

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.28.005

ILK 介导 TGF-β/Smad 通路诱导肾小球内皮细胞-间充质细胞转分化的研究^{*}

林 琳,郑 晶,朱伟平

(中山大学附属第五医院肾内科,广东珠海 519000)

[摘要] **目的** 观察 TGF-β1 在肾小球内皮细胞-间充质细胞转分化(EndMT)中的作用,探讨 ILK 介导 TGF-β/Smad 信号通路在 EndMT 过程中的作用。**方法** 以体外培养人肾小球内皮细胞为研究对象,分为空白对照组、TGF-β1 12.5、25.0、50.0 ng/mL 组、TGF-β1 50.0 ng/mL + I 型受体抑制剂(LY364749)5.0 μmol/L 组和 ILK 抑制剂(QLT-0267)5.0 μmol/L 组,各组细胞在上述处理因素下培养 48、72 h,以 RT-PCR 测定 P-Smad2/3 和 ILK mRNA 的表达水平,以 Western blot 测定 P-Smad2/3、ILK 及 E-cadherin、CD31、α-SMA 和 FSP-1 蛋白的表达水平。**结果** (1)TGF-β1 可剂量依赖性诱导 HGEEnC-P-Smad2/3 和 ILK mRNA 水平显著升高($P<0.01$)以及 P-Smad2/3、ILK、α-SMA 和 FSP-1 蛋白水平显著升高($P<0.01$),但是剂量依赖性诱导 E-cadherin 和 CD31 蛋白水平显著降低($P<0.01$);(2)TGF-β1 I 型受体抑制剂和 ILK 抑制剂可显著抑制 TGF-β1 诱导 ILK mRNA 水平的升高($P<0.01$)以及 ILK、α-SMA 和 FSP-1 蛋白水平的升高($P<0.01$),抑制 E-cadherin 和 CD31 蛋白水平的降低($P<0.01$);(3)TGF-β1 I 型受体抑制剂可显著抑制 TGF-β1 诱导 P-Smad2/3 mRNA 和蛋白水平的升高($P<0.01$),但是 ILK 抑制剂对 P-Smad2/3 mRNA 和蛋白无显著影响($P>0.05$)。**结论** TGF-β1 可促进肾小球内皮-间充质细胞转分化,ILK 作为下游效应因子介导 TGF-β/Smad 信号通路参与了该过程,可能在肾脏纤维化过程中发挥重要作用。

[关键词] 整合素连接激酶;人肾小球内皮细胞;肾小球内皮细胞-间充质细胞转分化;转化生长因子-β1
[中图分类号] R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)28-3911-04

Effect of TGF-β/Smad signal pathway mediated by integrin linked kinase in the progress of renal fibrosis^{*}

Lin Lin,Zheng Jing,Zhu Weiping

(Department of Nephrology,the Fifth Affiliated Hospital,Sun Yat-Sen University,Zhuhai,Guangdong 519000,China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of TGF-β1 in the endothelial-mesenchymal transition EndMT of glomeruli,and to explore the effect of TGF-β/Smad signaling pathway mediated by integrin linked kinase(ILK) in the progress of renal fibrosis.
Methods Human glomerular endothelial cells (HGEEnC) incubated in vitro were divided into blank control group,TGF-β1 (12.5, 25.0,50.0 ng/mL) group. TGF-β1 50.0 ng/mL receptor type one antagonist (LY364749)5.0 μmol/L group,ILK (QLT-0267)5.0 μmol/L antagonist group. The mRNA level of P-Smad 2/3 and ILK was determined by RT-PCR,and the protein level of P-Smad 2/3, ILK,E-cadherin,CD31,α-SMA and FSP-1 was determined by Western blot after 48 h and 72 h after incubation in each group under the above-mentioned condition. **Results** (1)TGF-β1 could significantly increased the mRNA level of P-Smad2/3 and ILK ($P<0.01$),and the protein level of P-Smad2/3,ILK,E-cadherin,CD31,α-SMA as well as FSP-1 ($P<0.01$) in the concentration-dependent manner,but significantly decreased the protein level of E-cadherin and CD31($P<0.01$) in the concentration-dependent manner;(2)TGF-β1 receptor type one antagonist and ILK antagonist significantly inhibited the increasing mRNA level of ILK ($P<0.01$),and the protein level of ILK,E-cadherin,CD31,α-SMA as well as FSP-1 ($P<0.01$) induced by TGF-β1 in the concentration-dependent manner,and significantly inhibited the decreasing protein level of E-cadherin and CD31 induced by TGF-β1 in the concentration-dependent manner($P<0.01$);(3)TGF-β1 receptor type one antagonist significantly inhibited the increasing mRNA and protein level of P-Smad2/3($P<0.01$),but ILK antagonist had no effect to the increased mRNA and protein level of P-Smad2/3 ($P>0.05$). **Conclusion** TGF-β1 as the effector molecule in downstream can promote endothelial-mesenchymal transition of HGEEnC,and TGF-β/Smad signaling pathway mediated integrin linked kinase participate in this process,which probably play important role in the progress of renal fibrosis.

