doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.12.002

孕期邻苯二甲酸二正丁酯暴露促进大鼠子代肾小管上皮细胞 发生 Snail1 介导的上皮 - 间充质转化 *

赵 圣 李 登 朱依萍 贝晓宇 蒋君涛 韩邦旻 14

(1上海交通大学附属第一人民医院泌尿外科上海200080;2上海交通大学附属第一人民医院临床转化研究院上海200080)

摘要 目的:本实验以 DBP 暴露的大鼠为模型,研究 DBP 相关纤维化肾脏细胞上皮 - 间充质转化(EMT)水平改变以及该过程的 调节机制。方法:动物模型中实验组妊娠大鼠在妊娠 14-18 天期间以 800 mg/kg/ 天的剂量胃饲 DBP,使用免疫组织化学(IHC)检 测 EMT 相关指标;使用 IHC、Western blot 和 PCR 技术检测转录因子 Snaill 表达;以肾小管上皮细胞 NRK52E 作为体外模型,使 用同样方法检测 DBP 暴露对中 TGF-β1 表达影响,检测 H₂O₂ 对 TGF-β1 表达影响、TGF-β1 信号通路拮抗剂对 DBP 诱导的 Snaill 表达的影响。结果:与对照组相比较,孕期 DBP 暴露导致子代肾脏 E-cadherin 指标显著升高,IHC 染色强度超过对照组的 3 倍,N-cadherin 指标显著下降,IHC 染色强度约为对照组 20%(P<0.05)。 DBP 能够显著促进肾小管上皮细胞 Snaill 表达,IHC 染色强度相比对照组升高约 2.5 倍(P<0.05),干扰 Snaill 能够抑制 DBP 诱导 EMT 指标的改变;DBP 暴露与肾脏 TGF-β1 高表 达相关,TGF-β1 信号通路抑制剂能够引起 DBP 相关的 Snaill 表达显著降低(约 25%);此外,DBP 造成的活性氧(ROS)产物累积 促进了肾小管上皮细胞 TGF-β1 的表达(P<0.05)。结论:孕期暴露于 DBP 会导致肾脏 ROS 产物累积和 TGF-β1 高表达,进而促 进肾小管上皮细胞发生 Snaill 介导的 EMT。

关键词:邻苯二甲酸二正丁酯;上皮-间充质转化;Snaill;肾纤维化 中图分类号:R-33;R339.2;R114 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2019)12-2207-07

Maternal Exposure to Di-n-butyl phthalate Induces Snail1-mediated Epithelial-mesenchymal Transition in Rat Renal Tubular Cell*

ZHAO Sheng¹, LI Deng¹, ZHU Yi-ping¹, BEI Xiao-yu², JIANG Jun-tao¹, HAN Bang-min¹

(1 Department of Urology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China; 2 Institute of clinical transformation, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: In this study, DBP-exposed rats were used as models to study the changes in the level of fibrotic kidney epithelial-mesenchymal transition (EMT) and the regulatory mechanisms of this process. **Methods:** Pregnant rats in experimental group were fed with DBP at a dose of 800 mg/kg/day during the 14-18 days of gestation. Immunohistochemistry (IHC) was used to detect relevant indicators of EMT; IHC, Western blot and PCR were used to detect expression of transcription factor Snaill; Renal tubular cells NRK52E was used in vitro. With the same method, expression of TGF- β 1 in vivo and in vitro, effect of H₂O₂ on TGF- β 1 expression and effect of TGF- β 1 receptor inhibitor on DBP Inducted Snail-mediated EMT was detected. **Results:** Maternal exposure to DBP promoted the development of EMT in the offspring; Compared with the control group, DBP exposure during pregnancy led to a significant increase in the E-cadherin index of the offspring, IHC staining intensity was 3 times higher than the control group. Also, N-cadherin index decreased significantly, IHC staining intensity was about 20% of the control group (*P*<0.05). DBP promoted Snail1 expression and interference on Snail1 function leaded to inhibition on DBP-induced EMT (about 20% of the control group). DBP exposure was associated with high expression of TGF- β 1 in the kidney, and TGF- β 1 receptor inhibitor was able to inhibit the activation of Snail1 by DBP (*P*<0.05). Accumulation of reactive oxygen species (ROS) induced by DBP promoted the expression of TGF- β 1 in renal tubular cells. **Conclusions:** Exposure to DBP during pregnancy leads to accumulation of ROS in the kidney and high expression of TGF- β 1, which in turn promotes Snail1-mediated EMT in renal tubular epithelial cells.

