

Lefty - 2 蛋白对转化生长因子 β 1 诱导的大鼠肾成纤维细胞 NRK - 49F 转分化的逆转作用及其机制

秦 聪 张 杰 张礼军 吴 品

摘要 目的 观察 Lefty - 2 蛋白对转化生长因子 β 1(TGF - β 1)诱导的肾成纤维细胞(NRK - 49F)转分化的逆转作用,并探讨其机制。**方法** 对照组:NRK - 49F 不做处理;刺激组:加入 TGF - β 1(10ng/ml);低剂量治疗组:TGF - β 1(10ng/ml) + Lefty - 2(10ng/ml);中剂量治疗组:TGF - β 1(10ng/ml) + Lefty - 2(20ng/ml);高剂量治疗组:TGF - β 1(10ng/ml) + Lefty - 2(50ng/ml)。通过细胞免疫荧光法观察各组 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、纤连蛋白(FN)和波形蛋白(Vimentin)的表达水平,通过 Western blot 法检测各组 α -SMA、FN、Vimentin、p-Smad3 蛋白、Smad7 蛋白的表达水平。**结果** 细胞免疫荧光结果显示,刺激组 α -SMA、FN、Vimentin 表达量均显著增加,治疗组较刺激组表达量均明显减少。Western blot 法结果显示,治疗组 α -SMA、FN、Vimentin 的表达量较刺激组均下降($P < 0.01$),而且呈现剂量效应。刺激组 p-Smad3 蛋白表达上调,治疗组 p-Smad3 蛋白的表达量较刺激组明显下调($P < 0.01$);刺激组 Smad7 蛋白表达下调,治疗组 Smad7 蛋白的表达量较刺激组明显上调($P < 0.01$)。**结论** Lefty - 2 蛋白可逆转 TGF - β 1 诱导的 NRK - 49F 的转分化,可降低 α -SMA、FN、Vimentin 的表达,可能是通过活化 Smad7 信号通路,抑制 Smad3 的磷酸化,从而抑制 Smad3 信号通路来实现的。

关键词 Lefty - 2 TGF - β 1 NRK - 49F 转分化

中图分类号 R6

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.04.006

Reversal Effect of Lefty - 2 Protein on the Differentiation of Rat Kidney Fibroblasts(NRK - 49F) Induced by TGF - β 1 and Its Mechanism.

Qin Cong, Zhang Jie, Zhang Lijun, et al. Central Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract Objective To observe the reversal effect of Lefty - 2 protein on the differentiation of renal fibroblasts (NRK - 49F) induced by TGF - β 1 and to explore its mechanism. **Methods** The control group is not treated, and the stimulation group was treated with TGF - β 1(10ng/ml), and the low dose treatment group was treated with TGF - β 1(10ng/ml) and Lefty - 2 (10ng/ml) , and the middle dose treatment group was treated with TGF - β 1 (10ng/ml) and Lefty - 2 (20ng/ml) , the high dose treatment group was treated with TGF - β 1(10ng/ml) and Lefty - 2 (50ng/ml). By immunofluorescence, the expression levels of α -SMA, FN, Vimentin were observed and by Western blot, the expression levels of α -SMA, FN, Vimentin, p-Smad3 and Smad7 were detected. **Results** The results showed that the expression of α -SMA, FN and Vimentin in the stimulation group were significantly increased, and the expression of the treatment group was significantly decreased ($P < 0.01$). Western blot results showed that the expression of α -SMA, FN and Vimentin in the treatment group were decreased, and the dose effect relationship was found. The expression of p-Smad3 was up-regulated in the treatment group, the expression of p-Smad3 in the treatment group was significantly lower than that in the stimulation group ($P < 0.01$). The expression of Smad7 in the stimulation group was significantly lower than that in the treatment group ($P < 0.01$). **Conclusion** Lefty - 2 protein can reverse the differentiation of NRK - 49F induced by TGF - β 1. It can decrease the expression of α -SMA, FN and Vimentin, by activating Smad7 signaling pathway and inhibit the phosphorylation of Smad3 so as to inhibit the Smad3 signaling pathway.

