

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.12.002

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.12.002>

纤维细胞生长因子 1 对转化生长因子 β 1 诱导的人肾成纤维细胞活化纤维化的保护作用

王玉路, 薛现军, 刘敏洁, 苗月亭

(濮阳市油田总医院肾内科, 河南 濮阳 457001)

[摘要] 目的: 探讨纤维细胞生长因子1(fibroblast growth factor 1, FGF1)对转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)诱导的人肾成纤维细胞活化纤维化的保护作用及机制。方法: 将NRK-49F细胞过表达FGF1后, 用2 ng/mL TGF- β 1刺激诱导肾纤维化模型。24 h后观察细胞密度及BrdU阳性率; MTT法测定细胞活力; 细胞免疫荧光和蛋白质印迹法检测NRK-49F细胞中 α -SMA和FN蛋白表达水平; 细胞免疫荧光和蛋白质印迹法检测NRK-49F细胞中p-S6, p-Akt(Ser473), β -catenin和p-Smad3(Ser423/425)蛋白的表达和分布的变化。结果: 外源性TGF- β 1促进肾成纤维细胞体外增殖, 而过表达FGF1可以降低TGF- β 1诱导的肾成纤维细胞增殖, 减轻由TGF- β 1处理刺激的肾成纤维细胞活化; FGF1过表达可以抑制TGF- β 1诱导的Akt/ β -catenin改变, 但不抑制Smad信号转导。结论: FGF1可能是通过Akt/ β -catenin通路实现对TGF- β 1诱导的人肾成纤维细胞活化纤维化的保护作用。

[关键词] 纤维细胞生长因子1; 肾纤维化; Akt; β -catenin

Protective effect of fibroblast growth factor 1 on transforming growth factor β 1 induced activation of human renal fibroblasts

WANG Yulu, XUE Xianjun, LIU Minjie, MIAO Yueting

(Department of Nephrology, Puyang Oilfield General Hospital, Puyang Henan 457001, China)

Abstract **Objective:** To investigate the protective effect and mechanism of fibroblast growth factor 1 (FGF1) on transforming growth factor β 1 (TGF- β 1)-induced activation of human renal fibroblasts. **Methods:** NRK-49F cells were over-expressed with FGF1 and then stimulated with 2 ng/mL TGF- β 1 to induce renal fibrosis model. Cell density and BrdU positive rate were observed after 24 h. The cell viability was determined by MTT assay. The expressions of α -SMA and FN protein in NRK-49F cells were detected by immunofluorescence and Western blot. The changes of p-S6, p-Akt (Ser473), β -catenin and p-Smad3 (Ser423/425) in NRK-49F cells were detected by immunofluorescence and Western blot. **Results:** Exogenous TGF- β 1 promoted the proliferation of renal

收稿日期 (Date of reception): 2019-03-12

通信作者 (Corresponding author): 王玉路, Email: wangyuluccxx@163.com

fibroblasts in vitro, while over-expression of FGF1 reduced TGF- β 1-induced renal fibroblast proliferation and reduced renal fibroblast activation stimulated by TGF- β 1. Over-expression of FGF1 inhibited TGF- β 1-induced Akt/ β -catenin alteration, but did not inhibit Smad signaling. **Conclusion:** The protective effect of FGF1 on TGF- β 1-induced activation of human renal fibroblasts may be achieved through the Akt/ β -catenin pathway.

Keywords fibroblast growth factor 1; renal fibrosis; Akt; β -catenin

难以治愈的间质纤维化进程是进行性肾病 (progressive renal disease, PRD) 的一个重要特征, 也是造成临床上PRD患者预后差、治疗选择有限的重要因素^[1-2]。虽然肾中的许多进行性疾病起源于肾小球, 但肾小管间质受累程度是最佳预后指标^[3]。肾小管间质纤维化的特征主要表现在肾小管扩张或萎缩, 间质细胞数量增加, 肌成纤维细胞活化, α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)表达增加, 微血管形成闭塞和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积^[4-5]。而转化生长因子(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)诱导的肾成纤维细胞活化是肾间质纤维化的关键步骤^[6]。纤维细胞生长因子1(fibroblast growth factor 1, FGF1)是培养的成纤维细胞的有丝分裂原^[7-8], 参与多种生理过程, 包括细胞生长和分化, 血管生成和组织修复^[9]。本研究试图通过细胞学实验, 探索FGF1通过抑制TGF- β 1信号转导途径对体外肾纤维化中的保护作用, 以期对肾纤维化的预防和治疗提供思路。