Key words: Di-n-butyl phthalate; Epithelial-mesenchymal transition; Snail1; Renal fibrosis Chinese Library Classification(CLC): R-33; R339.2; R114 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2019)12-2207-07

^{*}基金项目:国家自然科学基金项目(81771564)

作者简介:赵圣(1992-),硕士研究生,主要研究方向:泌尿外科学,E-mail: medseek@163.com

[△] 通讯作者:韩邦旻(1973-),博士生导师,教授,主要研究方向:泌尿外科学,E-mail: hanbangmin@126.com

⁽收稿日期:2019-01-08 接受日期:2019-01-30)

前言

邻苯二甲酸二正丁酯(di-n-butyl phthalate, DBP)是环境内 分泌干扰物的代表,在聚氯乙烯塑料产品中尤为常见。据报道, DBP产前暴露危害子代的生殖道发育并能够引起多种疾病^[1,2]。 在我们既往的研究中发现母体孕期接触 DBP 会导致成年雄性 后代发生先天性肾发育不良和肾纤维化^[3]。但 DBP 孕期暴露引 起的后代肾纤维化的具体机制尚未清楚阐明。

肾纤维化是慢性肾脏疾病的典型特征,肾纤维化最终导致 终末期肾衰竭^[4]。上皮 - 间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)和间充质 - 上皮转换正反过程在肾脏的胚胎发 育中起着关键作用。已有报道称肾小管上皮细胞的 EMT 可能 参与了肾纤维化的发展^[57]。作为 EMT 有效的发起点, Snail 已 经被广为接受是 EMT 过程中至关重要的调节因子^[7]。据报道, 成年机体肾脏 Snaill 的重激活足够促使肾纤维化发生^[5]。然而, DBP 暴露引起的肾纤维化是否涉及 EMT 的调节尚未得知。 TGF-β1 被认为与肾纤维化发生密切相关^[9-11],并且是调节 EMT 的常见因子, 是否 TGF-β1 能够将 DBP 暴露与 EMT 相联系未 见报道。

既往我们通过给予妊娠的的雌性大鼠胃饲 DBP 成功构建 了新生仔鼠肾发育不良模型^[3]。在本研究中,我们在 DBP 的体 内和体外模型中检测了 EMT 相关标记和 TGF-β1 表达。使用 肾小管上皮细胞与 H₂O₂ 共培养模拟氧化应激,测定 TGF-β1 的浓度改变,并检测了 TGF-β1 对 EMT 的调节作用。这里,我 们试图揭示 DBP 导致的纤维化肾脏其肾小管上皮细胞 EMT 水平以及调节的相关机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型

动物实验选用的是购买来自上海动物实验中心的 30 只 SD 大鼠。所有的 8 周龄清洁级 SD 大鼠饲养于实验动物中心 清洁级动物房,人工控制设定适宜温度和湿度。使用 12 h 灯光 开关交替控制模式来模拟正常的昼夜变化。为建立孕鼠模型, 雌鼠与雄鼠两两配对后在单独的鼠笼配种。24 h 后通过检查笼 底托盘是否有精栓存在确定孕鼠,并将日期标记为妊娠首日。 孕鼠随后被随机分配为 DBP 暴露组和正常对照组。在孕 14 天 时,每天 14:00 通过灌胃针予孕鼠胃饲 DBP 或食用油,DBP 暴 露组予以 800 mg/kg 体重 DBP 胃饲液,正常对照组予以 800 mg/kg 体重的食用油,连续灌胃处理 5 天。母鼠产后第一天记 录后代子鼠性别和体重。所有后代中随机选取 DBP 暴露鼠 8 只,正常对照鼠 8 只,颈椎脱臼法处死后清洗消毒,解剖分离得 到肾脏。

1.2 细胞和暴露条件

大鼠肾小管上皮细胞 NRK52E 从美国 ATCC 细胞中心购 买获得,培养条件为添加了 10%胎牛血清(Gibco)和 1%青霉 素 - 链霉素(HyClone)的改良 Eagle 培养基(HyClone)。配置 DBP 溶解于 DMSO 中,浓度为 1,10 和 100 µmol/L。随后的实 验使用前,使用 0.22 µm 孔径的过滤器过滤 DBP 溶液进行消毒。

1.3 组织学检查和免疫组织化学

将肾脏样品使用用福尔马林固定,包埋在石蜡块中,切片

厚度 5 μm,并用苏木精和伊红(H&E)染色。 然后通过光学显 微镜检查这些样品以鉴定肾纤维化。免疫组织化学方法同前所 报道^[12]。简要步骤如下:包埋好的石蜡切片使用柠檬酸进行抗 原修复,含过氧化氢的甲醇溶液抑制内源性过氧化物酶。用含 有 PBS 的封闭液封闭非特异性表位。稀释好的一抗和二抗分 别孵育。DAB 溶液显色,倒置显微镜下观察切片染色。

