

· 论 著 ·

ERK1/2 信号通路在 Ang-(1-7) 抑制 Ang II 诱导的 NRK52E 转分化中的作用*

王明勇¹, 袁波², 夏基毅¹, 陈枫¹, 陈庄¹, 刘建^{3△}

(1. 泸州医学院附属医院医学实验中心, 四川泸州 646000; 2. 四川省宜宾市第一人民医院 644000;

3. 泸州医学院附属医院肾病内科, 四川泸州 646000)

摘要:目的 探讨血管紧张素-(1-7)[Ang-(1-7)]对血管紧张素 II (Ang II) 诱导的大鼠肾小管上皮细胞(NRK52E)表型转化及 ERK1/2 信号分子在转分化过程中的作用。方法 体外培养 NRK52E, 经 Ang-(1-7) 和 Ang II (终浓度均为 10^{-6} mol/L) 干预 24、48、72、96 h 后, 应用细胞免疫化学法检测 E-cadherin、 α -SMA 的表达; 干预 72、96 h 后, 应用 Western blot 法检测 P-ERK1/2 表达水平的变化。结果 Ang II 作用 96 h 后, E-cadherin 的表达显著减弱 ($P < 0.05$), α -SMA 的表达显著增强 ($P < 0.05$), P-ERK1/2 表达显著增强 ($P < 0.05$); 同时加入 Ang-(1-7) 后, 与 Ang II 组比较, E-cadherin 的表达显著增强 ($P < 0.05$), α -SMA 的表达显著减弱 ($P < 0.05$), P-ERK1/2 表达显著减弱 ($P < 0.05$)。结论 Ang-(1-7) 能够抑制 Ang II 诱导的大鼠 NRK52E 表型转化, ERK1/2 信号通路参与了肾小管上皮细胞转分化过程。

关键词:血管紧张素类; 血管紧张素 II; 肾小管; 上皮细胞; 细胞转分化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.09.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)09-0835-03

Role of ERK1/2 signaling pathway on angiotensin-(1-7) inhibit rat's tubular epithelial myofibroblast transdifferentiation induced by angiotensin II *

Wang Mingyong¹, Yuan Bo², Xia Jiyi¹, Chen Feng¹, Chen Zhuang¹, Liu Jian^{3△}

(1. Medical Experimental Center, Affiliated Hospital, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China;

2. Yibin First People's Hospital, Yibin, Sichuan 644000 China; 3. Department of Nephrology,

Affiliated Hospital, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To explore the role of ERK1/2 signaling pathway on angiotensin-(1-7) inhibit rat's tubular epithelial myofibroblast transdifferentiation induced by angiotensin II. **Methods** NRK52E were maintained and sub-cultured. The NRK52E cells were stimulated by angiotensin-(1-7) and angiotensin II (both 10^{-6} mol/L), cultured for 24, 48, 72, 96 h, we detected the expressions of E-cadherin and α -SMA by immunocytochemistry method; cultured for 72, 96 h, ERK1/2, detected by Western blot. **Results** The cells, cultured for 96h, expressions of α -SMA and P-ERK1/2 of Ang II group increased significantly than that of control group ($P < 0.05$), expressions of E-cadherin of Ang II group decreased significantly than that of control group ($P < 0.05$); expressions of α -SMA and P-ERK1/2 of Ang II + Ang-(1-7) group decreased significantly than that of Ang II group at the same time ($P < 0.05$), expressions of E-cadherin of Ang II + Ang-(1-7) group increased than that of Ang II group at the same time ($P < 0.05$). **Conclusion** Ang-(1-7) can inhibit Ang II-induced tubular epithelial myofibroblast transdifferentiation. ERK1/2 signaling pathway plays an important role in rat's tubular epithelial myofibroblast transdifferentiation.

