

# RNA 干扰抑制肾小管上皮细胞 TSP1 表达和 TGF- $\beta$ 1 活化

吴开胤 王伟铭 黄秋花<sup>1</sup> 周同 陈楠\*

(上海交通大学医学院附属瑞金医院肾脏科,<sup>1</sup>上海血液病研究所, 上海 200025)

**摘要** 血小板反应蛋白 1 (TSP1) 是转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 体内重要的活化因子, 而后者又是致肾小管间质纤维化的关键因素。观察了针对 TSP1 的小双链干扰 RNA (siRNA-TSP1), 抑制由血管紧张素 II (AngII) 诱导的肾小管上皮细胞 TGF- $\beta$ 1 过度活化。将根据人 TSP1 基因序列设计的特异 siRNA-TSP1 转染人肾小管上皮细胞系(HK-2), 利用 Western 印迹、RT-PCR、流式细胞仪及 ELISA 等方法, 检测了 TSP1、TGF- $\beta$ 1 及其信号蛋白 Smad2 与 p-Smad2、纤维连接蛋白(FN) 和纤溶酶原激活剂抑制物-1(PAI-1) 的基因转录水平、蛋白质表达或蛋白质活性。结果显示, siRNA-TSP1 能有效转染 HK-2 细胞, 并以剂量依赖方式显著抑制 TSP1 的基因转录与合成; 其对 TGF- $\beta$ 1 的合成影响较小, 但能明显抑制 TGF- $\beta$ 1 的活化。此外 siRNA-TSP1 可阻抑 TGF- $\beta$ 1 依赖的 Smad2 磷酸化, 减少细胞外基质 FN 以及 PAI-1 的合成。研究结果提示, 由于 TSP1 是 TGF- $\beta$ 1 重要的内源性活化因子, 故针对 TSP1 的 RNA 干扰能在体外有效抑制 TSP1 表达并相应调抑了 TGF- $\beta$ 1 的活化。

**关键词** RNA 干扰; 血小板反应蛋白 1; 转化生长因子- $\beta$ 1; 肾小管上皮细胞; 肾纤维化

血小板反应蛋白 1(TSP1) 是转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 体内重要活化因子, 而 TGF- $\beta$ 1 既在体内发挥重要生理作用, 其过度活化又是导致肾脏小管间质纤维化的一个关键因素<sup>[1]</sup>。作为肾纤维化重要参与细胞, 肾小管上皮细胞在肾损伤中可通过表型转化、表达分泌包括 TGF- $\beta$ 1 等多种致炎或致纤维化成分, 在肾损伤修复乃至纤维化发生发展中起重要作用<sup>[2]</sup>。故调抑 TSP1 表达和作用, 可调节 TGF- $\beta$ 1 活化并相应阻抑由其参与的肾纤维化形成及进程<sup>[3]</sup>。RNA 干扰(RNA interference, RNAi) 技术是近几年发展起来的一种研究基因功能的新技术, 并迅速成为重要的基因沉默方法。已知 19~23 个核苷酸的小双链干扰 RNA(siRNA), 具有 RNAaseIII 样活性, 作用于具相同序列的目标 mRNA, 可使靶向基因表达明显降低<sup>[4,5]</sup>。因而此种 RNAi 技术较基因剔除技术更易且简便了解基因的功能<sup>[6-8]</sup>。为此本研究通过应用针对 TSP1 的 siRNA (siRNA-TSP1), 观察了 siRNA-TSP1 对经血管紧张素 II (AngII) 诱导的肾小管上皮细胞 TGF- $\beta$ 1 过度活化, 及其细胞外基质纤维连接蛋白(FN) 和纤溶酶原激活剂抑制物-1(PAI-1) 合

成的抑制作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人肾小管上皮细胞系(HK-2) 购于 ATCC 公司, RPMI 1640 培养基、小牛血清和胰蛋白酶购于 Gibco BRL 公司, 21 nt 人特异 TSP1 siRNA (siRNA-TSP1, 货号: sc-36665)、含变异序列 siRNA (scramble siRNA)、荧光素标记的 siRNA (siRNA-fluorescent)、转染试剂及转染培养基均购于 Santa Cruz 公司, 小鼠抗人 TSP1、TGF- $\beta$ 1 和  $\beta$  肌动蛋白单抗购于 Sigma 公司, 兔抗人 p-Smad2、Smad2 多抗购于 Calbiochem 公司, 山羊抗小鼠和山羊抗兔 HRP 标记抗体均购于 KPL 公司, RT-PCR 试剂盒购于 Promega 公司, 人 TGF- $\beta$ 1 免疫检测试剂盒购于

收稿日期: 2005-11-21 接受日期: 2006-02-05

国家自然科学基金资助项目(No. 30270613); 上海市重点学科(No. T0201); 上海市卫生局重点学科基金(No. 05 III 001); 上海市卫生局重点项目(No. 2003ZD002)