Key words Lefty - 2; TGF - β 1; NRK - 49F; Differentiation

Lefty 蛋白可以调节胚胎的发育和干细胞分化^[1],是一种重要的细胞因子,可以通过抑制 TGF - β 1/Smads 信号通路的多个环节而发挥抗纤维化的作用

用^[1,2]。在人体,Lefty 蛋白分为 Lefty - A 和 Lefty - B;在小鼠中,Lefty 蛋白分为 Lefty - 1 和 Lefty - 2^[3]。本实验所用的 Lefty - 2 蛋白来源于小鼠。肾成纤维细胞的转分化,是肾纤维化形成的重要方式之一,肾纤维化是一个动态发展的过程,大致分为 4 个阶段:起始、活化、执行、进展,这 4 个过程在肾纤维化的发生、发展中是相互重叠的^[4,5]。在肾纤维化的一期和

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81170710)

作者单位:430060 武汉大学人民医院泌尿外科

通讯作者:张杰,教授,博士生导师,电子信箱:zhangjiewhu666@163.com

二期及时进行干预是防止肾纤维化进展到瘢痕形成期和尿毒症终末期的重要手段。本实验中 Lefty - 2 作为治疗药物,干预经 TGF - β 1 诱导的 NRK - 49F 细胞,观察 Lefty - 2 蛋白对肾纤维化的治疗作用,并探讨其机制。

材料与方法

1. 材料:大鼠肾成纤维细胞(NRK - 49F)购于美国 ATCC 细胞库;Lefty - 2 和 TGF - β 1 购自 R&D Systems;胎牛血清、0.25% 胰酶购于美国 Gibco 公司;GADPH、兔抗大鼠 α -SMA、FN、Vimentin、p-Smad3、Smad7 抗体和山羊抗兔抗体购自美国 Abcam 公司;DMEM 培养基、双抗、Marker、SDS 凝胶配制试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒购自武汉谷歌生物有限公司。超净工作台购自苏净安泰,冰箱购自容声公司,压力蒸气灭菌锅购于日本 Sanyo 公司,高温烤箱购自上海精宏公司,微量移液器购于 Eppendorf 公司,电子天平购自德国 Sartorius,离心机购于德国 Thermo 公司,超级纯水仪购于美国 Millipore 公司,37℃恒温水浴箱购自天津泰斯特公司,倒置显微镜购自日本 Olympus 公司,正置荧光显微镜购自日本 Olympus 公司。

2. 肾成纤维细胞的培养:肾成纤维细胞用含有 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 完全培养基,于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养并传代,每 2~3 天传代 1 次,待细胞长至 80% 左右,将细胞分为对照组、刺激组、低剂量治疗组、中剂量治疗组和高剂量治疗组。

3. 细胞处理:对照组不作处理;刺激组用 10ng/ml 的 TGF - β 1 刺激;治疗组用 TGF - β 1 刺激并加入 Lefty - 2 蛋白,浓度梯度为 10、20、50ng/ml。培养 48h,通过细胞免疫荧光法观察各组 α -SMA、FN、Vimentin 的表达水平,通过 Western blot 法检测各组 p-Smad3、Smad7 的表达水平。

4. 细胞免疫荧光法观察各组细胞 α -SMA、FN、Vimentin 的表达量的改变:①清洗:在培养板中将已爬好细胞的玻片用 PBS 浸洗 3 次,每次 1min;②固定:用 4% 的多聚甲醛室温固定爬片 15min,用 PBS 浸洗玻片 3 次,每次 1min。③打孔:0.5% Triton X - 100 室温通透 2~5min,用 PBS 浸洗玻片 3 次,每次 1min;④封闭:4℃ 1% BSA 处理细胞 10min;⑤一抗标记:用 PBS 清洗盖玻片 3 次,置于 Parafilm 上,有细胞一面朝上,滴加约 50 μ l 的一抗于盖玻片上,置于湿盒,4℃过夜;⑥二抗标记:用 PBS 浸洗爬片 3 片,于 Parafilm 上,有细胞一面朝上,滴加 50 μ l 的二抗于盖

