

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.16.007

TGF- β /ILK 信号通路在甲状旁腺激素诱导血管内皮细胞向间质细胞转化中的作用

李 宁¹, 张克勤^{2△}, 彭侃夫²

(1. 重庆大学附属中心医院/重庆市急救医疗中心/重庆市第四人民医院内分泌肾内科 400014;
2. 陆军军医大学第一附属医院肾科, 重庆 400038)

[摘要] **目的** 探讨尿毒症毒素甲状旁腺激素(PTH)诱导血管内皮细胞发生内皮-间充质转化(EndMT)的分子机制。**方法** 采用全长重组 PTH(1×10^{-8} mol/L)处理人主动脉血管内皮细胞(HAECs),同时利用转化生长因子 β (TGF- β)信号通路抑制剂 SB431542、Pirfenidone(PFD)和 ILK 抑制剂 Cpd22 进行干预。蛋白质印迹法(Western blot)检测 HAECs 中内皮细胞标志物血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin)、CD31,以及间充质细胞标志物 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的蛋白水平。**结果** 在 PTH 作用下,血管内皮细胞标志分子 VE-cadherin 和 CD31 表达降低($P < 0.05$),间充质细胞标志分子 α -SMA 的表达明显升高($P < 0.05$)。使用信号通路抑制剂抑制 TGF- β 和 ILK 可以部分逆转 PTH 诱导 HAECs 细胞发生间质转化,包括逆转 PTH 降低内皮细胞标志物和增加纤维化细胞标志物的作用。**结论** PTH 可能通过 TGF- β /ILK 通路诱导血管内皮细胞发生 EndMT。

[关键词] 甲状旁腺激素;血管内皮细胞;内皮细胞-间质转化;转化生长因子 β ;整合素连接激酶

[中图分类号] R692.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)16-2140-04

The effect of TGF- β /ILK pathway in endothelial-mesenchymal transition induced by parathyroid hormone in human vascular endothelial cells

LI Ning¹, ZHANG Keqin^{2△}, PENG Kanfu²

(1. Department of Nephrology, Chongqing University Central Hospital/Chongqing Emergency Medical Center/Chongqing the Fourth Hospital, Chongqing 400014, China; 2. Department of Nephrology, the First Hospital Affiliated to AMU, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the molecular mechanism of endothelial-mesenchymal transition (EndMT) induced by uremic toxin, parathyroid hormone (PTH), in vascular endothelial cells. **Methods** PTH (1×10^{-8} mol/L) was used to induce EndMT in human aortic endothelial cells (HAECs). TGF- β signaling inhibitor, including SB431542 and pirfenidone (PFD), and integrin-linked kinase (ILK) inhibitor Cpd22 were used to investigate the potential mechanism of EndMT induced by PTH in HAECs. Then the vascular endothelial cell markers VE-cadherin and CD31, and the mesenchymal marker α -SMA were detected by western blot. **Results** PTH reduced the expression levels of vascular endothelial cell marker CD31 and VE-cadherin ($P < 0.05$), while significantly increased the expression level of fiber cell marker α -SMA ($P < 0.05$). Furthermore, the TGF- β signaling inhibitors (SB431542 and PFD) and ILK inhibitor (Cpd22) were able to partially reverse the EndMT induced by PTH in HAECs, which reversed the effect of PTH on reducing vascular endothelial cell marker expression and increasing fiber cell marker expression. **Conclusion** PTH could induce EndMT in HAECs via TGF- β /ILK pathway.