\* 通讯作者。021-64370045, E-mail: chen-nan@medmail.com.cn

R&D 公司, FN 和 PAI-1 ELISA 试剂盒购自上海太阳生物公司, AngII 购于 Merck 公司, 氯沙坦 (Losartan) 由 Roche 公司提供。

### 1.2 siRNA 转染 HK-2 细胞

$2 \times 10^5$  个 HK-2 细胞 / 孔种植于六孔细胞培养板, 于含 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养基中扩增到 50% 细胞汇合, 再置无血清培养基 6 h。siRNA 转染: 将 0.1、1.0 和 10  $\mu\text{mol/L}$  siRNA-TSP1 分别与转染试剂混合 0.5 h, 置转染培养基并转染 HK-2 细胞 30 h, 以选择最适抑制浓度。此外以转染含变异序列 scramble siRNA 作为 RNA 干扰对照, 另设无转染的 HK-2 细胞作为正常对照。上述转染后的 HK-2 细胞经同步化处理, 用 1  $\mu\text{mol/L}$  AngII 刺激 12 h, 并以 AngII 受体抑制剂氯沙坦 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 为抑制对照。

### 1.3 siRNA 细胞转染率检测

将 10  $\mu\text{mol/L}$  siRNA-fluorescent 及作为对照未标记荧光素 siRNA-TSP1, 分别转染 HK-2 细胞 30 h, 用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化 5 min, PBS 洗涤 2 次, 制成细胞甩片或细胞悬液, 然后用荧光显微镜 (Nikon 公司) 及流式细胞仪 (Beckman 公司) 分别观察分析阳性细胞数和阳性细胞率。

### 1.4 Western 印迹检测 HK-2 细胞 TSP1、TGF- $\beta$ 1、Smad2 和 p-Smad2 表达

siRNA-TSP1 转染 30 h 后,  $2 \times 10^5$  个 HK-2 细胞经 RIPA+1%PMSF (中能博彩公司) 冰上裂解 30 min, 12000 r/m 离心 10 min, BCA 法检测上清液中蛋白质浓度。然后取 50  $\mu\text{g}$  蛋白质上样, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳 (TSP1 为 6%, TGF- $\beta$ 1、Smad2 和 p-Smad2 分别为 12%), 半干转印电转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭 60 min; 分别加入 I 抗 (1:400 稀释的 TSP1 及 TGF- $\beta$ 1 单抗, 1:1000 稀释的 Smad2 及 p-Smad2 多抗, 以及 1:10000 稀释的  $\beta$  肌动蛋白单抗), 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜; 0.05% TTBS 洗膜 3 次, 每次 5 min; 分别加入 II 抗 (均为 1:3000 稀释的山羊抗鼠或山羊抗兔 HRP 标记抗体) 1 h; 0.05% TTBS 洗膜 3 次, 每次 15 min, ECL (Pierce 公司) 作用 5 min, 曝光 10 s~3 min, 冲片, 用图象分析系统进行杂交信号吸光度分析。

### 1.5 RT-PCR 检测 TSP1 mRNA、TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达

常规抽提细胞总 RNA, 取 2  $\mu\text{g}$  RNA, 在 M-MLV 逆转录酶作用下, 合成 cDNA, 取 3  $\mu\text{l}$  cDNA, 经 Taq DNA 聚合酶作用, 扩增目的基因 (TSP1、

TGF- $\beta$ 1 和 GAPDH)。引物序列如下: TSP1 上游: 5'-AAA GCGTCTTCACCAGAGACCT-3', 下游: 5'-GCAGATGGTAACTGAGTTCTGACA-3', 产物长度 496 bp; TGF- $\beta$ 1 上游: 5'-TGAGTGGCTGTCTTTT-GACG-3', 下游: 5'-TTCTCTGTGGAGCTGAAGCA-3', 产物长度 510 bp; GAPDH 上游: 5'-CCATGGAG-AAGGCTGGGG-3', 下游: 5'-CAAAGTTGTCATGG-ATGACC-3', 产物长度 250 bp。引物由上海生物工程公司合成。PCR 反应条件为 94  $^{\circ}\text{C}$ , 3 min, 35 个循环包括 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 60 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  复性 60 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 90 s, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳 (含 0.5  $^{\circ}\text{C}$  5  $\mu\text{g/ml}$  溴乙锭), 3~5 V/cm 电压下电泳约 30 min 后, 于紫外灯下观察并用计算机图像分析系统扫描和分析, 以 GAPDH 吸光值进行校正。

