DOI:10.16016/j.2097-0927.202107152

TSSC3 通过调控 PI3K/Akt-细胞失巢凋亡途径抑制肾小管上皮的纤维化表型

刘兴红,陈 雁,肖 菲,戴欢子 400042 重庆,陆军特色医学中心肾脏内科

[摘要] **目的** 研究印记基因 STF cDNA 3(TSSC3)对肾脏来源的肌成纤维细胞(myofibroblast,MyoFb)抗失巢凋亡和促纤维化能力的影响及其相关机制。**方法** 使用 TGF-β1 处理人肾近曲小管上皮细胞系 HK-2 诱导其成为 MyoFb,并采用超低粘附板悬浮培养法以及外源性 RGD 多肽培养法建立失巢凋亡模型;使用含或不含 TGF-β1 的细胞培养基处理稳定转染过表达 TSSC3 慢病毒的 HK-2 细胞,采用流式细胞术及 CCK-8 检测 TSSC3 对 MyoFb 及 HK-2 细胞失巢凋亡、增殖的影响;qRT-PCR 及 Western blot 检测 PI3K/AKT 介导的凋亡途径以及纤维化相关分子 mRNA 及蛋白表达情况。**结果** TGF-β1 明显增加 HK-2 中 α-SMA 的表达、降低 Villin 的表达($P<0.05$),且具有时间依赖性,表明 TGF-β1 成功诱导 HK-2 细胞成为 MyoFb,且 MyoFb 的失巢凋亡率明显低于 HK-2 细胞($P<0.01$),表明 TGF-β1 诱导的 MyoFb 具有失巢凋亡抵抗的能力。相对于 HK-2 细胞,MyoFb 增殖率明显增加、失巢凋亡率明显降低($P<0.01$),PI3K/AKT 通路抑制剂 LY204002 则部分逆转了上述改变。过表达 TSSC3 明显抑制失巢凋亡模型中 MyoFb 中 p-PI3K、p-AKT 的表达,增加 cleaved-caspase 3 的表达。过表达 TSSC3 明显抑制 MyoFb 和 HK-2 细胞中Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、纤连蛋白、PAI-1、MMP-2、MMP-9 的 mRNA 及蛋白的表达。**结论** TSSC3 通过下调 PI3K/Akt 途径抑制肾脏来源 MyoFb 的失巢凋亡抵抗及促纤维化的能力。

[关键词] 肾纤维化;TSSC3;TGF-β1;HK-2 细胞;PI3K/Akt 信号通路
[中图法分类号] R163; R322.12; R329.25 [文献标志码] A

TSSC3 suppresses fibrosis of renal tubular epithelium by regulating PI3K/Akt signaling pathway and anoikis resistance in myofibroblasts

LIU Xinghong, CHEN Yan, XIAO Fei, DAI Huanzi Department of Nephrology, Army Medical Center of PLA, Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of tumor suppressing STF cDNA 3 (TSSC3) on the anoikis resistance and profibrogenic ability of renal myofibroblasts (MyoFb) and its related mechanisms. **Methods** Renal tubular epithelial HK-2 cells were stimulated with transforming growth factor beta 1 (TGF-β1) to induce the formation of MyoFb. The model of cell anoikis was established by culturing cells in ultra-low adhesion plate suspension or by exogenous RGD-containing peptides culture. In addition, HK-2 cells transfected with TSSC3-overexpressing lentiviral vector were treated with or without TGF-β1, and the effects of TSSC3 on the anoikis and proliferation of cells were observed using flow cytometry and cell counting kit-8 (CCK-8) assay. Finally, qRT-PCR and Western blotting were performed to detect the mRNA and protein expression of the PI3K/AKT pathway and fibrosis related molecules. **Results** The results demonstrated that α-SMA expression was significantly increased while that of Villin was decreased in HK-2 cells after stimulation of TGF-β1 in a time-dependent manner ($P<0.05$), indicating that HK-2 cells were successfully induced to MyoFb, which showed remarkably lower anoikis rate and higher proliferation than HK-2 cells ($P<0.01$), and had anoikis resistance. However, the above changes were partially reversed by PI3K/Akt pathway inhibitor LY294002. Further study suggested that overexpression of TSSC3 obviously inhibited the mRNA and protein expression of fibrosis related genes, such as type Ⅰ and type Ⅲ collagen, fibronectin, PAI-1, MMP-2 and MMP-9 in MyoFb and HK-2 cells. TSSC3 overexpression also up-regulated the level of cleaved-caspase 3 and

[基金项目] 重庆市自然科学基金面上项目(cstc2020jcyj-msxmX0013)
[通信作者] 戴欢子,E-mail:dhz084426@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

attenuated the expression of p-PI3K and p-Akt in MyoFb. **Conclusion** TSSC3 suppresses the anoikis resistance and profibrogenic ability of renal myofibroblasts by down-regulating the PI3K/Akt pathway.

