

MDCK 细胞外基质对 HK-2 细胞的增殖和迁移的影响

袁育珺¹ 杨秀玲² 胡志坚³ 汪 渊³

摘要 目的 研究 MDCK 细胞外基质对 HK-2 细胞的增殖和迁移的影响。方法 用氨水制备 MDCK 细胞外基质,并作为 HK-2 细胞培养基础,随机分为正常对照组和细胞外基质组。用酸性磷酸酶、细胞划痕实验观察细胞的增殖和迁移状况;细胞免疫荧光和 Western blot 分析整合素 $\alpha 3$ 和 $\alpha 6$ 蛋白的表达变化。结果 与正常对照组比较,MDCK 细胞外基质能明显促进 HK-2 细胞的体外增殖和迁移,整合素 $\alpha 3$ 和 $\alpha 6$ 表达增加($P < 0.05$)。结论 MDCK 细胞外基质可促进体外培养的 HK-2 细胞的增殖和迁移。

关键词 细胞外基质;HK-2;整合素;增殖;迁移

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)02-0216-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.02.011

肾小管上皮细胞生长、移行在急性肾损伤修复,延缓糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)进展等过程中起重要作用,寻找促进肾小管上皮细胞增殖和迁移的因素或药物十分重要。整合素(integrin)是一类由 α 亚基和 β 亚基组成的异源二聚体跨膜蛋白,属细胞黏附分子家族,研究^[1]表明,其能介导细胞与细胞及细胞外基质(extracellular matrix,

ECM)之间的黏附,是细胞迁移、增殖等生理活动重要的调控因素。整合素 $\alpha 3$ 和 $\alpha 6$ 能与细胞外基质中的层黏连蛋白(Laminin, LN)结合^[2-3],影响细胞的黏附和运动^[4]。该研究采用体外培养 HK-2 细胞,运用相关分子生物学技术(如酸性磷酸酶活性、细胞划痕实验、免疫荧光、Western blot 等)分析生长于细胞外基质上的 HK-2 细胞的增殖和迁移状况以及整合素 $\alpha 3$ 和 $\alpha 6$ 蛋白表达的变化,并进一步探讨这些作用可能的分子调控机制,以开拓其在临床的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料 犬肾小管上皮细胞株 MDCK 和肾近曲小管上皮细胞株 HK-2 均购自中国科学技术大学生命科学院细胞库,于实验室液氮保存;DMEM 和原装小牛血清均购自美国 Gibco 公司;酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)活性检测试剂盒购自安徽碧云天生物试剂公司;一抗 actin、整合素 $\alpha 3$ 和 $\alpha 6$ 均购自美国 Santa Cruz 公司;二抗购自美国 Pierce 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和细胞外基质的制备 液氮取出 HK-2 和 MDCK 细胞,迅速 37 °C 循环水浴解冻,及时接种于含 10% 小牛血清 DMEM 细胞培养箱(条件:37 °C、5% CO₂、饱和湿度)培养过夜。胰酶消化传代,备用。细胞外基质制备方法如下^[5-6]:取 MDCK 细胞(细胞覆盖率 90%),弃上清液, PBS 清洗 2 遍,加入氨水(浓度为 20 mmol/L)处理 10 min,弃氨水, PBS 清洗基质 3 遍,在含或不含 MDCK 细胞外基

2018-09-12 接收

基金项目:江西省卫生计生委科技计划项目(编号:20181141)

作者单位:江西省九江学院附属医院¹ 检验科、² 院感科,九江 332000

³ 安徽医科大学分子生物学实验室、生物化学教研室、安徽省/省部共建教育部重要遗传病基因资源利用重点实验室,合肥 230032

作者简介:袁育珺,男,硕士研究生;

汪 渊,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: wan-gyuan@ahmu.edu.cn

supernatant. By using RNAi, NEAT1 was silenced in macrophages, and after H37Rv infection, the secretion of was detected, and the change of bactericidal capacity against MTB was assessed. **Results** Test results showed that the expression of NEAT1 and secretion of IL-6 were both significantly increased ($P < 0.01$). By silencing NEAT1 in macrophages, there was a significant decrease in secretion of IL-6 ($P < 0.01$), and the ability of MTB removal was significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** H37Rv infection RAW264.7 macrophages can promote NEAT1 expression, silencing NEAT1 can reduce the clearance of intracellular MTB by macrophages.