1.4 荧光实时定量聚合酶链式反应

Trizol 法提取生殖结节 RNA 和细胞 RNA。RNA 样品经过 提纯和浓度鉴定后,Superscript II 逆转录酶逆转录为 cDNA。冰 水浴操作使用 SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 与 cDNA 以及相应引物配置 25 μL PCR 反应体系液,在 ABIPRISM 7300 系统上进行实时聚合酶链式反应 (实时 PCR)。

1.5 Western blot 蛋白分析

使用 RIPA 提取试剂和 10× 蛋白酶抑制剂提取蛋白。蛋白 质浓度通过 BCA 蛋白质测定试剂盒测定。使用适当百分比的 聚丙烯酰胺凝胶对每组中相等量的蛋白质提取物进行 SDS-PAGE。然后将凝胶中的蛋白转移至硝酸纤维素膜 (Bio-Rad)。随后,使用 5%脱脂奶粉封闭,并在4℃与第一抗体 孵育过夜。TBST 洗膜,将膜与 HRP 缀合的二抗室温孵育 1 小 时。化学发光显影试剂 A 液和 B 液各取 100 μL 混匀配置成显 影液,PVDF 膜孵育 10 min。在暗室中对膜行感光扫描。保存的 结果使用软件 Image-Pro Plus 6.0 作为定量分析工具。

1.6 siRNA 转染

肾小管上皮细胞 NRK52E 接种于 6 孔板,取生长状态良好、75 %~80 %融合率时操作。选取构建好的 siRNA 表达片段,限制性内切酶进行酶切、DNA 连接酶将 siRNA 片段连接到载体构建 pLV-Snail siRNA。对照组转染空白载体。转染 6 h 后更换用正常培养基,72 h 后收获目的细胞。

1.7 ELISA 检测

取上清液样本孵育与相应抗体孵育,按照 ELISA 试剂盒 说明书操作。经过封闭、加样、孵育、终止反应,酶标仪 450 nm 波长下测定吸光度,根据标准曲线判断样本的浓度。

1.8 统计学分析

所有数据均采用 SPSS 18.0 统计学软件进行分析。各组资料皆以均数±标准差(mean±SD)来表示,计数资料使用卡方检验,计量资料则采用 t 检验进行统计学检验,*P<0.05 表示有统计学显著性差异。

2 结果

2.1 孕期 DBP 暴露会促进后代肾脏 EMT 标志物升高

我们既往的研究发现,母体暴露于 DBP 会导致子鼠肾小管基底膜显著增厚和损伤^[3,12]。在本研究中,我们进一步揭示,孕期接触 DBP 导致的纤维化肾脏其 EMT 水平异常升高。IHC 染色显示与对照组相比,DBP 暴露组子鼠肾脏肾小管区域间质细胞标记物 N-cadherin 显著升高约为对照组 3.7 倍,而上皮细胞标记物 E-cadherin 显着降低约为对照组 0.2 倍(图 1a,*P<0.05)。实时荧光定量 PCR 揭示相比对照组,DBP 暴露组肾脏 E-cadherin 基因 Cadh1 表达相比对照组下降 37%,N-cadherin 基因 Cadh2 表达升高 83%,(图 1b,c,*P<0.05)。这些结果表明 宫内 DBP 接触会诱导肾脏小管细胞发生 EMT。



图 1 DBP 暴露组和对照组大鼠肾脏 EMT 指标 a. E-cadherin 和 N-cadherin 指标的 IHC 染色(400× 镜下改变)。 b-c. PCR 检测对照组和实验组基因 Cadh1 和 Cadh2 转录水平, *P<0.05 具有统计学意义。

Fig.1 Comparison of EMT markers in rat kidney between DBP-exposed group and control group. a.IHC staining for E-cadherin and N-cadherin (magnification, 400×). b-c. PCR analysis of gene Cadh1and Cadh2 expression in DBP-exposed group and control group (*P<0.05).</p>

2.2 DBP 暴露能够促进转录因子 Snail1 表达

为了进一步研究 DBP 对 EMT 过程产生影响的机制,我们 检测了后代子鼠肾脏 Snaill 表达。IHC 染色显示 DBP 暴露组 子鼠肾脏 Snail 表达显著升高约 2.5 倍(图 2a,*P<0.05)。体外 实验中,使用非致死剂量 DBP 处理大鼠肾小管上皮细胞 NRK52E,对照组加入相应浓度的溶剂 DMSO,处理 24 h 后收 集蛋白和 RNA 样本。Western blot 实验显示 DBP 显著促进了 NRK52E 细胞中 Snaill 蛋白水平表达,相对对照组,低剂量 1 μ M 和中等剂量 10 μ M DBP 处理下分别显著提高了 Snaill 表 达,实时荧光定量 PCR 分析显示 1 μ M 和 10 μ M DBP 提高了 NRK52E 细胞中 Snaill mRNA 表达 7.1 倍和 9.4 倍。(图 2b,c, **P*<0.05)。