[Key words] parathyroid hormone; vascular endothelial cells; endothelial-mesenchymal transition; transforming growth factor- β ; integrin-linked kinase

尿毒症是慢性肾衰竭(chronic kidney disease, CKD)等多种肾脏疾病转归的最终形式。对尿毒症患者机体产生严重致病作用的主要是滞留堆积的各种无机或有机分子,被称为尿毒症毒素。按来源来分,主要包括本来就需排泄的有毒物质和机体正常所需由于排除障碍导致含量剧增的物质,前者的代表性分子有尿素、肌酐,而甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)是后者的典型代表^[1]。笔者在前期研究中发现,PTH 可以诱导人血管内皮细胞发生内皮细

胞-间质转化(endothelial-mesenchymal transition, EndMT)^[2],既可以观察到细胞形态发生纤维化转变,又可以检测到 EndMT 一系列标志分子的表达改变,包括血管内皮细胞标志分子血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin)和 CD31 的表达降低,纤维细胞标志分子 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达升高,提示尿毒症患者血清中较高水平的 PTH 可能通过诱导血管内皮细胞发生 EndMT 来产生对心血管的损伤,但是其中的分子机制尚不清楚。近年来的研究发现,整合素连接

激酶(integrin-linked kinase, ILK)作为转化生长因子 β (TGF- β)信号下游效应蛋白,其激活与EndMT密切相关^[3-5]。因此,本研究进一步利用TGF- β 及ILK的抑制剂,探讨TGF- β /ILK通路在PTH诱导EndMT中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 人主动脉血管内皮细胞(HAECs)及内皮细胞培养基购自美国 Lifeline Cell Technology 公司。PTH 购自美国 Anaspec 公司(货号:27080),按照说明书溶解于无菌水中。TGF- β 抑制剂 SB431542、Pirfenidone(PFD)购自美国 Selleck 公司,ILK 抑制剂 Cpd22 购自美国 Millipore 公司,均按照说明书溶解于二甲基亚砜(DMSO)中。蛋白质印迹法(Western blot)所用抗体包括 VE-cadherin(美国 Cell Signaling Technology 公司,货号:2500),CD31(美国 Cell Signaling Technology 公司,货号:3528), α -SMA(美国 Abcam 公司,货号:ab5694),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(美国 Proteintech 公司,货号:60004-1)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及刺激处理 取对数生长期的 HAECs 接种于 6 孔细胞培养板中(3×10^5 个/孔),置于 CO₂ 细胞培养箱中培养,同步静止 12 h 后开始加入诱导刺激因素:PTH 诱导组加入 PTH 至终浓度 1×10^{-8} mol/L,对照组加入等体积的注射用水;抑制剂组分别加入不同浓度的抑制剂,对照组和单独加 PTH 的实验组(PTH 实验组)同时加入 DMSO (1:1 000)作为抑制剂的溶剂对照。诱导刺激处理 36 h 后,收取各组细胞分别对各个标志分子的蛋白水平进行检测。

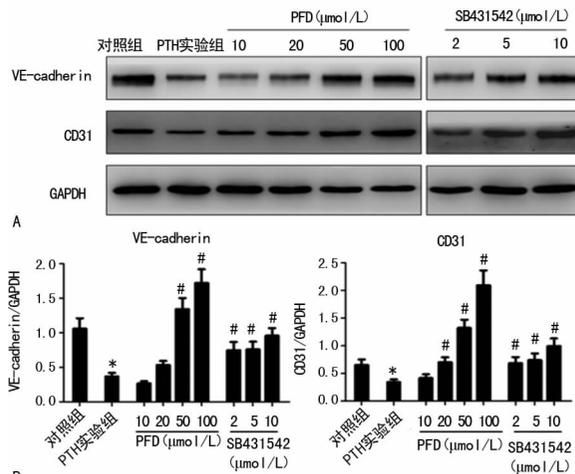
1.2.2 Western blot 吸去细胞培养液,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次,加入 $1 \times$ 十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液吹下细胞,转移至 EP 管中,冰上超声 30 s,煮沸 10 min,即为全细胞裂解液,于 -80°C 保存;取适量蛋白裂解液上样进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),冰浴条件下电转移至硝酸纤维素膜;5%脱脂奶粉[Tris 缓冲盐水/吐温(TBS/T)配制]室温封闭 2 h;加一抗工作液,4 $^\circ\text{C}$ 反应过夜;加辣根过氧化物酶标记的二抗工作液,室温反应 1 h;化学发光法显示目标条带。采用 Image J 软件对 Western blot 目标条带进行灰度扫描。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件对各实验结果数据进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素或两因素方差分析,组间两两比较采用 Bonferroni 法,两组间比较采用两独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

