

白细胞介素-1 β 在人肾小管上皮细胞转分化中的作用及 Janus 激酶 2 抑制剂 AG490 的影响

刘青娟 史永红 刘淑霞 郝军 曹延萍 李航 韦金英 段惠军

【摘要】 目的 探讨 Janus 激酶 2 抑制剂 AG490 对白细胞介素-1 β (IL-1 β)诱导人肾小管上皮细胞转分化的影响。**方法** 将体外培养人肾近曲小管上皮细胞株(HKCs)分为空白对照组、IL-1 β (5 ng/ml)刺激组及 AG490 干预组(IL-1 β 5 ng/ml+AG490 10 μ mol/L)。分别于处理后 24、48、72 h 收集细胞,采用免疫细胞化学染色和蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测细胞角蛋白-18(CK-18)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)蛋白表达。**结果** 正常肾小管上皮细胞内其自身标志物 CK-18 高表达(1.25 ± 0.08),而 α -SMA 表达很少(0.17 ± 0.01)。IL-1 β 刺激组随刺激时间延长 CK-18 表达逐渐减少(24 h: 0.69 ± 0.04 , 48 h: 0.52 ± 0.03 , 72 h: 0.30 ± 0.01),而 α -SMA 蛋白合成逐渐增加(24 h: 0.56 ± 0.04 , 48 h: 1.05 ± 0.07 , 72 h: 1.43 ± 0.07),与空白对照组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。AG490 干预能使 CK-18 的表达逐渐恢复(24 h: 1.07 ± 0.07 , 48 h: 0.93 ± 0.06 , 72 h: 0.83 ± 0.06),并减弱 IL-1 β 对肾小管上皮细胞 α -SMA 蛋白的诱导作用(24 h: 0.33 ± 0.01 , 48 h: 0.52 ± 0.01 , 72 h: 0.61 ± 0.04),且作用显著(均 $P < 0.05$)。免疫细胞化学染色观察结果与其一致。**结论** 炎症因子 IL-1 β 通过降低肾小管上皮细胞 CK-18 表达,上调 α -SMA 表达,促使肾小管上皮细胞转分化为肌成纤维细胞;Janus 激酶 2 抑制剂 AG490 能部分阻断 IL-1 β 对肾小管上皮细胞的促转分化作用。

【关键词】 白细胞介素-1 β ; 肾小管上皮细胞; 表型转分化; Janus 激酶 2 抑制剂 AG490; 细胞角蛋白-18; α -平滑肌肌动蛋白

The effect of Janus kinase 2 inhibitor AG490 on renal tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation induced by interleukin-1 β LIU Qing-juan*, SHI Yong-hong, LIU Shu-xia, HAO Jun, CAO Yan-ping, LI Hang, WEI Jin-ying, DUAN Hui-jun.* Department of Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei, China

Corresponding author: DUAN Hui-jun, Email: duanhj@hebm. edu. cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of AG490, a Janus kinase 2 inhibitor, on epithelial-myofibroblast transdifferentiation induced by interleukin-1 β (IL-1 β). **Methods** Cultured human renal tubular epithelial cell line (HKCs) were divided into three groups: blank control group, IL-1 β (5 ng/ml) group and AG490 group (IL-1 β 5 ng/ml+AG490 10 μ mol/L). The cells in all groups were collected at 24, 48, 72 hours after intervention. Immunocytochemistry and Western blotting analysis were used to determine the expressions of cytokeratin-18 (CK-18) and α -smooth muscle actin (α -SMA). **Results** The higher expression of CK-18 (1.25 ± 0.08) and mild expression of α -SMA (0.17 ± 0.01) were found in blank control group. In IL-1 β group, the protein level of CK-18 was gradually decreased with prolongation of stimulus (24 hours: 0.69 ± 0.04 , 48 hours: 0.52 ± 0.03 , 72 hours: 0.30 ± 0.01), while the expression level of α -SMA was gradually increased (24 hours: 0.56 ± 0.04 , 48 hours: 1.05 ± 0.07 , 72 hours: 1.43 ± 0.07), and the difference between blank control group and IL-1 β group was statistically significant (all $P < 0.05$). The administration of AG490 could restore the expression of CK-18 (24 hours: 1.07 ± 0.07 , 48 hours: 0.93 ± 0.06 , 72 hours: 0.83 ± 0.06), and inhibit the expression of α -SMA induced by IL-1 β (24 hours: 0.33 ± 0.01 , 48 hours: 0.52 ± 0.01 , 72 hours: 0.61 ± 0.04). There was significant difference between AG490 group and IL-1 β group (all $P < 0.05$). The results of immunocytochemistry and that of Western blotting were identical. **Conclusion** IL-1 β can induce the transdifferentiation of renal tubular epithelial cells, up-regulate the expression of α -SMA, induce the renal tubular epithelial cells to transform to myofibroblast, while AG490 can inhibit the effect of IL-1 β .