图 2 DBP 促进肾小管上皮细胞 Snail1 表达 a. 大鼠肾脏 Snail1 的 IHC 染色(400× 镜下改变)。b. Western blot 检测不同浓度 DBP 处理后 NRK52E 细胞 Snail1 表达 c. Western blot 条带灰度值的定量分析 d.PCR 检测 DBP 处理 NRK52E 细胞 Snail1 基因转录水平 *P<0.05 具有统计学意义。 Fig.2 DBP promoted Snail1 expression in renal tublar cells. a. IHC staining for Snail1 in rat kidney (magnification, 400×). b. Western blot analysis of Snail1 expression in NRK52E cells. c. Densitometric quantification of Snail1 expression in NRK52E cells. d. PCR analysis of gene Snail1 expression in in NRK52E cells. (*P<0.05).

2.3 干扰 Snail 表达抑制了 DBP 诱导的 EMT

为了明确 Snail1 高表达是否是 DBP 诱导 EMT 发生的必要条件,我们使用了 siRNA-Snail1 处理 NRK52E 细胞。Western blot 实验显示选择的 siRNA-Snail1 显著抑制了 NRK52E 细胞 Snail1 的表达,定量 PCR 显示 Snail1 mRNA 下降了约 90% (图 a-c,**P*<0.05)。10 μmol/L 浓度 DBP 显著降低了对照组上

皮细胞标志物 E-cadherin 的表达,并提高了间质细胞标志物 N-cadherin 的表达,条带灰度定量显示相比对照组,DBP 暴露 组 E-cadherin 表达下降了 38%,N-cadherin 表达上升了 90%; siRNA-Snail1 干 Snail1 后,DBP 不再引起显著意义的 E-cadherin 和 N-cadherin 表达改变(图 d-f,*P<0.05)。这些结果表明 在 DBP 相关的 EMT 激活过程中 Snail1 发挥了介导作用。



图 3 Snail1 介导了 DBP 相关的 EMT a. Western blot 检测NRK52E 细胞 siRNA-Snail1 干扰效果。 b. Western blot 条带的灰度值定量检测。 c. Western blot 检测 d.PCR 检测 siRNA-Snail1 干扰效。d-f. siRNA-Snail1 和空白载体分别转染 NRK52E 细胞,10 μmol/L DBP 处理后 EMT 指标 改变以及灰度值的定量分析。*P<0.05 具有统计学意义。

Fig.3 Snail1 mediated DBP-related EMT. a. Western blot analysis of effect of siRNA-Snail1 on NRK52E cells. b. Densitometric quantification of Snail1 expression. c. PCR analysis of gene Snail1 expression in in NRK52E cells after siRNA-Snail1 treatment. d. NRK52E cells transfected with siRNA-Snail1 and its control, Western blot analysis of EMT markers. e-f Densitometric quantification of EMT markers. (*P<0.05).

2.4 DBP 暴露会导致肾小管上皮细胞 TGF-β1 表达升高

TGF-β1 是 EMT 重要调节因子。我们检测了 DBP 孕期暴 露后子代肾脏 TGF-β1 表达。IHC 染色显示,DBP 暴露组的肾 脏 TGF-β1 表达高于正常对照组约 4.1 倍(图 4a)。体外实验 中,使用 10 μmol/L 浓度的 DBP 处理 NRK52E 细胞 24 小时, 对照组使用相同浓度的溶剂 DMSO 处理相同时间,分别提取 蛋白样品和 RNA 样品。Western blot 分析揭示了 DBP 暴露组 肾脏 TGF-β1 在蛋白和转录水平的显著升高,荧光定量 PCR 显示 DBP 导致 TGF-β1 mRNA 表达上升了 2.8 倍(图 4b-d, **P*<0.05)。这些结果表明 DBP 孕期暴露会导致子代肾脏 TGF-β1 的累积。

