

细胞因子信号传导抑制蛋白-1对白介素-1 β 诱导的人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 郝 军¹ 刘 巍¹ 王 品⁴ 刘淑霞^{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; ⁴河北现代女子医院, 石家庄 050000)

摘要 为研究细胞因子信号传导抑制蛋白-1(suppressors of cytokine signaling-1, SOCS-1)对白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)诱导的人肾小管上皮细胞转分化的影响, 构建了稳定表达SOCS-1的人肾近曲小管上皮细胞(HKC)。用IL-1 β (10 ng/mL)刺激48 h后, 用Western blot、酶联免疫吸附和RT-PCR方法分析显示: IL-1 β 刺激使不转染的细胞和转染空载体的细胞中 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin 1, α -SMA)和磷酸化信号转导及转录激活因子1(phospho-signal transducers and activators of transcription 1, p-STAT1)表达增加, I型胶原(collagen I, Col I)和纤维连接蛋白(fibronectin, FN)的分泌增加, 而细胞角蛋白18(cytokeratin 18, CK18)的表达减少。SOCS-1过表达能抑制IL-1 β 刺激引起的 α -SMA和p-STAT1的表达, 减少Col I和FN的分泌, 同时能够部分恢复IL-1 β 刺激引起的CK18的表达。可见, SOCS-1过表达能抑制IL-1 β 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; 白介素-1 β ; 肾小管上皮细胞; 转分化

各种原因所致的慢性肾脏疾病发展至晚期的最终结果是肾功能衰竭, 其形态学改变的实质是肾脏纤维化和硬化。肾脏纤维化分为肾小球硬化和肾小管间质纤维化(tubular interstitial fibrosis, TIF)两个方面。最初认为肾小球的病变是肾功能下降的主要原因, 但之后逐渐认识到TIF的进展与肾功能的下降关系更为密切^[1]。细胞外基质的过度积聚是TIF的主要病理学变化, 而肌成纤维细胞是TIF发生发展过程中产生细胞外基质的主要细胞, 在TIF中发挥着重要作用。有关肌成纤维细胞的来源, 有研究表明^[2], 间质中约36%的肌成纤维细胞来自于肾小管上皮细胞转分化, 即肾小管上皮细胞肌成纤维细胞转分化(tubular epithelial myofibroblast transdifferentiation, TEMT)。因此, 抑制TEMT有利于延缓TIF的进展。

诱导肾小管上皮细胞转化为肌成纤维细胞的因素很多, 包括高糖、血管紧张素II、糖基化终末产物及多种炎症细胞因子, 比如肿瘤坏死因子- α 、白介素-1 β (IL-1 β)、抑瘤素M等^[3-5], 这些因素都可以通过激活JAK/STAT信号通路发挥作用。由此考虑阻断该通路可以抑制多种因素诱导的TEMT。细胞因子信号传导抑制蛋白(suppressors of cytokine

signaling, SOCS)是一类细胞信号传导过程的负调控因子, 包括八种家族成员(CIS、SOCS-1~7), SOCS对JAK/STAT信号通路的负调控作用已被肯定^[6]。本实验采用IL-1 β 诱导肾小管上皮细胞转分化, 利用体外质粒转染技术观察SOCS-1基因转染对IL-1 β 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, IL-1 β 购自Peprotech公司, 脂质体2000、pCR3.1质粒载体购自Invitrogen公司, 二步法

收稿日期: 2011-07-18 接受日期: 2011-09-21

河北省自然科学基金(No.C2009001083)和河北省卫生厅医学科学研究重点课题(No.20090056)资助项目

*通讯作者。Tel: 0311-86265734, E-mail: susanliu1976@163.com

免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥公司, Col I和FN的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DMEM培养基常规培养肾小管上皮细胞, 待细胞贴壁60%~80%、无血清培养基同步12 h后, 随机分为: 空白对照组(N); IL-1 β 组(IL, 10 ng/mL); 空质粒载体对照组(IL+PV)和SOCS-1质粒转染组(IL+PS1)。转染组用脂质体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。之后用IL-1 β 处理细胞, 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 电镜观察细胞形态学变化 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变化。