玻片上,置于湿盒避光室温 1h;⑦复染核:滴加 DAPI 避光孵育 5min,对标本进行染核,PBS 洗 3 次;⑧用吸水纸吸干爬片上的液体,用含有抗荧光淬灭剂的封片液封片,然后在正置荧光显微镜下观察并采集图像。

5. Western blot 法检测各组 α -SMA、FN、Vimentin、p-Smad3、Smad7 的表达量:①蛋白样品的制备:用 PBS 稀释蛋白上样缓冲液并加入 cocktail、PMSF 后在 6 孔板的 5 个组每空加入 80 μ l 冰上放 5min 后用刮取混合液,分别移至 5 个对应的 EP 管中置于 100℃ 的热快中 10min 使其变性。用 BCA 浓度测定法测蛋白浓度;②凝胶配制:从武汉谷歌公司购买的 SDS - PAGE 试剂盒,按照说明书中剂量首先配制 15ml 浓度为 10% 的分离胶,放置 20min 后配制 6ml 浓度为 5% 的浓缩胶,加浓缩胶后迅速插入梳子,放置 20min 后拔出梳子;③上样与电泳:将配置好的电泳液倒入电泳槽。根据提前测好的蛋白浓度,将一定量的蛋白加入上样孔。上样时,两端各加入 2.5 μ l 的 Marker。电泳时电压通常在浓缩胶时电压尽量低,为 60~80V,当进入分离胶,可调高电压至 100~120V。通常溴酚蓝进入底层胶时需 2h,此时蛋白已经被适当分离可停止电泳;④转膜:提前准备好切割好的 PVDF 膜,切勿用手直接触摸,在左上角做好标记后用甲醇激活 3min,切下胶片将条带贴在相应分子质量的位置。转膜时恒流 200mA,整个过程放在冰上进行。根据分子质量的大小确定转膜时间,高分子质量需要的转膜时间长,低分子质量的蛋白转膜 45~60min;⑤封闭:配制好 5% 的脱脂奶粉封闭液,在摇床上摇匀,将膜放入 TBST 液中稍微漂洗,将膜放入封闭液中在摇床上摇动 1h。若背景较深,可适当延长;⑥一抗孵育:参考 α -SMA、FN、Vimentin、p-Smad3、Smad7 一抗说明书,按比例用一抗稀释液稀释。从封闭液中取出膜,用 TBST 清洗,将膜放入到相应的装有一抗 EP 管中,置于 4℃ 低温摇床上过夜;⑦二抗孵育:将用一抗孵育好的膜取出,用 TBST 液清洗 3 遍,每遍 10min。用二抗稀释液稀释二抗,将膜放入盛有二抗的 EP 管中,在低速摇床上避光孵育 1h。将条带取出放入 TBST 洗涤液中,清洗 3 遍,每遍约 10min,此过程要避光;⑧蛋白检测:利用 Odyssey 双色红外激光成像系统扫膜,读取灰度值。

3. 统计学方法:所有数据均使用 SPSS 20.0 统计软件进行分析,数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 细胞免疫荧光观察结果: α -SMA 采用红色荧光,对照组表达量较少,几乎不表达,经过刺激后表达量明显增加,高剂量治疗组表达量较刺激组明显减少($P < 0.01$)。FN 采用绿色荧光,对照组有少量表达,

刺激组表达量明显增多,高剂量治疗组较刺激剂组表达量显著减少($P < 0.01$)。Vimentin 采用绿色荧光,对照组几乎不表达,刺激组表达量明显增加明显,高剂量治疗组几乎不表达,高剂量治疗组较刺激组($P < 0.01$,图 1)。

