

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.21.006

## 醛固酮诱导人肾小管上皮细胞胶原 I、III 表达的研究\*

黄海燕<sup>1</sup>, 魏佳莉<sup>2△</sup>

(海南省人民医院:1. 中心实验室;2. 肾内科,海口 570100)

**[摘要]** **目的** 探讨 Rho 激酶对醛固酮(ALD)诱导的人肾小管上皮细胞胶原 I、III (COL I、III)表达的影响。**方法** 将人肾小管上皮细胞 HK-2 培养于含 15% 胎牛血清(FBS)的 RPMI-1640 培养液中,ALD 受体拮抗剂依普利酮(10 μmol/L)和 Rho 激酶抑制剂 Y27632(1 μmol/L)预处理细胞 30 min 后,100 nmol/L ALD 作用 HK-2 细胞 24 h,实时定量 PCR 法检测各组细胞中 COL I、III mRNA 的表达,酶联免疫吸附试验测定培养上清液中 COL I、III 及 Rho 激酶蛋白表达水平。**结果** ALD 可上调 HK-2 细胞中 COL I、III mRNA 的表达,并增加培养上清液中 Rho 激酶、COL I、III 蛋白表达水平,Rho 激酶抑制剂 Y27632 及 ALD 受体拮抗剂依普利酮可拮抗上述效应。**结论** ALD 可活化 HK-2 细胞 Rho 激酶信号传导通路,并通过 Rho 激酶诱导 HK-2 细胞 COL I、III 的表达而加速肾小管间质纤维化的进展。

**[关键词]** 醛固酮;胶原 I;胶原 III;Rho 激酶;人近端肾小管上皮细胞;肾小管间质纤维化

**[中图分类号]** R692

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2016)21-2900-03

## Study on expressions of collagen I and III in aldosterone-induced human kidney tubular epithelial cells\*

Huang Haiyang<sup>1</sup>, Wei Jiali<sup>2△</sup>

(1. Central Laboratory;2. Department of Nephrology, Hainan Provincial General Hospital, Haikou, Hainan 570100, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the role of Rho kinase on collagen(COL) I and III expression of human renal tubular epithelial cells. **Methods** Human kidney tubular epithelial (HK-2) cells were cultured in the RPMI-1640 culture solution containing 15% fetal bovine serum. After 30 min pretreatment by the ALD receptor antagonist eplerenone(10 μmol/L) and Rho kinase inhibitor Y27632(1 μmol/L),100 nmol/L ALD acted the HK-2 cells for 24 h. The expressions of collagen I and III mRNA in each group were detected by real time PCR and the expression levels of COL I, III and Rho kinase protein were detected by ELISA. **Results** ALD could up-regulate the expressions of COL I, III mRNA in HK-2 cells, and increased the levels of Rho kinase, COL I and III protein, while the Rho kinase inhibitor Y27632 and ALD receptor inhibitor eplerenone could antagonize these effects. **Conclusion** ALD could activate Rho kinase signal transduction pathway in HK-2 cells and accelerate the progression of tubular interstitial fibrosis via Rho kinase induced expression of COL I and III.

**[Key words]** aldosterone; collagen-I; collagen-III; Rho kinase; human proximal tubular epithelial cells; tubular interstitial fibrosis

肾小管间质纤维化是衡量慢性肾脏疾病进展的重要指标之一,是各种肾脏疾病慢性进展,最终致慢性肾衰竭的共同机制<sup>[1]</sup>。肾间质纤维化的本质是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度合成而致 ECM 的异常沉积<sup>[2]</sup>。近期研究表明,醛固酮(aldosterone, ALD)在肾间质纤维化的发病机制中起着重要作用,可促进体外培养的肾小管上皮细胞表达致纤维化的细胞因子及 ECM 的表达,是胶原合成的强烈刺激剂<sup>[3]</sup>。但具体机制仍未完全明确。Rho 三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP)酶家族是 Ras 超家族中的一员,是真核细胞内重要的信号传递分子,在真核细胞信号传导过程中发挥着分子开关作用。目前发现该家族包括 RhoA、RhoB、RhoC 等在内的 15 种成员,其中 Rho 激酶是 RhoA 的下游效应蛋白,相对分子质量约 160 × 10<sup>3</sup>,是一个丝/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶,在细胞增殖、凋亡及细胞转型等过程中起关键调节作用<sup>[4-7]</sup>。本实验旨在观察 ALD 对人肾小管上皮细胞 Rho 激酶活性的影响,探讨 Rho 激酶信号转导通路与 ALD 诱导的肾小管上皮细胞胶原 I (collagen I, COL I)、胶原 III (collagen