### 1.6 流式细胞仪检测 HK-2 细胞 TSP1、TGF- $\beta$ 1 共表达

取经过上述转染处理后的  $5 \times 10^4$  个 HK-2 细胞, 0.2% PBS 洗涤 5 min, 100  $\mu\text{l}$  固定液 (Immunotech 公司) 中固定 10 min, 0.2% PBS 洗涤 5 min, 置 100  $\mu\text{l}$  穿透液 (Immunotech 公司) 中作用 20 min, 分别加入均为 1:100 稀释的小鼠抗人 TSP1 单抗和兔抗人 TGF- $\beta$ 1 多抗, 4  $^{\circ}\text{C}$  作用 1 h, 0.2% PBS 洗涤 2 次, 每次 5 min, 加入 II 抗 (均为 1:100 稀释的山羊抗鼠 IgG-PE 和山羊抗兔 IgG-FITC 抗体), 4  $^{\circ}\text{C}$  作用 30 min, 0.2% PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 重悬细胞于 300  $\mu\text{l}$  PBS 中, 用流式细胞仪检测 TSP1 和 TGF- $\beta$ 1 共表达的阳性细胞率 (%)。

### 1.7 ELISA 检测 HK-2 细胞上清液中 TGF- $\beta$ 1、FN 和 PAI-1 的含量

按 TGF- $\beta$ 1 免疫检测试剂盒说明书分别检测细胞上清液中总 TGF- $\beta$ 1 含量和活性 TGF- $\beta$ 1。其中总 TGF- $\beta$ 1 检测样本需经 1 mol/L 盐酸化处理, 而活性 TGF- $\beta$ 1 检测则采用非经盐酸化处理的细胞上清液。此外按 ELISA 试剂盒说明书, 分别检测细胞上清液中 FN 和 PAI-1 的含量。

### 1.8 统计学处理

所有数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 应用 SPSS 11.0 统计软件包进行分析。各组间指标比较用方差分析或  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 siRNA-TSP1 有效转染 HK-2 细胞



图1 免疫荧光检测 siRNA 转染细胞阳性表达

A: 转染未标记荧光素 siRNA 的 HK-2 细胞; B: 转染标记荧光素 siRNA 的 HK-2 细胞。

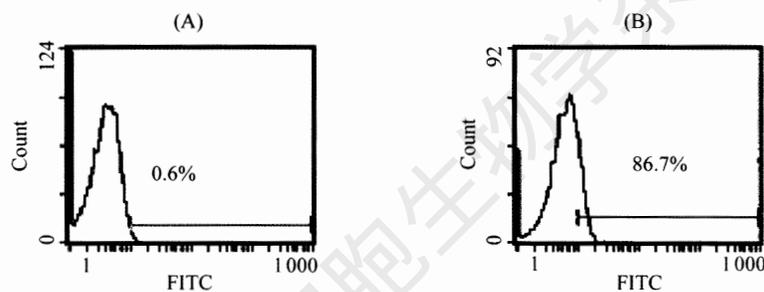


图2 流式细胞仪检测 siRNA 转染细胞阳性率

A: 转染未标记荧光素 siRNA 的 HK-2 细胞; B: 转染标记荧光素 siRNA 的 HK-2 细胞。

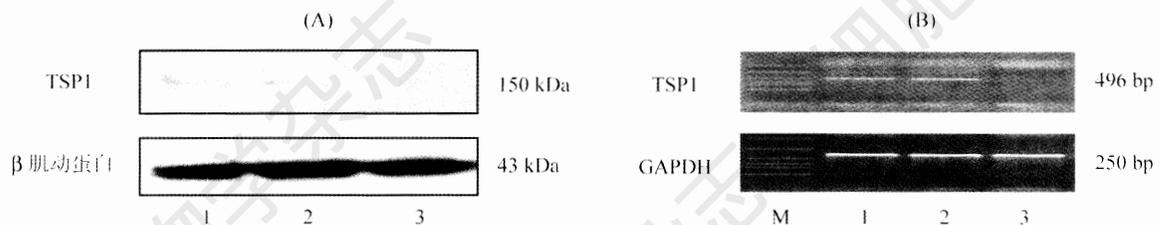


图3 Western 印迹(A)和 RT-PCR(B)检测 HK-2 细胞 TSP1 表达及其 mRNA 转录水平

M: marker; 1: 正常 HK-2 细胞; 2: 转染含变异序列 siRNA 的 HK-2 细胞; 3: 转染 siRNA-TSP1 的 HK-2 细胞。



图4 Western 印迹检测 HK-2 细胞 TSP1 的表达

1: 正常 HK-2 细胞; 2: AngII 刺激组; 3: AngII+ 0.1  $\mu\text{mol/L}$  siRNA-TSP1; 4: AngII+ 1  $\mu\text{mol/L}$  siRNA-TSP1; 5: AngII+ 10  $\mu\text{mol/L}$  siRNA-TSP1。