1.2.3 免疫细胞化学检测 采用6孔板, 无菌盖玻片爬片, 每组取6孔细胞, 应用二步法检测CK-18、 α -SMA表达, 过程如下: 70%乙醇固定细胞30 min; 3% H₂O₂甲醇室温孵育10 min灭活内源性过氧化物酶; 一抗1:100稀释, 4 °C过夜(以磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照); 试剂1于37 °C孵育30 min; 试剂2于37 °C孵育20 min; 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色, 光镜观察阳性信号。

1.2.4 Western blot检测 收集细胞加入蛋白裂解液200 μ L, 提取总蛋白, 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和p-STAT1抗体, 抗体均1:500稀释, 4 °C过夜。洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体(1:5 000稀释), 37 °C孵育1.5 h。洗膜后用ECL化学发光法显色。以 β -actin作为内参。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)。

1.2.5 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 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的上下游引物分别为: 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', 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', 5'-GAC TCC ATC CCA ATG AAA G-3'(520 bp); SOCS-1的上下游引物分别为: 5'-GAG ACC TTC GAC TGC CTT TT-3', 5'-AAG GGG AAG GAA CTC AGG TA-3'(203 bp)。所用引物均由上海捷锐生物公司合成。扩增条件为: 95 °C预变性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)中进行吸光度扫描, 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。

1.2.6 ELISA检测 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书进行操作。

1.2.7 数据分析 所得数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用SPSS 13.0进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, IL-1 β 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, 细胞内出现微丝(图1)。

2.2 SOCS-1基因转染效率鉴定

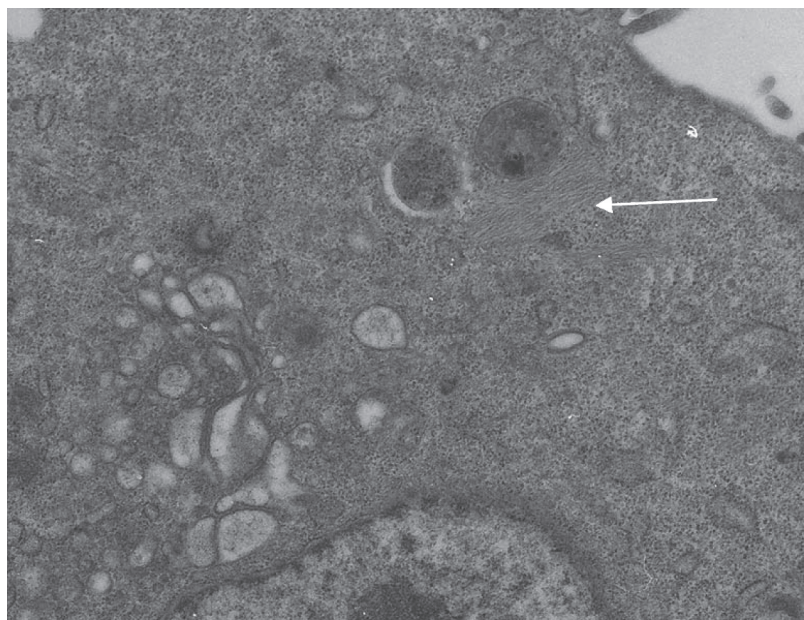
RT-PCR和Western blot结果显示, 与空载体转染组相比, pCR3.1/SOCS-1转染组的肾小管上皮细胞中SOCS-1蛋白及mRNA的表达明显增强, 提示SOCS-1基因转染成功并在蛋白水平获得高效表达(图2)。