III, COL III)表达的关系。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 人近端肾小管上皮 HK-2 细胞购自中南大学湘雅医学院细胞库,来源于美国标准培养物保藏中心(ATCC)。ALD (eplerenone, EPL, 美国 Amersco 公司),依普利酮(eplerenone, EPL, 美国 Sigma 公司),Rho 激酶抑制剂 Y27632 (以下简称 Y27632, 美国 Sigma 公司),Trizol 试剂、RNA 反转录试剂盒、实时定量 PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司),COL I、COL III、Rho 激酶酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海劲马公司),胎牛血清(FBS)、RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及药物干预** HK-2 细胞培养于含 15% FBS 的 RPMI-1640 培养液中,实验前用无血清培养液同步化 24 h。EPL(10 μmol/L)和 Y27632(1 μmol/L)预处理细胞 30 min 后,100 nmol/L ALD 作用于 HK-2 细胞 24 h,作为 ALD-EPL 组与 ALD-Y27632 组。另外以未处理 HK-2 细胞作为对照组,

\* 基金项目:海南省社会发展科技专项项目(2012SF04、2013SF04 和 2015SF43)。 作者简介:黄海燕(1980-),主管技师,本科,主要从事细胞遗传学研究。 △ 通讯作者, E-mail: wjl525@163.com。

100 mmol/L ALD 刺激 HK-2 细胞作为 ALD 组。

1.2.2 实时定量 PCR 法检测细胞中 COL I、III mRNA 的表达

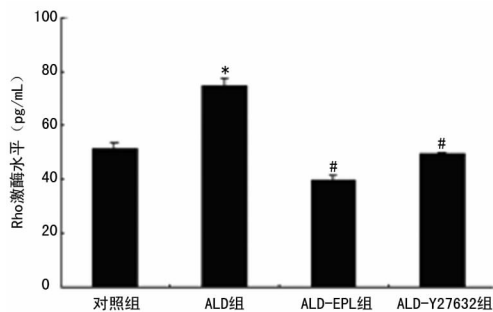
Trizol 提取细胞总 RNA。取 2 μg RNA 反转录为 cDNA。应用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, COL I (142 bp): 正义 5'-GTG GTG AGA CTG GTC CTG CTG-3', 反义 5'-AAG CCA CGG TGA CCC TTT ATG-3'; COL III (193 bp): 正义 5'-GCC TCC CAG AAC ATT ACA TAC C-3', 反义 5'-CTG TCT TGC TCC ATT CAC CAG-3'; 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH, 145 bp): 正义 5'-GGG TGT GAA CCA TGA GAA GTA TG-3', 反义 5'-GAT GGC ATG GAC TGT GGT CAT-3'。引物由上海 invitrogen 公司合成。PCR 反应条件: 94 °C 变性 5 min; 然后 94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 35 个循环; 再于 72 °C 延伸 5 min。计算目的基因与内参 GAPDH 的比值, 即得目的基因 mRNA 的表达量。