Key words: angiotensins; angiotensin II; kidney tubules; epithelial cells; transdifferentiation

肾间质纤维化(TIF)是各种原因引起的慢性肾脏疾病进展为终末期肾衰竭的共同途径。肾小管上皮细胞转分化(TEMT)为 TIF 发生的重要机制^[1-2], 并成为当今学者研究的热点。血管紧张素 II (Ang II) 作为肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAS)的主要成员, 已证实 TIF 中发挥重要作用。血管紧张素-(1-7)[Ang-(1-7)]具有抗细胞增殖、扩张血管、抑制组织细胞重塑等多种拮抗 Ang II 的生理作用。但 Ang-(1-7)能否抑制 Ang II 诱导的 TEMT 以及其可能的细胞内信号通路尚未阐明。本实验通过 Ang II 刺激体外培养的大鼠 TEMT, 观察 Ang-(1-7)对其转分化的影响以及 ERK1/2 信号传导通路在转分化发生机制中的作用, 为慢性肾脏疾病的防治提供新的思路和治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 材料 Ang-(1-7)、Ang II 购自美国 Sigma 公司, 免疫细胞化学试剂盒购自武汉博士德公司, 蛋白提取试剂盒购自碧云天生物技术研究所, 蛋白定量测定试剂盒购自普利莱基因技术有限公司, 化学发光试剂购自碧云天生物技术研究所, phospho-p44/42MAPK(Erk1/2)Mose mAb 购自美国 Cell Signaling 公司, E-cadherin 单克隆抗体购自博士德公司, E-cadherin 单克隆抗体购自博士德公司, HRP 标记羊抗兔 IgG 购自博士德公司, HRP 标记小鼠抗大鼠 IgG 购自博士德公司, HRP 标记羊抗小鼠 IgG 购自碧云天生物技术研究所。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 正常大鼠肾小管上皮细胞

(NRK52E)由泸州医学院中心实验室提供。将细胞用体积分数为 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基置 37℃、含体积分数为 5.00% 的恒温恒湿 CO₂ 孵箱中培养。8~12 h 细胞贴壁则换成无血清的 DMEM 培养基培养 24 h, 吸去上清液, 调整细胞浓度为 2×10⁵/mL, 并接种于 6 孔接种板中, 每孔 2 mL。分为对照组(仅加入培养液)、Ang II 组、Ang-(1-7) 组及 Ang-(1-7)+Ang II 组。各组 Ang-(1-7) 和 Ang II 终浓度均为 10⁻⁶ mol/L。培养 24、48、72、96 h。

1.2.2 免疫细胞化学法测 E-钙黏附蛋白(E-cadherin)和 α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的表达 采用 SABC, 分别对各组细胞爬片的 E-cadherin 和 α-SMA 进行免疫化学染色, DAB 显色, PBS 液代替一抗作阴性对照, 以细胞胞质出现棕黄色颗粒为阳性信号。采用 Image-pro plus6.0 分析系统进行半定量分析。

1.2.3 Western blot 法测 ERK1/2 的表达 用 4℃ 预冷的 PBS 液洗细胞 3 次, 刮下细胞, 加入 400 μL 含有蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液, 置冰浴中超声破碎细胞, 4℃、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 用 BAC 法测蛋白质浓度, 各组取 20 μg 待测蛋白质样本, 与蛋白相对分子质量标准品共同进行 SDS-PAGE 电泳, 配制 10% 分离胶和 5% 浓缩胶, 将蛋白质转移至 PVDF 膜上, 置封闭缓冲液中过夜, 与小鼠抗大鼠一抗(1:1 500)孵育, 充分洗膜后与辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠二抗(1:1 000)孵育, 暗室化学发光准确显影。结果由计算机凝胶图像分析系统(美国 BioRad)分析。