2.3 IL-1 β 对肾小管上皮细胞CK-18、 α -SMA蛋白的影响

CK-18、 α -SMA主要表达于肾小管上皮细胞的胞浆, 与空白对照组相比, IL-1 β 刺激后细胞内CK-18的阳性信号明显减弱, 而 α -SMA的阳性信号明显增强, SOCS-1转染后CK-18的阳性信号明显恢复而 α -SMA的阳性信号又有所减弱, 但空载体转染对CK-18和 α -SMA的表达无影响(图3和图4)。

2.4 SOCS-1对p-STAT1、CK-18、 α -SMA蛋白的影响

Western blot结果显示, 与空白对照组相比, IL-1 β

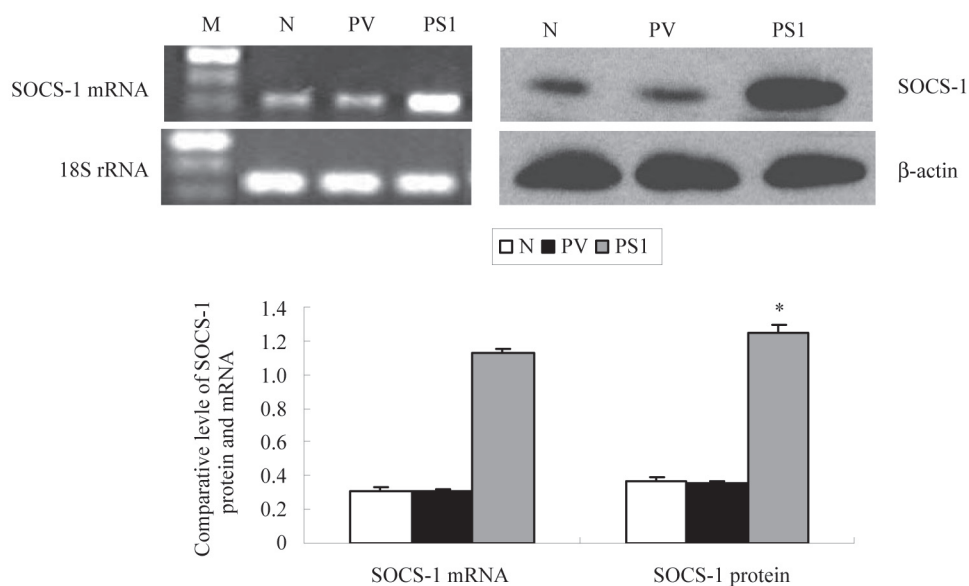


→: 微丝。

→: microfilament.

图1 IL-1 β 刺激后HKCs细胞的透射电镜观察(20 000 $\times$)

Fig.1 Morphology of HKC under electron micrographs after stimulated by IL-1 β (20 000 $\times$)



* $P < 0.05$, 与空白对照组相比。M: marker; N: 空白对照组; PV: 空质粒载体对照组; PS1: SOCS-1质粒转染组。

* $P < 0.05$ vs N group. M: marker; N: control group; PV: PCR 3.1/vector transfection group; PS1: PCR 3.1/SOCS-1 transfection group.