2.5 TGF-β 信号通路参与调节 DBP 诱导的 EMT

我们既往研究表明 DBP 会诱导发生显著的氧化应激反应 ^[11]。这里,我们试图解释 DBP 造成的 TGF-β1 在肾脏积蓄是否 与 DBP 相关的氧化应激反应有关。H₂O₂(800 mM)与 NRK52E 细胞孵育后,提取培养上清使用 ELISA 法检测肾小管上皮细 胞分泌的 TGF-β1,结果显示 H₂O₂ 模拟的氧化应激显著提高了 TGF-β1 的表达,24-48 h 内显著增高,48 h 后进入平台期(图5a, *P<0.05)。肿瘤学研究中,TGF-β1 被广为接受能够调控 EMT^[13:4]。 这里我们发现,NRK52E 细胞在 10 μmol/L DBP 处理环境下, 外源性添加 TGF-β 信号通路抑制剂 SM16 能够导致 Snaill 表 达下降约 25%(图 5c-d,*P<0.05)。基因转录水平实时 PCR 检测 显示相比对照组 Snail1 mRNA 表达下降超过 50%。(图 5b, *P<0.05)。这些结果表明,在 DBP 诱导发生的氧化应激反应会 引起肾小管上皮 TGF-β1 表达升高,TGF-β 信号通路激活参与 了 DBP 诱导的 Snail1 介导的 EMT 过程。

3 讨论

在本研究中,我们首次报道了孕期 DBP 暴露促进后代肾 小管细胞发生 EMT,该 EMT 发生由转录因子 Snaill 介导, DBP 氧化应激造成的 TGF-β1 高表达及其信号通路激活参与 了该过程的调控。我们认为肾小管上皮细胞异常激活的 EMT可 能在 DBP 相关的肾发育不良和纤维化中起着至关重要的作用。

环境内分泌干扰物是一类可以造成机体内分泌调节紊乱 并最终造成器官功能损害、孕期健康受损以及影响后代发育或 致畸的一类物质的总称^[15]。环境内分泌干扰物暴露无处不在, 其危害也日益受到学者们的重视,已有的研究表明,人类的幼 儿对 EEDs 敏感性较强。特别是在胎儿的发育过程中,胎体体 内的内分泌系统缺乏有效的自我保护机制,受到 EEDs 的毒性 伤害尤为明显。大量的调查证实 EEDs 是引起胎儿早产、死产、 先天畸形、发育异常的重要原因^[16]。在其中,DBP 作为环境内分 泌干扰物的重要一员以及典型的雄激素干扰物代表,也备受关



图 4 DBP 诱导肾小管上皮细胞产生 TGF-β1。a. IHC 检测 DBP暴露组和对照组大鼠肾脏 TGF-β1 表达。b. Western blot 检测 DBP 处理组与对照 组 NRK52E 细胞 TGF-β1 表达。 c. Western blot 条带的灰度值定量检测。 d. PCR 检测 DBP 处理组与对照组 NRK52E 细胞基因 Tgfb1 转录水 平。*P<0.05 具有统计学意义。

Fig.4 DBP induced TGF-β1 expression in renal tubular cells. a. IHC staining for TGF-β1 in rat kidney in DBP-exposed group and normal control.
b. Western blot analysis of TGF-β1 expression in NRK52E cells in DBP-exposed group and control group. c. Densitometric quantification of TGF-β1 expression. d. PCR analysis of gene Tgfb1 expression in NRK52E cells. (**P*<0.05).



图 5 TGF-β1 参与 DBP 诱导的 EMT 调节。a. NRK52E 细胞孵育于 H₂O₂(800 mM), ELISA 法检测上清 TGF-β1 浓度变化。b. PCR 检测 DBP 处理组、DBP 联合 TGF-β 信号通路拮抗剂信号通路抑制剂组以及对照组 NRK52E 细胞基因 Snail1 转录水平 c. Western blot 检测 DBP 处理组、DBP 联合 TGF-β 信号通路拮抗剂组以及对照组 NRK52E 细胞 Snail1 表达。d. Western blot 条带的灰度值定量检测。*P<0.05 具有统计学意义。
Fig.5 TGF-β1 regualted DBP-induced EMT a. ELISA analysis of TGF-β1 concetration in supernatants of NRK52E cells incubated with H₂O₂(800 mM).
b. PCR analysis of gene Snail1 expression in NRK52E cells in DBP-treated, DBP+SM16 and control group. c. Western blot analysis of Snail1 expression in NRK52E cells. (*P<0.05).