[Key words] integrin linked kinase;human glomerular endothelial cells;endothelial-mesenchymal transition;transforming growth factor-β1

肾脏纤维化是各种肾脏疾病进展到终末期肾衰竭的共同病理特征,以大量基质蛋白积聚和成纤维细胞增殖为主要的病理表现^[1]。已有大量研究显示,肾小管上皮细胞-间充质细胞转分化(EMT)在肾脏纤维化的发生发展中起着重要的作

^{*} 基金项目:珠海市科技计划项目(2013D0401990002)。 作者简介:林琳(1975—),硕士,主要从事慢性肾间质纤维化发生发展机制的研究。

用^[2]。TGF-β1 通过 TGF-β/Smad 信号途径上调整合素连接激酶(ILK),通过 ILK 调节细胞黏附、生存、分化和凋亡,从而引起细胞外基质(ECM)的积聚是促进肾脏纤维化的机制。已有研究报道,血管内皮细胞-间充质细胞转分化(EndMT)在心脏和肿瘤相关的器官纤维化中起重要作用^[3],并且可能在肾脏纤维化发病机制中有重要作用。ILK 作为 TGF-β/Smad 通路的下游效应因子可能参与介导 EndMT,但是对于 ILK 介导 TGF-β/Smad 信号通路诱导 EndMT 在肾脏纤维化中的作用却鲜有报道。本文研究 ILK 在 EndMT 及其信号传导通路中的作用,将进一步阐明肾脏纤维化的发生机制,并为肾脏纤维化的治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料 原代人肾小球内皮细胞(HGEnC),购自美国 Scien Cell 公司。

1.2 仪器与试剂 胎牛血清、内皮细胞生长添加剂、内皮细胞培养基(美国 Scien Cell 公司),TGF-β1(美国 Peprotech 公司);TGF-β1 I 型受体抑制剂 LY364749、ILK 抑制剂 QLT-0267(德国 Merk 公司),蛋白酶抑制剂(美国 Roche 公司),小鼠抗人 E-cadherin、小鼠抗人 α-SMA 单克隆抗体、小鼠抗人成纤维细胞特异蛋白-1(FSP-1)单克隆抗体及小鼠抗人内皮细胞黏附分子 1(CD31)单克隆抗体(美国 Sigma 公司),兔抗人磷酸化 Smad 2/3(p-Smad2/3)多克隆抗体、兔抗人 ILK 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),异硫氰酸荧光素(FITC)标记羊抗鼠 IgG(丹麦 DAKO 公司),总 RNA 提取试剂盒、Trizol 试剂盒、反转录试剂盒(美国 Invitrogen 公司),P-Smad2/3、ILK 及内参 GAPDH 引物(上海鼎安生科科技有限公司)。引物及产

物长度见表 1。CO₂ 恒温培养箱(美国 SHELAB 公司),EXL808 全自动酶标仪(美国 BIO-TEK 公司),SYBR Green PCR Reagents、ABI 7500 Real Time PCR System(美国 ABI 公司)。

表 1 引物序列及产物长度

引物	序列	长度 (bp)
P-Smad 2/3	上游:5'-TTG CTG AGT GCC TAA GTG AT-3'	157
	下游:5'-AC AGA CTG AGC CAG AGA GC-3'	
ILK	上游:5'-AAG GTG CTG AAG GTT CGA GA-3'	155
	下游:5'-CAG TGT GTG ATG AGG GTT GG-3'	
GAPDH	上游:5'-GGC ACA GTC AAG GCT GAG AA TG-3'	202
	下游:5'-ATG GTG GTG AAG ACG CCA GTA-3'	