Key words *Mycobacterium tuberculosis*; lncRNA NEAT1; RAW264.7 macrophages

质上接种 HK-2 细胞,备用。分组为:正常对照组和细胞外基质组。

1.2.2 ACP 活性检测细胞增殖 按 1.2.1 事先在 96 孔板内制备细胞外基质,取对数期生长的 HK-2 细胞,胰酶消化,制成 $(1 \times 10^2) \sim (1 \times 10^5)$ /ml 细胞悬液,平均接种于含或不含基质的 96 孔板,分别设 6 复孔。连续培养 48 h 后,取出 96 孔板,弃上清液, PBS 清洗 2 遍,按照 ACP 活性检测试剂盒说明书操作,第一步:加入底物,37 °C 孵育 2 h;第二步:加终止液,室温静置 20 min;第三步:酶标仪检测 A_{405} 吸光度,实验重复 3 次。

1.2.3 细胞划痕检测细胞迁移 按 1.2.1 预先在 6 孔板内制备细胞外基质,取一瓶 HK-2 细胞(对数期生长),弃上清液, PBS 清洗 2 遍,胰酶消化,制成合适细胞悬液(5 000 个/ml),平均接种于含或不含基质的 6 孔板。待各孔细胞覆盖率 90%,弃去上清液, PBS 清洗 2 遍,用划痕笔轻轻的在各孔正中央划“十”字, PBS 清洗 3 遍(尽量洗去残留细胞),加 DMEM 做好标记并拍照。拍照分为 0、24 和 48 h,实验重复 3 次。

1.2.4 免疫荧光 6 孔板内铺上盖玻片,事先在一半玻片上铺细胞外基质,再平均接种 HK-2 细胞。待细胞覆盖率 80% 左右时,弃上清液, PBS 清洗 2 遍,4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 清洗 3 遍,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,用镊子小心取出玻片,置于载玻片上, PBS 清洗 3 遍(每遍静置 10 min,尽量洗去残留物),加入鼠抗人 $\alpha 3$ 多克隆抗体(1:40 稀释于脱脂牛奶),4 °C 孵育过夜;次日 PBS 清洗 3 遍,加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG(1:100 稀释于 PBS),孵育 2 h, PBS 清洗 3 遍,加盖玻片封片,经复聚焦显微镜(confocal microscopy)双光观察,拍照备用,实验重复 3 遍。

1.2.5 Western blot 细胞总蛋白的提取:按 1.2.1 分组,细胞培养瓶批量培养 48 h 后,弃上清液, PBS 清洗 2 遍(尽量去除残留培养基,并控干),按照本实验室蛋白提取指南^[7],方法:① 蛋白提取,培养瓶置冰上,每瓶加裂解液 150 μ l 充分裂解,细胞刮子收集细胞,低温冷冻离心,上清置于 -80 °C 备用;② BCA 测定蛋白浓度,每组加入浓缩蛋白上样缓冲液,水浴煮沸,分装备用,置于 -20 °C 保存;③ SDS-PAGE 配制 12.5% SDS-PAGE 微量加样针上样,先用 40~50 V 电泳浓缩胶,100 V 电泳分离胶,100 mA 冰浴转膜,伊利脱脂牛奶封闭, PBS 洗膜;④ 一抗结合,配置一抗浓度为抑制素 $\alpha 3$ (1:400)、 $\alpha 6$ (1:800)、actin(1:1 000),将膜置于一抗 4 °C 过

夜;⑤ 二抗结合,配置相应二抗浓度分别为 1:1 000、1:1 500、1:3 000,37 °C 孵育 2 h, PBS 洗膜 3 次;⑥ 暗室内胶片显影、定影,重复实验 3 次。结果进行统计学分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。蛋白印记灰度值采用 Image Pro 4.5 进行分析。各组间差异比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞外基质对 HK-2 细胞体外增殖的影响 ACP 结果显示:从表 1 可以看出随着接种浓度的增加,无论含或不含基质的 HK-2 细胞 ACP 活性也随之增加;且细胞外基质组 ACP 活性明显高于正常对照组,结果表明细胞外基质能促进 HK-2 细胞体外增殖(图 1)。

表 1 细胞外基质对 HK-2 细胞体外增殖的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

细胞浓度 (个)	正常对照组 (OD 值)	基质组 (OD 值)	F 值	P 值
1×10^2	0.09 ± 0.03	0.13 ± 0.05	43.21	<0.05
1×10^3	0.15 ± 0.04	0.2 ± 0.06	32.14	<0.01
1×10^4	0.31 ± 0.03	0.47 ± 0.05	57.22	<0.05
1×10^5	0.44 ± 0.04	0.64 ± 0.07	29.34	<0.01
1×10^6	0.53 ± 0.05	0.77 ± 0.04	47.22	<0.05