注和研究。DBP 与各种先天性系统功能障碍有关,最常见的典型危害是造成男性生殖系统的损伤^[17]。但很少有报道描述 DBP 对肾纤维化、肾小管细胞的特异性作用。妊娠期母体持续暴露于 DBP 会造成体内性激素功能失衡并进一步造成子宫内胚胎

发育环境的性激素调节紊乱,这势必导致对性激素变化极为敏 感的泌尿系统发育造成持续的不良影响甚至重塑。

我们最近的研究报道了母体接触 DBP 会导致后代发生肾 发育不良和纤维化^[11]。其中发现 DBP 造成的肾纤维化子鼠有 大量 TGF-β 的累积, 而这恰恰是经典的 EMT 诱导剂。EMT 是 在生理和病理过程中上皮细胞获得间充质特征的现象化,可以 发生于胚胎发育、炎症/纤维化/伤口愈合和癌症进程。既往有 报道称邻苯二甲酸酯能够刺激肿瘤细胞发生 EMT^[18-20]。但是尚 未有实验研究 DBP 在胚胎发育过程中对正常肾脏细胞 EMT 的影响。胚胎发育和癌症进展都伴随有 EMT 进程,因为二者均 有相似的发展历程:细胞侵入基底膜,迁移,在适当环境中播种 并生长形成聚集体等过程。EMT 对肿瘤进展的作用已被广泛 研究,目前越来越多的目光投向了 EMT 在胚胎发育中的作用。 胚胎发生是一个复杂的过程,其细节远不能澄清。我们在总结 以往的研究成果后认为,尿道生殖结节发育过程的 EMT 受到 异常调节是导致肾脏发育不良的重要原因。在本研究中,我们 首次报道了 DBP 孕期暴露会导致子代肾脏 EMT 水平显著升 高。DBP 暴露组子鼠肾脏表现为高水平的间充质细胞标志物 N-cadherin 以及显著下降的上皮细胞标志 E-cadherin, PCR 实 验还证明 DBP 能够在基因转录水平改变上述基因的表达。既 往有通过建立大鼠输尿管狭窄诱导肾纤维化模型的研究确立 了 EMT 在肾纤维化发生中的重要作用[21]。 尽管 EMT 异常激活 导致肾纤维化发生的理论尚存一定争议,越来越多的证据揭示 肾纤维化伴随着肾小管细胞 EMT 的发生[21-23]。这与我们的实验 结果相一致,DBP导致的肾脏发育不良伴随着异常激活的 EMT_o

EMT 能够被缺氧以及周围环境因子改变所诱导,通过涉 及到 SNAI,ZEB1 和 Twist 等基因调节在内的复杂网络调控, 引起蛋白表达改变,非编码 RNA 表达改变,染色体重塑以及一 系列表观遗传改变^[24-26]。包括选择性剪接,翻译后调节,蛋白质 稳定性和亚细胞水平定位。我们本次研究通过体内体外实验的 结果表明,DBP 能够提高 EMT 诱导因子 Snail1 的表达。使用 siRNA 干扰 NRK52E 细胞 Snail1 功能后,DBP 诱导的的 EMT 效应会显著下降。这些结果提示 DBP 诱导的 EMT 由转录因子 Snail1 介导。Snail1 被报道对后天发生的肾纤维化发生具有重 要意义⁽⁴⁾,我们认为 Snail1 介导的 EMT 对 DBP 造成的肾脏先 天发育不良和纤维化至关重要。但是目前实验证据尚不足证明 DBP 引起的该 EMT 改变是肾纤维化发生所必需,需要进一步 开展动物 Snail1 基因敲除等实验。

我们前期研究发现 DBP 导致肾纤维化大鼠肾脏呈现显著 的 TGF-β1 高表达^[11], TGF-β1 是肾纤维化发生发展过程中极重 要的因子, TGF-β1 表达异常升高是解释肾纤维化病因的重要 一环, 它能够异常激活肾脏内成纤维细胞、肌纤维母细胞, 通过 Smad 依赖性和 Smad 非依赖性信号转导通路促进肾纤维化发 生^[27,28]。而 TGF-β1 也是常见的 EMT 调节因子。因此我们提出 假设: DBP 诱导发生的 TGF-β1 高表达与肾小管细胞 EMT 存 在关联。TGF-β 信号通路已被证实在成年肾纤维化发生过程中 扮演至关重要的角色^[29]。已有文献报道, TGF-β1 能够通过激活 Snaill 进而诱导 EMT 发生^[30-32]。这与我们观察到的现象一致, 在本研究中,我们证实了 DBP 孕期暴露导致后代肾脏 TGF-β1 的积蓄,并发现 TGF-β1 信号抑制剂 SM16 能够在一定程度上 逆转 DBP 的 EMT 诱导效应, Snaill 的表达与 TGF-β1 表达量 和功能呈正相关。这提示 TGF-β 在很大程度上是通过诱导 snaill 介导的 EMT 进程而在 DBP 相关的肾纤维化发生过程中 发挥作用。因此我们认为 DBP 相关的肾纤维化发生具体机制 可以解释为:DBP 能够通过诱导肾脏 TGF-β1 高表达^[334],促进 TGF-β 通路激活进而促进 snail1 介导的 EMT 发生。