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与分组 原代细胞按常规方法复苏后,加入含有 5% 胎牛血清、内皮细胞生长添加剂、内皮细胞培养基培养,置 37℃ 5% CO₂ 培养箱内传代培养,选取第 2~4 代细胞,当细胞张至 70%~80% 融合,用无血清培养基静止 24 h 进行同步化后进行试验。将同步化后的细胞按照 10⁵ 个/mL 浓度接种入 6 孔板中,每孔 2 mL。将 HGEnC 分为 6 组。A 组(空白对照)、B 组(TGF-β₁ 12.5 ng/mL)、C 组(TGF-β₁ 25.0 ng/mL)、D 组(TGF-β₁ 50.0 ng/mL)、E 组(TGF-β₁ 50.0 ng/mL+LY364749 5.0 μmol/mL)、F 组(TGF-β₁ 50.0 ng/mL+QLT-0267 5.0 μmol/mL),每组设 12 个复孔。

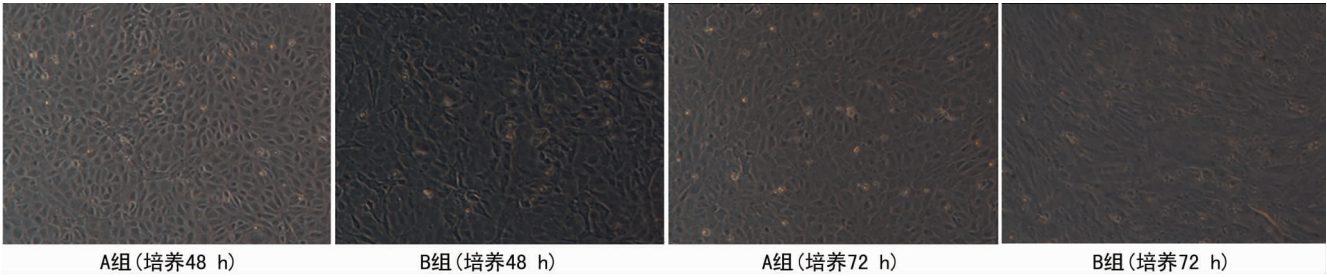


图 1 细胞形态学的结果

1.3.2 细胞形态学观察 各组细胞分别培养 48、72 h 采用倒置相关显微镜下观察细胞形态变化。

1.3.3 RT-PCR 以 RT-PCR 测定 P-Smad2/3、ILK mRNA 表达水平。按照说明书提取试剂盒制备总 RNA。取 RNA 样品,用核酸分析仪进行定量,测定 260 和 280 nm 的吸光度(A)值,控制 A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.9~2.1。然后应用 ABI 7500 Real Time PCR System 进行扩增。使用基于内参物 GAPDH 的相对定量分析,以 2^{-△△Ct} 计算目的基因 mRNA 表达量。

1.3.4 Western-blot 以 Western-blot 测定 P-Smad2/3、ILK 及 E-cadherin、CD31、α-SMA 和 FSP-1 蛋白的表达。用 Trizol 提取细胞总蛋白后 BCA 法测定蛋白浓度。采用凝胶电泳分离不同相对分子质量蛋白质,然后将蛋白转移至 PVDF 膜,脱脂奶粉室温封闭 1 h,一抗 4℃ 孵育过夜。漂洗 3 次后加入二抗室温孵育 2 h。ECL 化学发光、显影和定影。用美国 UVP 公司 LabWorks 4.5 软件对条带进行定量分析,以 GAPDH 为内

参,用目的蛋白吸光值与内参吸光度值的比值代表目的蛋白的相对表达含量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS15.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TGF-β1 在 EndMT 过程中的作用

2.1.1 细胞形态学的结果 A 组细胞多呈圆形和卵圆形。B 组培养 48 h 后已有部分转化为成纤维细胞,B 组培养 72 h 后更多内皮细胞转化为成纤维细胞,见图 1。