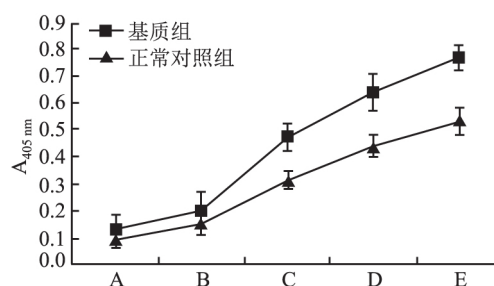


图 1 细胞外基质对 HK-2 细胞体外增殖的影响

A: 细胞浓度为 1×10^2 ; B: 细胞浓度为 1×10^3 ; C: 细胞浓度为 1×10^4 ; D: 细胞浓度为 1×10^5 ; E: 细胞浓度为 1×10^6

2.2 细胞外基质对 HK-2 细胞迁移的影响 细胞划痕结果显示:基质能明显增强 HK-2 细胞损伤愈合速度,由图 2 可以看出,无论是 24 h 或者 48 h,基质组迁移距离都明显高于正常对照组,结果表明细胞外基质能促进 HK-2 细胞迁移。见表 2。

表 2 细胞外基质对 HK-2 细胞迁移的影响($\mu\text{m}, n=6, \bar{x} \pm s$)

处理时间	正常对照组	基质组	F 值	P 值
24 h	18.3 ± 0.57	22.52 ± 1.68	58.31	<0.05
48 h	26.67 ± 0.85	32.57 ± 0.72	75.41	<0.05

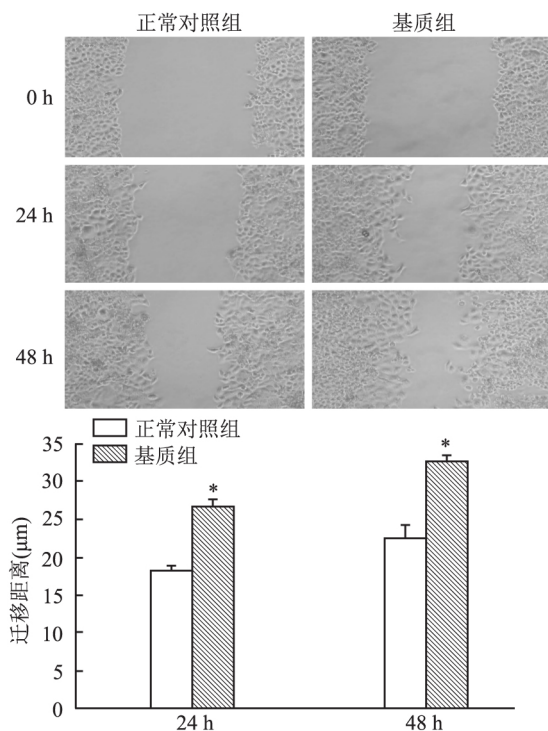


图2 细胞外基质对 HK-2 细胞迁移的影响 ×100
与正常对照组比较: * $P < 0.05$

2.3 细胞外基质对整合素 $\alpha 3$ 在细胞内表达的影响

免疫荧光结果显示:正常对照组(图 3A)细胞周围有弱的、零散的荧光,表明整合素 $\alpha 3$ 在正常 HK-2 细胞内有表达;但是由图 3B 可以看出,基质组细胞周围整合素 $\alpha 3$ 呈片状表达,而且荧光比较强。

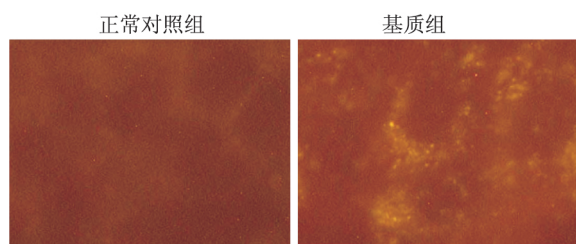


图3 细胞外基质对整合素 $\alpha 3$ 在细胞内表达的影响 ×400

2.4 细胞外基质对整合素 $\alpha 3$ 和 $\alpha 6$ 蛋白表达的影响

结果采用单因素方差分析进行主体间效应检测 ($F_{\alpha 3} = 39.54$, $F_{\alpha 6} = 57.31$, $P < 0.01$)。组间两两比较显示:与正常对照组比较,整合素 $\alpha 3$ 和 $\alpha 6$ 蛋白表达明显增加,见图 4。