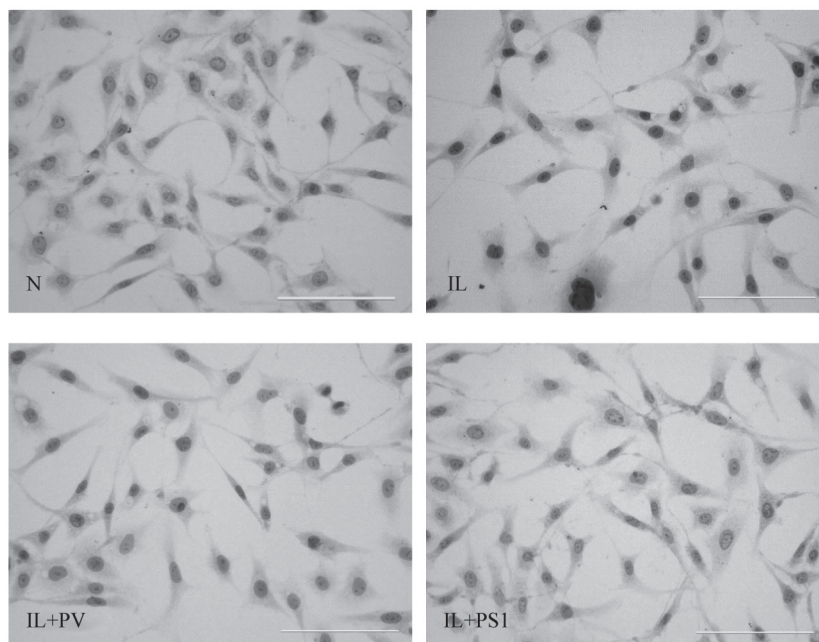
图2 SOCS-1蛋白及mRNA在肾小管上皮细胞中的表达

Fig.2 Expression of SOCS-1 protein and mRNA in HKCs

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。与IL-1 β 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5)。

2.5 SOCS-1对CK-18和 α -SMA mRNA表达的影响

RT-PCR结果显示, 与空白对照组相比, IL-1 β 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。与IL-1 β 刺激组和空

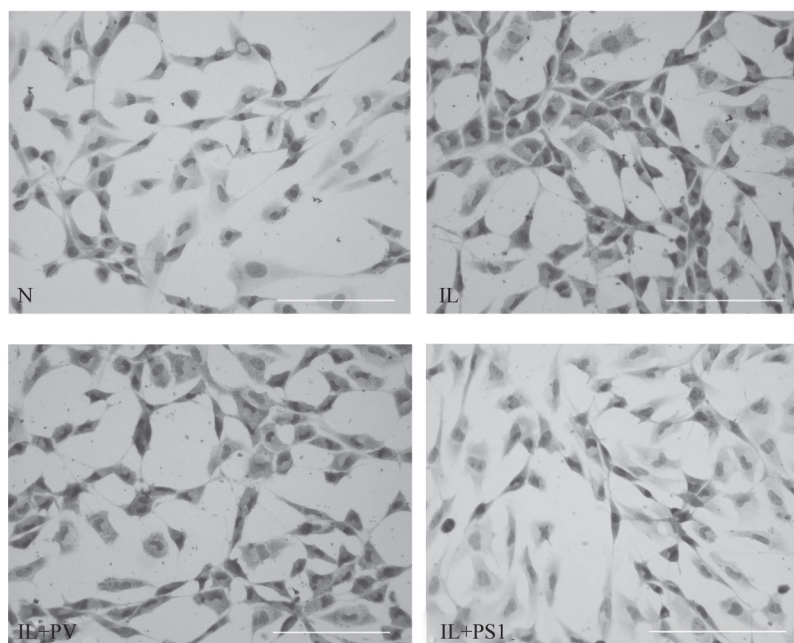


N: 空白对照组; IL: IL-1 β 刺激组; IL+PV: 空质粒载体对照组; IL+PS1: SOCS-1质粒转染组。标尺=100 μ m。

N: control group; IL: IL-1 β group; IL+PV: IL-1 β +PCR 3.1/vector transfection group; IL+PS1: IL-1 β +PCR 3.1/SOCS-1 transfection group. Bar=100 μ m.