1.2.3 ELISA 法检测细胞培养上清液中 COL I、III 及 Rho 激酶的表达 收集细胞上清液, ELISA 法检测细胞上清液中 COL I、III 及 Rho 激酶的表达, 按试剂盒说明书操作。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析; 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ALD 对 HK-2 细胞 Rho 激酶蛋白表达的影响 对照组 HK-2 细胞培养上清液中表达一定含量的 Rho 激酶蛋白 [(51.29 ± 2.74) pg/mL], 100 nmol/L 的 ALD 刺激细胞 24 h 后 (ALD 组), 培养上清液中 Rho 激酶蛋白表达 [(74.71 ± 2.61) pg/mL] 较对照组明显增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。与 ALD 组比较, ALE-EPL 组 [(39.51 ± 1.99) pg/mL] 和 ALD-Y27632 组 [(48.79 ± 0.45) pg/mL] Rho 激酶蛋白表达均降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.001$ ), 表明 EPL 和 Y27632 均可逆转 ALD 的上述效应。见图 1。



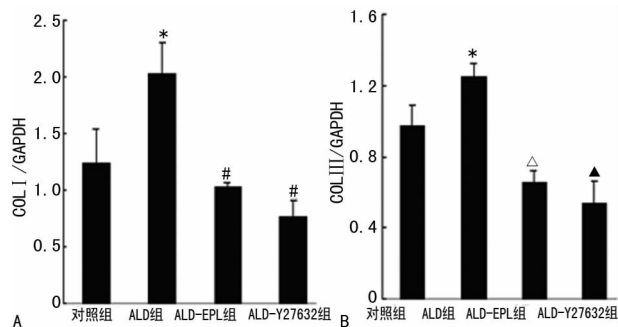
\*:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; #:  $P < 0.01$ , 与 ALD 组比较。

图 1 ALD 对 HK-2 细胞 Rho 激酶蛋白表达的影响

2.2 ALD 对 HK-2 细胞 COL I、III mRNA 表达的影响 实时定量 PCR 结果显示, 对照组 HK-2 细胞中有少量 COL I、III mRNA 表达, 100 nmol/L 的 ALD 作用 HK-2 细胞 24 h 后 (ALD 组), 与对照组相比, COL I、III mRNA 表达水平均明显增加, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与 ALD 组相比, ALD-EPL 组 COL I、III mRNA 表达水平均降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01, P < 0.001$ ); ALD-Y27632 组 COL I、III mRNA 表达水平均降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01, P = 0.001$ ), 表明 EPL 和 Y27632 均可明显抑制 ALD 所诱导的 COL I、III mRNA 表达。见图 2。

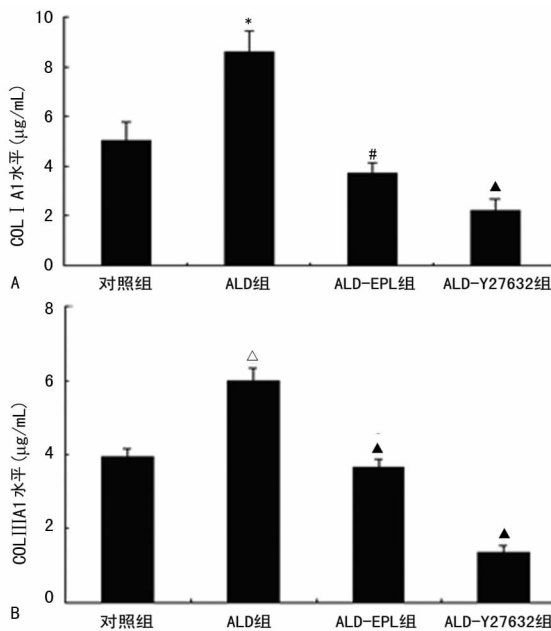
2.3 ALD 对 HK-2 细胞培养上清液 COL I、III 蛋白含量的影响