1 材料与方法

1.1 细胞和材料

FGF1质粒(Plasmid81825)购自美国Addgene公司; 重组大鼠TGF- β 1因子(ab236341)、MTT试剂盒(ab52903)和抗p-Smad3(S423/S425)抗体(ab211091)购自美国Abcam公司; PBS缓冲液(P10033)购自陕西海力克斯生物公司; DMEM普通高糖细胞培养液(C11995500BT)购自美国Gibco公司; 胎牛血清(2602-P130707)购自美国PAN公司; Lipofectamine 2000(11668027)购自美国Thermo公司; 抗BrdU抗体(B2531)和抗 α -SMA抗体(A5228)购自美国Sigma-Aldrich公司; 抗 β -catenin抗体(61054)购自美国BD公司; 抗p-S6抗体(3157)、p-Akt(Ser473)抗体(3868)购自美国CST公司; 抗GAPDH抗体(sc25778)购自美国Santa Cruz公司; 30%丙烯酰胺(W047-1)购自南京建成生物工

程研究所; 超敏化学发光检测试剂盒(JC-PC001)和SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5 \times)(JC-PE007)购自西安晶彩生物科技有限公司。

1.2 细胞培养

NRK-49F细胞(CRL-1570)购自美国ATCC细胞库, 采用含有2 mmol/L左旋谷酰胺(L-glutamine)和10%胎牛血清的DMEM普通高糖细胞培养液培养于37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂的细胞孵育箱。

1.3 细胞 FGF1 质粒转染

将NRK-49F细胞以 2×10^5 个/mL密度接种于24孔板, 待细胞贴壁后, 更换无血清培养基培养24 h, 分别加入含有2 μ L LipofectamineTM 2000与0.9 μ g质粒预混的100 μ L的Opti-MEM培养基, 培养6 h后, 更换成含10%胎牛血清的DMEM普通高糖细胞培养液, 在37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂孵育箱中继续培养24 h。

1.4 肾纤维化细胞模型的构建与分组

NRK-49F细胞分为对照组、单纯FGF1过表达组、肾纤维化细胞模型组和FGF1过表达+TGF- β 1刺激组。肾纤维化细胞模型组: NRK-49F细胞采用2 ng/mL TGF- β 1刺激24 h, 诱导肾纤维化模型。对照组: NRK-49F细胞不采用TGF- β 1刺激, 直接常规培养24 h。单纯FGF1过表达组: 采用过表达FGF1的NRK-49F细胞再常规培养24 h。FGF1过表达+TGF- β 1刺激组: 采用过表达FGF1的NRK-49F细胞再用2 ng/mL TGF- β 1刺激24 h。收集各组细胞, 用于后续实验。

1.5 BrdU 染色

将各组的细胞用BrdU(10 mmol/L)孵育24 h。将细胞用冰冷的70%乙醇固定20 min, 通过与2.5 mol/L HCL起温育20 min使DNA变性, 然后用0.1 mol/L硼酸中和。通过将细胞与PBS中的3% H₂O₂温育20 min来淬灭内源性过氧化物酶活性, 检测BrdU阳性率。

1.6 细胞免疫荧光染色

在处理的细胞到达处理时间终点时, 将细胞吸除培养基, 用预冷的PBS洗涤3次, 吸干表面液体。使用免疫荧光专用固定液固定后, 滴加大约40 μ L的抗体稀释液(1:50), 于4 $^{\circ}$ C过夜。用TBST浸洗后, 在样品上滴加大约40 μ L的二抗稀释液(1:50), 于室温避光孵育25 min。使用抗荧光淬灭封片剂封片, 在共聚焦显微镜下观察。