【Key words】 Interleukin-1 β ; Renal tubular epithelial cell; Phenotype transdifferentiation; Janus kinase 2 inhibitor AG490; Cytokeratin-18; α -smooth muscle actin

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.12.014

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(C2008001029)

作者单位:050017 石家庄,河北医科大学病理教研室(刘青娟、史永红、刘淑霞、郝军、李航、韦金英、段惠军);河北省中医院病理科(曹延萍)

通信作者:段惠军,Email:duanhj@hebm. edu. cn

慢性肾脏疾病发展至终末期肾衰竭时均可表现出肾小管间质纤维化(TIF),且 TIF 的程度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^[1]。TIF 本质上是细胞外基质(ECM)的过量堆积,肌成纤维细胞(Myof)分泌的 I、III、IV 型胶原和

纤维连接蛋白是 ECM 的主要成分。大量的实验研究表明,肾小管上皮细胞-肌成纤维细胞转分化(TEM)是 Myof 的主要来源^[2],在 TIF 中发挥了重要作用。

TIF 是慢性炎症反应,有研究表明,尿中炎症细胞因子的测定是判断肾损伤的重要指标^[3]。肾小管上皮细胞转分化常与肾间质炎症反应同时出现,考虑这种微环境的改变可能与肾小管上皮细胞转分化有关^[4]。已知细胞因子受体超家族信号传递的必经途径是 Janus 激酶/信号转导和转录激活因子(JAK/STAT)信号通路,由此推测阻断该通路能特异性阻断细胞因子的作用。本研究中拟通过体外细胞培养的方法,观察白细胞素-1 β (IL-1 β)对肾小管上皮细胞的促转分化作用,同时应用 JAK2 抑制剂 AG490 处理细胞,观察其对 IL-1 β 刺激后肾小管上皮细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 材料:人肾近曲小管上皮细胞株(HKCs,由解放军总医院陈香美教授惠赠);鼠抗细胞角蛋白-18(CK-18)单克隆抗体(单抗)购自北京博奥森生物技术有限公司,兔抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)多克隆抗体(多抗)购自美国 Abcam 公司,IL-1 β 购自美国 Peprotech 公司,AG490 购自美国 Calbiochem 公司;二步法免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥公司。

1.2 细胞培养及分组:使用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基常规培养 HKCs,待细胞贴壁 60%~80% 融合时,改用无血清培养基同步培养 12 h,然后分为空白对照组、IL-1 β 刺激组(IL-1 β 5 ng/ml)、AG490 干预组(IL-1 β 5 ng/ml + AG490 10 μ mol/L),各组分别刺激 24、48、72 h。

1.3 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 CK-18、 α -SMA 蛋白表达:刺激 24、48、72 h 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 $^{\circ}$ C 保存。每个样品取 50 μ g 总蛋白,10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后电转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,5% 脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h,再分别加入鼠抗 CK-18 单抗和兔抗 α -SMA 多抗,抗体均 1:400 稀释,4 $^{\circ}$ C 过夜。免疫化学发光法(ECL)显色,以 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参照。Western blotting 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(A)值。

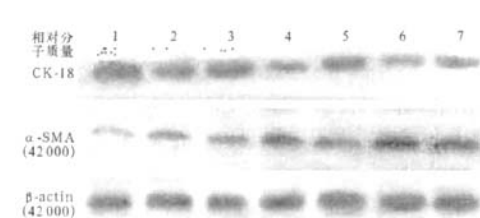
1.4 免疫细胞化学检测 CK-18、 α -SMA 蛋白表达:采用 6 孔板,置无菌盖玻片爬片,每组 6 个复孔,采

用二步法检测 CK-18、 α -SMA 表达。70% 乙醇固定细胞 30 min;3% H_2O_2 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 $^{\circ}$ C 过夜(以磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照);生物素化二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min;3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,光镜下观察阳性信号。