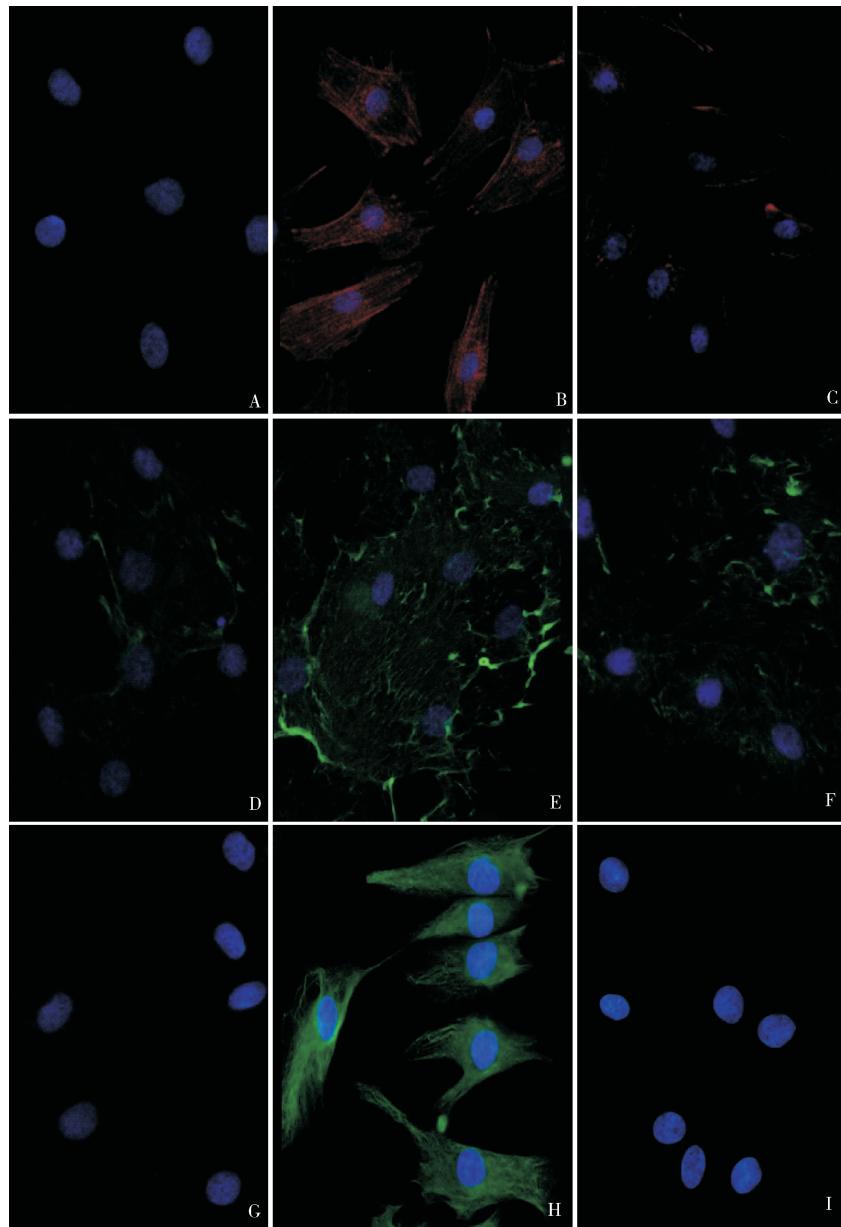


图 1 细胞免疫荧光检测 α -SMA、FN、Vimentin 的表达量

A. α -SMA 对照组;B. α -SMA 刺激组;C. α -SMA 高剂量治疗组;D. FN 对照组;
E. FN 刺激组;F. FN 高剂量治疗组;G. Vimentin 对照组;H. Vimentin 刺激组;I. Vimentin 高剂量治疗组

2. Western blot 法检测结果:(1) α -SMA、FN、Vimentin 的表达量:从 Western blot 法检测结果可以看出对照组 α -SMA 几乎不表达,刺激组表达量明显增加,治疗组较刺激组表达量明显减少,而且随着药物浓度的增加表达量减少更明显,呈现出剂量效应。对