3 讨论

DN 是常见的糖尿病并发症,近些年的发病率呈逐年上升趋势,已成为引起糖尿病患者死亡的主

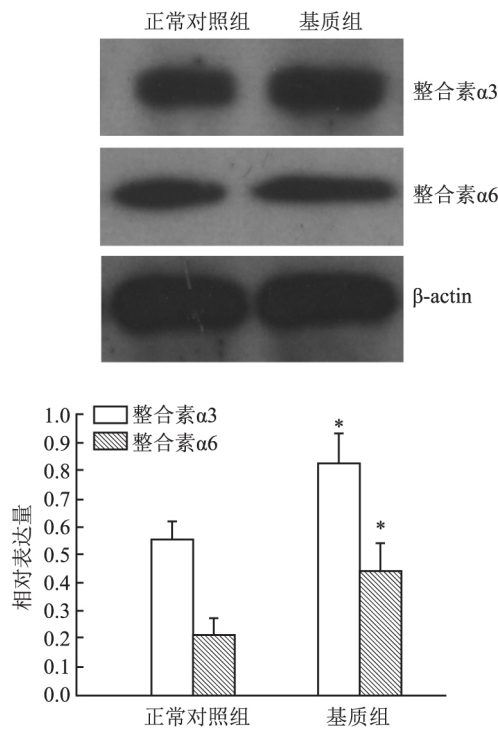


图4 细胞外基质对整合素 $\alpha 3$ 和 $\alpha 6$ 蛋白表达的影响
与正常对照组比较: * $P < 0.05$

要原因。相关研究^[8-9]指出在糖尿病肾病发生早期,肾小管上皮细胞的凋亡和氧化损伤是糖尿病并发病的原始启动因子和细胞损伤的首要因素,也是肾小管间质纤维化发生的关键环节;同样,在缺血性急性肾损伤病理特征中,肾小管上皮细胞凋亡增加,是缺血性急性肾损伤的重要发病机制之一^[10]。因此,寻找促进肾小管上皮细胞增殖和迁移的因素或药物来干预肾小管上皮细胞凋亡,维持上皮细胞活性,能有效地促进急性肾损伤修复,并有望延缓糖尿病肾病进展。

MDCK 细胞外基质是犬肾小管上皮细胞基底膜成分,富含 LN^[11]。整合素是一类由 α 亚基和 β 亚基组成的异源二聚体跨膜蛋白,属细胞黏附分子家族,能介导细胞与细胞及细胞外基质之间的黏附,是细胞迁移、增殖等生理活动重要的调控因素^[1]。每种亚单位包含胞外域、单跨膜和胞内域。由外向内的信号转导 (outside-insignaling) 和由内向外的信号转导 (inside-outsingaling) 两种途径,由外向内介导骨架重构,由内向外出调节与配体的亲和力^[12]。因为能够在细胞与细胞之间、细胞与胞外环境之间传递信息;从而对细胞的生存、增殖、黏附和迁移起到严格的控制^[13]。实验结果表明:与正常对照组比较,MDCK 细胞外基质能明显增加 HK-2 细胞的增殖和

迁移,且整合素 $\alpha 3$ 和 $\alpha 6$ 的表达也呈上升趋势。其机制可能为:整合素 $\alpha 3$ 和 $\alpha 6$ 属层黏连蛋白受体,可以作为桥梁与细胞外间质中的 LN 结合,调控多种细胞内信号通路,包括肌动蛋白(actin)成核、聚合的激活以及促活、促有丝分裂原信号等^[14-15],进而促使培养的细胞进行有丝分裂,影响 HK-2 细胞的黏附和运动。

但是细胞调控既复杂而严密,且细胞外基质也是一个动态且复杂的微环境,在不同的组织当中呈现出不同的生物物理、机械性、生物化学方面的特征,所以 MDCK 细胞外基质调控 HK-2 细胞增殖和迁移的机制并非如此的简单,如高表达的整合素 $\alpha 3$ 和 $\alpha 6$ 是通过哪些机制或信号通路来调控 HK-2 细胞的增殖和迁移尚不清楚,有待进一步的研究和探讨。