1.3 统计学处理 所有数据使用 SPSS13.0 统计软件作统计学分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 多个样本均数两两比较采用 *q* 检验(Student-Newman-keuls multiple range test, SNK), 组间同时间点比较采用独立样本均数 *t* 检验, 以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ang-(1-7) 对 Ang II 诱导的 NRK52E α-SMA 和 E-cadherin 表达的影响 培养 24、48、72、96 h 后, 对照组无 α-SMA 阳性表达的细胞, Ang-(1-7) 组与之类似, Ang II 组细胞随培养时间延长 α-SMA 表达逐渐增加, 但 24、48、72 h 时与对照组比较, 差异无统计学意义, 96 h 时, Ang II 组细胞 α-SMA 表达显著增加, 与对照组比较, 差异有统计学意义(*P*<0.05), Ang II + Ang-(1-7) 组与 Ang II 组比较, α-SMA 表达明显减少, 差异有统计学意义(*P*<0.05), 见表 1、封 2 图 1。

表 1 各组细胞 α-SMA 的表达($\bar{x} \pm s$)

时间(h)	对照组	Ang II 组	Ang-(1-7) 组	Ang II + Ang-(1-7) 组
24	11.646±0.513	12.057±0.847	11.726±0.612	13.079±0.728
48	12.505±0.901	13.866±0.305	13.256±0.481	12.031±0.488
72	12.733±0.642	14.444±0.167	12.208±0.343	11.776±0.327
96	12.692±1.219	150.934±8.189*	12.099±0.351	80.538±6.527#

*: *P*<0.05, 与对照组同时间点比较; #: *P*<0.05, 与 Ang II 组同时间点比较。

培养 24、48、72、96 h 后, 对照组无 E-cadherin 表达减少的细胞, Ang-(1-7) 组与之类似, Ang II 组细胞随时间增加 E-cadherin 表达减少, 但 24、48、72 h 时与对照组比较, 差异无统计学意义, 96 h 时, Ang II 组细胞 E-cadherin 表达显著减少, 与对

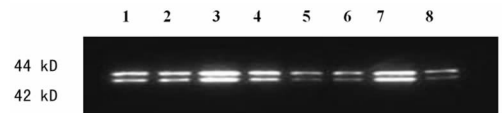
照组比较, 差异有统计学意义(*P*<0.05), Ang II + Ang-(1-7) 组与 Ang II 组比较, E-cadherin 表达明显增加, 差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 2、封 2 图 2。

表 2 各组细胞 E-cadherin 的表达($\bar{x} \pm s$)

时间(h)	对照组	Ang II 组	Ang-(1-7) 组	Ang II + Ang-(1-7) 组
24	202.987±6.614	204.543±8.317	201.836±8.110	212.499±6.581
48	212.531±6.252	211.386±9.469	212.523±4.303	208.001±7.219
72	210.595±9.821	215.782±8.562	210.095±4.656	209.720±9.122
96	203.435±8.653	77.568±3.148*	196.329±8.069	150.563±7.547#

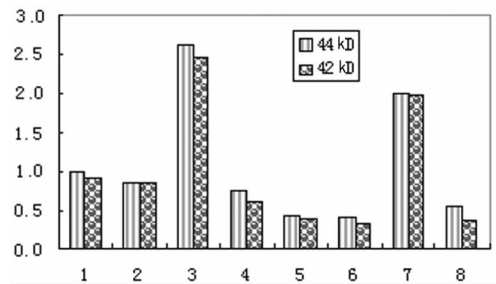
*: *P*<0.05, 与对照组同时间点比较; #: *P*<0.05, 与 Ang II 组同时间点比较。

2.2 Ang-(1-7) 对 Ang II 诱导的 NRK52E P-ERK1/2 表达的影响 Western blot 检测结果见图 3, NRK52E 同时表达 P-ERK1 和 P-ERK2; 相对分子质量分别为 44、42 kD。用 BIO-RAD 软件分析, 结果见图 4。培养 72、96 h 后, 与对照组比较, Ang II 组 P-ERK1/2 的表达明显增加(*P*<0.05), Ang-(1-7) 单独作用于细胞后, P-ERK1/2 的表达稍有降低(*P*>0.05); 与 Ang II 组比较, Ang-(1-7)+Ang II 组 P-ERK1/2 的表达明显降低(*P*<0.05)。