荧光显微镜和流式细胞仪检测显示, 转染荧光素标记 siRNA-fluorescent 的 HK-2 细胞胞质内多见绿色荧光表达, 细胞表达阳性率为 86.7%; 而转染未标记荧光素 siRNA-TSP1 的 HK-2 细胞胞质内几乎无绿色荧光表达, 细胞表达阳性率仅为 0.6%(图 1, 图 2)。

## 2.2 siRNA-TSP1 对 HK-2 细胞 TSP1 mRNA 转录和蛋白质合成的抑制作用

RT-PCR 和 Western 印迹检测显示, 正常 HK-2

细胞适量表达 TSP1, 而未经 AngII 刺激的 siRNA-TSP1 转染 HK-2 细胞 TSP1 mRNA 转录水平及蛋白质表达, 均较正常对照及 RNA 干扰对照明显下调或减少(图 3); 进一步显示, siRNA-TSP1 可剂量依赖地抑制 AngII 刺激的转染细胞 TSP1 上调表达, 尤以 10  $\mu\text{mol/L}$  siRNA-TSP1 作用最明显(图 4)。此外 siRNA-TSP1(10  $\mu\text{mol/L}$ )对经 AngII 刺激的 TSP1 表达及其 mRNA 转录水平的抑制效应, 均明显于作为抑制对照氯沙坦的作用(图 5)。

### 2.3 siRNA-TSP1 对 HK-2 细胞 TGF-β1 表达及其 mRNA 转录水平的影响

Western 印迹和 RT-PCR 检测显示, 正常 HK-2 细胞适量表达 TGF-β1, 经 AngII 刺激后其 TGF-β1 表达明显上调; 较氯沙坦的抑制效应, siRNA-TSP1 对 TGF-β1 表达及其 mRNA 转录水平无明显影响(图 6)。

### 2.4 siRNA-TSP1 对 HK-2 细胞 TSP1、TGF-β1 共表达的抑制作用

流式细胞仪检测显示, 未经 AngII 刺激的 siRNA-TSP1 转染 HK-2 细胞, 其 TSP1 和 TGF-β1 共表达阳性细胞率(6.7±4.3)% 较正常对照(15.1±11.0)%

减少; 经 AngII 刺激的 siRNA-TSP1 转染细胞两者共表达阳性率, 可由 AngII 刺激上调的 83.2±18.5% 明显降至 19.4±15.4% ( $P<0.05$ ), 该抑制效应明显高于氯沙坦(31.3±43.1)% 的抑制作用( $P<0.05$ )(图 7)。

### 2.5 siRNA-TSP1 对 HK-2 细胞 TGF-β1 活化的抑制作用

ELISA 检测显示, 未经 AngII 刺激的 siRNA-TSP1 转染 HK-2 细胞, 其上清液中总 TGF-β1 含量(300.4±71.2) pg/ml 较正常对照(220.6±74.9) pg/ml 增加, 但其活性 TGF-β1 (142.0±53.2) pg/ml 较正常对照(164.1±38.2) pg/ml 减少; 经 AngII 刺激的 siRNA-TSP1 转染细胞, 其上清液中总 TGF-β1 含量(433.1

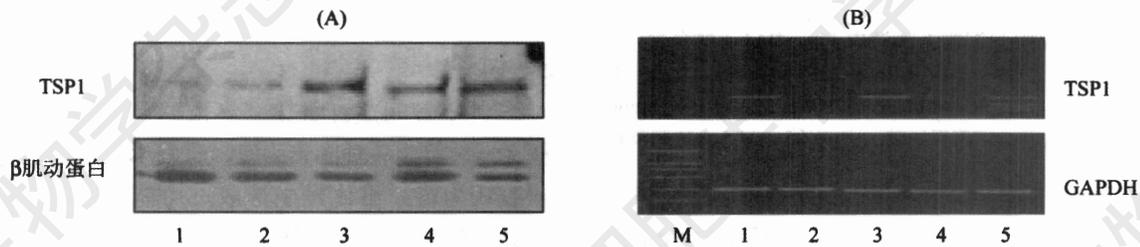


图 5 Western 印迹(A)和 RT-PCR(B)检测 HK-2 细胞 TSP1 表达及其 mRNA 转录水平

M: marker; 1: 正常 HK-2 细胞; 2: 10 μmol/L siRNA-TSP1 转染 HK-2 细胞; 3: AngII 刺激组; 4: AngII+10 μmol/L siRNA-TSP1; 5: AngII+10 μmol/L 氯沙坦。