1.7 MTT 实验

每个样品选择5 000个细胞接种到96孔板, 按照实验要求处理细胞。在处理的时间终点时, 每孔加入20 μ L 5mg/mL的MTT试剂溶液, 继续在37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂孵育箱中孵育3 h, 吸弃孔内培养液, 每孔加入150 μ L DMSO, 振荡至结晶物完全溶解。在酶联免疫酶标仪上测定各孔540 nm波长处吸光度值。

1.8 蛋白质印迹检测

对已处理的细胞, 按照蛋白提取试剂盒说明书, 提取细胞总蛋白。所有蛋白样品BCA法蛋白定量, 加入5 \times 上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C煮沸5 min变性, 置-80 $^{\circ}$ C冰箱保存。制备12%分离胶, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(上样量100 μ g)后电转印至PVDF膜, 5%BSA封闭后分别加入抗体(1:1 000), 在4 $^{\circ}$ C过夜孵育, 洗膜后以辣根过氧化物酶标记抗体孵育2 h。抗原-抗体复合物用ECL法显示, 采用Image-Pro Plus软件分析蛋白条带的M值, 以靶蛋白吸光度值/GAPDH吸光度值的比值反映靶蛋白的相对水平。

1.9 统计学处理

采用SPSS 24.0统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间资料的两两比较采用单因素方差分析后LSD-*t*法检验, 检验水准为 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达FGF1降低TGF- β 1诱导的肾成纤维细胞增殖

为确定外源性TGF- β 1在肾纤维化发生中的作用, 我们将NRK-49F细胞(大鼠肾间质成

纤维细胞系)与TGF- β 1共同孵育来模拟体内情况。与对照组相比, 在肾纤维化细胞模型组细胞密度明显增加($P<0.01$); 与肾纤维化细胞模型组相比, FGF1过表达+TGF- β 1刺激组细胞密度显著降低($P<0.05$; 图1A, 图1B)。与对照组相比, 在肾纤维化细胞模型组中细胞BrdU阳性率增加($P<0.01$); 与肾纤维化细胞模型组相比, FGF1过表达+TGF- β 1刺激组细胞BrdU阳性率显著降低($P<0.05$; 图1C, 图1D)。提示FGF1过表达可以降低TGF- β 1诱导的肾成纤维细胞增殖。

2.2 过表达FGF1降低TGF- β 1诱导的肾成纤维细胞活力

与对照组相比, 在肾纤维化细胞模型组细胞活力明显增加($P<0.01$); 与肾纤维化细胞模型组相比, FGF1过表达+TGF- β 1刺激组细胞活力显著降低($P<0.05$, 图2)。

2.3 FGF1过表达减轻由TGF- β 1处理刺激的肾成纤维细胞活化

为进一步研究FGF1在肾成纤维细胞活化中的作用, 本研究用FGF1过表达NRK-49F细胞, 然后以2 ng/mL TGF- β 1处理24 h。通过NRK-49F细胞中 α -SMA和FN的免疫荧光染色发现TGF- β 1可诱导 α -SMA和FN高表达, 而FGF1的过表达则显著抑制TGF- β 1诱导的 α -SMA和FN表达(图3A)。蛋白质印迹结果也同样证明这一结果(图3B~3D), 表明FGF1过表达可通过抑制由TGF- β 1处理引发的成纤维细胞活化而发挥抗纤维化作用。

2.4 FGF1过表达抑制TGF- β 1诱导的Akt, β -catenin通路改变

如图4所示, 与对照组相比, 在肾纤维化细胞模型组中细胞p-S6, p-Akt(Ser473)和 β -catenin, p-Smad3表达增加; 与肾纤维化细胞模型组相比, FGF1过表达+TGF- β 1刺激组细胞p-S6, p-Akt(Ser473)和 β -catenin表达降低, 而Smad3磷酸化(经典TGF- β 1信号转导的关键分子)没有改变。提示FGF1过表达可以抑制TGF- β 1诱导的Akt, β -catenin通路的改变, 但不抑制由p-Smad3介导的信号转导。