影响 对照组 HK-2 细胞培养上清液中有一定含量的 COL I、III 蛋白表达 [(5.02 ± 0.77)、(3.95 ± 0.20) μg/mL], 100 nmol/L 的 ALD 刺激细胞 24 h 后 (ALD 组), 培养上清液中 COL I [(8.63 ± 0.83) μg/mL,  $P < 0.01$ ], COL III 蛋白 [(6.0 ± 0.32) μg/mL,  $P = 0.001$ ] 表达水平较对照组均明显增加。与 ALD 组相比, ALD-EPL 组 COL I A1 [(3.70 ± 0.46) μg/mL], COL III A1 [(3.66 ± 0.20) μg/mL] 表达水平均降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01, P < 0.001$ ); ALD-Y27632 组 COL I A1 [(2.19 ± 0.46) μg/mL], COL III A1 [(1.36 ± 0.18) μg/mL] 表达水平均降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.001$ ), 表明 EPL 和 Y27632 均可明显抑制 ALD 所诱导的 COL I、III 蛋白的表达。见图 3。



\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; #:  $P < 0.01$ ,  $\Delta$ :  $P < 0.001$ ,  $\blacktriangle$ :  $P = 0.001$ , 与 ALD 组比较。

图 2 ALD 对 HK-2 细胞 COL I、III mRNA 表达的影响



\*:  $P < 0.01$ ,  $\Delta$ :  $P = 0.001$ , 与对照组比较; #:  $P = 0.001$ ,  $\blacktriangle$ :  $P < 0.001$ , 与 ALD 组比较。

图 3 ALD 对 HK-2 细胞培养上清液 COL I、III 蛋白含量的影响

3 讨论

肾小管间质纤维化是衡量慢性肾脏疾病进展的重要指标之一, 是各种肾脏疾病慢性进展, 最终致慢性肾衰竭的共同机制<sup>[8]</sup>。近年来大量临床和实验研究表明, 在各种肾脏疾病中, 肾小管间质的病变程度是反映肾功能减退严重程度和判断预后最重要的指标。因此, 对其发生、发展的机制, 以及其防治的研究越来越受到国内外研究学者的重视。目前, 尽管采用了多

种干预治疗措施,仍无法有效延缓大多数患者肾小管间质纤维化的进展,并且随着血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)和(或)血管紧张素受体阻滞剂(ARB)在各种肾病患者中的广泛应用及深入研究,越来越多的临床证据表明,随治疗时间的延长,ALD 脱逸现象的发生导致其降压外的器官保护效应亦逐渐消失。因此,找寻肾小管间质纤维化可能的发病机制及干预措施,具有十分重要的卫生、经济和社会意义。

ALD 是调节人体水盐代谢的重要激素,除肾上腺皮质外,肺动脉和肠系膜上动脉的血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、肝脏、肾脏及脑组织中均发现 ALD 合成酶,其可催化合成单乙酰基 ALD,并通过旁分泌或自分泌的方式在局部发挥作用。过去一直认为,血管紧张素 II(Ang II)是肾素-血管紧张素-ALD 系统中造成肾损伤的主要物质。近年的研究结果发现,在进展性肾脏疾病中,ALD 亦是重要的独立的致病因子,其可通过血流动力学效应和直接作用促进肾脏疾病的发生、发展,具有完全不依赖 Ang II 的独立的致器官纤维化作用,是有丝分裂和胶原合成的强烈刺激剂<sup>[3]</sup>。

动物实验及临床资料均表明,肾脏疾病的进展与 ALD 有密切关系。各种肾衰竭动物模型及临床慢性肾衰竭患者均存在高 ALD 血症,在大鼠肾衰竭模型中,ALD 水平与高血压、蛋白尿和组织损伤的严重程度明显相关<sup>[9]</sup>。Walker 等<sup>[10]</sup>亦报道了糖尿病肾病患者血浆 ALD 水平与肾损伤程度明显相关。随着 ACEI 及 ARB 在肾病患者中的广泛应用及深入研究,越来越多的临床证据发现,随治疗时间的延长,ALD 脱逸现象的发生导致其降压外的器官保护效应亦逐渐消失。而该效应在加用 ALD 受体拮抗剂后又再次出现<sup>[11]</sup>。以上均提示 ALD 在残余肾的进一步损伤中起着重要的作用。ALD 引起肾损伤的机制涉及多个方面。在大鼠抗 thy1.1 系膜增生性肾小球肾炎模型、单侧肾切除致高血压的大鼠模型、残余肾衰竭模型、慢性环孢素 A 肾毒性、糖尿病肾病的大鼠模型中发现,ALD 能增加前炎症因子的表达,上调转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)、刺激肾间质 COL I 合成和纤维连接蛋白分泌,而 ALD 受体拮抗剂,则可减低上述炎症因子及 TGF- $\beta$ 1 的表达,延缓肾间质纤维化的形成,但具体机制尚不明确。与以往报道相一致,本试验结果提示 ALD 可明显上调 HK-2 细胞 COL I、III mRNA 和蛋白的表达,证实 ALD 可直接诱导肾小管上皮细胞 COL I、III 的合成与分泌,同时盐皮质激素受体(MR)拮抗剂 EPL 可拮抗上述效应。