1.5 统计学方法:数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS 13.0 行单因变量多因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Western blotting 检测 CK-18、 α -SMA 蛋白表达(图 1;表 1):空白对照组 CK-18 蛋白高表达,很少有 α -SMA 蛋白表达;IL-1 β 刺激组 CK-18 表达逐渐减少,而 α -SMA 表达逐渐增多,呈时间依赖性;AG490 干预后 IL-1 β 的作用减弱。



CK-18:细胞角蛋白-18; α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白; β -actin: β -肌动蛋白,1:空白对照组,2~4:白细胞介素-1 β 刺激组刺激 24、48、72 h,5~7:Janus 激酶 2 抑制剂 AG490 干预组刺激 24、48、72 h

图 1 蛋白质免疫印迹法检测人肾小管上皮细胞 CK-18、 α -SMA 蛋白表达

表 1 各组肾小管上皮细胞 CK-18、 α -SMA 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	时间	样本数	CK-18	α -SMA
空白对照组		6	1.25 $\pm$ 0.08	0.17 $\pm$ 0.01
IL-1 β 刺激组	24 h	6	0.69 $\pm$ 0.04 ^a	0.56 $\pm$ 0.04 ^a
	48 h	6	0.52 $\pm$ 0.03 ^a	1.05 $\pm$ 0.07 ^a
	72 h	6	0.30 $\pm$ 0.01 ^a	1.43 $\pm$ 0.07 ^a
AG490 干预组	24 h	6	1.07 $\pm$ 0.07 ^b	0.33 $\pm$ 0.01 ^b
	48 h	6	0.93 $\pm$ 0.06 ^b	0.52 $\pm$ 0.01 ^b
	72 h	6	0.83 $\pm$ 0.06 ^b	0.61 $\pm$ 0.04 ^b

注:CK-18:细胞角蛋白-18, α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白,IL-1 β :白细胞介素-1 β ,AG490:Janus 激酶 2 抑制剂;与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与 IL-1 β 刺激组比较,^b $P<0.05$

2.2 免疫细胞化学检测 CK-18 蛋白表达(彩色插页图 2):CK-18 表达于肾小管上皮细胞胞质内。空白对照组肾小管上皮细胞 CK-18 呈强阳性表达;IL-1 β 刺激组 72 h CK-18 表达明显减弱;AG490 干

预组 72 h 的表达强度又有所恢复。

2.3 免疫细胞化学检测 α -SMA 蛋白表达(彩色插图 3):空白对照组肾小管上皮细胞未见 α -SMA 阳性表达;而 IL-1 β 刺激组 72 h 肾小管上皮细胞胞质内 α -SMA 表达呈阳性;AG490 干预组的表达又有所减弱。

3 讨论

肾小球硬化和肾小管间质纤维化是慢性肾脏疾病晚期的特征性病理变化,其中 TIF 的程度与肾功能的关系更加密切。以往研究表明 α -SMA 阳性的 Myof 在 TIF 的发生发展过程中起关键作用,是产生 ECM 的主要细胞。近年来大量研究证实肾小管上皮细胞转分化是 Myof 的主要来源^[4]。正常肾组织中几乎无 Myof,但在多种病理状态下,肾组织中可出现较多 Myof。Myof 可来源于成纤维细胞的分化,血管外周细胞的迁移,也可来自于肾小管上皮细胞。其中肾小管上皮细胞通过表型转分化转变为 Myof 越来越引起人们的关注。Iwano 等^[2]利用 DNA 示踪技术发现在慢性肾间质纤维化疾病中,36%左右的 Myof 来自于肾小管上皮细胞表型转分化。在此基础上,亦有研究显示,抑制肾小管上皮细胞转分化可明显减轻肾间质纤维化^[5]。

炎症损伤是导致 TIF 的关键因素。肾脏固有细胞在病理状态下可以产生各种炎症因子,可这些因子又可通过旁分泌和自分泌方式使炎症效应不断扩大,引起炎症级联反应,从而参与肾脏疾病的发生发展,最终导致肾小球硬化及肾小管间质纤维化^[6]。ILs 是强有力的炎症细胞因子。有研究表明 IL-1 β 可损伤肾小管上皮细胞,促使肾小管上皮细胞转分化,从而上调 ECM 的合成,参与 TIF 的发生发展^[7-8]。本实验中利用 5 ng/ml IL-1 β 刺激细胞,结果证实,IL-1 β 可降低肾小管上皮细胞自身标志物 CK-18 的表达,同时上调 α -SMA 的表达,表明 IL-1 β 可刺激人肾近曲小管上皮细胞发生表型转分化,转分化为 Myof,且随刺激时间的延长,其促转分化作用增强。