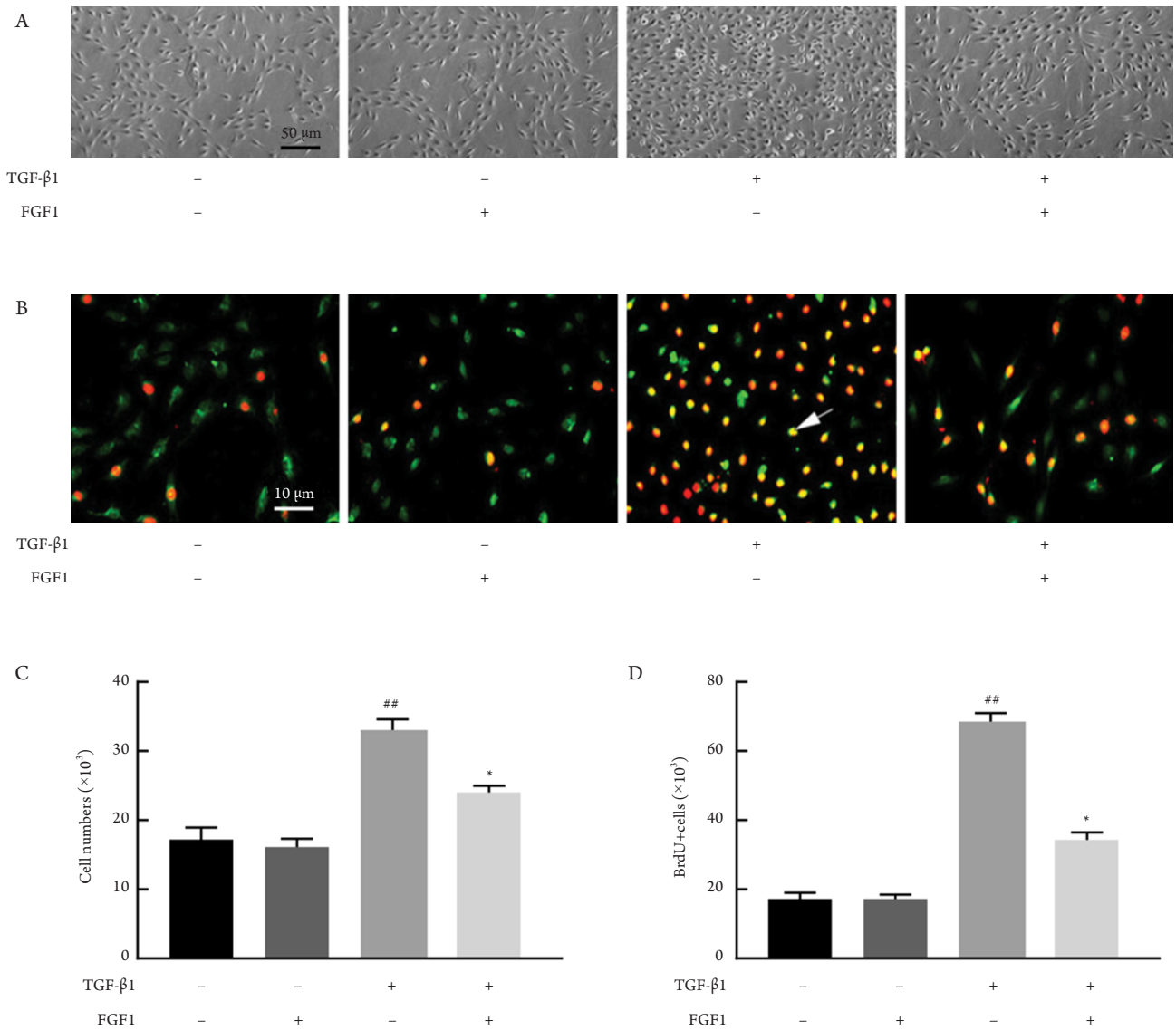


图1 FGF1过表达降低TGF- $\beta 1$ 诱导的肾成纤维细胞增殖

Figure 1 Over-expression of FGF1 reduces TGF- $\beta 1$ -induced renal fibroblast proliferation