图3 过表达SOCS-1对IL-1 β 诱导的HKCs中CK18表达的影响

Fig.3 Effect of SOCS-1 over expression on CK18 in HKCs induced by IL-1 β

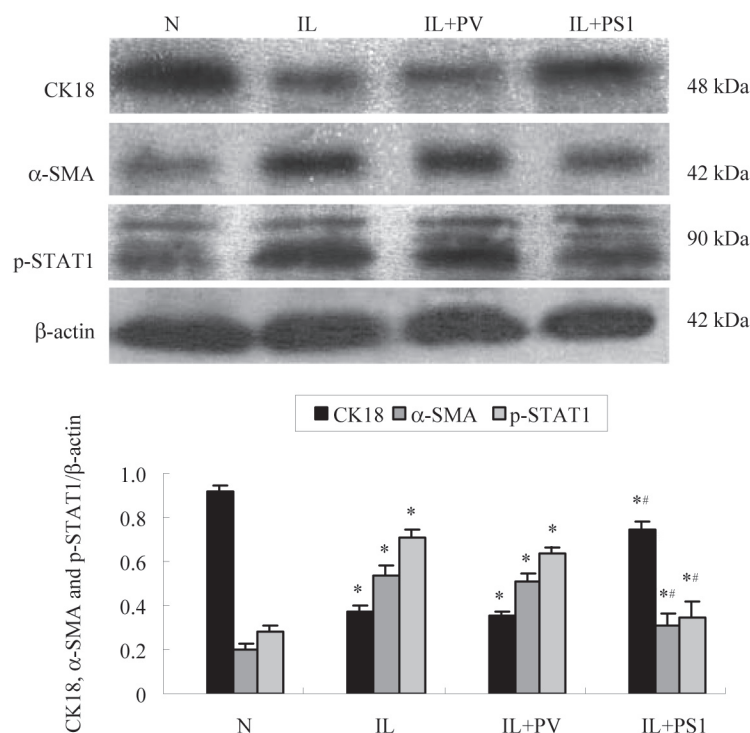


N: 空白对照组; IL: IL-1 β 刺激组; IL+PV: 空质粒载体对照组; IL+PS1: SOCS-1质粒转染组。标尺=100 μ m。

N: control group; IL: IL-1 β group; IL+PV: IL-1 β +PCR 3.1/vector transfection group; IL+PS1: IL-1 β +PCR 3.1/SOCS-1 transfection group. Bar=100 μ m.

图4 过表达SOCS-1对IL-1 β 诱导的HKCs中 α -SMA表达的影响

Fig.4 Effect of SOCS-1 over expression on α -SMA in HKCs induced by IL-1 β



* $P < 0.05$, 与空白对照组相比; # $P < 0.05$, 与IL刺激组相比。N: 空白对照组; IL: IL-1 β 刺激组; IL+PV: 空质粒载体对照组; IL+PS1: SOCS-1质粒转染组。
* $P < 0.05$ vs N group; # $P < 0.05$ vs IL group. N: control group; IL: IL-1 β group; IL+PV: IL-1 β +PCR 3.1/vector transfection group; IL+PS1: IL-1 β +PCR 3.1/SOCS-1 transfection group.

图5 过表达SOCS-1对IL-1 β 诱导的肾小管上皮细胞中CK18、 α -SMA和p-STAT1的影响

Fig.5 Effect of SOCS-1 over expression on CK18, α -SMA and p-STAT1 in HKCs induced by IL-1 β

