

细胞因子信号传导抑制蛋白1对抑瘤素M诱导的肾小管上皮细胞转分化的影响

刘青娟¹ 邢玲玲² 李建英³ 刘淑霞¹ 王 辉¹ 段惠军^{1*}

(¹河北医科大学病理教研室, 石家庄 050017; ²河北医科大学第二医院肾内科, 石家庄 050000;

³河北省石家庄市人民医院皮肤科, 石家庄 050000)

摘要 观察细胞因子信号传导抑制蛋白1(suppressors of cytokine signaling, SOCS-1)对抑瘤素M(oncostatin M, OSM)诱导的肾小管上皮细胞转分化的影响。体外培养人肾近曲小管上皮细胞(HKC), 应用脂质体2000分别转染pCR3.1/SOCS-1表达质粒和pCR3.1空质粒载体, G418筛选阳性克隆, 应用OSM(10 ng/mL)进行刺激。培养48 h后收集细胞及上清液, 分别采用Western蛋白印迹检测细胞角蛋白18(cytokeratin18, CK18)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、SOCS-1和磷酸化信号传导及转录激活因子1(phospho-signal transducers and activators of transcription, p-STAT1)的表达; 采用酶联免疫吸附实验测定细胞上清液中I型胶原(collagen I, Col I)和纤维连接蛋白(fibronectin, FN)的分泌; 采用逆转录-聚合酶链反应检测CK18、 α -SMA mRNA的表达。结果显示, 与对照组相比, OSM组肾小管上皮细胞 α -SMA及p-STAT1蛋白的合成增加, α -SMA mRNA表达增加, 细胞培养上清液Col I和FN的含量增加, 而CK18蛋白及mRNA的表达减少。SOCS-1过表达能抑制OSM刺激引起的 α -SMA和p-STAT1的表达, 减少Col I和FN的分泌, 下调 α -SMA mRNA的表达, 同时能够逆转OSM刺激引起的CK18蛋白及mRNA的表达。由此可见, SOCS-1过表达能抑制OSM诱导的肾小管上皮细胞转分化, 此过程可能与STAT1的磷酸化受抑有关。

关键词 细胞因子信号传导抑制蛋白1; 抑瘤素M; 肾小管上皮细胞; 转分化

肾脏疾病晚期均表现为肾小球硬化及肾小管间质纤维化(tubular interstitial fibrosis, TIF), 其中TIF与肾功能的相关性比肾小球硬化与肾功能的相关性更为密切。研究表明, 肾小管上皮细胞来源的肌成纤维细胞是产生细胞外基质的主要细胞^[1], 在TIF中发挥重要作用。

抑瘤素M(OSM)属于白细胞介素-6家族成员, 具有多种生物学活性。研究表明, OSM可以通过激活JAK/STAT信号通路诱导肾小管上皮细胞发生表型转化, 转变为肌成纤维细胞^[2]。此外, 高糖、糖基化终末产物均可通过激活该通路诱导肾小管上皮细胞表型转化^[3-4]。细胞因子信号传导抑制蛋白(suppressors of cytokine signaling, SOCS)家族是JAK/STAT信号通路重要的负调控因子。SOCS-1作为SOCS家族的一员, 因作用广泛而倍受关注。本实验旨在观察SOCS-1基因转染对OSM诱导的肾小管上皮细胞表型转化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人肾近曲小管上皮细胞株由中国人民解放军总医院肾内科陈香美教授惠赠, p-CR3.1/SOCS-1表达载体由德国慕尼黑大学Christoph J. Auernhammer教授惠赠。鼠抗CK18单克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司, 兔抗 α -SMA、SOCS-1多克隆抗体购自美国AbCam公司, p-STAT1多克隆抗体购自Santa Cruz公司。OSM购自Peprotech公司。脂质体2000、pCR3.1质粒载体购自Invitrogen公司。二步法免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥公司。Col I和FN ELISA试剂盒为美国R&D公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞实验及分组 用含10%胎牛血清的