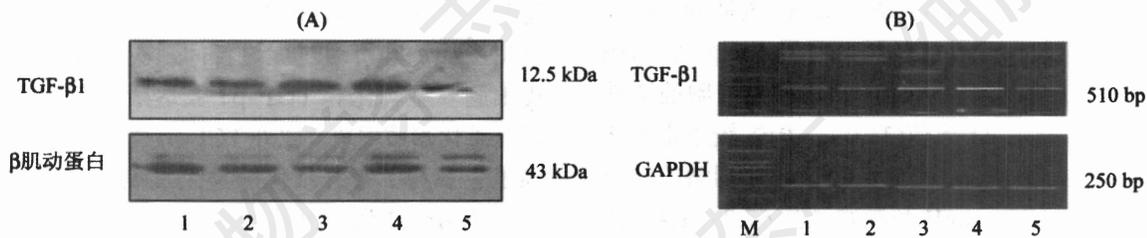


图 6 Western 印迹(A)和 RT-PCR(B)检测 HK-2 细胞 TGF-β1 表达及其 mRNA 转录水平

M: marker; 1: 正常 HK-2 细胞; 2: 10 μmol/L siRNA-TSP1 转染 HK-2 细胞; 3: AngII 刺激组; 4: AngII+10 μmol/L siRNA-TSP1; 5: AngII+10 μmol/L 氯沙坦。

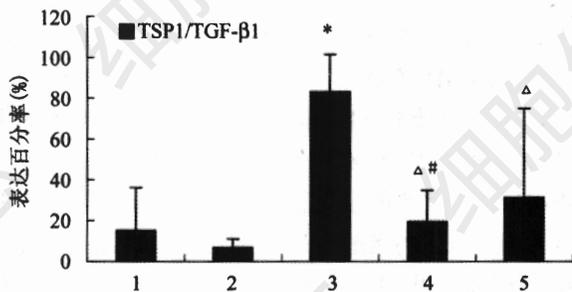


图 7 流式细胞仪检测 TSP1 和 TGF-β1 共表达

1: 正常 HK-2 细胞; 2: 10 μmol/L siRNA-TSP1 转染 HK-2 细胞; 3: AngII 刺激组; 4: AngII+10 μmol/L siRNA-TSP1; 5: AngII+10 μmol/L 氯沙坦。与正常 HK-2 细胞组比较, \* $P<0.05$ ; 与 AngII 刺激组比较,  $\Delta P<0.05$ ; 与氯沙坦组比较,  $\#P<0.05$ 。

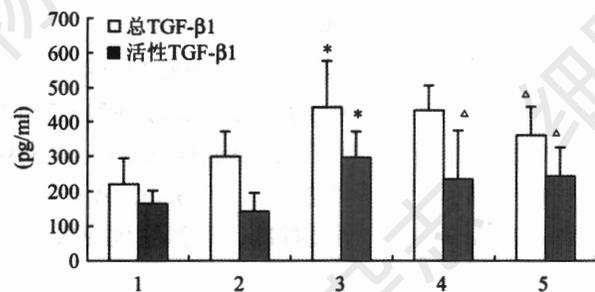


图 8 ELISA 检测细胞上清液中总 TGF-β1 的含量和活性 TGF-β1

1: 正常 HK-2 细胞; 2: 10 μmol/L siRNA-TSP1 转染 HK-2 细胞; 3: AngII 刺激组; 4: AngII+10 μmol/L siRNA-TSP1; 5: AngII+10 μmol/L 氯沙坦。与正常 HK-2 细胞组比较, \* $P<0.05$ ; 与 AngII 刺激组比较,  $\Delta P<0.05$ 。

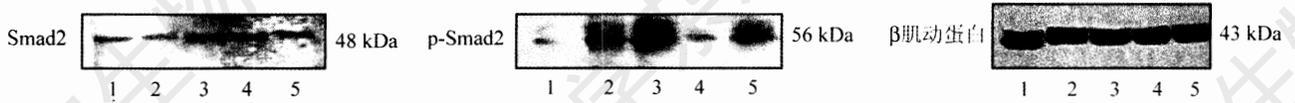


图9 Western 印迹检测 HK-2 细胞 Smad2 和 p-Smad2 的表达

1: 正常 HK-2 细胞; 2: 10  $\mu\text{mol/L}$  siRNA-TSP1 转染 HK-2 细胞; 3: AngII 刺激组; 4: AngII+10  $\mu\text{mol/L}$  siRNA-TSP1; 5: AngII+10  $\mu\text{mol/L}$  氯沙坦。

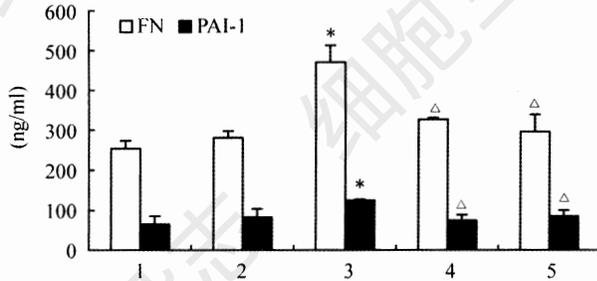


图10 ELISA 检测细胞上清液中 FN、PAI-1 的含量

1: 正常 HK-2 细胞; 2: 10  $\mu\text{mol/L}$  siRNA-TSP1 转染 HK-2 细胞; 3: AngII 刺激组; 4: AngII+10  $\mu\text{mol/L}$  siRNA-TSP1; 5: AngII+10  $\mu\text{mol/L}$  氯沙坦。与正常 HK-2 细胞组比较, \* $P<0.05$ ; 与 AngII 刺激组比较,  $\Delta P<0.05$ 。