[**Key words**] renal fibrosis; TSSC3; TGF-β1; HK-2 cells; PI3K/Akt signaling pathway

Supported by the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2020jcyj-msxmX0013). Corresponding author: DAI Huanzi, E-mail: dhz084426@163.com

肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis,RIF)是所有慢性肾病进展为终末期肾病的共同途径和主要病理基础,实质为细胞外基质(extracellular matrix,ECM)的过度沉积[1-2]。而肌成纤维细胞(myofibroblast,MyoFb)是ECM的主要生成细胞,为调控RIF发生、发展的中心环节[3-4]。肾间质纤维化的发生是一个动态和汇聚的过程,分为启动、激活、执行、演进四个阶段[5]。创伤、免疫反应、血流动力学改变、代谢紊乱、遗传性疾病等损伤因素作用下,在局部形成炎症微环境(启动),MyoFb活化(激活),产生大量ECM(执行),形成纤维化。早期为可逆性纤维化,在损伤因素持续存在的情况下,以上效应被逐步地放大,MyoFb大量积聚和ECM过度沉积取代肾实质细胞(演进),形成不可逆性肾间质纤维化;若损伤因素被及时清除,随着组织修复的完成,MyoFb通过凋亡而数目减少并最终消失或者是转化为静止的MyoFb,纤维化消退[6-7]。因此,MyoFb的持续活化是决定RIF不可逆性的关键。

目前针对阻断MyoFb激活的实验性治疗主要集中在抑制TGF-β,但参与RIF发生发展的细胞因子众多,针对单一因子的治疗有其局限性。近年来随着对MyoFb活化机制认识的不断深入,如何有效地特异性阻断MyoFb的持续激活成为抗纤维化治疗亟待解决的关键问题。研究表明MyoFb获得失巢凋亡抵抗能力是其活化的重要标志,FAK/Src-AKT的激活是MyoFb获得失巢凋亡抵抗特性继而活化的重要分子机制[8-10]。FAK/Src-AKT信号途径是多种致纤维化因素的共同作用通路,在各种致纤维化因素作用下产生的MyoFb,整合素相关蛋白复合物integrin-FAK/Src处于持续活化的状态,激活下游的PI3K/AKT信号途径,使MyoFb获得失巢凋亡抵抗特性继而活化,活化的MyoFb分泌TGF-β等细胞因子通过自分泌作用使FAK/Src-AKT信号途径得以持续的激活,造成MyoFb大量积聚和ECM过度沉积,最终形成不可逆性肾间质纤维化。因此,通过靶向抑制FAK/Src-AKT信号途径诱导MyoFb失巢凋亡有望成为治疗肾间质纤维化的有效手段。

印记基因TSSC3在胎肾表达,成年肾脏不表达,这种表达的时空特异性表明TSSC3在调控肾脏发育中具有重要作用;Wilms'肿瘤(肾母细胞瘤)类似于后肾原基,TSSC3在Wilms'肿瘤中表达缺失保证了WT细胞的持续生长[11],通过以上研究推测TSSC3在肾脏可能发挥生长抑制、凋亡诱导的作用。此外,课题组前期的研究证实,TSSC3抑制肿瘤细胞生长并通过线粒体途径诱导其凋亡,并且TSSC3能够通过与RanBP9相互作用抑制Src激酶的活化增加细胞失巢凋亡敏感性[12],说明TSSC3具有强大的诱导细胞失巢凋亡的能力。本研究旨在探讨TSSC3能否通过调控PI3K/Akt信号途径促进MyoFb失巢凋亡发挥抑制肾间质纤维化的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

永生化的人近端小管上皮细胞(HPTEC)HK-2系来自美国模式培养物集存库(ATCC,美国)。培养基为含10%优质胎牛血清(Gibco,美国)和1%青霉素-链霉素(碧云天,中国)双抗的低糖DMEM(Gibco,美国)和DMEM-F12培养基(Gibco,美国),DMEM-F12培养基与低糖DMEM以1∶1比例混合使用,在37 ℃、5% CO_2的孵箱中培养。2~3 d换液1次。分为对照组和TGF-β1处理组,处理组分别加入TGF-β1(50 ng/mL)处理24、48、72 h。

1.2 转染过表达TSSC3慢病毒

过表达TSSC3慢病毒购自Invabio(中国上海)。将HK-2细胞悬浮液(5×10^5/mL)接种到每孔100 μL培养基的24孔培养基中,细胞培养至细胞融合度达到70%,然后向每孔中加入过表达慢病毒(1×10^8uA/mL),在培养基中加用ploybrene(8 μg/mL)来提高病毒的感染效率,培养72 h。使用嘌呤霉素(100 ng/mL)筛选感染后的细胞,直至细胞未出现死亡,后用低浓度的嘌呤霉素维持培养。实验分组为:HK-2细胞组、空载病毒转染组、过表达TSSC3慢病毒转染组。

1.3 失巢凋亡模型

应用两种方法建立失巢凋亡模型[9,13]。①超低粘附板失巢凋亡模型建模,采用细胞传代的方法收集HK-2细胞,调整细胞数为10^6/mL,接种于超低粘附板(Coring,美国)中,于培养箱中培养,分别在0、12、24、48 h观察细胞形态并检测。②外源性RGD多肽失巢凋亡模型建模,采用细胞传代的方法收集HK-2细胞,调整细胞数为10^6/mL,接种于细胞培养板,待细胞完全贴壁后,分别加用不同浓度RGD多肽(Sigma,美国)作用于细胞。按照RGD浓度分为0、1、2、4 mg/mL组。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率