收稿日期: 2011-03-09 接受日期: 2011-03-18

河北省卫生厅医学科学研究重点课题(No.20090055)资助项目

*通讯作者。Tel: 0311-86265734, E-mail: duanhj246@hotmail.com

DMEM培养基常规培养肾小管上皮细胞, 随机分为: 空白对照组、OSM组(10 ng/mL)、空质粒载体对照组(OSM+V)和SOCS-1质粒转染组(OSM+S1)。利用脂质体2000分别转染pCR3.1/SOCS-1和pCR3.1质粒载体。采用G418(0.8 mg/mL)筛选阳性克隆。将筛选出的阳性细胞克隆进行传代培养。待细胞贴壁60%~80%后用无血清培养基同步12 h。然后用OSM进行刺激, 于刺激48 h后收集细胞, 分别提取蛋白、RNA及细胞上清液进行以下观察。

1.2.2 电镜观察 收集细胞用2.5%的戊二醛固定, 包埋, 超薄切片, 透射电镜观察细胞的形态学改变。

1.2.3 Western blot分析 收集细胞加入蛋白裂解液200 μ L提取蛋白, 用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度, -70°C 保存。每个样品取50 μ g总蛋白, 10% SDS-PAGE凝胶电泳后电转移至PVDF膜, 5%脱脂奶粉 37°C 封闭2 h, 再分别加入CK18、 α -SMA、SOCS-1、p-STAT1抗体, 抗体均1: 500稀释, 4°C 过夜。ECL化学发光法显色。以 β -actin作为内参照。Western blot条带信号强度应用LabWork 45图像分析软件进行定量分析, 测定各条带的吸光度值(D)。

1.2.4 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR) Trizol法提取细胞总RNA, 用紫外分光光度仪测定其浓度后, 在逆转录酶的作用下合成cDNA, 以cDNA为模板进行PCR扩增。18S rRNA 5'-ACA CGG ACA GGA TTG ACA GA-3', 5'-GGA CAT CTA AGG GCA TCA CAG-3'(238 bp); CK18的上下游引物分别为: 5'-CGC TCG TTC ACG AGT GGA CCC GGT-3'和5'-CCA GCT GCC GAC GGA GGT TGA TGA-3'(388 bp), α -SMA的上下游引物分别为: 5'-CTG AAG AGC ATC CGA CAC-3'和5'-GAC TCC ATC CCA ATG AAA G-3'(520 bp)。所用引物均由上海捷锐生物公司合成。扩增条件为: 预变性 95°C 5 min, 进入循环, 94°C 变性45 s, 55°C 退火60 s, 72°C 延伸60 s, 36个循环后 72°C 延伸10 min。将PCR产物在2%琼脂糖凝胶中进行电泳, 然后置于凝胶图像分析系统(UVP公司, 美国)进行吸光度扫描, 以18S rRNA作为内参照校正, 用目的基因的吸光度与18S rRNA吸光度的比值代表目的基因的相对表达含量。

1.2.5 ELISA 收集各组细胞培养上清液用于检测Col I和FN的含量, 具体步骤严格按照试剂盒使用说明进行操作。

1.2.6 统计学方法 所得数值用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用SPSS 13.0行单因变量多因素方差分析进行显著性检验, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞的形态学改变

透射电镜观察, OSM刺激后细胞内线粒体有所减少, 部分嵴消失, 粗面内质网轻度扩张, 且细胞内出现微丝(图1)。

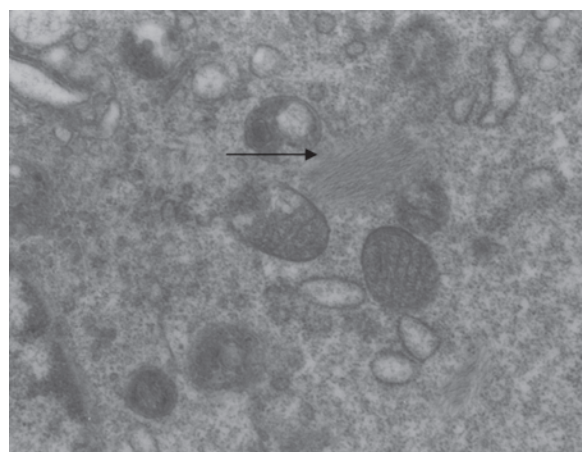


图1 OSM刺激后电镜观察细胞形态学改变($\times 20\,000$, 箭头处示微丝)

