文章编号:1000-5404(2012)19-1921-04

论著

GSK3β促进TGF-β1诱导的肾小管上皮HK-2细胞纤维化

赵 凯[1,2],陈 姗[1],龚如军[3],黎 松[4],何凤田[1] (400038 重庆,第三军医大学基础医学部:生物化学与分子生物学教研室[1],病原生物学教研室[2];Division of Kidney Disease and Hypertension, Brown University School of Medicine, Providence, Rhode Island 02903, USA[3];School of Pharmacy, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA15261, USA[4])

[摘要] **目的** 阐明GSK3β对于肾脏小管间质纤维化的作用。**方法** 以TGF-β1诱导的体外肾小管间质纤维化模型为研究对象,以GSK3β特异抑制剂LiCl处理细胞和不同GSK3β表达质粒(野生型GSK3β表达质粒GSK3β-WT;第9位点上丝氨酸突变为丙氨酸,由此不能再被磷酸化失活而具有固有活性的GSK3β突变质粒GSK3β-S9A;第85、86位点上赖氨酸突变为丙氨酸、失去激酶活性的GSK3β突变质粒GSK3β-KD)转染细胞,观察肾脏纤维化的标志性分子纤维连接素蛋白(fibronectin,FN)表达水平的改变,以及对TGF-β/Smad信号通路的作用。**结果** LiCl增加HK-2细胞GSK3β的磷酸化,抑制GSK3β的活性,同时降低了细胞基础水平和TGF-β1诱导的FN表达。过表达的GSK3β-WT增强TGF-β1诱导的FN表达,而这种效应在GSK3β-S9A转染细胞更为显著。过表达GSK3β-KD抑制TGF-β1诱导的FN表达。分析对TGF-β/Smad信号通路的作用,LiCl可以抑制TGF-β1诱导的Smad3磷酸化,而对Smad2磷酸化水平无影响。同时,LiCl也不改变Smad3的总蛋白表达。**结论** GSK3β通过TGF-β1/Smad3信号通路促HK-2细胞纤维化,抑制GSK3β可以抗纤维化。

[关键词] 肾脏纤维化;糖原合成酶激酶3;转化生长因子β1;Smad3蛋白质
[中图法分类号] R322.61; R329.26; R394.3 [文献标志码] A

GSK3β plays pro-fibrogenic activity through TGF-beta/Smad signaling pathway in renal tubular epithelial cells

Zhao Kai[1,2], Chen Shan[1], Gong Rujun[3], Li Song[4], He Fengtian[1] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, [2]Department of Pathogenic Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China;[3] Division of Kidney Disease and Hypertension, Brown University School of Medicine, Providence, Rhode Island 02903, USA; [4]School of Pharmacy, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA15261, USA)

[**Abstract**] **Objective** To address whether glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3β) plays direct roles in renal fibrosis based on our previous study that expression of GSK3β is substantially increased in transplanted human kidney with chronic allograft nephropathy and valproate markedly ameliorates renal fibrosis in rats with unilateral urethral obstruction. **Methods** A standard *in vitro* model of interstitial fibrosis, cultured human tubular epithelial (HK-2) cells treated with TGF-β1, was examined in our experiments. A selective GSK3β inhibitor, LiCl was used to suppress the activity of GSK3β. The eukaryotic expression vectors encoding HA-tagged wild type (WT-GSK3β-HA/pcDNA3.1), uninhibitable mutant GSK3β (S9A-GSK3β-HA/pcDNA3.1) and kinase dead mutant GSK3β (K85,86A-GSK3β-HA/pcDNA3.1) were transfected in HK-2 cells respectively. **Results** LiCl increased the phosphorylation of GSK3β, and suppressed both the basal and TGF-β1 induced fibronectin (FN) expression in HK-2 cells. When transfected with expression vector encoding wild type GSK3β or an mutant GSK3β S9A, HK-2 cells displayed increased FN expression; whereas decreased FN expression was observed when transfected vector encoding GSK3β K85A, K86A. To further analyze the possible pathway that GSK3β regulated fibrosis, it was found that in LiCl treated HK-2 cells, phosphorylation of Smad3 was suppressed. While there was no change observed for the phosphorylation level of Smad2. **Conclusion** In summary, our results suggest that TGF-β/Smad3 pathway can be regulated by GSK3β, and therefore GSK3β plays pro-fibrogenic activity in renal tubular epithelial cells.