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6)。

2.6 SOCS-1对Col II和FN分泌的影响

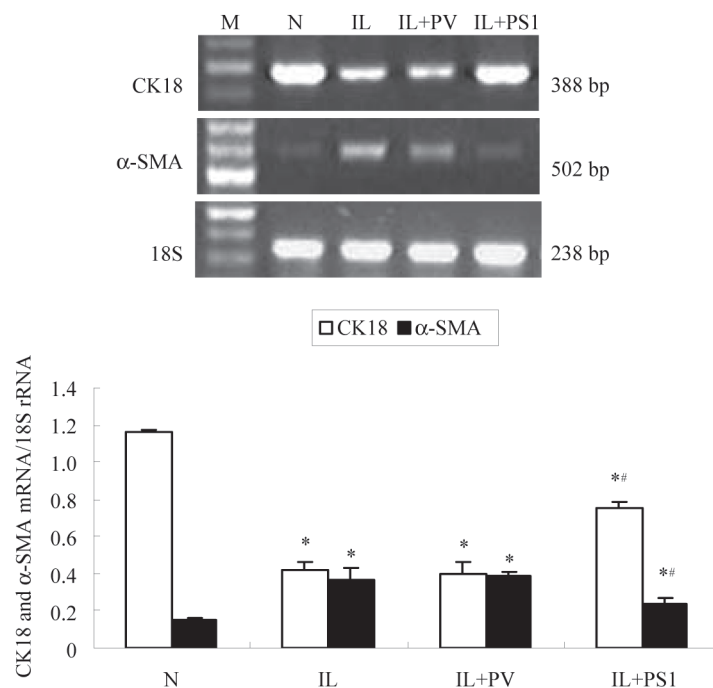
在IL-1 β 刺激72 h后, 肾小管上皮细胞上清液中Col I和FN的含量明显增加, 与空白对照组相比差异显著。SOCS-1质粒转染后的肾小管上皮细胞上清液中Col I和FN的含量明显低于IL-1 β 刺激组, 而空载体对照组与IL-1 β 相比, Col I和FN的含量无明显变化(图7)。

3 讨论

TIF主要表现为炎细胞浸润、多种致纤维化因子的释放、成纤维细胞增殖与活化, 继而肾小管上皮细胞表型转分化、凋亡或过度增殖, 这些改变最终导致细胞外基质合成增多, 从而出现TIF。其中, 炎性损伤包括炎症细胞的浸润和炎症细胞因子的释放可通过诱导TEMPT并促使其产生大量的细胞外基质而在TIF发生发展中发挥重要作用。IL-1 β 是一个主要由巨噬细胞分泌的前炎性细胞因子, 具有多种

生物学功能, 除诱发炎症反应外, 还具有促纤维化的作用。研究表明, IL-1 β 在慢性肾脏疾病过程中是一个调节肾小管上皮细胞损伤和间质纤维化的关键因素, 它可通过诱导肾小管上皮细胞转分化从而参与TIF^[7]。本实验首先用IL-1 β 刺激人近曲小管上皮细胞, 诱导其发生转分化, 通过Western blot检测证实, 10 ng/mL IL-1 β 刺激72 h后肾小管上皮细胞的自身标志蛋白CK18的表达明显下降, 而肌成纤维细胞的标志蛋白 α -SMA的表达增多, 提示在IL-1 β 的刺激下肾小管上皮细胞转分化为了肌成纤维细胞。此外通过透射电镜观察到肾小管上皮细胞胞浆内出现肌动蛋白丝, 这进一步强有力地证实了TEMPT这一现象的存在。

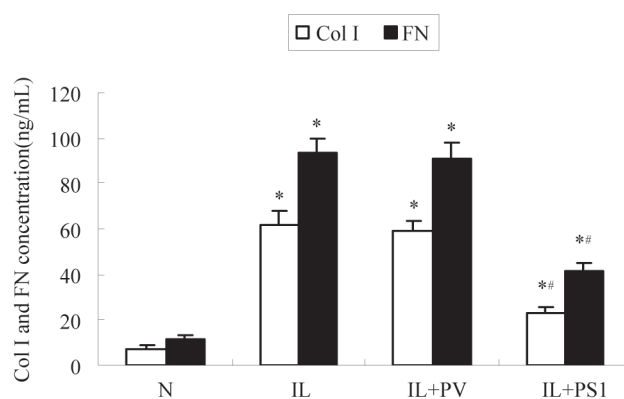
IL-1 β 是一种细胞因子, 细胞因子与其受体结合后均须通过激活细胞内信号传导通路发挥其生物学作用, 其中, JAK/STAT信号通路可介导多种细胞因子生物学作用的发挥^[8-9]。我们以往的研究证实, IL-1 β 可通过激活JAK/STAT信号通路诱导肾小管上皮细胞转分化为肌成纤维细胞^[10]。本实验也检测到了STAT1的磷酸化激活。因为肌成纤维细胞是TIF