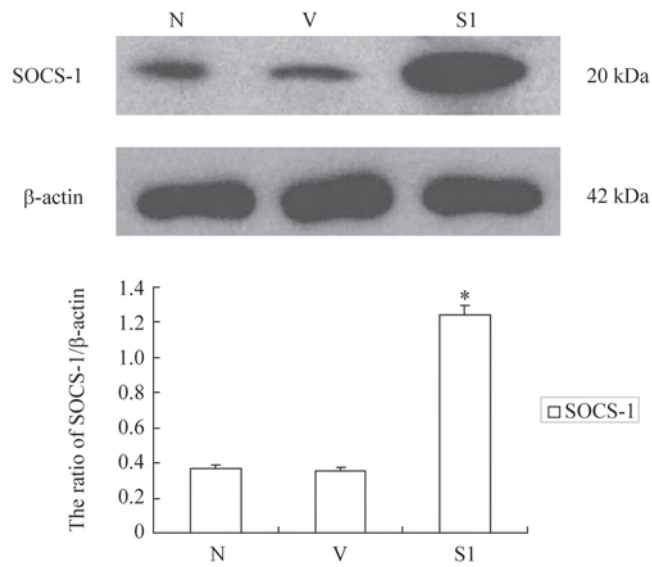
Fig.1 Electron micrographs of HKC after stimulated for 48 hours by OSM ($\times 20\,000$, arrow shows microfilament)

2.2 SOCS-1对p-STAT1、CK18、 α -SMA蛋白的影响

Western blot结果显示, 与其它组相比, SOCS-1蛋白在pCR3.1/SOCS-1转染组肾小管上皮细胞中的表达明显升高(图2)。表明SOCS-1基因成功转入细胞, 并在蛋白水平获得高效表达。与空白对照组相比, OSM刺激组和空载体对照组CK18的表达降低而 α -SMA和p-STAT1蛋白的表达增加。而与OSM刺激组和空载体对照组相比, SOCS-1转染组肾小管上皮细胞 α -SMA和p-STAT1表达下降而CK18的表达上调(图3)。

2.3 SOCS-1对CK18和 α -SMA mRNA表达的影响

与空白对照组相比, OSM刺激组和空载体对照组CK18 mRNA的表达减弱而 α -SMA mRNA的表达增强。而与OSM刺激组和空载体对照组相比, SOCS-1转染组肾小管上皮细胞 α -SMA mRNA的表达降低, 同时CK18 mRNA的表达回升(图4)。

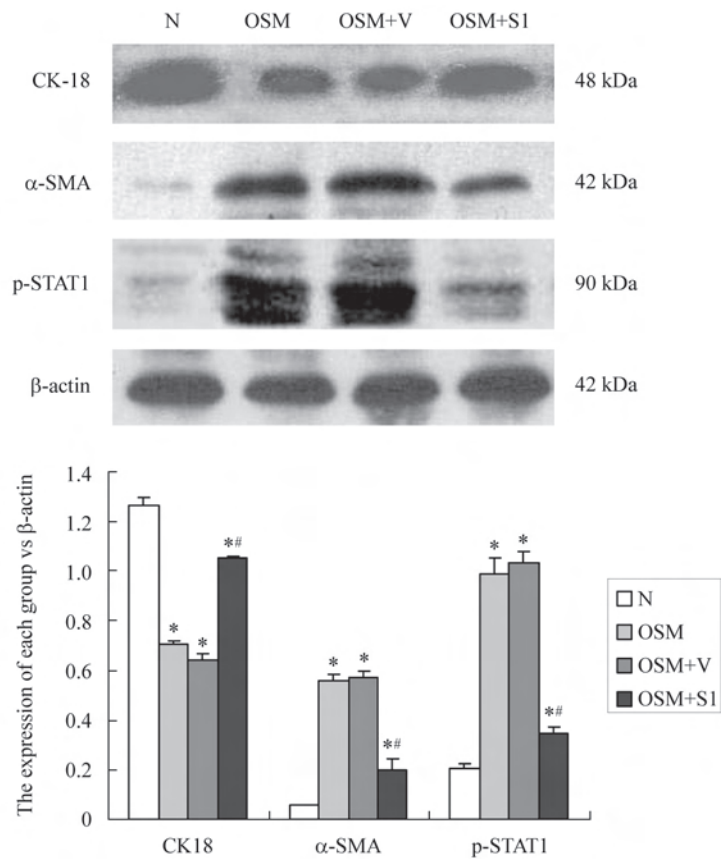


N: 空白对照组; V: 空质粒载体组; S1: SOCS1质粒转染组。* $P < 0.05$, 与空白对照组相比。

N: control; V: pCR3.1 vector transfection; S1: pCR3.1/SOCS-1 transfection. * $P < 0.05$ vs N group.