$\pm 72.3$  pg/ml 较 AngII 刺激组( $442.1 \pm 133.1$ ) pg/ml 变化不显, 而氯沙坦组( $361.3 \pm 82.5$ ) pg/ml 可见明显减少( $P<0.05$ ); 此外上述转染细胞上清液中活性 TGF- $\beta 1$ , 可由 AngII 刺激增强的( $296.7 \pm 74.9$ ) pg/ml 明显降至( $234.6 \pm 40.4$ ) pg/ml ( $P<0.05$ ), 但该抑制效应与氯沙坦( $243.5 \pm 83.4$ ) pg/ml 的抑制作用无明显差异(图 8)。进一步显示, 未经 AngII 刺激转染细胞的活性 TGF- $\beta 1$  与总 TGF- $\beta 1$  比值( $31.0 \pm 13.0$ )% 较正常对照( $45.0 \pm 12.6$ )% 减少( $P<0.05$ ); 经 AngII 刺激的转染细胞此比值, 可由 AngII 刺激增高的  $67.2 \pm 11.4\%$  降至  $54.0 \pm 13.0\%$  ( $P<0.05$ ), 但该抑制效应与氯沙坦( $57.0 \pm 9.2$ )% 的作用差异不显。

### 2.6 siRNA-TSP1 对 HK-2 细胞的 Smad2、p-Smad2 表达的抑制作用

Western 印迹检测显示, 正常 HK-2 细胞适量表达 Smad2 和 p-Smad2, 未经 AngII 刺激的 siRNA-TSP1 转染细胞两者表达无改变; 经 AngII 刺激的 siRNA-TSP1 转染细胞上述两者表达, 除 Smad2 仍无变化, p-Smad2 的表达受到明显抑制, 且抑制效应较氯沙坦作用更明显(图 9)。

### 2.7 siRNA-TSP1 对 HK-2 细胞 FN、PAI-1 分泌的抑制作用

ELISA 检测显示, 未经 AngII 刺激的 siRNA-TSP1 转染 HK-2 细胞, 其上清液中 FN、PAI-1 含量(分别为  $281.4 \pm 16.6$  和  $75.1 \pm 4.0$ ) ng/ml 较正常对照

(分别为  $253.8 \pm 19.2$  和  $65.4 \pm 19.8$ ) ng/ml 增加; 经 AngII 刺激 siRNA-TSP1 转染细胞, 其上清液中 FN、PAI-1 含量(分别为  $326.9 \pm 4.7$  和  $82.7 \pm 10.8$ ) ng/ml 较 AngII 刺激组(分别为  $470.3 \pm 42.4$  和  $125.2 \pm 2.5$ ) ng/ml 明显减少( $P<0.05$ ), 但该抑制效应与氯沙坦(分别为  $296.4 \pm 43.2$  和  $85.6 \pm 14.6$ ) ng/ml 的作用差异不显(图 10)。

## 3 讨论

肾小管间质纤维化是终末期肾病的重要病理特征之一, 可由各种因素引发, 且发生机制十分复杂<sup>[9]</sup>。一般认为肾纤维化发生形成, 可能与肾损伤后某些血管活性物质和细胞因子对肾小管上皮细胞或间质成纤维细胞生物学行为、细胞外基质产生及降解过程影响或调控失衡有关<sup>[10]</sup>, 而 TGF- $\beta 1$  在介导肾纤维化进展中起着关键作用<sup>[11]</sup>。近年研究证明, 在上述肾纤维化发生过程中, 肾内血管活性物质 AngII 产生增加, 其可通过促进肾间质炎症反应、小管上皮细胞表型转化和 TGF- $\beta 1$  表达活化等, 而有助于肾纤维化形成<sup>[12,13]</sup>。此外 TGF- $\beta 1$  等多种细胞和生长因子也参与了肾纤维化的发生发展<sup>[11]</sup>, 且 TGF- $\beta 1$  是上述 AngII 致纤维化作用的主要介导成分<sup>[13]</sup>。已知 TGF- $\beta 1$  是具有多种生物学功能的生长因子, 其可通过与受体结合, 并经其信号蛋白 Smads 磷酸化及信号转导, 促进包括肾小管间质细胞等细胞外基质(ECM)成分如胶原、FN 等合成<sup>[14]</sup>; 进一步刺激 PAI-1 和组织型金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)的活性, 以此抑制 ECM 降解酶活性并减少前者降解导致 ECM 积聚, 以致纤维化的形成及发展<sup>[15]</sup>。TSP1 也是兼有致血小板活化等多种生物学功能糖蛋白, 作为 TGF- $\beta 1$  体内重要的活化因子, 其可通过与 TGF- $\beta 1$  前体相关肽(LAP)接触反应, 致后者与 TGF- $\beta 1$  非共价结合解离, 并相应诱发由前两者结合致 TGF- $\beta 1$  因不能与其受体作用而处无活性状态, 使得 TGF- $\beta 1$  发挥生物学功能<sup>[16,17]</sup>。已知 TGF- $\beta 1$  既在体内调控细胞生长和分化、促进伤口愈合以及免疫应答调节等具有重要生理效应, 而其过度表达活化又是上