此外,有研究表明 DBP 暴露与机体氧化应激反应发生密 切相关^[33,4]。我们前期实验也证实 DBP 能够导致肾脏显著的 ROS 产物累积^[11]。ROS 产物积累与 TGF-β1 信号通路存在相互 调节的关联,在肿瘤学的相关研究中,已有报道称氧化应激引 起的 ROS 产生能够通过 ERK 通路等途径促进 TGF-β1 的表 达^[35-37]。本实验中我们证明 DBP 造成的氧化应激能够促进肾小 管细胞 TGF-β1 的表达,这在一定程度上解释了 DBP 暴露后 肾脏 TGF-β1 高表达的现象。

综上所述,我们实验表明孕期 DBP 暴露会促进后代肾小 管细胞的 EMT 发生。DBP 诱导的 EMT 由转录因子 Snail1 所 介导。该过程涉及 DBP 相关 ROS 产物累积和 TGF-β1 的调控。 我们的研究结果也为孕期环境内分泌干扰化合物暴露引起的 其他畸形提供了新的线索和潜在机制。

参考文献(References)

- Gaspari L, Paris F, Jandel C, et al. Prenatal environmental risk factors for genital malformations in a population of 1442 French male newborn: a nested case-control study [J]. Human Reproduction, 2011, 26 (11): 3155-3169
- [2] Giribabu N, Reddy P S. Protection of male reproductive toxicity in rats exposed to di-n-butyl phthalate during embryonic development by testosterone [J]. Biomedicine & pharmacotherapy, 2017, 87 (1): 355-356
- [3] Zhu Y P, Chen L, Wang X, et al. Maternal exposure to di-n-butyl phthalate (DBP) induces renal fibrosis in adult rat offspring[J]. Oncotarget, 2017, 8(19): 311-401
- [4] Lovisa S, Zeisberg M, Kalluri R, et al. Partial Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Other New Mechanisms of Kidney Fibrosis [J]. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2016, 27(10): 681-695
- [5] Grande M T, Sá nchezlaorden B, Lópezblau C, et al. Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease [J]. Nature Medicine, 2015, 21(9): 989-997
- [6] Liu Q F, Ye J M, Yu L X, et al. Klotho mitigates cyclosporine A (CsA) -induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) and renal fibrosis in rats[J]. International Urology & Nephrology, 2016, 49(2): 345-352
- [7] Lovisa S, Lebleu V S, Tampe B, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis[J]. Nature Medicine, 2015, 21(9): 998-1009
- [8] Wei Z, Shan Z, Shaikh Z A, et al. Epithelial-mesenchymal transition in breast epithelial cells treated with cadmium and the role of Snail[J]. Toxicology & Applied Pharmacology, 2018, 344(1): 46-55
- [9] Mcgaraughty S, Davistaber R A, Zhu C Z, et al. Targeting Anti-TGF-β Therapy to Fibrotic Kidneys with a Dual Specificity Antibody Approach [J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2017, 28 (12): 3616-3628
- [10] Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF-β: the master regulator of fibrosis[J]. Nature Reviews Nephrology, 2016, 12(6): 325-336
- [11] Lan H Y. Diverse Roles of TGF-β/Smads in Renal Fibrosis and Inflammation [J]. International Journal of Biological Sciences, 2011, 7