[**Key words**] renal fibrosis; glycogen synthase kinase-3 beta; transforming growth factor beta1; Smad3 protein

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30900766, 81228005) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011BB5025). Corresponding author: Chen Shan, E-mail: cs723cn@yahoo.com.cn; He Fengtian, E-mail: hefengtian66@yahoo.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(30900766, 81228005);重庆市自然科学基金(CSTC2011BB5025)
[通信作者] 陈 姗,E-mail: cs723cn@yahoo.com.cn
何凤田,E-mail: hefengtian66@yahoo.com.cn

肾脏纤维化是绝大多数慢性肾脏疾病的终末期共同通路(common pathway)。肾脏纤维化包括肾小球的硬化、小管间质的纤维化以及肾脏小血管的透明变性和硬化。其中,肾脏小管间质纤维化是其中的主要病变,也是许多肾脏疾病进展和判断肾功能及预后的主要标志。研究肾脏小管间质纤维化的机制和选择防治靶点具有重要的临床意义[1-3]。

糖原合成酶激酶3β(glycogen synthase kinase 3 beta,GSK3β)是一种广泛存在于各种细胞中的丝/苏氨酸蛋白激酶,最初因为在糖代谢中被发现能够调节糖原合成酶活性而得名。但后来的研究表明,由于它能够识别的靶蛋白包括酶、信号分子、核转录因子等,并通过磷酸化影响蛋白的活性、稳定性、细胞内分布,因此在包括细胞增殖、细胞周期调控、细胞凋亡、细胞黏附等多种细胞应答中发挥调节作用,并作为信号分子参与多条信号通路调节[4-5]。我们在前期研究中发现,在以肾脏纤维化为主要病理特征的慢性移植物肾病中,GSK3β在受损的肾小管细胞中显著高表达。而给予单侧输尿管梗阻模型(unilateral urethral obstruction,UUO)大鼠GSK3β抑制剂2-丙戊酸钠(Valproate,VPA),肾脏组织切片中胶原组织的表达较非处理组明显下调,纤维化程度减轻[6]。为阐明GSK3β是否直接促进肾脏纤维化,本研究以TGF-β1诱导的体外肾小管间质纤维化模型为研究对象,通过GSK3β特异抑制剂氯化锂(lithium chloride,LiCl)处理细胞和不同GSK3β表达质粒转染细胞,初步探讨GSK3β对肾小管间质纤维化的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人近端肾小管上皮细胞系HK-2细胞为本室冻存细胞。

1.1.2 载体 质粒GSK3β-WT-HA:野生型(wild type)GSK3β构建于pcDNA3.1表达载体,HA为表达标签。质粒GSK3β-S9A:在GSK3β-WT的基础上将GSK3β蛋白第9位点上丝氨酸突变为丙氨酸,因此GSK3β抑制物不能再通过磷酸化GSK3β使其失活。质粒GSK3β-KD:突变GSK3β-WT蛋白第85、86位点上赖氨酸突变为丙氨酸,使GSK3β失去磷酸化底物的能力,即失去激酶活性(kinase dead)。以上质粒均由美国Brown大学龚如军博士惠赠。以空载体pcDNA3.1为转染对照。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HK-2细胞用含5% 胎牛血清的DMEM/F12(1∶1)培养基在37 ℃、5% CO_2的条件下传代培养。取对数生长期细胞,传代于35 mm培养板中,继续培养至50% ~60%融合后,换无血清培养基同步化24 h后,以TGF-β1(5 ng/ml)和LiCl(20 mmol/L)分别和联合处理细胞24 h后收集细胞。TGF-β1组以无刺激为正常对照。LiCl刺激组以加入同浓度的NaCl为对照。