图2 SOCS-1在肾小管上皮细胞中的表达

Fig.2 Expression of SOCS-1 in HKCs

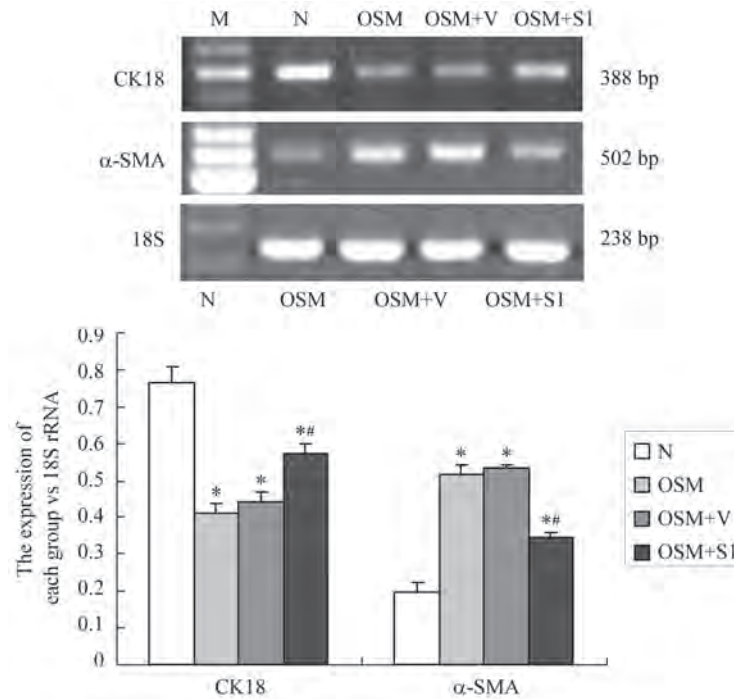


* $P < 0.05$, 与空白对照组相比; # $P < 0.05$, 与OSM刺激组相比。

* $P < 0.05$ vs N group, # $P < 0.05$ vs OSM group.

图3 过表达SOCS-1对OSM诱导的肾小管上皮细胞中CK18、α-SMA和p-STAT1的影响

Fig.3 Effect of SOCS-1 on expression of CK18, α-SMA and p-STAT1 in HKCs induced by OSM



* $P < 0.05$, 与空白对照组相比; # $P < 0.05$, 与OSM刺激组相比。

* $P < 0.05$ vs N group; # $P < 0.05$ vs OSM group.

图4 SOCS-1对OSM诱导的肾小管上皮细胞中CK18、 α -SMA mRNA的影响

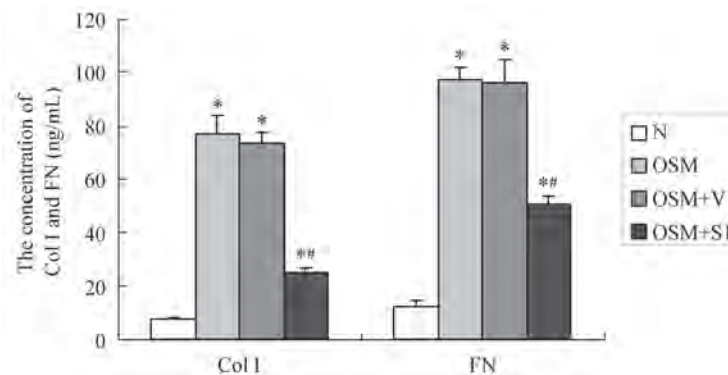
Fig.4 Effect of SOCS-1 on expression of CK18 and α -SMA mRNA in HKCs induced by OSM