(7): 1056-1067

- [12] Sun W L, Zhu Y P, Ni X S, et al. Potential involvement of Fgf10/Fgfr2 and androgen receptor (AR) in renal fibrosis in adult male rat offspring subjected to prenatal exposure to di-n-butyl phthalate (DBP)[J]. Toxicology Letters, 2017, 282(2): 37-42
- [13] Ferrucci V, de Antonellis P, Pennino FP, et al. Metastatic group 3 medulloblastoma is driven by PRUNE1 targeting NME1-TGF-β-OTX2-SNAIL via PTEN inhibition[J]. Brain J Neurol, 2018[Epub ahead of print]
- [14] Y Bo, J Kaibiao, Z Jidong. MicroRNA-124 suppresses growth and aggressiveness of osteosarcoma and inhibits TGF-β-mediated AKT/GSK-3β/SNAIL-1 signaling [J]. Molecular Medicine Reports, 2018[Epub ahead of print]
- [15] Gore A C, Chappell V A, Fenton S E, et al. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals[J]. Endocrine Reviews, 2015, 36(6): 593-602
- [16] Haraux E, Braun K, Buisson P, et al. Maternal Exposure to Domestic Hair Cosmetics and Occupational Endocrine Disruptors Is Associated with a Higher Risk of Hypospadias in the Offspring [J]. Int J Environ Res Public Health, 2017, 14(1): 27-39
- [17] Li M, Jiang X, Liu D, et al. Autophagy protects LNCaP cells under androgen deprivation conditions[J]. Autophagy, 2008, 4(1): 54-60
- [18] Hsieh T H. Phthalates stimulate the epithelial to mesenchymal transition through an HDAC6-dependent mechanism in human breast epithelial stem cells[J]. Toxicological Sciences, 2013, 128(2): 365-376
- [19] Oral D, Erkekoglu P, Kocer-Gumusel B, et al. Epithelial-Mesenchymal Transition: A Special Focus on Phthalates and Bisphenol A [J]. Journal of Environmental Pathology Toxicology & Oncology Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology & Cancer, 2016, 35(1): 43-60
- [20] Wang Y C, Tsai C F, Chuang H L, et al. Benzyl butyl phthalate promotes breast cancer stem cell expansion via SPHK1/S1P/S1PR3 signaling[J]. Oncotarget, 2016, 7(20): 29563-29576
- [21] Kautz J, Michel V, Meinhardt A. The contribution of fibroblasts and EMT to fibrosis in bacterial infection of the epididymis[J]. Journal of Reproductive Immunology, 2016, 115: 37-37
- [22] Galichon P, Finianos S, Hertig A. EMT-MET in renal disease: Should we curb our enthusiasm [J]. Cancer Letters, 2013, 341(1): 24-29
- [23] Xiao X, Tang W, Yuan Q, et al. Epigenetic repression of Krüppel-like factor 4 through Dnmt1 contributes to EMT in renal fibrosis[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2015, 35(6): 1596-1602
- [24] Haslehurst A M, Koti M, Dharsee M, et al. EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer[J]. BMC Cancer, 2013, 12(1): 91

- [25] Ansieau S, Bastid J, Doreau A, et al. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence[J]. Cancer Cell, 2008, 14(1): 79-89
- [26] Smith B N, Bhowmick N A. Role of EMT in Metastasis and Therapy Resistance[J]. Journal of Clinical Medicine, 2016, 5(2): 17
- [27] Dong Z, Liu Y. Renal fibrosis in 2015: Understanding the mechanisms of kidney fibrosis[J]. Nature Reviews Nephrology, 2015, 12(2): 68-80
- [28] Farris A B, Colvin R B. Renal interstitial fibrosis: mechanisms and evaluation [J]. Current Opinion in Nephrology & Hypertension, 2012, 21(3): 289-335
- [29] Niu M, Valdes S, Naguib Y W, et al. Tumor-Associated Macrophage-Mediated Targeted Therapy of Triple-Negative Breast Cancer[J]. Molecular Pharmaceutics, 2016, 13(6): 1833-1842
- [30] Fan Zhang, Hongsheng Wang, Xianfeng Wang, et al. TGF-β induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype [J]. Oncotarget, 2016, 7 (32): 52294-52306
- [31] Naber H P, Drabsch Y, Snaar-Jagalska B E, et al. Snail and Slug, key regulators of TGF-β-induced EMT, are sufficient for the induction of single-cell invasion [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2013, 435(1): 58-63
- [32] JC Cheng, Y Yi, HM Chang, et al. TGF-β1 up-regulates cadherin-11 expression through Snail: A potential mechanism for human trophoblast cell differentiation[J]. Cell Signal, 2018, 43(1): 55-61
- [33] Aly H A, Hassan M H, Elbeshbishy H A, et al. Dibutyl phthalate induces oxidative stress and impairs spermatogenesis in adult rat [J]. Toxicology & Industrial Health, 2015, 32(8): 108-115
- [34] Heierhorst J, Smyth I, Jurado S, et al. A breathtaking phenotype: Unexpected roles of the DNA base damage response protein ASCIZ as a key regulator of early lung development [J]. Cell Cycle, 2011, 10(8): 1222-1240
- [35] Han W, Li G N, Xie J, et al. Resveratrol ameliorates myocardial fibrosis by inhibiting ROS/ERK/TGF-β/periostin pathway in STZ-induced diabetic mice [J]. Bmc Cardiovascular Disorders, 2016, 16(1): 5-19
- [36] Jiang M, Zhang H, Zhai L, et al. ALA/LA ameliorates glucose toxicity on HK-2 cells by attenuating oxidative stress and apoptosis through the ROS/p38/TGF-β 1, pathway[J]. Lipids in Health & Disease, 2017, 16(1): 216-223
- [37] Sun S, Xie F, Zhang Q, et al. Advanced oxidation protein products induce hepatocyte epithelial-mesenchymal transition via a ROS-dependent, TGF-Î²/Smad signaling pathway [J]. Cell Biology International, 2017, 41(8): 842-853