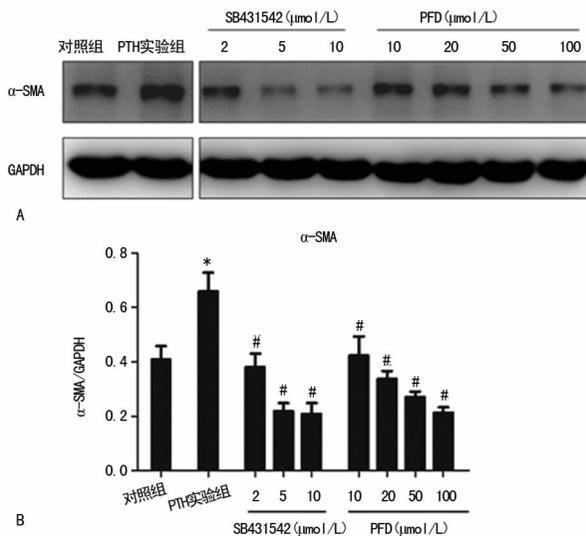
2.1 TGF- β 抑制剂作用后 HAECs 内皮细胞标志物的表达 为了探讨 TGF- β 通路在 PTH 诱导 HAECs 细胞发生 EndMT 中的作用,采用 TGF- β 的两种抑制剂 SB431542 和 PFD 抑制 TGF- β 通路,检测 HAECs

内皮细胞标志物 VE-cadherin 和 CD31 蛋白水平的改变。由图 1 可见, 1×10^{-8} mol/L 的 PTH 诱导刺激后,HAECs 细胞中 VE-cadherin 和 CD31 的蛋白水平均出现明显降低。随着 TGF- β 抑制剂 PFD 和 SB431542 的加入,VE-cadherin 和 CD31 的蛋白水平有明显的恢复,并且随着抑制剂浓度的增加,VE-cadherin 和 CD31 的蛋白表达水平也随之升高。



A: Western blot 蛋白条带; B: 蛋白条带进行灰度扫描后以 GAPDH 为内参计算蛋白相对表达水平; *: $P < 0.05$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与 PTH 实验组比较

图 1 TGF- β 抑制剂作用后 HAECs 内皮细胞标志物的表达

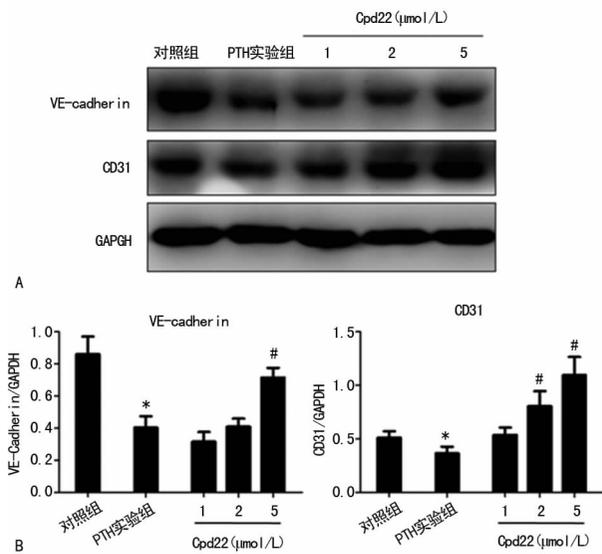


A: Western blot 蛋白条带; B: 蛋白条带进行灰度扫描后以 GAPDH 为内参计算蛋白相对表达水平; *: $P < 0.05$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与 PTH 实验组比较