用6孔板培养HK-2细胞,待细胞生长达到60%~

70%,根据不同实验需求处理细胞继续培养,设计实验分组如下:HK-2 细胞组(对照);超低粘附板培养法+TGF-β1(50 ng/mL)处理组;RGD 培养法+TGF-β1(50 ng/mL)处理组,RGD 浓度分别为 0、1、2、4 mg/mL;RGD 4 mg/mL+50 ng/mL TGF-β1+LY204001 处理组;空载病毒转染(overCON)+4 mg/mL RGD 处理组;overCON+4 mg/mL RGD+50 ng/mL TGF-β1 处理组;过表达 TSSC3 慢病毒转染组(overTSSC3)+4 mg/mL RGD 处理组;overTSSC3+4 mg/mL RGD+50 ng/mL TGF-β1 处理组。将收集的细胞用不含 EDTA 胰酶消化细胞、离心,PBS 重悬细胞并计数。取 5×10^5 个重悬的细胞,加入 195 μL 异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC,BD,美国)结合液重悬细胞。然后加入 5 μL Annexin V-FITC(20 μg/mL)轻轻混匀。室温(20~25 ℃)避光孵育 10 min,分别加入 190 μL Annexin V-FITC 结合液和 10 μL 碘化丙啶(PI)染色液,混匀,冰浴避光放置。随即用流式细胞仪(BD,美国)检测。

1.5 Western blot 检测相关蛋白表达

BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天公司,全蛋白提取试剂盒及相关试剂购自北京索莱宝公司;PVDF 膜购自美国 Bio-Rad 公司;α-SMA 、Villin、磷酸化 PI3K(p-PI3K)、PI3K、磷酸化-AKT(p-AKT)、AKT、cleaved-caspase3、pro-caspase3、collagens type Ⅰ、collagens type Ⅲ、fibronectin、PAI-1、MMP-2,MMP-9、凋亡调节因子 Bcl-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、cleaved-caspase9、pro-caspase9、磷酸化 PI3K-P85(p-PI3K-P85)、PI3K-P85、磷酸化-Akt-ser473(p-Akt-ser473)、TSSC3、细胞色素 C(Cytc)、GAPDH 抗体均购自美国 Abcam 公司。设置实验分组如下:1 组为超低粘附板培养 24 h+空载病毒转染处理组;2 组为超低粘附板培养 24 h+空载病毒转染+50 ng/mL TGF-β1 处理组;3 组为超低粘附板培养 24 h+TSSC3 过表达慢病毒转染+50 ng/mL TGF-β1 处理组;4 组为超低粘附板培养 24 h+TSSC3 过表达慢病毒转染+50 ng/mL TGF-β1 处理+740-YP 处理组;5 组为空载病毒转染+ 4 mg/mL RGD 处理组;6 组为空载病毒转染+ 4 mg/mL RGD 处理+50 ng/mL TGF-β1 处理组; 7 组:TSSC3 过表达慢病毒转染+ 4 mg/mL RGD 处理+50 ng/mL TGF-β1 处理组;8 组为 TSSC3 过表达慢病毒转染+ 4 mg/mL RGD 处理+50 ng/mL TGF-β1 处理+740-YP 处理组。提取各组蛋白进行凝胶电泳,上样量为 20~30 μg;进行转膜、封闭,一抗孵育过夜;TBST 洗去一抗,二抗孵育 1.5 h,TBST 清洗 3 次;ECL 显色法显色,测定灰度值。

1.6 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 mRNA 相对表达量

使用 TRIzol 试剂(碧云天,中国)提取细胞总 RNA,按两步法将 RNA 反转录为 cDNA,参照 SYBR Green mastermix 试剂盒(Western Biotechnology,美国)说明书配置反应体系,反转录条件为设定为 25 ℃ 10 min、42 ℃ 50 min、85 ℃ 5 min;实时荧光定量 PCR 条件设定为 94 ℃ 4 min、94 ℃ 20 s、60 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s,共 35 个循环。绘制熔解曲线,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析 mRNA 相对表达量。GAPDH 作为内参。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5′→3′)	产物大小/bp
α-SMA	上游:TGTACCCTGGGATCGCTGAC 下游:CTCGTCGTACTCCTGCTTGG	179
Villin	上游:TGTCAAGGGCAAGAGGAACG 下游:CCCCTGAGTCTCTCCATACGG	147
TSSC3	上游:TCCAGCTATGGAAGAAGAAGC 下游:GTGGTGACGATGGTGAAGTACA	163
MMP-2	上游:TTTGACGGTAAGGACGGACTC 下游:TACTCCCCATCGGCGTTC	146
Ⅰ型胶原	上游:GTGCGATGACGTGATCTGTGA 下游:GTTTCTTGGTCGGTGGGTG	114
Ⅲ型胶原	上游:TGCTCGGGGTAATGACGG 下游:GCACCATTTGAACCAGGAGAC	138
纤连蛋白	上游:ACAGACCTATCCAAGCTCAAGTG 下游:AAATGTGAGATGGCTGTGGTG	110
PAI-1	上游:GAATGCCCTCTACTTCAACGG 下游:CAGTTCCAGGATGTCGTAGTAATG	181
MMP-9	上游:CGAACTTTGACAGCGACAAGA 下游:TCAGGGCGAGGACCATAGAG	214
GAPDH	上游:TGACGTGGACATCCGCAAAG 下游:CTGGAAGGTGGACAGCGAGG	205