1: 72 h 对照组; 2: 72 h Ang-(1-7) 组; 3: 72 h Ang II 组; 4: 72 h Ang-(1-7)+Ang II 组; 5: 96 h 对照组; 6: 96 h Ang-(1-7) 组; 7: 96 h Ang II 组; 8: 96 h Ang-(1-7)+Ang II 组。

图 3 NRK52E p-ERK1/2 的免疫印迹结果



1: 72 h 对照组; 2: 72 h Ang-(1-7) 组; 3: 72 h Ang II 组; 4: 72 h Ang-(1-7)+Ang II 组; 5: 96 h 对照组; 6: 96 h Ang-(1-7) 组; 7: 96 h Ang II 组; 8: 96 h Ang-(1-7)+Ang II 组。

图 4 Ang-(1-7) 对 Ang II 诱导的 NRK52E ERK1/2 表达的影响

3 讨论

肾脏纤维化是各种原因所致的终末期肾病的共同病理表现, 包括肾小球硬化和 TIF。大量研究表明, TIF 的程度与肾功能损害的相关性比肾小球硬化更为密切, 动物实验证实, 在不伴有 TIF 的肾脏疾病中, 肾功能的恶化较慢, 因此 TIF 越来越多地受到关注和重视^[3]。在 TIF 的过程中, 30%~50% 的新增纤维细胞来源于 NRK52E-间充质细胞转分化^[4]。如何阻止 NRK52E 发生转分化, 减少肌成纤维细胞的生成, 已成为抑制 TIF 的另一突破口。

Ang II 是 RAS 系统的主要活性肽,它能促进左心室肥厚的形成^[5]。现已证实它在 TIF 中发挥重要作用。给大鼠持续静脉输入 Ang II,可诱导肾小管萎缩,肾间质表达 α -SMA,胞外基质积聚^[6];也有研究发现,Ang II 可时间依赖性地增加 HK2 细胞 α -SMA 的表达,导致转分化的发生^[7]。

近来发现 Ang-(1-7)是一种具有抗纤维化的细胞因子,其可通过抑制细胞增殖及细胞外基质积聚而发挥其抗纤维化作用。研究证实 Ang-(1-7)可抑制 Ang II 诱导的心肌肥大和间质纤维化,从而改善心肌重塑,并且可同时降低血浆中 TGF- β_1 的水平^[8]。TGF- β_1 能影响 NRK52E 的凋亡与增殖,导致肾纤维化的发生^[9]。越来越多的研究表明,MAPK 家族成员所主导的信号通路是将细胞外生物信号转入核内,是引起细胞核生物反应的重要途径。其中以 ERK1/2 与细胞增殖反应的关系最为密切。Su 等^[10]发现 Ang-(1-7)可抑制 Ang II 诱导的 P38MAPK、ERK1/2、JNK 等的磷酸化,进而减少肾近端小管细胞增殖及细胞外基质(ECM)的分泌而发挥其抑制肾纤维化的作用。

但 Ang-(1-7)能否抑制 Ang II 诱导的体外培养的 TEMT 呢?并且这一作用是通过什么途径实现的呢?TEMT 表现为细胞失去极性,失去上皮细胞标志物 E-cadherin 及表达肌成纤维细胞的标志物 α -SMA。本研究结果显示,在 Ang II 中同时加入 Ang-(1-7)96 h 后,Ang-(1-7)可抑制 Ang II 诱导的 NRK52E α -SMA 表达增加($P < 0.05$),减少 Ang II 对 E-cadherin 的表达抑制($P < 0.05$),提示 Ang-(1-7)可以抑制 Ang II 诱导的 TEMT;本实验还发现,培养 72、96 h 后,Ang II 组 P-ERK1/2 的表达明显高于对照组($P < 0.05$);在 Ang II 中同时加入 Ang-(1-7)96 h 后,与 Ang II 组比较,P-ERK1/2 的表达明显减少($P < 0.05$),提示 ERK1/2 信号通路在 Ang-(1-7)抑制转分化过程中有重要作用。

