 mice. **Methods** Macrophage-derived exosomes were injected into

网络出版时间: 2019-12-18 17:11 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20191217.1516.002.html>

TGF- β_1 体外诱导兔子宫内膜上皮细胞 EMT 模型

姚 远¹, 汪国武¹, 张 雨¹, 刘 芳²

摘要 目的 探讨转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 对兔子宫内膜上皮细胞的影响,以建立子宫内膜上皮细胞上皮间质转化 (EMT) 模型。方法 分离培养新西兰大白兔子宫内膜上皮细胞,采用不同浓度 (0、10、60、110 $\mu\text{g/L}$) 的 TGF- β_1 诱导 24 h 和 48 h,筛选 TGF- β_1 最适诱导浓度和时间,建立 EMT 模型。观察细胞形态变化,分别采用 CCK-8 检测细胞的增殖抑制,Western blot 及免疫组化检测波形蛋白 (VIM) 和 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 表达变化。结果 60 $\mu\text{g/L}$ TGF- β_1 诱导细胞 24 h 能明显抑制兔子宫内膜上皮细胞的增殖作用,改变细胞形态,降低细胞密度使其向间质样形态发展,并下调 E-cadherin 蛋白和上调 VIM 蛋白的表达。结论 60 $\mu\text{g/L}$ TGF- β_1 诱导细胞 24 h 能成功建立兔子宫内膜 EMT 模型。

关键词 转化生长因子- β_1 ; 兔子宫内膜上皮细胞; 上皮间质

转化; 宫腔黏连

中图分类号 R 711.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)01-0006-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.01.002

宫腔黏连 (intrauterine adhesion, IUA) 是子宫内膜损伤修复障碍最常见的疾病,其本质是子宫内膜纤维化修复,确切的发病机制至今尚不明确。近年研究证实, IUA 的发生与上皮间质转化 (epithelial mesenchymal, EMT) 密切相关^[1-2]。Thiery et al^[3] 提出 2 型 EMT 是大部分纤维化疾病的主要发病机制之一。TGF- β_1 是诱导 EMT 的重要因子之一,广泛用于体外诱导上皮细胞 EMT^[4-6]。项目组首次以兔子宫内膜上皮细胞为研究对象,通过 CCK-8、免疫组化、Western blot 等方法探讨 TGF- β_1 诱导兔子宫内膜上皮细胞发生 EMT 的条件,为研究 IUA 的发病机制、预防及治疗等提供一定的细胞基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 10~12 周龄雌性新西兰大白兔

male SPF-class C57BL/6 mice via the tail vein. The animals were divided into three groups: high glucose-stimulated macrophage-derived exosomes (HG-Exo), mannitol-stimulated macrophages-derived exosomes (MC-Exo), and normal glucose-stimulated macrophage-derived exosomes group (NG-Exo). The urine and kidney tissues of mice were collected after 8 weeks. The urinary protein excretion rate was detected by the urinary albumin kit. The proliferation of mesangial cells and the degree of matrix expansion was observed by HE staining and PAS staining. The infiltration of macrophages CD68 and the expression of extracellular matrix, including collagen-IV (Col-IV) and fibronectin (FN), in renal tissues were detected by immunohistochemistry. The expression of inflammatory factors TNF- α , IL-1 β and extracellular matrix α -Smooth muscle actin (α -SMA), Col-IV, FN and TGF- β_1 /Smad3 proteins in kidney tissues were detected by Western blot. **Results** It showed that the proliferation of mesangium in HG-Exo group was significantly higher than that in NG-Exo group and MC-Exo group by HE and PAS staining, and the expression of CD68, Col-IV and FN in renal tissue were also higher in the HG-Exo group by immunohistochemistry stain. The expression of inflammatory factors such as TNF- α , pro-IL-1 β , IL-1 β and extracellular matrix including α -SMA, Col-IV, FN and TGF- β_1 , Smad3 and p-Smad3 in HG-Exo group were higher than those in NG-Exo group and MC-Exo group by Western blot. **Conclusion** High glucose-stimulated macrophage-derived exosomes can cause inflammation and extracellular matrix in mouse kidney tissue, and its mechanism may be related to activation of TGF- β_1 /Smad3 signaling pathway.

Key words TGF- β_1 /Smad3 pathway; macrophage; mesangial cells; exosomes