1.7 细胞增殖率测定

将 HK-2 细胞悬浮液(1×10^5/mL)接种于 96 孔板中,每孔 100 μL,每组细胞设 3 个复孔,待细胞长到 80%~90%时,按实验分组处理细胞。实验分组为:HK-2 细胞组(对照)、RGD 4 mg/mL 处理组、RGD 4 mg/mL+50 ng/mL TGF-β1 处理组、RGD 4 mg/mL+50 ng/mL TGF-β1+LY204001 处理组、overCON+4 mg/mL RGD 处理组、overCON+4 mg/mL RGD+50 ng/mL TGF-β1 处理组、overTSSC3 + 4 mg/mL RGD 处理组、overTSSC3+4 mg/mL RGD +50 ng/mL TGF-β1 处理组。将 96 孔板移入培养箱中培养 24 h。每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,在培养箱内孵育 4 h。用酶标仪(ThermoFisher,美国)检测 450 nm 处各孔光密度值[$D(450)$],并计算细胞增殖率。

1.8 统计学分析

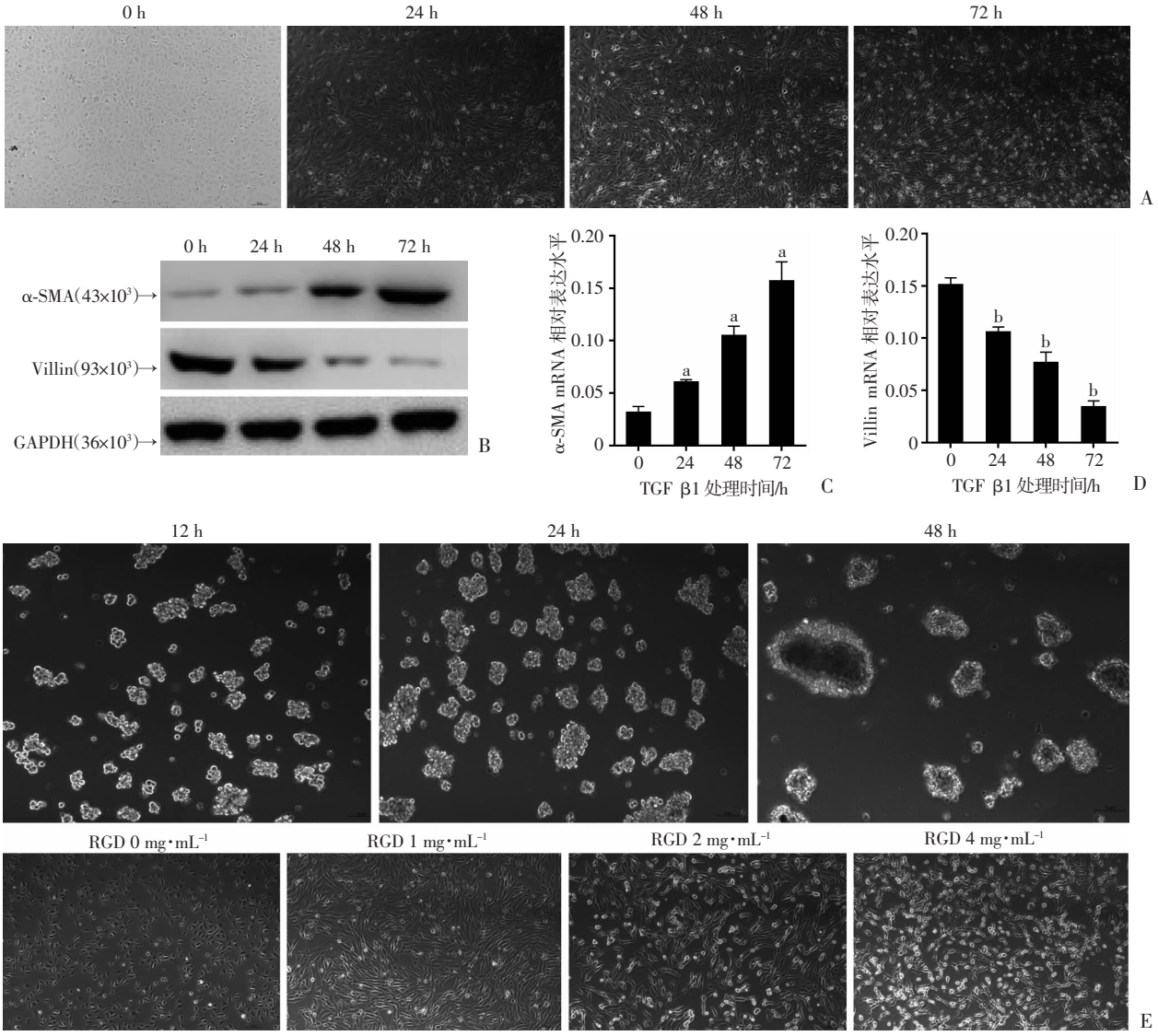
所有实验按 3 次独立实验进行,采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,使用双侧

student's *t* 检验(组间)或单因素方差分析(多组)确定组之间的差异性。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