总之,本研究结果表明,Ang-(1-7)作为 Ang II 的内源性拮抗因子,可以从蛋白水平抑制 Ang II 诱导的 TEMT,并且这一作用是通过 ERK1/2 信号通路来实现的,提示 Ang-(1-7)作为 TIF 的负性调节因子,可能用于肾纤维化的治疗,从而为临床肾纤维化的防治提供新的思路和治疗靶点。

参考文献:

[1] Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis

(上接第 834 页)

- [9] Hovhannisyan RH, Carstens RP. Heterogeneous ribonucleoprotein m is a splicing regulatory protein that can enhance or silence splicing of alternatively spliced exons[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(50):36265-36274.
- [10] Hung CJ, Lee YJ, Chen DH, et al. Proteomic analysis of methylarginine-containing proteins in HeLa cells by two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting with a methylarginine-specific antibody[J]. *Protein J*, 2009, 28(3/4):139-147.
- [11] Ettore S, Guglielmo M, Stefano M, et al. Staging of colon cancer: whole-body MRI vs whole-body PET-CT-initial clinical experience[J]. *Abdom Imaging*, 2008, 33(6):676-688.

and therapeutics[J]. *Kidney Int*, 2006, 69(2):213-217.

- [2] Zeisberg M, Kalluri R. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis[J]. *J Mol Med*, 2004, 82(3):175-181.
- [3] Chevalier RL. Pathogenesis of renal injury in obstructive uropathy[J]. *Curr Opin Pediatr*, 2006, 18(2):153-160.
- [4] Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, et al. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(12):2282-2287.
- [5] 张莉娜,袁艳荣,孙慧丽,等. Ang II、TGF- β_1 、MMP-1 及 TIMP-1 与原发高血压左心室肥厚的相关性研究[J]. *山东医药*, 2005, 45(28):7-8.
- [6] Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, et al. Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension[J]. *Hypertension*, 1992, 19(5):464-474.
- [7] Chen L, Liu BC, Zhang XL, et al. Influence of connective tissue growth factor antisense oligonucleotide on angiotensin II-induced epithelial mesenchymal transition in HK2 cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(8):1029.
- [8] Grobe JL, Mecca AP, Lingis M, et al. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7)[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292(2):H736-742.
- [9] 任韫卓,郝军,史永红,等. TGF- β_1 激活 Smad 信号通路影响肾小管上皮细胞的增殖与凋亡[J]. *重庆医学*, 2007, 36(20):2079-2081.
- [10] Su Z, Zimpelmann J, Barns KD. Angiotensin-(1-7) inhibits angiotensin II-stimulated phosphorylation of MAP kinases in proximal tubular cells[J]. *Kidney Int*, 2006, 69(12):2212-2218.

(收稿日期:2010-09-10 修回日期:2010-11-10)

- [12] 方桦,王兴元,王金斤,等. 300 例结直肠癌肝转移患者临床预后分析[J]. *中华肿瘤杂志*, 2009, 31(3):220-221.
- [13] 赵会民,张森,高枫. 癌胚抗原受体在消化系统各器官中的表达及意义[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2010, 13(8):608-611.
- [14] Jessup JM, Laguinge L, Lin S, et al. Carcinoembryonic antigen induction of IL-10 and IL-6 inhibits hepatic ischemic/reperfusion injury to colorectal carcinoma cells[J]. *Int J Cancer*, 2004, 111(3):332-337.
- [15] 黄泽林,周铁英,郭祥发,等. 脑转移瘤的 CT 诊断[J]. *医用放射技术杂志*, 2006, 31(5):58-59.

(收稿日期:2010-10-10 修回日期:2010-11-10)