2.4 SOCS-1对Col I和FN分泌的影响

在OSM刺激48 h后, 肾小管上皮细胞上清液中Col I和FN的含量明显增加, 与空白对照组相比差异有显著性。SOCS-1质粒转染后的肾小管上皮细胞上清液中Col I和FN的含量明显低于OSM刺激组, 而空载体对照组与OSM相比, Col I和FN的含量无明显变化(图5)。

3 讨论

OSM最初是1986年从U937组织型淋巴瘤细胞培养上清液中分离的一种对A375黑色素瘤细胞有生长抑制作用的因子。后经体外实验证实, OSM具有多种生物学活性, 包括刺激造血、抑制肿瘤细胞生长、促进巨噬细胞分化、调节胆固醇代谢等。有研究表明, OSM具有促纤维化的特性, 在肺损伤后的



* $P < 0.05$, 与空白对照组相比; # $P < 0.05$, 与OSM刺激组相比。

* $P < 0.05$ vs N group; # $P < 0.05$ vs OSM group.

图5 SOCS-1对OSM诱导的细胞上清液中Col I和FN分泌的影响

Fig.5 Effect of SOCS-1 on secretion of Col I and FN in the supernatant of HKCs induced by OSM

修复以及肺纤维化过程中发挥重要作用^[5]。

OSM属于细胞因子,是白细胞介素-6家族成员,细胞因子发挥其生物学作用需要通过细胞内信号传导通路。以往的研究表明,ERK以及JAK/STAT信号通路与OSM的促肾小管上皮细胞转分化作用有关^[2,6]。本研究结果表明,OSM可诱导肾小管上皮细胞高表达肌成纤维细胞的标志蛋白 α -SMA,而其自身标志蛋白CK18的表达下降,同时激活STAT1,并促使肾小管上皮细胞分泌细胞外基质蛋白Col I和FN。结果进一步证实了OSM可诱导肾小管上皮细胞转分化并促使其分泌细胞外基质,而该作用可能与STAT1的磷酸化激活有关。

SOCS家族是一类由细胞因子诱导产生并可负反馈调节细胞因子的蛋白质,现已证实,SOCS对JAK/STAT信号通路具有负调控作用^[7-8]。因此我们有理由推测,SOCS具有抑制肾小管上皮细胞转分化的作用。SOCS家族成员包括8种,即SOCS-1~SOCS-7和CIS。有关其家族成员的研究多集中在SOCS-1和SOCS-3。本课题组最近的研究表明,SOCS-1过表达能够抑制糖基化终末产物诱导的肾小管上皮细胞转分化^[9]。基于此,本实验采用脂质体转染法进行体外细胞转染,使HKCs过表达SOCS-1,以观察SOCS-1对OSM诱导的肾小管上皮细胞转分化的影响。结果表明,过表达SOCS-1能够抑制OSM诱导的肾小管上皮细胞高表达肌成纤维细胞的标志蛋白 α -SMA,同时还能逆转OSM诱导的肾小管上皮细胞自身标志蛋白CK18的表达。此外,过表达SOCS-1可抑制p-STAT1的表达。提示,SOCS-1抑制肾小管上皮细胞转分化可能与STAT1的磷酸化激活有关。

肾小管间质纤维化是慢性肾病进展到终末期肾衰的特征,主要表现为细胞外基质的异常积聚,而肌成纤维细胞是产生细胞外基质的主要细胞。研究表明,肾小管上皮细胞转分化是肌成纤维细胞的一个重要来源,是小管间质纤维化过程中的一个重要事件^[10-13]。本实验结果表明,SOCS-1过表达能抑制肾小管上皮细胞分泌细胞外基质蛋白Col I和FN,提示SOCS-1具有抑制肾小管间质纤维化的作用,对其在纤维化中的作用及机制的研究将有助于慢性肾脏

疾病的防治。

参考文献 (References)