照组 FN 少量表达,刺激组表达量明显增加,治疗组较刺激组表达量明显减少,而且随着药物浓度的增加表达量减少更明显。对照组 Vimentin 几乎不表达,刺激组表达量明显增加,治疗组较刺激组表达量明显减少,而且随着药物浓度的增加表达量减少更明显,

呈现出剂量效应(图2)。(2)p-Smad3蛋白、Smad7蛋白的表达量:对照组p-Smad3几乎不表达,刺激组表达量较多,治疗组较刺激组表达量明显减少,呈现剂量效应关系,TGF- β 1刺激会使Smad3发生磷

酸化,磷酸化的Smad3是致病性的,会促进肾成纤维细胞向肌成纤维细胞转分化,从而导致肾脏纤维化。对照组Smad7高表达,刺激组表达量显著减少,治疗组较刺激组表达量明显增加,呈现剂量效应关系(图3)。

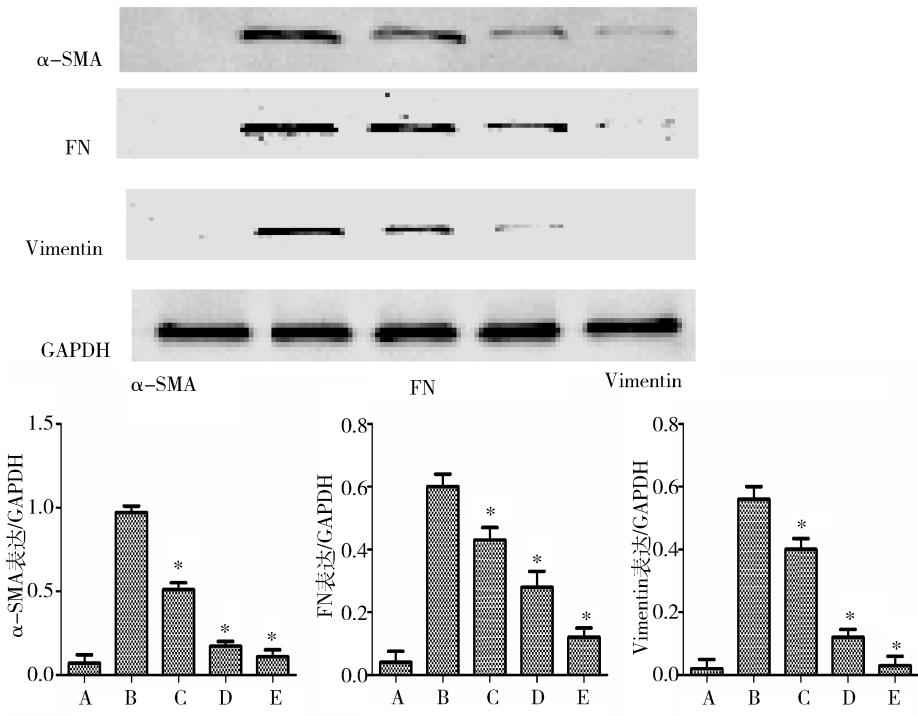


图2 Western blot法检测 α -SMA、FN、Vimentin 的表达量

α -SMA. α -平滑肌肌动蛋白;FN. 纤连蛋白;Vimentin. 波形蛋白;A. 对照组;B. 刺激组;
C. 低剂量治疗组;D. 中剂量治疗组;E. 高剂量治疗组;与刺激组相比, * $P < 0.01$