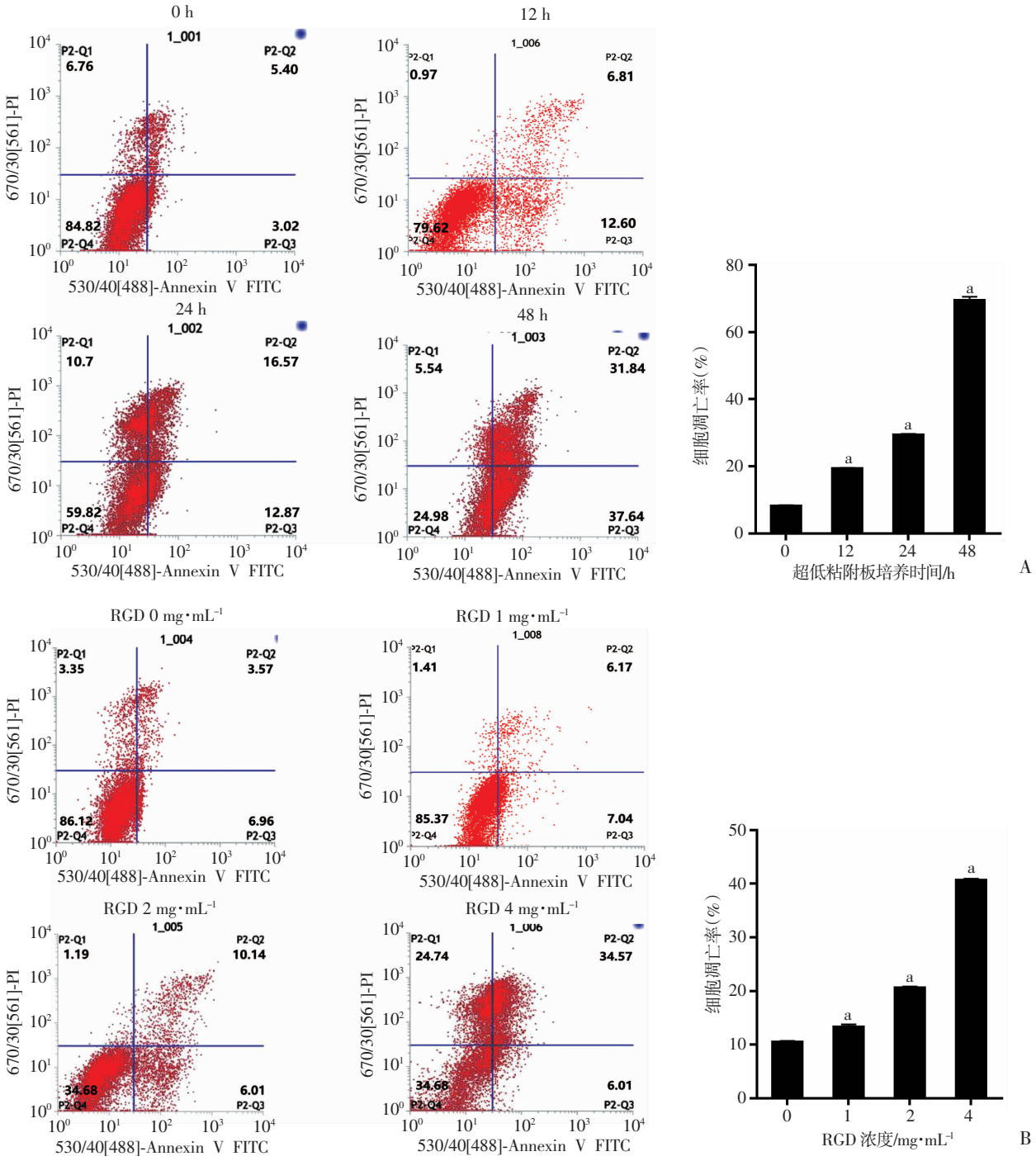
2.1 TGF-β1 诱导 MyoFb 失巢凋亡模型的建立

采用 50 ng/mL TGF-β1 处理人肾近曲小管上皮细胞 HK-2 后,可见 HK-2 细胞逐渐变长、肥大,提示其由上皮细胞形态逐渐向间质细胞形态转变(图 1)。α-SMA 是肌成纤维细胞的标志性蛋白,Villin 是 HK-2 细胞上皮标记的绒毛蛋白。使用 qRT-PCR 及 Western blot 检测各时间点 α-SMA 及 Villin 的 mRNA 及蛋白表达情况,发现 α-SMA 的表达呈时间依赖性地上升,而 Villin 的表达呈时间依赖性地下降(图 1),表明成功诱导 HK-2 细胞成为 MyoFb。选用 50 ng/mL TGF-β1 处理 HK-2 细胞 72 h 作为后续实验诱导 MyoFb 的条件。超低粘附板悬浮培养法以及外源性 RGD 多肽培养法(GRDS)建立失巢凋亡模型,如图 1 所示,细胞接种入培养板时,最初为单个分散细胞,呈单层生长,排列整齐,大小均一,随着时间推移,细胞逐渐聚集成簇,随后形成大而松散的珊瑚状细胞团。在超低粘附板悬浮培养模型中,随着悬浮时间的延长,HK-2 细胞的失巢凋亡率逐渐增加($P<0.01$,图 2A)。而在 RGD 多肽培养模型中,随着 RGD 浓度的增加,HK-2 细胞的失巢凋亡率亦逐渐增加($P<0.01$,图 2B)。