参考文献

- [1] Humphries M J. Integrin structure[J]. *Biochem Soc Trans* 2000, 28(4):311-39.
- [2] Takahashi T, Friedmacher F, Zimmer J, et al. Decreased expression of integrin subunits $\alpha 3$, $\alpha 6$, and $\alpha 8$ in the branching airway mesenchyme of nitrofen-induced hypoplastic lungs[J]. *Eur J Pediatr Surg* 2018, 28(1):109-14.
- [3] Liao H D, Mao Y, Ying Y G. The involvement of the laminin-integrin $\alpha 7 \beta 1$ signaling pathway in mechanical ventilation-induced pulmonary fibrosis[J]. *J Thorac Dis* 2017, 9(10):3961-72.
- [4] Schütte K, Schulz C, Link A, et al. Current biomarkers for hepatocellular carcinoma: surveillance, diagnosis and prediction of prognosis[J]. *World J Hepatol* 2015, 7(2):139-49.
- [5] 汪 渊, 桂淑玉. 804G 细胞外间质对体外培养牛角膜内皮细胞增殖的影响[J]. *中国药理学通报*, 1998, 14(4):348-50.
- [6] 张金明, 崔永言, 徐路生. 兔脱细胞尿道基质制备的可行性[J]. *中国临床康复* 2005, 9(42):48-9.
- [7] 袁育珺, 段惠芳, 胡志坚, 等. 高糖诱导人肾近曲小管上皮细胞凋亡及其调控机制[J]. *安徽医科大学学报* 2016, 51(4):497-501.
- [8] De Nicola L, Gabbai F B, Liberti M E, et al. Sodium/glucose co-transporter2 inhibitors and prevention of diabetic nephropathy: targeting the renal tubule in diabetes[J]. *Am J Kidney Dis* 2014, 64(1):16-24.
- [9] Guo K, Lu J, Huang Y, et al. Protective role of PGC-1 α in diabetic nephropathy is associated with the inhibition of ROS through mitochondrial dynamic remodeling [J]. *PLoS One* 2015, 10(4):e0125176.
- [10] 胡红林, 王共先. 肾缺血再灌注损伤中细胞凋亡和氧化应激[J]. *中国现代医学杂志* 2010, 20(15):2279-83.
- [11] Chan L S, Wang X S, Lapiere J C, et al. A newly identified 105-kD lower lamina lucida autoantigen is an acidic protein distinct from the 105-kD gamma 2 chain of laminin-5 [J]. *J Invest Dermatol*, 1995, 105(1):75-9.
- [12] Campbell I D, Humphries M J. Integrin structure, activation, and interactions[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011, 3(3):a004994.
- [13] 李雪映, 孙小然, 张宏权. 整合素相关微环境调控肿瘤转移[J]. *生物化学与生物物理进展* 2017, 44(8):672-7.
- [14] Caswell P T, Vadrevu S, Norman J C. Integrins: Masters and slaves of endocytic transport [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, 10(12):843-53.
- [15] Longmate W M, Lyons S P, DeFreest L, et al. Opposing roles of epidermal integrins $\alpha 3 \beta 1$ and $\alpha 9 \beta 1$ in Regulation of mTLD/BMP-1-mediated laminin- $\gamma 2$ processing during wound healing[J]. *J Invest Dermatol* 2018, 38(2):444-51.

Effects of MDCK extracellular matrix on the proliferation and migration of HK-2 cells

Yuan Yujun¹, Yang Xiuling², Hu Zhijian³, et al

(¹Clinical Laboratory, ²Hospital Sense, The Affiliated Hospital of Jiujiang University, Jiujiang 332000;

³Dept of Molecular Biology and Biochemistry, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To study the effects of extracellular matrix on the proliferation and migration of HK-2 cells.

Methods The MDCK extracellular matrix was used as the basis for the culture of HK-2 cells and randomly divided into normal control group and extracellular matrix group. The condition of cell proliferation and migration was observed with acid phosphatase and cell scratches; the expression of integrin $\alpha 3$ and $\alpha 6$ protein was analyzed by immunofluorescence and Western blot. **Results** Compared with normal group, MDCK extracellular matrix significantly promoted the proliferation and migration of HK-2 cells *in vitro*, and increased the expression of integrin $\alpha 3$ and $\alpha 6$ ($P < 0.05$). **Conclusion** MDCK extracellular matrix could promote the proliferation and migration of HK-2 cells cultured *in vitro*.

Key words extracellular matrix; HK-2; integrins; proliferation; migration