炎症因子属于细胞因子,细胞因子作用的发挥必须通过细胞内的信号转导,JAK/STAT 信号通路是细胞因子受体超家族信号传递的必经途径,推测阻断该通路能特异性抑制炎症效应。AG490 是一种人工合成的苯亚甲基丙二腈脂类衍生物,结构类似于酪氨酸,可以和受体酪氨酸激酶竞争结合位置,特异性阻滞各种细胞因子引起的 JAK/STAT 信号通路,目前尚未应用于临床。本实验中在 IL-1 β 刺激细胞的同时加入 AG490 干预,结果显示,CK-18 的表达多于 IL-1 β 刺激组,Myof 的标志物 α -SMA 少于 IL-1 β 刺激组。表明 IL-1 β 对肾小管上皮细胞具有促转分化作用,该作用能被 JAK2 抑制剂 AG490 阻断,提示 AG490 可通过抑制炎症反应来延缓 TIF,为临床治疗慢性肾脏疾病奠定了理论基础。

参考文献

- [1] Meyer TW. Tubular injury in glomerular disease. *Kidney Int*, 2003,63:774-787.
- [2] Iwano M, Plieth D, Danoff TM, et al. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest*, 2002,110:341-350.
- [3] 董文斌,唐章华,陈红英,等. 窒息新生儿尿中炎症细胞因子改变与肾小管损伤的关系. *中国危重病急救医学*, 2003, 15: 94-96.
- [4] 刘青娟,何宁,刘淑霞,等. 糖尿病大鼠肾小管上皮细胞转化与肝细胞生长因子和 Smad7 蛋白的表达. *中国危重病急救医学*, 2005,17:675-678.
- [5] 赵爱青,张晓明,侯恒,等. 姜黄素对单侧输尿管梗阻大鼠肾小管上皮细胞转分化影响的研究. *中国中西医结合急救杂志*, 2007,14:348-351.
- [6] Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol*, 2000,15:290-301.
- [7] Vesey DA, Cheung CW, Cuttle L, et al. Interleukin-1 β induces human proximal tubule cell injury, α -smooth muscle actin expression and fibronectin production. *Kidney Int*, 2002,62:31-40.
- [8] Vesey DA, Cheung C, Endre Z, et al. Role of protein kinase C and oxidative stress in interleukin-1 β -induced human proximal tubule cell injury and fibrogenesis. *Nephrology (Carlton)*, 2005,10:73-80.

(收稿日期:2010-03-26)

(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

线粒体损伤是重症休克时血管平滑肌收缩功能障碍的基础

以往研究表明,小动脉平滑肌上的 ATP 依赖性钾通道激活在休克血管收缩中发挥巨大作用,即使有足够的氧供给,但由于 ATP 水平较低,血管收缩物质依然存在。我国学者为了研究重症休克时线粒体的变化,把大鼠平滑肌细胞分为 4 组处理:对照组、失血性休克组、环孢素+休克组、ATP+环孢素+休克组。研究结果显示:失血性休克组线粒体肿胀,嵴不清;在休克组,线粒体膜电位提高了 49.7%,细胞内 ATP 水平降低了 82.1%,由此导致 ATP 依赖性钾通道的激活,但这些变化在环孢素+休克组有所减少;而由 ATP 引起的线粒体损伤不能被环孢素所改善。研究人员认为在休克引起的低血压状态,线粒体保护治疗可能成为治疗重症休克的一种新方法。

韩晓春,编译自《Am J Hypertens》,2010-09-09(电子版);胡森,审核

白介素-1 β 在人肾小管上皮细胞转分化中的作用及Janus激酶2抑制剂 AG490 的影响

(正文见747页)