2.1.2 PCR 结果 HGEnC 与不同浓度 TGF-β1 共同培养后 P-Smad2/3 和 ILK mRNA 水平显著升高(*P* < 0.01),并且具有剂量依赖性(*P* < 0.01),见表 2,图 2。

2.1.3 Western blots 结果 HGEnC 与不同浓度 TGF-β1 共同培养后 P-Smad2/3、ILK、α-SMA 和 FSP-1 蛋白水平显著升

高($P<0.01$),而 E-cadherin 和 CD31 水平显著降低($P<0.01$),并且具有剂量依赖性($P<0.01$),见表 3、图 3。

表 2 各组细胞 P-Smad2/3 和 ILK mRNA 水平的比较($\bar{x}\pm s,n=6$)

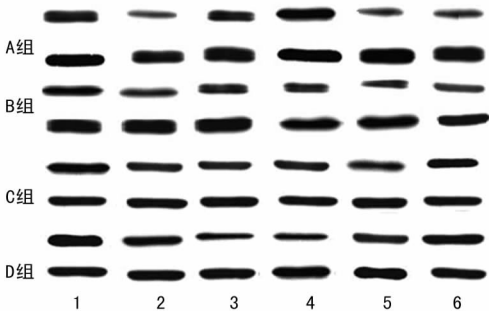
组别	P-Smad2/3	ILK
A 组	0.47±0.05	0.05±0.03
B 组	0.63±0.06 ^a	0.15±0.05 ^a
C 组	0.84±0.08 ^{ab}	0.26±0.04 ^{ab}
D 组	1.30±0.09 ^{abc}	0.48±0.06 ^{abc}

^a: $P<0.01$,与 A 组比较;^b: $P<0.01$,与 B 组比较;^c: $P<0.01$,与 C 组比较。

表 3 各组细胞 P-Smad2/3、ILK 及 E-cadherin、CD31、 α -SMA 和 FSP-1 蛋白水平的比较($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	P-Smad2/3	ILK	E-cadherin	CD31	α -SMA	FSP-1
A 组	0.98±0.08	0.12±0.03	0.68±0.04	0.84±0.09	0.24±0.03	0.26±0.05
B 组	1.23±0.10 ^a	0.24±0.05 ^a	0.52±0.05 ^a	0.65±0.09 ^a	0.32±0.05 ^a	0.57±0.06 ^a
C 组	1.57±0.16 ^{ab}	0.46±0.08 ^{ab}	0.42±0.03 ^{ab}	0.54±0.07 ^{ab}	0.39±0.04 ^{ab}	0.86±0.09 ^{ab}
D 组	2.54±0.21 ^{abc}	0.86±0.11 ^{abc}	0.32±0.05 ^{abc}	0.43±0.06 ^{abc}	0.73±0.06 ^{abc}	1.76±0.12 ^{abc}

^a: $P<0.01$,与 A 组比较;^b: $P<0.01$,与 B 组比较;^c: $P<0.01$,与 C 组比较。



1:P-Smad2/3;2:ILK;3:E-cadherin;4:CD31;5: α -SMA;6:FSP-1。

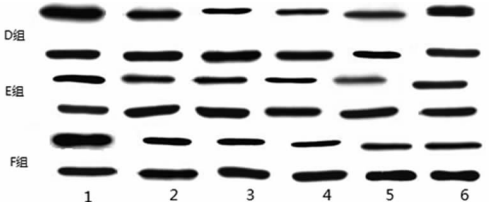
图 3 Western blots 结果

2.2.2 West blots 结果 TGF- β 1 I 型受体抑制剂 LY364749 均可显著抑制 TGF- β 1 导致的 P-Smad2/3、ILK、 α -SMA 和 FSP-1 蛋白水平的升高($P<0.01$),并且显著抑制 E-cadherin 和 CD31 蛋白水平的降低($P<0.01$);ILK 抑制剂 QLT-0267 可显著抑制 TGF- β 1 导致的 ILK、 α -SMA 和 FSP-1 蛋白水平的

表 5 3 组细胞 P-Smad2/3、ILK 及 E-cadherin、CD31、 α -SMA 和 FSP-1 蛋白水平的比较($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	P-Smad2/3	ILK	E-cadherin	CD31	α -SMA	FSP-1
D 组	2.56±0.23	0.95±0.13	0.30±0.06	0.40±0.05	0.75±0.07	1.73±0.15
E 组	1.72±0.19 ^a	0.48±0.09 ^a	0.51±0.05 ^a	0.61±0.06 ^a	0.40±0.06 ^a	0.94±0.11 ^a
F 组	2.52±0.22	0.53±0.08 ^a	0.44±0.04 ^a	0.54±0.04 ^a	0.44±0.06 ^a	0.90±0.12 ^a