述致肾纤维化过程中的一个关键因素。正常情况下, TSP1 可在包括肾小管上皮细胞等适度表达, 但在病理状态下或刺激诱导下, 其表达合成增多且可增强 TGF- $\beta$ 1 活性<sup>[18]</sup>。故以 TSP1 为靶标进行调节, 可调节随后 TGF- $\beta$ 1 的过度表达与活化<sup>[19]</sup>, 如此可在不影响后者生理功能状态下, 达到干预和调节肾损伤修复目的。为此本研究体外观察了利用 siRNA-TSP1 对经 AngII 诱导的肾小管上皮细胞 TGF- $\beta$ 1 过度活化, 及其细胞外基质 FN 以及 PAI-1 合成等抑制作用。

本研究发现, 人肾小管上皮细胞适量分泌 TSP1 和 TGF- $\beta$ 1, 经 AngII 刺激后可明显上调两者 mRNA 转录和蛋白质表达, 且 TGF- $\beta$ 1 分泌增加及其活性增强; 此外 TGF- $\beta$ 1 信号蛋白 p-Smad2 也相应上调表达, 以及 FN 和 PAI-1 合成分泌增加。经 siRNA-TSP1 干预后, 可以剂量依赖方式下调 TSP1 mRNA 转录和蛋白质表达, 以及 TSP1 与 TGF- $\beta$ 1 两者共表达; 此外在不影响 TGF- $\beta$ 1 合成情况下, 可抑制 TGF- $\beta$ 1 的过度活化, 并相应抑制前者依赖的 p-Smad2 表达及其 Smad2 磷酸化, 以至减少 FN 和 PAI-1 的合成分泌。这一结果表明, 针对 TSP1 的 RNA 干扰可有效抑制 TGF- $\beta$ 1 过度活化和信号通路, 并由此可相应抑制 ECM 的合成与积聚, 这与相关报道相符<sup>[3]</sup>。由于 RNA 干扰技术是一个有效抑制基因表达的简便新方法, 本研究结果将对肾纤维化机制研究及寻找有效干预措施, 进一步提供新的依据和途径。如前所述, 鉴于 TSP1 对 TGF- $\beta$ 1 活性调控, 必须首先通过与 LAP 结合并改变其构象, 才能解离后者与 TGF- $\beta$ 1 间的结合, 使 TGF- $\beta$ 1 获得活性而发挥生物学功能。本研究 siRNA-TSP1 抑制后的 TSP1 和 TGF- $\beta$ 1 共表达显著减少, 及相应可下调 TGF- $\beta$ 1 活性。进一步表明, siRNA-TSP1 可通过抑制 TSP1 表达而阻抑相邻 TGF- $\beta$ 1 的活化, 并减少后者与其受体结合, 继而影响其细胞内信号蛋白 Smad2 磷酸化及信号转导, 籍此可调节 TGF- $\beta$ 1 活化和信号通路。目前认为, FN 作为重要的 ECM 蛋白, 可在细胞表面形成纤维网状结构, 以利细胞分

泌的胶原等其他基质蛋白沉积; 而 PAI-1 则可通过抑制纤维蛋白原的活化, 下调 ECM 降解酶如金属蛋白酶活性, 使 ECM 合成降解失平衡, 由此造成的 ECM 积聚, 又是肾纤维化的重要物质基础<sup>[20,21]</sup>。本研究再次表明, 对 TGF- $\beta$ 1 主要活性成分 TSP1 的干预调节, 最终可起到逆转 ECM 合成与降解转换失平衡的重要调节作用, 有待进一步探讨。

目前针对 TGF- $\beta$ 1 干预调节, 通常采用中性和抗体等拮抗剂<sup>[22]</sup>。尽管后者在短期内能抑制 TGF- $\beta$ 1 活性, 但由于动物源性抗体在体内半衰期短及可被迅速清除, 并可能因多次使用可产生免疫副反应, 故不利于慢性肾病的防治。而利用 TSP1 靶标调节 TGF- $\beta$ 1 活性及作用, 可在不明显影响其体内生理功能情况下, 起到损伤修复及肾病等防治目的, 可能是一个较为理想的防治手段。从这个意义上说, 采用 RNA 干扰新技术调节 TGF- $\beta$ 1 活化和功能, 可能不失为临床上延缓肾小管间质纤维化进程一个新的干预措施和途径。