A:TGF-β1 处理 HK-2 细胞后其形态变化(×100);B:Western blot 检测经 50 ng/mL TGF-β1 处理的 HK-2 细胞在各个时间点 α-SMA 及 Villin 蛋白相对表达量;C、D:qRT-PCR 检测经 50 ng/mL TGF-β1 处理的 HK-2 细胞在各个时间点 α-SMA 及 Villin mRNA 表达　a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 0 h 组比较;E:超低粘附板悬浮培养法以及外源性 RGD 多肽培养法(GRDS)建立的失巢凋亡模型(×100)

图 1　TGF-β1 诱导 MyoFb 失巢凋亡模型的建立

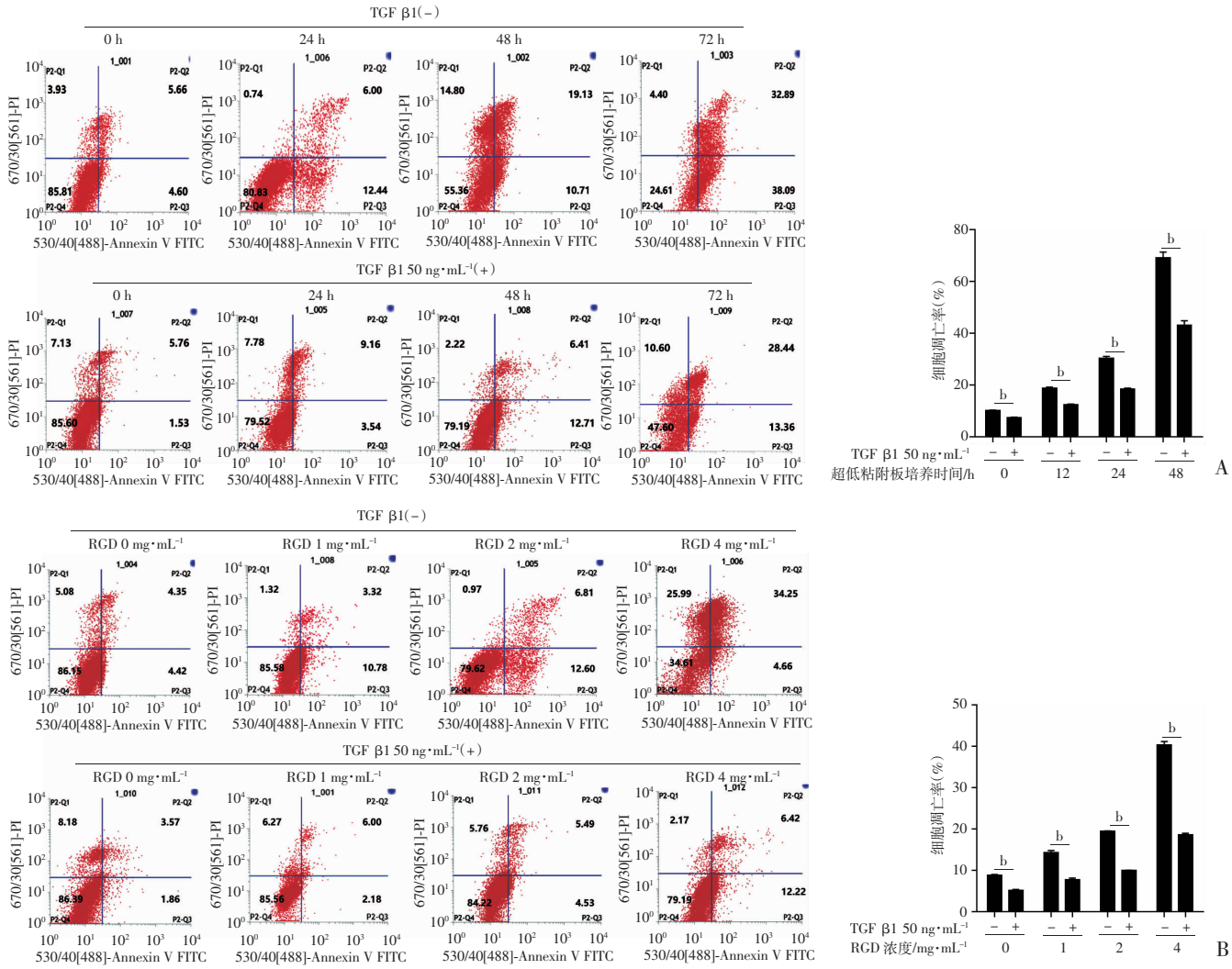


A:流式细胞仪在不同时间点检测超低粘附板悬浮培养法培养 HK-2 细胞凋亡率　a:$P<0.01$,与 0 h 组比较;B:流式细胞仪在不同 RGD 浓度检测 GRGDS 培养法培养 HK-2 细胞凋亡率　a:$P<0.01$,与 0 mg/mL 组比较