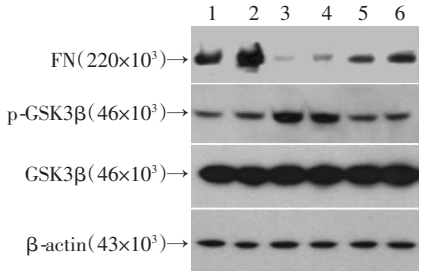
1.2.2 脂质体转染细胞表达质粒 按Invitrogen Lipofectamine™2000标准方法操作。转染前1 d,以合适的细胞密度[(3 ~4)×10^5/ml]接种到35 mm培养板上,继续培养至细胞达到90% ~95%的融合。溶液1:240 μl无血清培养基+10 μl Lipofectamine™2000,温育5 min。溶液2:246 μl无血清培养基+4 μg质粒(1 μg/μl)。将溶液1与溶液2混合,室温下置20 min。与此同时,将培养板中的细胞用无血清培养基冲洗细胞2遍后,加入2 ml无血清培养基。将溶液1与溶液2的混合液逐滴加入孔中,摇动培养板轻轻混匀。在37 ℃、5% CO_2中培养6 h后,更换含有血清的全培养基继续培养,于24 h检测转染水平。实验中先按质粒:Lipofectamine™2000不同比例梯度转染细胞,确定最佳转染条件,然后按实验分组进行转染。

1.2.3 Western blot 用预冷PBS洗涤细胞2次后收集各组细胞,加入含蛋白酶抑制剂的细胞蛋白裂解液RIPA(Invitrogen公司)冰浴裂解30 min,4 ℃下12 000 r/min离心30 min,收集上清液。Bradford法测定蛋白含量。各样本取相同蛋白量以上样缓冲液调节至同样体积,进行SDS-PAGE电泳。PVDF膜转印,湿转法,300 mA,2 h。5%脱脂奶粉室温封闭30 min。然后按照实验设计加入一抗(抗目的蛋白的抗体,1∶1 000),4 ℃孵育过夜;洗膜,加入HRP标记的二抗(1∶1 000),室温孵育1 h,洗膜。ECL试剂与膜孵育,压片,洗片。

2 结果

2.1 GSK3β特异抑制剂LiCl抑制TGF-β1诱导的FN表达

TGF-β1诱导了人近端肾小管上皮细胞HK-2中细胞纤维连接素(fibronectin,FN)的蛋白表达,成功建立体外肾小管间质纤维化模型。GSK3β特异抑制剂LiCl通过增强GSK3β的磷酸化水平而抑制其活性(以同样高浓度的NaCl为对照),同时可以降低HK-2细胞基础水平和TGF-β1诱导的FN表达,见图1。



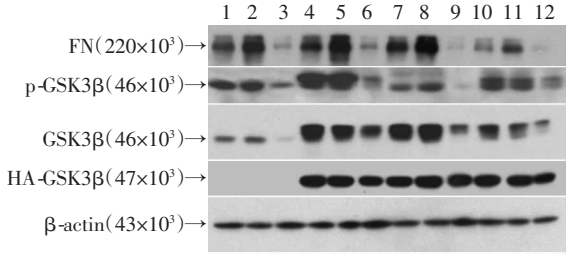
1:正常对照;2:5 ng/ml TGF-β1;3:20 mmol/L LiCl;4:5 ng/ml TGF-β1+20 mmol/L LiCl;5:20 mmol/L NaCl;6:5 ng/ml TGF-β1+20 mmol/L NaCl

图1 Western blot检测TGF-β1和LiCl作用HK-2细胞24 h后FN的蛋白表达

2.2 过表达GSK3β增强TGF-β1诱导的FN表达,失活GSK3β的过表达抑制FN表达

HK-2细胞转染GSK3β质粒,以空质粒pcDNA3.1为对照。过表达野生型GSK3β-WT增强TGF-β1诱导的FN表达,这种

效应在不能被磷酸化失活而具有固有活性的突变体 GSK3β-S9A 中更加显著。突变失去 GSK3β 激酶活性的 GSK3β-KD 的过表达则抑制 FN 表达。见图 2。