(A)代表性普通光镜下细胞照片; (B)普通光镜下细胞数量统计数据; (C)荧光显微镜下BrdU阳性细胞的百分比统计数据; (D)代表性荧光显微镜下BrdU染色照片; 用小鼠抗BrdU抗体(红色)标记细胞, SYTO-Green(绿色)用于标记细胞核。箭头表示BrdU阳性细胞。与对照组相比, $^{**}P < 0.01$; 与单纯TGF- $\beta 1$ 刺激相比, $^{*}P < 0.05$ 。

(A) Representative cell photographs under microscope; (B) Statistical data of cell number under microscope; (C) Statistical data of the percentage of BrdU positive cells under fluorescence microscope; (D) Representative fluorescence microscope images of BrdU staining. Cells were labeled with mouse anti-BrdU antibody (red) and SYTO-Green (green) was used to label nuclei. Arrows indicate BrdU positive cells. Compared with the control group, $^{**}P < 0.01$; compared with TGF- $\beta 1$ alone group, $^{*}P < 0.05$.

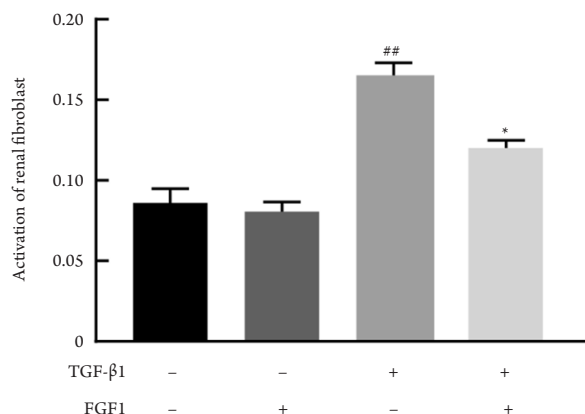


图2 MTT测定细胞活力

Figure 2 Cell viability was measured by MTT assay

与对照组相比, ^{##} $P < 0.01$; 与单纯TGF-β1刺激相比, ^{*} $P < 0.05$ 。

Compared with the control group, ^{##} $P < 0.01$; compared with TGF-β1 alone group, ^{*} $P < 0.05$.