* $P < 0.05$, 与空白对照组相比; # $P < 0.05$, 与IL刺激组相比。N: 空白对照组; IL: IL-1 β 刺激组; IL+PV: 空质粒载体对照组; IL+PS1: SOCS-1质粒转染组。
* $P < 0.05$ vs N group; # $P < 0.05$ vs IL group. N: control group; IL: IL-1 β group; IL+PV: IL-1 β +PCR 3.1/vector transfection group; IL+PS1: IL-1 β +PCR 3.1/SOCS-1 transfection group.

图6 SOCS-1对IL-1 β 诱导的肾小管上皮细胞中CK18和 α -SMA mRNA的影响

Fig.6 Effect of SOCS-1 on expression of CK18 and α -SMA mRNA in HKCs induced by IL-1 β



* $P < 0.05$, 与空白对照组相比; # $P < 0.05$, 与IL刺激组相比。N: 空白对照组; IL: IL-1 β 刺激组; IL+PV: 空质粒载体对照组; IL+PS1: SOCS-1质粒转染组。

* $P < 0.05$ vs N group; # $P < 0.05$ vs IL group. N: control group; IL: IL-1 β group; IL+PV: IL-1 β +PCR 3.1/vector transfection group; IL+PS1: IL-1 β +PCR 3.1/SOCS-1 transfection group.

图7 SOCS-1对IL-1 β 诱导的细胞上清液中Col I和FN分泌的影响

Fig.7 Effect of SOCS-1 on secretion of Col I and FN in the supernatant of HKCs induced by IL-1 β

过程中产生细胞外基质的主要细胞, 而肾小管上皮细胞是肌成纤维细胞的一个主要来源, 因此从抑制肾小管上皮细胞转分化入手对TIF进行治疗必将有助于延缓TIF的发生发展。

基于以上实验基础, 即IL-1 β 可通过激活JAK/STAT信号通路促使肾小管上皮细胞转分化, 考虑通过抑制JAK/STAT通路来阻断IL-1 β 的促转化作用。SOCS家族蛋白是JAK/STAT通路的负调控因子,

其发挥作用主要通过抑制JAK/STAT信号通路的激活。SOCS家族成员有八种, 包括SOCS-1~7和CIS, SOCS-1是该家族的重要成员, 其主要抑制STAT1的磷酸化。本课题组近来也有研究表明^[11], SOCS-1过表达可抑制高糖诱导的系膜细胞JAK/STAT信号通路的激活。基于此, 我们采用脂质体转染法进行SOCS-1质粒转染, 观察了SOCS-1对IL-1 β 诱导的肾小管上皮细胞转分化的影响。实验结果表明, 过表达SOCS-1能够抑制IL-1 β 诱导的 α -SMA蛋白及其mRNA的高表达, 同时能部分恢复CK18蛋白及其mRNA的表达, 降低肾小管上皮细胞Col I和FN的分泌。此外, 过表达SOCS-1可抑制IL-1 β 诱导的STAT1的磷酸化激活。这些结果提示, SOCS-1过表达抑制IL-1 β 诱导的肾小管上皮细胞转分化及细胞外基质的合成过程可能部分是通过抑制STAT1的磷酸化实现的, 即SOCS-1的该作用与JAK/STAT信号通路有关。

肾小管间质纤维化是慢性肾病进展到终末期肾衰的特征, 肌成纤维细胞产生的细胞外基质的异常积聚是其主要病理学变化, 而肾小管上皮细胞是肌成纤维细胞的主要来源, 本实验检测了培养细胞上清液中细胞外基质Col I和FN的分泌水平。结果表明, IL-1 β 可刺激肾小管上皮细胞Col I和FN分泌量增多, 而SOCS-1过表达能抑制肾小管上皮细胞分泌Col I和FN。以上实验结果表明, SOCS-1可通过抑制肾小管上皮细胞转分化、抑制细胞外基质的表达从而延缓肾小管间质纤维化的进展, 为慢性肾脏疾病的防治提供新的实验基础。