^a: $P<0.01$,与 D 组比较。



1:P-Smad2/3;2:ILK;3:E-cadherin;4:CD31;5: α -SMA;6:FSP-1。

图 5 Western blots 结果

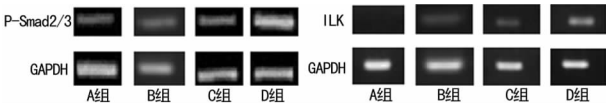


图 2 PCR 结果

2.2 ILK 在 TGF- β 1 介导 EndMT 中的作用

2.2.1 PCR 结果 TGF- β 1 I 型受体抑制剂 LY364749 均可显著抑制 TGF- β 1 导致的 P-Smad2/3 和 ILK mRNA 水平的升高($P<0.01$);ILK 抑制剂 QLT-0267 均可显著抑制 TGF- β 1 导致的 ILK mRNA 水平的升高($P<0.01$),但是对 P-Smad2/3 mRNA 无显著影响($P>0.05$),见表 4、图 4。

升高($P<0.01$),并且显著抑制 E-cadherin 和 CD31 蛋白水平的降低($P<0.01$),但是对 P-Smad2/3 蛋白的抑制作用差异无统计学意义($P>0.05$),见表 5、图 5。

表 4 3 组细胞 P-Smad2/3 和 ILK mRNA 水平的比较($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	P-Smad2/3	ILK
D 组	1.32±0.16	0.52±0.07
E 组	0.84±0.09 ^a	0.27±0.05 ^a
F 组	1.29±0.07	0.31±0.06 ^a

^a: $P<0.01$,与 D 组比较。

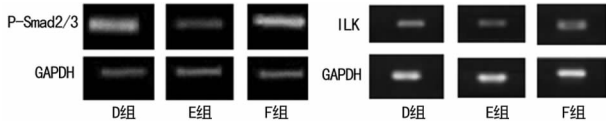


图 4 PCR 结果

3 讨 论

肾脏纤维化是多种肾脏疾病走向肾衰竭的共同途径,是多种慢性肾病的共同病理基础。既往认为肾脏组织中肌成纤维细胞主要来源于局部固有成纤维细胞、骨髓源性细胞、肾小球系膜细胞和 EMT。2007 年 Zeiberg 等^[4]首次发现血管 EndMT 在心脏和肿瘤相关的器官纤维化中起重要作用。EndMT 参与成纤维细胞和肌成纤维细胞的堆积,提示 EndMT 可能是肾早期纤维化的主要原因^[5]。EndMT 可以被许多细胞和细胞

因子所诱导,TGF-β 被认为是最重要的因子,在各种进行性肾脏疾病发展为肾脏纤维化过程中发挥了重要作用,是引起肾小球硬化及肾间质纤维化的主要介质。ILK 是一种丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶,近年来研究发现 ILK 与肾间质纤维化具有密切的关系^[6]。目前认为 ILK 通过整合素信号转导途径和 TGF-β/Smad 信号转导途径促进肾间质纤维化的发生发展。但是对于 ILK 介导 TGF-β/Smad 信号通路诱导 EndMT 的作用却鲜有报道,因此本文对该过程中 ILK 介导 TGF-β/Smad 信号通路诱导的作用进行研究。

在本研究中,TGF-β1 与 HGENC 共同培养后部分内皮细胞已转化为成纤维细胞,因此初步提示 TGF-β1 促进了 HGENC 的 EndMT 过程。近年来发现 TGF-β1 信号转导级联从细胞膜传入细胞核与基因表达偶联依赖于 Smad 家族蛋白的调节,而 P-Smad2/3 是 TGF-β1/Smad 信号通路中的重要信号转导分子,其 mRNA 和蛋白表达量则是 TGF-β1/Smad 信号通路激活程度的标志^[7]。TGF-β1 与 HGENC 共同培养后 P-Smad2/3 的 mRNA 和蛋白水平表达显著升高,提示 TGF-β1 激活了 HGENC 的 TGF-β1/Smad 信号通路。ILK 是一种存在于细胞胞质中的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是参与细胞内外信号传导通路形成的重要介质,调节细胞黏附、生存、分化和凋亡^[8]。本研究中 TGF-β1 与 HGENC 共同培养后 ILK 的 mRNA 和蛋白水平表达显著升高,提示 ILK 参与 HGENC 的 EndMT 过程。肾小管上皮细胞发生 EMT 会出现 E-cadherin 的丢失,以及表达间质细胞特异性的成纤维细胞特异性蛋白 FSP-1、α-SMA 等,从而转分化为间质成纤维细胞^[9],在本研究我们也观察到 HGENC 的 EndMT 过程出现类似现象。