图 2 TGF- β 抑制剂作用后 HAECs 细胞纤维化标志物的表达

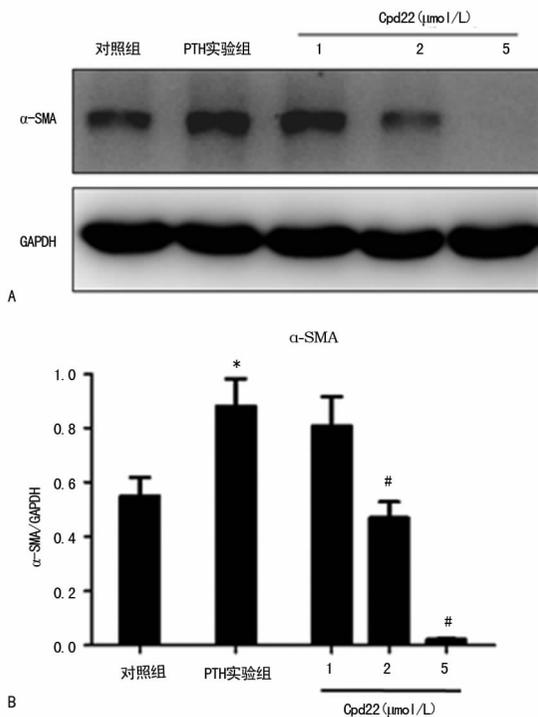
2.2 TGF- β 抑制剂作用后 HAECs 细胞纤维化标志物的表达 进一步检测 HAECs 中 α -SMA 蛋白水平在 TGF- β 抑制剂 SB431542 和 PFD 干预处理后的表达改变。由图 2 可见, 1×10^{-8} mol/L 的 PTH 诱导刺激后,HAECs 细胞中 α -SMA 的蛋白表达水平出现了明显升高。随着 TGF- β 通路抑制剂 SB431542 和

PFD 的加入, α -SMA 的蛋白水平出现了明显的降低, 并且随着抑制剂浓度的增加, α -SMA 的蛋白水平出现剂量依赖性下降, 几乎恢复到对照组的水平。



A: Western blot 蛋白条带; B: 蛋白条带进行灰度扫描后以 GAPDH 为内参计算蛋白相对表达水平; *: $P < 0.05$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与 PTH 实验组比较

图 3 ILK 抑制剂作用后 HAECs 内皮细胞标志物的表达



A: Western blot 蛋白条带; B: 蛋白条带进行灰度扫描后以 GAPDH 为内参计算蛋白相对表达水平; *: $P < 0.05$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与 PTH 实验组比较

图 4 ILK 抑制剂作用后 HAECs 纤维化标志物的表达

2.3 ILK 抑制剂作用后 HAECs 内皮细胞标志物的表达 为了探讨 ILK 在 PTH 诱导 HAECs 细胞发生 EndMT 中的作用, 采用 ILK 抑制剂 Cpd22 处理细

胞, 检测 HAECs 内皮细胞标志物 VE-cadherin 和 CD31 蛋白水平的改变。由图 3 可见, 1×10^{-8} mol/L 的 PTH 诱导 HAECs 细胞中 VE-cadherin 和 CD31 蛋白水平出现明显降低, 随着 ILK 抑制剂 Cpd22 的加入, VE-cadherin 和 CD31 的蛋白水平有比较明显的恢复, 并且随着抑制剂浓度剂量的增加, VE-cadherin 和 CD31 的蛋白表达水平出现剂量依赖性的增加。

2.4 ILK 抑制剂作用后 HAECs 细胞纤维化标志物的表达 进一步检测 HAECs 中 α -SMA 蛋白水平在 ILK 抑制剂 Cpd22 干预条件下的改变。由图 4 可见, 1×10^{-8} mol/L 的 PTH 刺激使 HAECs 细胞中 α -SMA 的蛋白水平出现明显升高, 随着 ILK 抑制剂 Cpd22 的加入, α -SMA 的蛋白表达水平出现明显的降低, 并且随着抑制剂浓度剂量的增加, α -SMA 的蛋白水平出现更加明显的下降。