图 2　流式细胞仪检测不同时间及不同 RGD 浓度下 HK-2 细胞的凋亡率

2.2　TGF-β1 诱导的 MyoFb 具有失巢凋亡抵抗表型

在超低粘附板悬浮培养建立的失巢凋亡模型中,MyoFb 的失巢凋亡率明显低于 HK-2 细胞($P<0.01$,图 3A)。在 RGD 多肽培养法建立的失巢凋亡模型中,RGD 浓度为分别为 0、1、2、4 mg/mL 时,MyoFb 的凋亡率均显著低于 HK-2 细胞($P<0.01$,图 3B)。结果表明,MyoFb 具有失巢凋亡抵抗的表型。



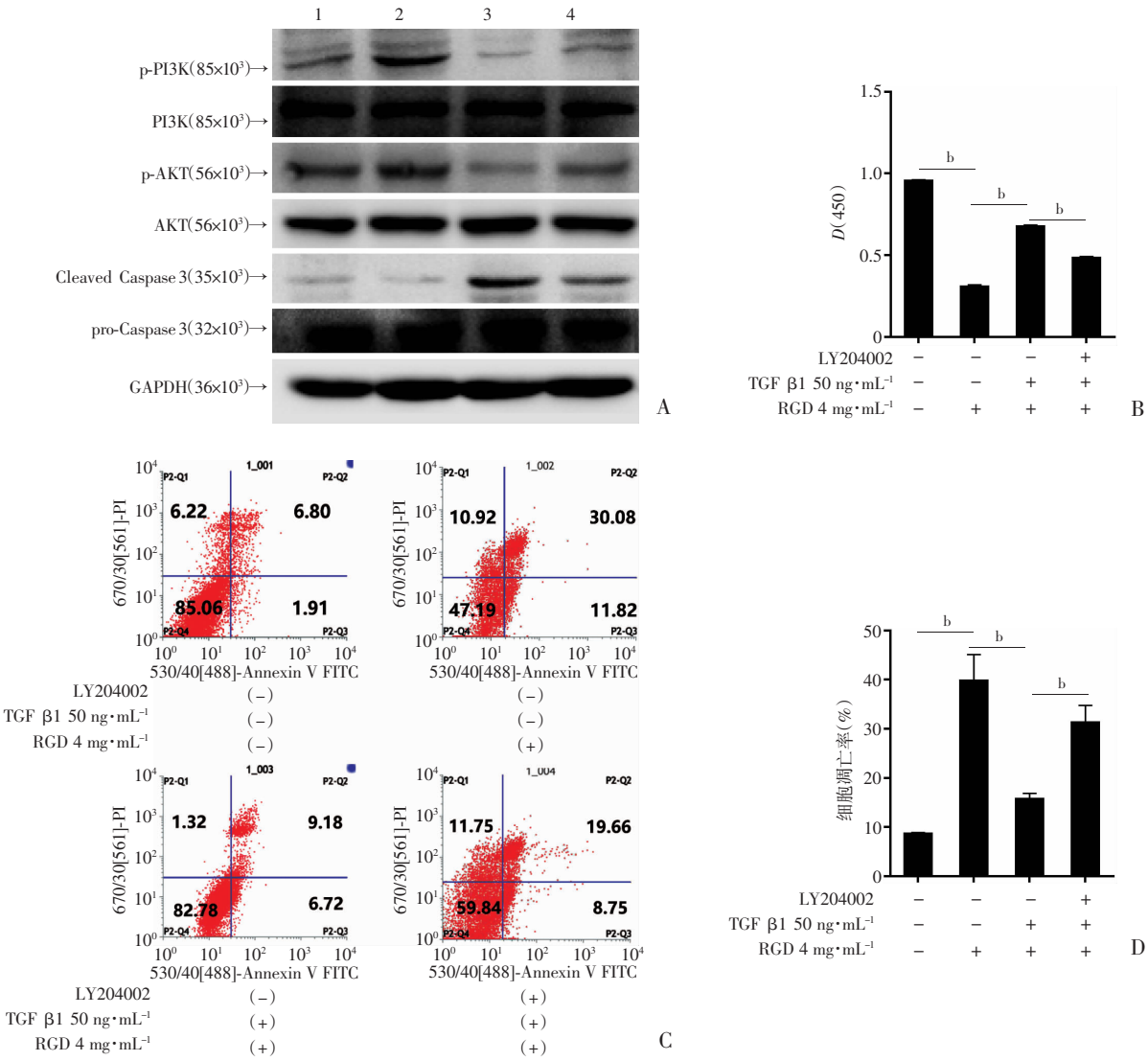
b:$P<0.01$

A:流式细胞仪在不同时间点检测超低粘附板悬浮培养法建立的 HK-2 细胞及 MyoFb 细胞失巢凋亡模型其细胞凋亡情况;B:流式细胞仪在不同 RGD 浓度检测 GRGDS 培养法建立的 HK-2 细胞及 MyoFb 细胞失巢凋亡模型其细胞凋亡情况