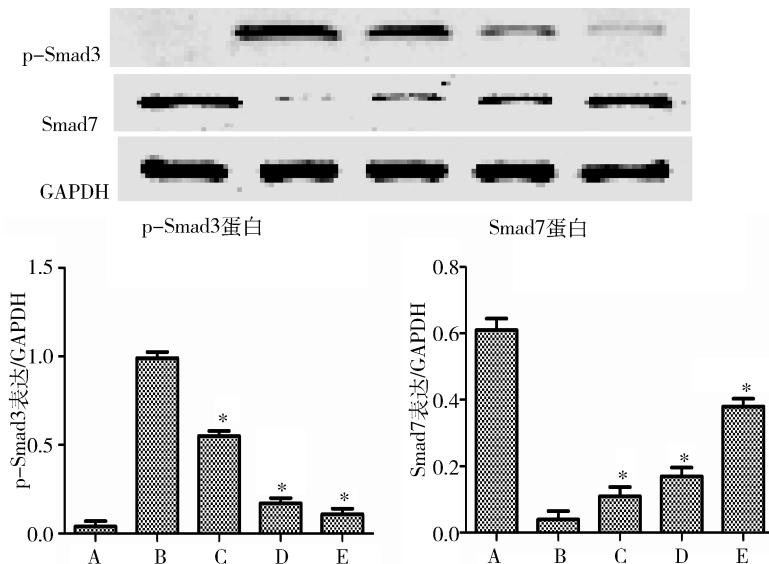


图3 Western blot法检测 p-Smad3 蛋白、Smad7 蛋白的表达量

A. 对照组;B. 刺激组;C. 低剂量治疗组;D. 中剂量治疗组;E. 高剂量治疗组;与刺激组相比, * $P < 0.01$

讨 论

Smad蛋白在将转化生长因子- β (TGF- β)信

号从细胞表面受体传导至细胞核的过程中起着重要的作用^[6,7]。根据结构的不同,Smad蛋白分为R-

Smad、Co-Smad、I-Smad 这 3 个亚家族,包括 9 种 Smad 蛋白^[8]。按照功能可分为 3 类:受体活化型 Smad 蛋白(R-Smad)、共同通路型 Smad 蛋白(Co-Smad)、抑制型 Smad 蛋白(I-Smad)^[9,10]。不同 Smad 介导不同 TGF-β 家族成员的信号转导。由激活素 TGF-β 激活的 R-Smad 包括 Smad2、Smad3,由 BMP 等激活的 Smad 包括 Smad1、Smad5、Smad8、Smad9。Co-Smad 包括 Smad4 是 TGF-β 家族中各类信号转导过程中共同需要的介质^[11~13]。TGF-β 作为配体形成受体复合物,激活 Smad 进入核内,共同激活或抑制他们调节的靶基因的转录^[14]。TGF-β 超家族二聚配体能与细胞膜表面的 I 和 II 型丝氨酸/苏氨酸激酶受体结合形成异物四聚复合体,活化后的 I 型受体使 R-Smad 磷酸化,磷酸化的 R-Smad 与 Co-Smad 形成异聚复合体,进入细胞核,与其他转录协同子和抑制子共同调节靶基因的转录^[15,16]。 α -SMA、FN、Vimentin 的表达量可以反映转分化的程度^[17~19],可以作为治疗效果的指标。本实验中 TGF-β1 作为刺激药物使肾成纤维细胞转分化为肌成纤维细胞,制造出肾纤维化的模型,从细胞免疫荧光和 Western blot 法检测结果可以看出本次试验成功做出了肾纤维化模型,用 Lefty-2 蛋白作为治疗药物逆转肾纤维化,从细胞免疫荧光和 Western blot 法结果可以看出 Lefty-2 蛋白治疗作用显著,Lefty-2 蛋白可以减少转分化细胞中 α -SMA、FN、Vimentin 的表达量,可以活化 Smad7 信号通路,抑制 Smad3 的磷酸化,抑制 Smad3 信号通路从而发挥抗肾纤维化的作用。

综上所述,Lefty-2 蛋白可激活 Smad7 信号通路,抑制 Smad3 信号通路从而降低 TGF-β1 刺激后 NRK-49F 细胞中 α -SMA、FN、Vimentin 的表达,可以逆转 TGF-β1 诱导的 NRK-49F 细胞的转分化,为肾纤维化的药物治疗提供理论依据,随着研究的不断深入,其更多的作用机制将会被发现。