3 讨论

文献表明, 大多数早期和晚期 CKD 患者血清 PTH 水平明显升高^[6-7]。而 PTH 是由甲状旁腺主细胞分泌的一种激素, 主要调节人体钙、磷代谢, 对人体内没有危害。但是, 由于尿毒症患者正常肾功能受损, 不但引起 PTH 降解减缓, 排泄也难以正常进行。因此, PTH 不断在患者体内积蓄。并且患者大多钙磷代谢紊乱(由肾衰竭引起), 患者血清钙离子水平降低、血磷水平升高, PTH 在刺激下分泌增加, 进一步诱发 PTH 的蓄集。这些变化, 会导致多种并发症, 主要有继发性甲状旁腺功能亢进、皮肤瘙痒、转移性钙化、肾性骨病和周围神经病变等。已有大量文献报道, PTH 受体存在于成纤维细胞和心肌细胞表面。此外, PTH 也可作用于心肌。早期的研究发现, PTH 是导致心肌间质纤维化的重要因素, 而这由患者体内过高的 PTH 导致心肌间质的非修复性纤维化及胶原堆积引起。

细胞发生 EndMT 时, 细胞丢失其内皮细胞标志物蛋白 VE-cadherin 和 CD31 等, 获得性表达间质细胞标志物 α -SMA 等^[8-10]。本实验结果表明, 在 PTH 作用下血管内皮细胞 HAECs 的 VE-cadherin 和 CD31 表达降低(图 1、3), 而 α -SMA 的表达变化则相反(图 2、4), 说明 PTH 作为尿毒症毒素, 可以减弱 HAECs 的内皮细胞特征, 同时增强纤维化的特征, 诱导 HAECs 发生较明显的 EndMT。

TGF- β 是一种生长调节因子, 具有多种细胞生物学功能。TGF- β 的分泌方式有多种, 主要有自分泌、旁分泌及内分泌 3 种方式; TGF- β 主要调控细胞分化、增殖、凋亡以及细胞外基质, 也可深入调控组织形成、分化等; TGF- β 可与细胞表面受体结合, 从而传导信号。研究发现, 间质纤维化与 TGF- β 1 功能密切相关, TGF- β 1 是诱导 EndMT 发生的关键因子之一^[5, 11-12]。有研究表明, TGF- β 可诱导小鼠胚胎干细胞来源的 EndMT^[13]。此外, 血管内皮细胞的增殖和表型转化也可由 TGF- β 刺激产生, 主要表型是成纤维

细胞分子标志 α -SMA 水平升高、内皮细胞标志蛋白 CD31 表达则明显下调^[14-15]。本研究主要针对 HAECs 运用 PTH 刺激诱导,并额外使用 TGF- β 信号通路抑制剂 SB431542 和 PFD。结果发现,PTH 诱导 HAECs 发生的 EndMT 可被抑制剂 SB431542 和 PFD 逆转,如 HAECs 内皮细胞标志分子减少(图 1)、纤维化分子标志增加(图 2)。结果提示,PTH 诱导 HAECs 发生 EndMT 可能受到 TGF- β 信号通路的有效调控。

学术界已发现,TGF- β 调控上皮间充质转化(EMT)的发生,Smad 依赖性 & 非 Smad 依赖性两种主要的信号通路^[16]。非 Smad 依赖性通路涉及多种激酶通路,包括细胞外调节蛋白激酶-丝裂原活化蛋白激酶(ERK-MAPK)、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)、p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38-MAPK)和 Rho 激酶等^[16]。最近的研究表明,与表型转变相关的 TGF- β 信号下游蛋白主要是 ILK^[3]。SERRANO 等^[3]发现,当乳腺上皮细胞内发生 EMT,往往伴随 ILK 表达水平明显升高,通过阻断 ILK 可以有效逆转转化过程。上述研究表明,ILK 是 TGF- β 1 诱导 EMT 发生的极为重要的下游分子。另有研究尝试对肾小管上皮细胞采用 TGF- β 1 干预,结果发现肾小管上皮细胞原型丢失,间充质细胞标志表达则明显升高,而这一表型变化可应用小分子 QLT-0267(ILK 抑制剂)有效抑制^[17]。已有报道指出,内皮细胞与上皮细胞具有一定的同源性^[9],笔者前期的研究结果也发现 HAECs 的 ILK 水平可由 PTH 刺激升高^[2],为深入研究 ILK 在这一过程中的作用,笔者首先运用 PTH 诱导刺激 HAECs,再加入小分子物质 Cpd22(ILK 抑制剂)干预,结果发现 Cpd22 可逆转 PTH 引发的 HAECs 的内皮细胞分子标志物的减少和纤维化标志蛋白的增加。这一结果表明,ILK 信号活化在 PTH 诱导 HAECs 发生 EndMT 过程中起着重要的作用。