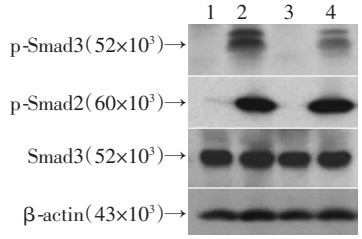


1:转染 pcDNA3.1; 2:转染 pcDNA3.1 + 5 ng/ml TGF-β1; 3:转染 pcDNA3.1 + 5 ng/ml TGF-β1 + 20 mmol/L LiCl; 4:转染 GSK3β-WT;5:转染 GSK3β-WT + 5 ng/ml TGF-β1;6:转染 GSK3β-WT + 5 ng/ml TGF-β1 + 20 mmol/L LiCl;7:转染 GSK3β-S9A;8:转染 GSK3β-S9A + 5 ng/ml TGF-β1;9:转染 GSK3β-S9A + 5 ng/ml TGF-β1 + 20 mmol/L LiCl;10:转染 GSK3β-KD;11:转染 GSK3β-KD + 5 ng/ml TGF-β1;12:转染 GSK3β-KD + 5 ng/ml TGF-β1 + 20 mmol/L LiCl

图 2 Western blot 分析不同 GSK3β 质粒转染 HK-2 细胞 24 h 后 FN 表达水平

2.3 LiCl 抑制 TGF-β1 诱导的 Smad3 磷酸化

TGF-β1 诱导 HK-2 细胞中 Smad2 和 Smad3 的磷酸化。LiCl 抑制 TGF-β1 诱导的 Smad3 磷酸化,但对 Smad2 磷酸化水平无影响。LiCl 不改变 Smad3 的总蛋白合成水平。见图 3。



1:正常对照;2:5 ng/ml TGF-β1;3:20 mmol/L LiCl;4:5 ng/ml TGF-β1 + 20 mmol/L LiCl

图 3 Western blot 分析 TGF-β1 和 LiCl 作用于 HK-2 细胞 24 h 后 Smad3、p-Smad3 的蛋白表达水平

3 讨论

肾纤维化是指在各种致病因子如炎症、损伤、药物等的作用下,间质细胞及细胞间质增多,尤其是基质蛋白合成增加、基质降解受抑制造成细胞外基质(extracellular matrix,ECM)的大量堆积导致的肾小球硬化和小管间质纤维化。肾脏纤维化是慢性肾脏疾病进展至终末期肾衰竭的最终共同通路,其发生及进展,尤其是肾小管间质纤维化程度是反映肾功能下降严重程度和判断预后最重要的指标。肾脏纤维化可以在多种肾脏损伤因素如高血压、炎症、高糖高脂、药物损害后发生,但是研究发现,即使有效控制住这些原发病因,包括有效控制血压、血糖、去除致损药物等,肾脏纤维化的进程有时仍难以遏止[1-3],因此,解析纤维化发生、发展的分子机制、寻找直接抑制纤维化的治疗靶点成为近年来研究的重要方向。

人 GSK3β 的基因位于染色体 3ql3.3 ~ q21,由 433 个氨基酸残基组成,相对分子质量为 46×10^3。GSK3β 基因有高度保守性,从果蝇到人 GSK3β 结构域序列上有 90% 以上同源性。GSK3β 的基本功能是识别并磷酸化特定序列:丝氨酸/苏氨酸-X-X-X-磷酸化丝氨酸/苏氨酸。GSK3β 与体内的许多激酶不同的是,其在细胞中具有基础活性,维持对靶蛋白的磷酸化状态。当 GSK3β 自身第 9 位点上丝氨酸被其他信号分子磷酸化,GSK3β 失去激酶活性。GSK3β 广泛参与多种信号传导通路调节[4-5]。近年来 GSK3β 在肾脏疾病中的作用开始受到人们关注。Lin 等[7]观察到受高糖刺激的肾脏系膜细胞激活 GSK3β 和细胞凋亡;以 LiCl 处理细胞,可以降低高糖引起的 Caspase-3 激活和细胞凋亡,由此认为 GSK3β 参与高糖刺激的肾脏系膜细胞凋亡。GSK3β 还参与高血糖引起的血管内皮损伤。Zhang 等[8]研究认为 GSK3β 参与肾脏细胞凋亡和细胞极性反应。研究还发现 GSK3β 抑制剂 thiadiazolidinones(TDZD)可以削弱内毒素引起的组织损伤,并认为这是干预炎症反应所致。在我们以前的研究中也证实,在人近端肾小管上皮细胞(human kidney proximal tubular epithelial cell line,HKC)中,GSK3β 可以识别 NF-κB p65 并磷酸化其 S468 位点,介导了肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor,HGF)的抑制细胞炎症作用[9]。虽然高糖、凋亡、内皮损伤、炎症均参与纤维化进程,但目前尚不清楚 GSK3β 是否能直接调控小管间质纤维化这一决定肾脏功能和转归的最终共同通路。