#### 参考文献 (References)

- [1] Yu L *et al. Kidney Int*, 2003, **64**: 844
- [2] Massague J *et al. EMBO*, 2000, **19**: 1745
- [3] Daniel C *et al. Am J Pathol*, 2003, **163**: 1185
- [4] Ziyadeh FN. *Kidney Int Suppl*. 1996, **54**: S10
- [5] Rasch R. *Diabeologia*, 1984, **27**: 32
- [6] Nyengaard JR *et al. Diabetologia*, 1993, **36**: 1126
- [7] Wald H *et al. Am. J. Physiol*, 1993, **265**: E96
- [8] Torffvit O *et al. Nephron*, 1993, **65**: 227
- [9] Eddy AA. *J Am Soc Nephrol*, 1996, **7**: 2495
- [10] Hocevar BA *et al. EMBO J*, 1999, **18**: 1345
- [11] Kliem V *et al. Kidney Int*, 1996, **49**: 666
- [12] Gilbert RE *et al. Am J Pathol*, 1999, **155**: 429
- [13] Wu LL *et al. Kidney Int*, 1997, **51**: 1553
- [14] McKay NG *et al. Exp Nephrol*, 1995, **3**: 142
- [15] O'Donnell MP. *Postgrad Med*, 2000, **108**: 159
- [16] Leask A *et al. FASEB J*, 2004, **18**: 816
- [17] Sinha S *et al. Matrix Biol*, 1998, **17**: 529
- [18] Schultz-Cherry S *et al. J Biol Chem*, 1995, **270**: 7304
- [19] Shull MM *et al. Nature*, 1992, **359**: 693
- [20] de la Motte CA *et al. Am J Pathol*, 2003, **163**: 121
- [21] Daniel L *et al. Kidney Int*, 2001, **60**: 2215
- [22] Annes JP *et al. J Cell Sci*, 2003, **116**: 217

## RNA Interference Targeting Thrombospondin 1 Suppresses the Activation of Latent Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 in Human Renal Tubular Epithelial Cell

Kai-Yin Wu, Wei-Ming Wang, Qiu-Hua Huang<sup>1</sup>, Tong Zhou, Nan Chen\*

(Department of Nephrology, Ruijin Hospital, Medical School of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China; <sup>1</sup>Shanghai Institute of Hematology, Ruijin Hospital, Medical School of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China)

**Abstract** Thrombospondin 1 (TSP1) is a major endogenous activator for transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), which plays an critical role on the development of renal tubulointerstitial fibrosis. The purpose of the study was to determine whether small interference RNAs (siRNA) targeting the thrombospondin-1 could be used to suppress the over-activation of TGF- $\beta$ 1 induced by angiotensin II in human renal tubular epithelial cells. TSP1 specific siRNA designed from the human gene sequence was transfected into cultured human renal tubular epithelial cells (HK-2). The protein and transcript levels of the TSP1 and TGF- $\beta$ 1 were determined by Western blotting and RT-PCR. The co-localization of TSP1 and TGF- $\beta$ 1 was observed by flow-cytometry. Western blotting was performed to measure the level of Smad2 and phosphorylated-Smad2. The secreting extracellular matrix such as fibronectin and PAI-1 was examined by ELISA. TGF- $\beta$ 1 bioactivity was determined by ELISA. siRNA targeting TSP1 was successfully transferred into HK-2 cells and markedly inhibited *de novo* synthesis of TSP1 in a dose dependent manner. This effect was accompanied by decreased activation TGF- $\beta$ 1 but the total level of TGF- $\beta$ 1 remained unaffected, siRNA additionally inhibited TGF- $\beta$ 1-dependent Smad-signaling pathway, markedly suppressed accumulation of fibronectin as well as transcription of TGF- $\beta$ 1 target gene PAI-1. TSP1 is the major endogenous activator of TGF- $\beta$ 1, TSP1 specific siRNA were efficacious in vitro knocking down the expression of TSP1 and further suppressing TGF- $\beta$ 1 activation.

**Key words** RNA interference; thrombospondin-1; transforming growth factor-beta1; renal tubular epithelial cell; renal fibrosis

Received: November 21, 2005 Accepted: February 5, 2006

This work was supported by the National Natural Sciences Foundation of China (No.30270613), Key Subject of Shanghai (No. 05III001), Key Foundation of Shanghai Health Bureau (No.T0201) and Key Subject of Shanghai Health Bureau (No.2003ZD002)

\*Corresponding author. Tel: 86-21-64370045, E-mail: chen-nan@medmail.com.cn