综上所述,PTH 可明显诱导出 HAECs 发生 EndMT,而且 TGF- β /ILK 信号通路参与调控 EndMT 过程。从临床价值来看,血管内皮细胞的 EndMT 可显著降低血管弹性、增加血管硬化,导致心血管系统损伤,对机体造成很大的危害。未来 TGF β /ILK 通路可能作为抑制血管内皮细胞发生 EndMT 的治疗靶点,用于预防尿毒症患者的心血管损伤。

参考文献

[1] RODRIGUEZ M, FELSENFELD A J. PTH, FGF-23 and early CKD[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(11): 3391-3393.
 [2] 李宁,李亚斐. 甲状旁腺激素对 HAEC 细胞 EndMT 诱导作用及机制探讨[J]. *中国血液净化*, 2014, 13(9): 647-649.
 [3] SERRANO I, MCDONALD P C, LOCK F E, et al. Role of

the integrin-linked kinase (ILK)/Rictor complex in TGF β 1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT)[J]. *Oncogene*, 2013, 32(1): 50-60.

- [4] XU W, YANG Z, LU N. A new role for the PI3K/Akt signaling pathway in the epithelial-mesenchymal transition[J]. *Cell Adh Migr*, 2015, 9(4): 317-324.
 [5] SUTARIYA B, JHONSA D, SARAF M N. TGF- β ; the connecting Link between nephropathy and fibrosis[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2016, 38(1): 39-49.
 [6] GARRETT G, SARDIWAL S, LAMB E J, et al. PTH-a particularly tricky hormone; why measure it at all in kidney patients? [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2013, 8(2): 299-312.
 [7] WANG W H, CHEN L W, LEE C C, et al. Association between parathyroid hormone, 25(OH) vitamin D, and chronic kidney disease: a population-based study[J]. *Biomol Res Int*, 2017(2017): 7435657.
 [8] CAREW R M, WANG B, KANTHARIDIS P. The role of EMT in renal fibrosis[J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 347(1): 103-116.
 [9] LI J, BERTRAM J F. Review; endothelial-myofibroblast transition, a new player in diabetic renal fibrosis [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2010, 15(5): 507-512.
 [10] TENNAKOON A H, IZAWA T, KUWAMURA M, et al. Pathogenesis of type 2 epithelial to mesenchymal transition (EMT) in renal and hepatic fibrosis[J]. *J Clin Med*, 2015, 5(1): 4.
 [11] MORRISON C D, PARVANI J G, SCHIEMANN W P. The relevance of the TGF- β paradox to EMT-MET programs[J]. *Cancer Lett*, 2013, 341(1): 30-40.
 [12] KAGE H, BOROK Z. EMT and interstitial lung disease; a mysterious relationship[J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2012, 18(5): 517-523.
 [13] MEDICI D, POTENTA S, KALLURI R. Transforming growth factor- β 2 promotes snail-mediated endothelial-mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and smad-independent signalling[J]. *Biochem J*, 2011, 437(3): 515-520.
 [14] ZEISBERG E M, POTENTA S, XIE L, et al. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(21): 10123-10128.
 [15] ZEISBERG E M, TARNAVSKI O, ZEISBERG M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis[J]. *Nat Med*, 2007, 13(8): 952-961.
 [16] DERYNCK R, ZHANG Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling[J]. *Nature*, 2003, 425(6958): 577-584.
 [17] LI Y, TAN X, DAI C, et al. Inhibition of integrin-linked kinase attenuates renal interstitial fibrosis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(9): 1907-1918.