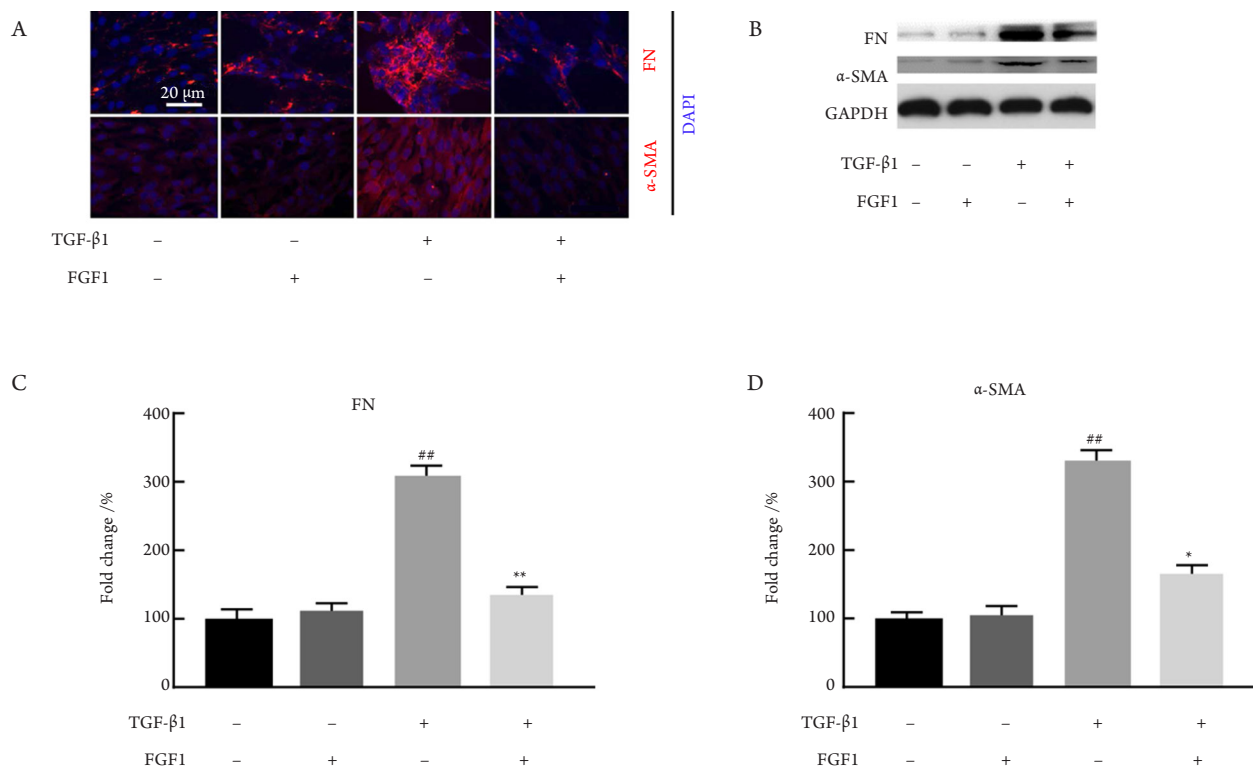


图3 FGF1过表达可以减少TGF-β1诱导的NRK-49F细胞活化

Figure 3 Over-expression of FGF1 reduces TGF-β1-induced NRK-49F cell activation

将NRK-49F细胞过表达FGF1, 然后用TGF-β1处理, (A)免疫荧光染色的代表性显微照片示: FGF1过表达可以抑制NRK-49F细胞中TGF-β1诱导的FN和α-SMA表达; (B)蛋白质印迹分析揭示FGF1过表达可以下调TGF-β1诱导的FN和α-SMA表达; (C) FN蛋白表达的定量分析; (D)α-SMA蛋白表达的定量分析。与对照组相比, ^{##} $P < 0.01$; 与单纯TGF-β1刺激相比, ^{*} $P < 0.05$ 。

NRK-49F cells were overexpressed with FGF1 and then treated with TGF-β1: (A) Representative micrographs of immunofluorescence staining showed that FGF1 overexpression inhibited TGF-β1-induced FN and α-SMA expression in NRK-49F cells; (B) Western blot analysis revealed that FGF1 overexpression can down-regulate TGF-β1-induced FN and α-SMA expression; (C) Quantitative analysis of FN protein expression; (D) Quantitative analysis of α-SMA protein expression. Compared with the control group, ^{##} $P < 0.01$; compared with TGF-β1 alone group, ^{*} $P < 0.05$.