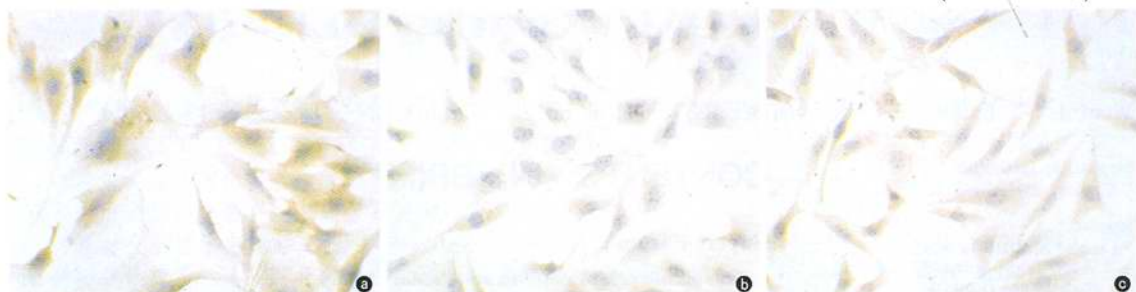


图2 光镜下观察人肾小管上皮细胞中细胞角蛋白-18(CK-18)蛋白表达 空白对照组(a)小管上皮细胞呈梭形,有突起,CK-18表达于胞质,呈强阳性,细胞核呈卵圆形,居中,未见着色;白介素-1 β (IL-1 β)刺激组(b)72h后细胞胞体呈梭形,有突起,CK-18表达于胞质,呈弱阳性,细胞核呈卵圆形,居中,未见着色;Janus激酶2抑制剂AG490干预组(c)72h后细胞胞体呈梭形、有突起,CK-18表达于胞质,阳性信号介于空白对照组(a)和IL-1 β 刺激组(b)之间,细胞核呈卵圆形,居中,未见着色 免疫细胞化学染色 $\times 400$

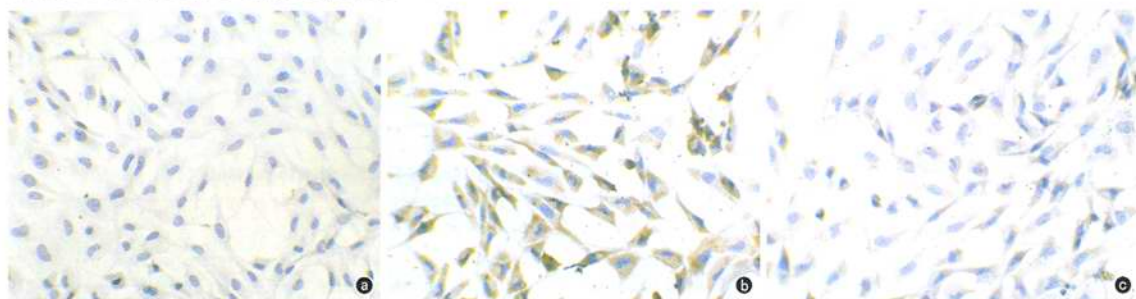
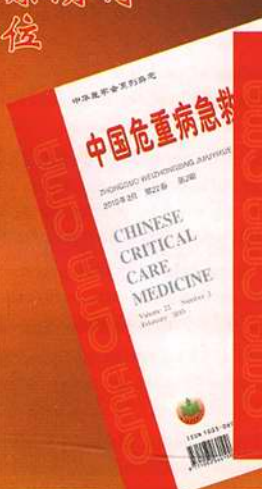


图3 光镜下观察人肾小管上皮细胞中 α -平滑肌细胞(α -SMA)蛋白表达 空白对照组(a)小管上皮细胞呈梭形,细胞核呈卵圆形,居中,胞质和胞核均未见着色;白介素-1 β (IL-1 β)刺激组(b)72h后细胞胞体呈梭形、有突起, α -SMA表达于胞质,阳性信号较强,细胞核呈卵圆形,居中,未见着色;Janus激酶2抑制剂AG490干预组(c)72h后细胞胞体呈梭形,有突起,胞质内可呈弱阳性,细胞核呈卵圆形,居中,未见着色 免疫细胞化学染色 $\times 400$

中文核心期刊 论文统计源期刊
影响因子分别排全国前三位



中国中西医结合学会主办
邮发代号: 6-93
双月刊 全年定价: 60.00元



中华医学会主办
邮发代号: 6-58
月刊 全年定价: 168.00元



欢迎订阅
欢迎投稿

刊社地址: 天津市和平区睦南道122号 邮编: 300050

请到当地邮局办理订阅手续,也可到本刊发行部订阅

电话: 022-23197150 传真: 022-23306917

Email: cccm@em120.com

万方数据