参考文献

- Wang L, Cao AL, Chi YF, et al. You-gui Pill ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis via inhibition of TGF-β/Smad signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 169 (10): 229~238
- Overstreet JM, Samarakoon R, Cardona-Grau D, et al. Tumor suppressor ataxia telangiectasia mutated functions downstream of TGF-β1 in orchestrating profibrotic responses[J]. FASEB J, 2015, 29 (4): 1258~1268
- Li J, Ren J, Liu X, et al. Rictor/mTORC2 signaling mediates TGFβ1-induced fibroblast activation and kidney fibrosis[J]. Kidney International, 2015, 88 (3): 515~527
- Wang L, Chi YF, Yuan ZT, et al. Astragaloside IV inhibits renal tubulointerstitial fibrosis by blocking TGF-β/Smad signaling pathway in vivo and in vitro[J]. Exp Biol Med: Maywood, 2014, 239 (10): 1310~1324
- Chen KH, Hsu HH, Lee CC, et al. The AMPK Agonist AICAR inhibits TGF-β1 induced activation of kidney myofibroblasts[J]. PLoS One, 2014, 9 (9): e106554
- Shiohira S, Yoshida T, Sugiura H, et al. Sphingosine-1-phosphate acts as a key molecule in the direct mediation of renal fibrosis [J]. Physiol Rep, 2013, 1 (7): e00172
- Meng XM, Chung AC, Lan HY. Role of the TGF-β/BMP-7/Smad pathways in renal diseases[J]. Clin Sci: Lond, 2013, 124 (4): 243~254
- He J, Xu Y, Koya D, et al. Role of the endothelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis of chronic kidney disease[J]. Clin Exp Nephrol, 2013, 17 (4): 488~497
- Yanagita M. Inhibitors/antagonists of TGF-β system in kidney fibrosis[J]. Nephrol Dial Transplant, 2012, 27 (10): 3686~3691
- Samarakoon R, Overstreet JM, Higgins SP, et al. TGF-β1 → SMAD/p53/USF2 → PAI-1 transcriptional axis in ureteral obstruction-induced renal fibrosis[J]. Cell Tissue Res, 2012, 347 (1): 117~128
- Oh CJ, Kim JY, Choi YK, et al. Dimethylfumarate attenuates renal fibrosis via NF-E2-related factor 2-mediated inhibition of transforming growth factor-β/smad Signaling[J]. PLoS One, 2012, 7 (10): e45870
- Grgic I, Duffield JS, Humphreys BD. The origin of interstitial myofibroblasts in chronic kidney disease[J]. Pediatr Nephrol, 2012, 27 (2): 183~193
- Farris AB, Colvin RB. Renal interstitial fibrosis: mechanisms and evaluation[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2012, 21 (3): 289~300
- Chang FC, Chou YH, Chen YT, et al. Novel insights into pericyte-myofibroblast transition and therapeutic targets in renal fibrosis[J]. J Formos Med Assoc, 2012, 111 (11): 589~598
- Zhu B, Lin Y, Zhu G, et al. Emodin inhibits extracellular matrix synthesis by suppressing p38 and ERK1/2 pathways in TGF-β1-stimulated NRK-49F cells[J]. Mol Med Rep, 2011, 4 (3): 505~509
- Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis[J]. Na Revi Nephrol, 2011, 7 (12): 684~696
- Chen SC, Guh JY, Lin TD, et al. Gefitinib attenuates transforming growth factor-β1-activated mitogen-activated protein kinases and mitogenesis in NRK-49F cells[J]. Transl Res, 2011, 158 (4): 214~224
- Zhu B, Wang YJ, Zhu CF, et al. Triptolide inhibits extracellular matrix protein synthesis by suppressing the Smad2 but not the MAPK pathway in TGF-β1-stimulated NRK-49F cells[J]. Nephrol Dial Transplant, 2010, 25 (10): 3180~3191
- Liu Y. New Insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis[J]. JASN, 2010, 21 (2): 212~222

(收稿日期:2015-09-30)

(修回日期:2015-10-08)