- Iwano M, Plieth D, Danoff TM. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during renal interstitial fibrosis. *J Clin Invest* 2002; 110(3): 341-9.
- Nightingale J, Patel S, Suzuki N, Buxton R, Takagi KI, Suzuki J, *et al.* Oncostatin M, a cytokine released by activated mononuclear cells, induces epithelial cell-myofibroblast transdifferentiation via Jak/Stat pathway activation. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(1): 21-32.
- 赵松, 史永红, 段惠军. JAK/STAT信号途径参与高糖诱导的肾小管上皮细胞转分化. *中国病理生理杂志* 2008; 24 (2): 325-9.
- 史永红, 任温卓, 赵松, 郝军, 姚芳, 刘巍, 等. 细胞因子信号传导蛋白1对糖基化终末产物诱导的肾小管细胞转分化的影响. *中国药理学通报* 2010; 26(2): 190-4.
- Scaffidi AK, Mutsaers SE, Moodley YP, McAnulty RJ, Laurent GJ, Thompson PJ, *et al.* Oncostatin M stimulates proliferation, induces collagen production and inhibits apoptosis of human lung fibroblasts. *Br J Pharmacol* 2002; 136(5): 793-801.
- Pollack V, Sarközi R, Banki Z, Feifel E, When S, Gstraunthaler G, *et al.* Oncostatin M-induced effects on EMT in human proximal tubular cells: Differential role of ERK signaling. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 293(5): F1714-26.
- Wormald S, Hilton DJ. Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem* 2004; 279(2): 821-4.
- Shi Y, Zhang Y, Wang C, Du C, Zhao S, Qi Z, *et al.* Suppressor of cytokine signaling-1 reduces high glucose-induced TGF- β 1 and fibronectin synthesis in human mesangial cells. *FEBS Lett* 2008; 582(23/24): 3484-8.
- Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 2001; 159(4): 1465-75.
- Zeisberg M, Kalluri R. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med* 2004; 82(3): 175-81.
- Rastaldi MP, Ferrario F, Giardino L, Dell'Antonio G, Grillo C, Grillo P, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney Int* 2002; 62(1): 137-46.
- Tan TK, Zheng GP, Hsu TT, Wang Y, Lee VW, Tian X, *et al.* Macrophage matrix metalloproteinase-9 mediates epithelial-mesenchymal transition *in vitro* in murine renal tubular cells. *Am J Pathol* 2010; 176(3): 1256-70.
- Kida Y, Asahina K, Teraoka H, Gitelman I, Sato T. Twist relates to tubular epithelial-mesenchymal transition and interstitial fibrogenesis in the obstructed kidney. *J Histochem Cytochem* 2007; 55(7): 661-73.

Influence of SOCS-1 on OSM-induced Renal Tubular Epithelial-myofibroblast Transdifferentiation

Liu Qingjuan¹, Xing Lingling², Li Jianying³, Liu Shuxia¹, Wang Hui¹, Duan Huijun^{1*}

(¹Department of Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; ²Department of Nephrology, Second Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; ³Department of Dermatology, People's Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract In order to investigate the effect of suppressor of cytokine signaling-1 on oncostatin M-induced-renal epithelial-myofibroblast transdifferentiation in human renal tubular epithelial cells, stable transfections of HKC with pCR3.1 vector and pCR3.1/SOCS-1 were performed with Lipofectamine 2000, and cells were selected with geneticin. Cells were stimulated with OSM. The protein expressions of CK18, α -SMA, SOCS-1 and p-STAT1 were observed by Western blot. The protein synthesis of Col I and FN in the supernatants of the HKC was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *CK18* and *α -SMA* mRNA were measured by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). Compared with control group, the expression levels of α -SMA protein and mRNA and p-STAT1 were significantly increased in HKC with OSM stimulation and there was a higher concentrations of Col I and FN in the supernatants. However, the expression of CK18 protein and mRNA were decreased with OSM stimulation. Overexpression of SOCS-1 inhibited OSM-induced high expression of α -SMA protein and mRNA and activation of STAT1, and reversed the expression of CK18 protein and mRNA. Meanwhile, overexpression of SOCS-1 reduced the concentration of Col I and FN in the supernatants of HKC with OSM stimulation. We conclude that overexpression of SOCS-1 inhibits OSM-induced renal tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation maybe partly through blocking activation of STAT1.

Key words suppressor of cytokine signaling-1; oncostatin M; renal tubular epithelial cell; transdifferentiation

Received: March 9, 2011 Accepted: March 18, 2011

This work was supported by the Department of Health of the Hebei Province of China (No.20090055)

*Corresponding author. Tel: 86-311-86265734, E-mail: duanhj246@hotmail.com