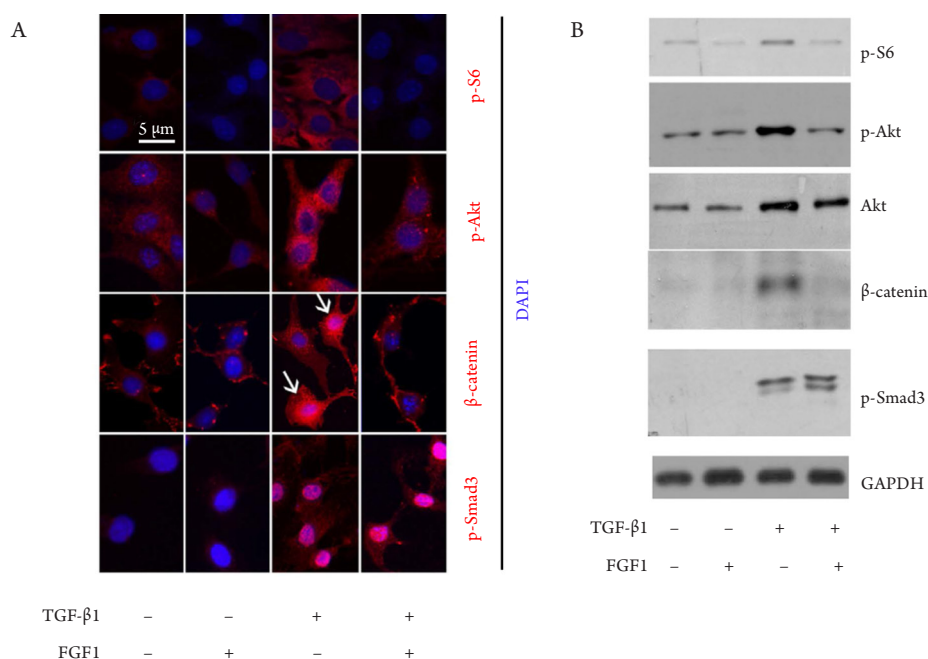


图4 在TGF-β1刺激的NRK-49F细胞中, FGF1过表达抑制p-S6, p-Akt, β-catenin表达, 但不抑制p-Smad3信号转导

Figure 4 Over-expression of FGF1 in NRK-49F cells inhibits the expressions of p-S6, p-Akt and β-catenin, but does not inhibit p-Smad3 stimulated by TGF-β1

(A) p-S6, p-Akt(Ser473), β-catenin和p-Smad3(Ser423/425)的免疫荧光染色的代表性显微图片。白色箭头表示具有β-catenin核转位的细胞; (B)蛋白质印迹分析证明FGF1过表达可以减少p-S6, p-Akt(Ser473)和β-catenin的丰度, 而非p-Smad3(Ser423/425)。

(A) Representative immunofluorescence staining micrographs of p-S6, p-Akt (Ser473), β-catenin and p-Smad3 (Ser423/425). White arrows indicate cells with β-catenin nuclear translocation; (B) Western blot analysis demonstrated that FGF1 overexpression reduced the abundance of p-Akt (Ser473) and β-catenin, but not p-Smad3 (Ser423/425).

3 讨论

PRD病因众多, 包括肥胖、高血压、糖尿病或罕见基因突变等, 其机制尚未确定^[10-12], 然而通常有同样的结局, 即肾纤维化加重, 负责过滤血液的细胞最终被破坏^[13]。肾病的治疗措施很少, 近40年来几乎没有新药研制的进展。接受移植的患者常经历并发症, 大部分透析患者最终死亡^[14]。因而, 以对抗持续的肾纤维化进程为目的的治疗显得尤为重要^[13,15-16]。

TGF-β1是一种有效的促纤维化因子, 对肾成纤维细胞的分化具有多重作用^[17-19]。众所周知, TGF-β1通过激活细胞内信号转导途径促进肾纤维化。其中, Smad信号转导是控制TGF-β1诱导的纤维化最重要的信号之一^[20]。然而, TGF-β1诱导的成纤维细胞活化和纤维化也需要TGF-β1刺激的其他几种信号通路, 如Akt和

β-catenin^[19,21]。本研究证明: 外源性TGF-β1促进肾成纤维细胞体外增殖, 而过表达FGF1可以降低TGF-β1诱导的肾成纤维细胞增殖, FGF1过表达可以减轻由TGF-β1处理刺激的肾成纤维细胞活化。在此基础上的免疫荧光和印迹实验则证明了TGF-β1诱导的肾成纤维细胞分化, 是在Akt/β-catenin依赖性途径中起调节作用。在TGF-β1处理后, p-Akt(Ser473), p-β-catenin(Ser675)丰度在很大程度上有所增加。这些结果共同表明, FGF1对TGF-β1诱导的人肾成纤维细胞活化纤维化有保护作用, 这一作用是经由Akt/β-catenin这一通路来实现的。

本研究表明FGF1过表达不仅能够预防肾纤维化, 还能够限制TGF-β1诱导的肾纤维化的进展。这为临床治疗PRD提供了新思路, 即刺激保护性FGF1信号转导可能是平衡抗纤维化疗法的有效策略。