本研究证实,ALD 可激活 HK-2 细胞 Rho 激酶信号传导通路。Nagatoya 等<sup>[12]</sup>用 Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶(Rho associated coiled coil forming protein kinase,Rock)的特异性抑制剂 Y-27632 干预小鼠单侧输尿管结扎肾间质纤维化模型,发现其早期炎症细胞浸润明显减少,小管间质纤维化也明显减轻,提示 Rho 激酶可能通过介导早期炎症细胞浸润和炎症介质分泌参与肾间质纤维化的发生。Sun 等<sup>[13]</sup>报道,Rho 激酶通过 TGF- $\beta$ 1 依赖旁路参与 ALD 诱导的肾小管间质损伤。但迄今为止,Rho 激酶信号转导通路是否参与 ALD 诱导的肾小管上皮细胞胶原的合成国内外尚未见报道。本研究证实,ALD 可激活 HK-2 细胞 Rho 激酶的活化,同时 Rho 激酶抑制剂可抑制 ALD 诱导的肾小管上皮细胞 COL I、III 的分泌。

综上所述,本试验证实 ALD 可激活 HK-2 细胞 Rho 激酶

信号传导通路,并通过 Rho 激酶诱导 HK-2 细胞 COL I、III 的分泌,从而加速肾小管间质纤维化的进展。

## 参考文献

- [1] Nangaku M. Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure [J]. Intern Med, 2004, 43(1): 9-17.
- [2] Iwano M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2004, 13(3): 279-284.
- [3] Zhang A, Jia Z, Guo X, et al. Aldosterone induces epithelial-mesenchymal transition via ROS of mitochondrial origin [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2007, 293(3): F723-F731.
- [4] Larjava H, Lyons JG, Salo T, et al. Anti-integrin antibodies induce type IV collagenase expression in keratinocytes [J]. J Cell Physiol, 1993(157): 190-200.
- [5] Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases [J]. Bioessays, 1992, 14(7): 455-463.
- [6] Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases [J]. J Biol Chem, 1999(274): 21491-21494.
- [7] Wendt TM, Tanji N, Guo J, et al. RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. Am J Pathol, 2003, 162(4): 1123-1137.
- [8] Mundel P, Reiser J, Zúñiga Mejía Borja A, et al. Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines [J]. Exp Cell Res, 1997, 236(1): 248-258.
- [9] Matsui T, Amano M, Yamamoto T, et al. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho [J]. EMBO J, 1996, 15(9): 2208-2216.
- [10] Walker WG. Hypertension-related renal injury: a major contributor to end-stage renal disease [J]. Am J Kidney Dis, 1993, 22(1): 164-173.
- [11] Leung T, Chen XQ, Manser E, et al. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton [J]. Mol Cell Biol, 1996, 16(10): 5313-5327.
- [12] Nagatoya K, Moriyama T, Kawada N, et al. Y-27632 prevents tubulointerstitial fibrosis in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction [J]. Kidney Int, 2002, 61(5): 1684-1695.
- [13] Sun GP, Kohno M, Guo P, et al. Involvements of Rho-kinase and TGF-beta pathways in aldosterone-induced renal injury [J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(8): 2193-2201.