已有研究提示 GSK3β 介导肾脏小管间质的纤维化。一些临床和实验研究发现在纤维化的肾脏 GSK3β 表达或活性增高;以药物干预,常可以同时观察到纤维化被抑制和 GSK3β 的表达下调或者活性被抑制。Hirotani 等[10]转染在小鼠心脏特异表达的 GSK3β 活性区域突变体 Tg-GSK3β-DN,该突变体表达失去激酶活性的 GSK3β,从而显著下调心肌细胞的 GSK3β 活性,结果发现转基因鼠较非转基因小鼠在心脏过负荷时,心脏纤维化程度显著降低。反之,在心脏过表达具有正常激酶活性的野生型 GSK3β 质粒,心肌细胞纤维化加重,诱导心脏功能衰竭。Zhai 等[11]的研究也有类似结果。Mariappan 等[12]研究认为 GSK3β 调节肾小管上皮细胞高糖和高胰岛素诱导的细胞外蛋白合成。Kapoor 等[13]通过对条件性 GSK3β 敲除小鼠的研究认为 GSK3β 调控皮肤伤痕的愈合和纤维化。我们在前期研究中也同样发现了 GSK3β 在纤维化小管细胞高表达,GSK3β 抑制剂可以抑制 UUO 模型的

大鼠肾脏纤维化程度。上述研究强有力地提示GSK3β促纤维化,但是由于体内研究的复杂性,尚不足以阐明GSK3β可以直接促进肾脏纤维化以及其中的机制。因此,本研究以TGF-β1诱导的体外肾小管间质纤维化模型为研究对象,首先以GSK3β特异抑制剂处理细胞人近端小管上皮细胞HK-2,结果发现,LiCl增加HK-2细胞GSK3β的磷酸化,抑制GSK3β的活性,同时降低了细胞基础水平和TGF-β1诱导的肾脏纤维化的标志性分子FN的蛋白表达。

为了进一步证明GSK3β在其中的作用,我们转染了HK-2细胞3种GSK3β表达质粒:GSK3β-WT-HA,GSK3β-S9A和GSK3β-KD,以空载体pcDNA3.1为对照。GSK3β-WT-HA是野生型GSK3β表达质粒,GSK3β-WT转染细胞,正常功能的GSK3β蛋白过表达。但是由于GSK3β活性同时受到细胞自身多种因素的调控,高蛋白表达水平的GSK3β不一定具有相应高的GSK3β激酶活性。GSK3β-S9A由于第9位点上丝氨酸突变为丙氨酸,不再受到GSK3β抑制物磷酸化第9位点上丝氨酸而造成失活,由此转染GSK3β-S9A的细胞高表达具有组成性活性(constitutively active)的GSK3β。GSK3β-KD同样是在GSK3β-WT的基础上将GSK3β基因突变而获得,所不同的是突变使GSK3β蛋白第85、86位点上赖氨酸突变为丙氨酸。GSK3β的第85、86位点是其发挥激酶活性的功能区,突变使GSK3β失去磷酸化底物的能力。GSK3β-KD转染细胞后虽然仍然有高表达的GSK3β蛋白,但是不能磷酸化底物启动下游反应。同时GSK3β-KD过表达竞争性抑制了细胞固有GSK3β的表达,因此细胞的GSK3β被knock down。转染细胞24 h后我们观察到,过表达的GSK3β-WT增强TGF-β1诱导的FN表达。而这种效应在GSK3β-S9A转染细胞更为显著。与此相反,过表达GSK3β-KD的细胞TGF-β1诱导的FN表达则受到明显抑制。上述实验结果表明,在HK-2细胞中,GSK3β活性是TGF-β1介导的促细胞纤维化(profibrotic)作用的必要因素,抑制GSK3β可以抗肾小管间质纤维化。