参考文献

- Jacobson HR. Chronic renal failure: pathophysiology[J]. *Lancet*, 1991, 338(8764): 419-423.
- Bohle A, Kressel G, Müller CA, et al. The pathogenesis of chronic renal failure[J]. *Pathol Res Pract*, 1989, 185(4): 421-440.
- Bohle A, Strutz F, Müller GA. On the pathogenesis of chronic renal failure in primary glomerulopathies: a view from the interstitium[J]. *Exp Nephrol*, 1994, 2(4): 205-210.
- Bohle A, von Gise H, Mackensen-Haen S, et al. The obliteration of the postglomerular capillaries and its influence upon the function of both glomeruli and tubuli. Functional interpretation of morphologic findings[J]. *Klin Wochenschr*, 1981, 59(18): 1043-1051.
- Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics[J]. *Kidney Int*, 2006, 69(2): 213-217.
- Huguier V, Giot JP, Simonneau M, et al. Oncostatin M exerts a protective effect against excessive scarring by counteracting the inductive effect of TGF β 1 on fibrosis markers[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 2113.
- Itoh N, Ornitz DM. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease[J]. *J Biochem*, 2011, 149(2): 121-130.
- Gospodarowicz D, Moran JS. Stimulation of division of sparse and confluent 3T3 cell populations by a fibroblast growth factor, dexamethasone, and insulin[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, 71(11): 4584-4588.
- Abdian N, Ghasemi-Dehkordi P, Hashemzadeh-Chaleshtori M, et al. Comparison of human dermal fibroblasts (HDFs) growth rate in culture media supplemented with or without basic fibroblast growth factor (bFGF)[J]. *Cell Tissue Bank*, 2015, 16(4): 487-495.
- Baluarte JH. Neurological complications of renal disease[J]. *Semin Pediatr Neurol*, 2017, 24(1): 25-32.
- Krolewski AS, Skupien J, Rossing P, et al. Fast renal decline to end-stage renal disease: an unrecognized feature of nephropathy in diabetes[J]. *Kidney Int*, 2017, 91(6): 1300-1311.
- Krolewski AS. Progressive renal decline: the new paradigm of diabetic nephropathy in type 1 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2015, 38(6): 954-962.
- Piyaphanee N, Ananboontarick C, Supavekin S, et al. Renal outcome and risk factors for end-stage renal disease in pediatric rapidly progressive glomerulonephritis[J]. *Pediatr Int*, 2017, 59(3): 334-341.
- Textor SC. Renal Arterial disease and hypertension[J]. *Med Clin North Am*, 2017, 101(1): 65-79.
- Kawamoto S, Koda R, Yoshino A, et al. Rapidly progressive renal dysfunction in two elderly patients with renal enlargement and medullary cystic kidney disease-like acute tubulointerstitial injury[J]. *Intern Med*, 2016, 55(20): 3001-3007.
- Brenner BM, Meyer TW, Hostetter TH. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease[J]. *N Engl J Med*, 1982, 307(11): 652-659.
- Li H, Cai H, Deng J, et al. TGF- β -mediated upregulation of Sox9 in fibroblast promotes renal fibrosis[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(2): 520-532.
- Romi MM, Arfian N, Tranggono U, et al. Uric acid causes kidney injury through inducing fibroblast expansion, endothelin-1 expression, and inflammation[J]. *BMC Nephrol*, 2017, 18(1): 326.
- Li J, Ren J, Liu X, et al. Rictor/mTORC2 signaling mediates TGF β 1-induced fibroblast activation and kidney fibrosis[J]. *Kidney Int*, 2015, 88(3): 515-527.
- Li J, Qu X, Yao J, et al. Blockade of endothelial-mesenchymal transition by a Smad3 inhibitor delays the early development of streptozotocin-induced diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*, 2010, 59(10): 2612-2624.
- Tan J, Tong BD, Wu YJ, et al. MicroRNA-29 mediates TGF β 1-induced extracellular matrix synthesis by targeting wnt/ β -catenin pathway in human orbital fibroblasts[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(11): 7571-7577.

本文引用: 王玉路, 薛现军, 刘敏洁, 苗月亭. 纤维细胞生长因子1对转化生长因子 β 1诱导的人肾成纤维细胞活化纤维化的保护作用[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(12): 2646-2652. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.12.002

Cite this article as: WANG Yulu, XUE Xianjun, LIU Minjie, MIAO Yueting. Protective effect of fibroblast growth factor 1 on transforming growth factor β 1 induced activation of human renal fibroblasts[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(12): 2646-2652. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.12.002