参考文献 (References)

- 1 Okoń K. Tubulo-interstitial changes in glomerulopathy. II. Prognostic significance. *Pol J Pathol* 2003; 54(3): 163-9.
- 2 Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 2002; 110(3): 341-50.
- 3 Pollack V, Sarközi R, Banki Z, Feifel E, Wehn 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.
- 4 Doerner AM, Zuraw BL. TGF- β 1 induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells is enhanced by IL-1 β but not abrogated by corticosteroids. *Respir Res* 2009; 10(1): 100.
- 5 Kamitani S, Yamauchi Y, Kawasaki S, Takami K, Takizawa H, Nagase T, *et al.* Simultaneous stimulation with TGF- β 1 and TNF- α induces epithelial mesenchymal transition in bronchial epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 155(2): 119-28.
- 6 Croker BA, Kiu H, Nicholson SE. SOCS regulation of the JAK/STAT signaling pathway. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19(4): 414-22.
- 7 Vesey DA, Cheung CW, Cuttle L, Endre ZA, Gobé G, Johnson DW. Interleukin-1 β induces human proximal tubule cell injury, α -smooth muscle actin expression and fibronectin production. *Kidney Int* 2002; 62(1): 31-42.
- 8 Schindler C, Levy DE, Decker T. JAK-STAT signaling: From interferons to cytokines. *J Biol Chem* 2007; 282(28): 20059-63.
- 9 Kutty RK, Nagineni CN, Samuel W, Vijayasarathy C, Hooks JJ, Redmond TM. Inflammatory cytokines regulate microRNA-155 expression in human retinal pigment epithelial cells by activating JAK/STAT pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 402(2): 390-5.
- 10 刘青娟, 刘淑霞, 郝军, 李航, 曹延萍, 吴海江, 等. AG490对肾小管上皮细胞转分化影响的实验研究. *中国药理学通报* 2009; 25(9): 1235-8.
- 11 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.

Influence of SOCS-1 on IL-1 β -induced Renal Tubular Epithelial-Myofibroblast Transdifferentiation

Liu Qingjuan¹, Xing Lingling², Li Jianying³, Hao Jun¹, Liu Wei¹, Wang Pin⁴, Liu Shuxia^{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; ⁴Modern Women Hospital, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract In order to investigate the effect of suppressor of cytokine signaling-1 on renal epithelial-myofibroblast transdifferentiation induced by interleukin-1 β in human renal tubular epithelial cells, we constructed stable transfection of HKC with pCR3.1/SOCS-1. The cells were collected after stimulated 48 h with IL-1 β (10 ng/mL). The protein and mRNA were observed by immunocytochemistry, Western blot, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). The results suggested that after stimulated by IL-1 β , the expression levels of α -SMA, p-STAT1, ColI and FN were significantly increased. however, the expression of CK18 decreased in control group and transfected with pCR3.1 vector group. Overexpression of SOCS-1 inhibited IL-1 β -induced high expression of α -SMA, STAT1, ColI and FN. Meanwhile, overexpression of SOCS-1 reversed the expression of CK18 in HKC with IL-1 β stimulation. We conclude that overexpression of SOCS-1 inhibits IL-1 β -induced renal tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation maybe partly through blocking activation of STAT1.

Key words suppressor of cytokine signaling-1; interleukin-1 β ; renal tubular epithelial cell; transdifferentiation

Received: July 18, 2011 Accepted: September 21, 2011

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (No.C2009001083) and the Department of Health of Hebei Province (No.20090056)

*Corresponding author. Tel: 86-311-86265734, E-mail: susanliu1976@163.com