已有大量研究证实,TGF-β1是促肾脏纤维化的关键因素[14-15]。TGF-β1激活TGF-β受体后,磷酸化下游的R-Smads(receptor-regulated Smads)分子,主要包括Smad2和Smad3,使其活化并与Co-Smad(common-mediator Smad)分子Smad4结合后,进入细胞核调节基因转录[16]。本研究发现LiCl可以抑制TGF-β1诱导的Smad3磷酸化,而对Smad2磷酸化水平无影响。同时,LiCl也不改变Smad3的总蛋白表达。因此,GSK3β很可能是通过TGF-β1/Smad3信号通路发挥促纤维化作用,其具体的机制还有待进一步研究发现。

本研究初步阐明了在HK-2细胞GSK3β通过TGF-β1/Smad3信号通路促纤维化,抑制GSK3β可以抗纤维化,为防治肾脏小管间质纤维化新靶点的筛选及GSK3β信号通路与TGF-β1/Smad3信号通路cross-talk的分析提供了新的依据。

参考文献:

[1] Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis [J]. Nat Rev Nephrol, 2011, 7(12): 684-696.

[2] Zeisberg M, Neilson E G. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis [J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(11): 1819-1834.

[3] Farris A B, Colvin R B. Renal interstitial fibrosis: mechanisms and evaluation[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2012, 21(3): 289-300.

[4] Hur E M, Zhou F Q. GSK3 signalling in neural development [J]. Nat Rev Neurosci, 2010, 11(8): 539-551.

[5] Trepiccione F, Christensen B M. Lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus: new clinical and experimental findings [J]. J Nephrol, 2010, 23(Suppl 16): S43-S48.

[6] Gong R, Ge Y, Chen S, *et al*. Glycogen synthase kinase 3beta: a novel marker and modulator of inflammatory injury in chronic renal allograft disease[J]. Am J Transplant, 2008, 8(9): 1852-1863.

[7] Lin C L, Wang J Y, Huang Y T, *et al*. Wnt/beta-catenin signaling modulates survival of high glucose-stressed mesangial cells [J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(10): 2812-2820.

[8] Zhang M, Lee C H, Luo D D, *et al*. Polarity of response to transforming growth factor-beta1 in proximal tubular epithelial cells is regulated by beta-catenin [J]. J Biol Chem, 2007, 282(39): 28639-28647.

[9] Gong R, Rifai A, Ge Y, *et al*. Hepatocyte growth factor suppresses proinflammatory NFkappaB activation through GSK3beta inactivation in renal tubular epithelial cells [J]. J Biol Chem, 2008, 283(12): 7401-7410.

[10] Hirotani S, Zhai P, Tomita H, *et al*. Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta during heart failure is protective [J]. Circ Res, 2007, 101(11): 1164-1174.

[11] Zhai P, Gao S, Holle E, *et al*. Glycogen synthase kinase-3alpha reduces cardiac growth and pressure overload-induced cardiac hypertrophy by inhibition of extracellular signal-regulated kinases [J]. J Biol Chem, 2007, 282(45): 33181-33191.

[12] Mariappan M M, Shetty M, Sataranatarajan K, *et al*. Glycogen synthase kinase 3beta is a novel regulator of high glucose- and high insulin-induced extracellular matrix protein synthesis in renal proximal tubular epithelial cells [J]. J Biol Chem, 2008, 283(45): 30566-30575.

[13] Kapoor M, Liu S, Shi-wen X, *et al*. GSK-3beta in mouse fibroblasts controls wound healing and fibrosis through an endothelin-1-dependent mechanism [J]. J Clin Invest, 2008, 118(10): 3279-3290.

[14] Lan H Y, Chung A C. TGF-β/Smad Signaling in Kidney Disease [J]. Semin Nephrol, 2012, 32(3): 236-243.

[15] Piera-Velazquez S, Li Z, Jimenez S A. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders [J]. Am J Pathol, 2011, 179(3): 1074-1080.

[16] Massague J. How cells read TGF-beta signals [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000, 1(3): 169-178.

(**收稿**:2012-08-18;**修回**:2012-08-27)

(编辑 栾 嘉)