综上所述,TGF-β1 可促进肾小球内皮-间充质细胞转分化,TGF-β/Smad 信号通路参与了该过程,ILK 是其重要的下游效应因子,可能在肾脏纤维化过程发挥重要作用。

参考文献

[1] 谢恺庆,史伟,李东风,等. C 反应蛋白诱导肾小管上皮细胞 TGFβ1 表达的受体途径[J]. 中华医学杂志,2012,92

(18):1281-1284.
[2] Burns WC,Kantharidis P,Thomas MC. The role of tubular epithelial-mesenchymal transition in progressive kidney disease[J]. Cells Tissues Organs,2007,185(1/3):222-231.
[3] Ghosh AK,Nagpal V,Covington JW,et al. Molecular basis of cardiac endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT):differential expression of microRNAs during EndMT[J]. Cell Signal,2012,24(5):1031-1036.
[4] Zeisberg EM,Potenta SE,Sugimoto H,et al. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition[J]. J Am Soc Nephrol,2008,19(12):2282-2287.
[5] 陈蓉,谢梅林. TGF-β/Smads 信号通路在心肌纤维化发生和治疗中应用前景的研究进展[J]. 中国药理学通报,2012,28(9):1189-1192.
[6] Liu BC,Li MX,Zhang JD,et al. Inhibition of integrin-linked kinase via a siRNA expression plasmid attenuates connective tissue growth factor-induced human proximal tubular epithelial cells to mesenchymal transition[J]. Am J Nephrol,2008,28(1):143-151.
[7] 曹慧霞,牛福坤,尤冠巧,等. 硫化氢对 TGF-β1 诱导的 HK-2 细胞上皮间充质转化的抑制作用[J]. 郑州大学学报:医学版,2012,47(5):654-657.
[8] 牛洪琳,李英,刘茂东,等. 贝那普利对高糖培养下大鼠肾小球系膜细胞整合素连接激酶及 α 平滑肌肌动蛋白表达的影响[J]. 中华肾脏病杂志,2013,29(1):33-38.
[9] 翟英,孙世仁,杜锐,等. 早期生长反应因子 1 过表达促进肾小管上皮细胞转分化[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2009,18(6):537-541.

(收稿日期:2015-04-15 修回日期:2015-05-20)

(上接第 3910 页)

后骨不连原因分析[J]. 重庆医学,2008,37(21):2472-2475.
[8] 彭国常,汪玉辉,李跃,等. 胫骨内固定术后非感染性骨不连的原因分析及治疗[J]. 临医学工程,2014,21(1):52-53.
[9] 蒋亮东,陶澄,何爱咏,等. 75 例股骨骨折不愈合发生的原因分析[J]. 重庆医学,2014,43(8):970-972.
[10] 潘治军,杨涛,思玉楼,等. 280 例骨不连原因分析[J]. 中国骨伤,2014,26(4):284-285.
[11] Kuffler DP. Hyperbaric oxygen therapy:can it prevent ir-

radiation-induced necrosis[J]. Int Exp Neurol,2012,235(2):517-527.
[12] 孙贵平. 高压氧在下肢创伤中的疗效分析 V. 华中科技大学,2012.
[13] 刘震. 高压氧对兔下颌骨牵引区生长因子表达的影响[D]. 泸州医学院,2012.
[14] 林忠豪,张玲,练克俭,等. 高压氧综合治疗肢体创伤疗效观察[J]. 中华理疗杂志,2000,23(3):147-149.

(收稿日期:2015-04-30 修回日期:2015-05-26)

欢迎投稿

欢迎订阅