图 3 TGF-β1 诱导的 MyoFb 具有失巢凋亡抵抗表型

2.3 TGF-β1 诱导的 MyoFb 的增殖活性及失巢凋亡抵抗能力依赖于 PI3K/AKT 途径

在粘附和悬浮培养条件下分别检测 HK-2 细胞和 MyoFb 的 p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、cleaved-caspase3, pro-caspase3 的蛋白表达情况,结果显示:相对于 HK-2 细胞,MyoFb 中 P-PI3K、P-AKT 的表达明显升高,而 cleaved-caspase3 的表达则明显降低。使用 RGD 处理 HK-2 细胞,其 P-PI3K、P-AKT 的表达明显降低,而 cleaved-caspase3 的表达则明显升高(图 4A)。采用 CCK8 及流式细胞术检测 MyoFb 的增殖率及凋亡率是否依赖 PI3K/AKT 途径的激活,结果显示,相对于 HK-2 细胞,在悬浮培养条件下 MyoFb 增殖率明显增加(图 4B,$P<0.01$)、凋亡率明显降低(图 4C、D,$P<0.01$),但在加入 PI3K/AKT 通路的抑制剂 LY294002(10 mg/mL)之后,部分逆转了 MyoFb 中增殖率的增加以及凋亡率的降低(图 4B、C)。以上结果表明,TGF-β1 诱导的 MyoFb 的增殖活性及失巢凋亡抵抗能力依赖于 PI3K/AKT 途径。

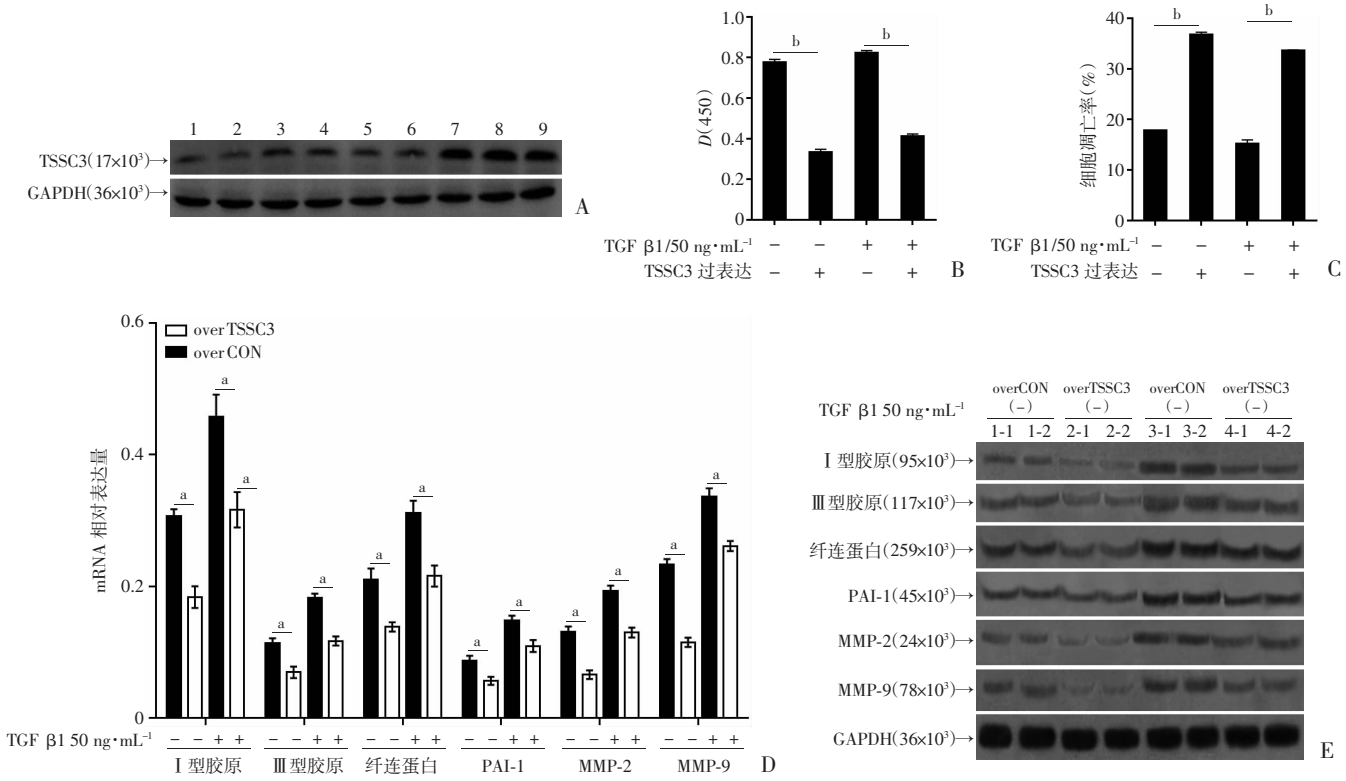


A:Western blot 检测 HK-2 及 MyoFb 相应蛋白表达情况　1:HK-2 细胞;2:50 ng/mL TGFβ1 处理;3:4 mg/mL RGD 处理;4:50 ng/mL TGFβ1+4 mg/mL RGD 处理;B:CCK-8 检测不同组 HK-2 细胞增殖情况;C、D:流式细胞仪检测不同组 HK-2 细胞凋亡情况　b:$P<0.01$

图 4　TGF-β1 诱导的 MyoFb 的增殖活性及失巢凋亡抵抗能力依赖于 PI3K/AKT 途径

2.4　TSSC3 抑制 TGF-β1 诱导的 MyoFb 的增殖活性、失巢凋亡抵抗能力及促纤维化能力

采用 TGF-β1 诱导稳定过表达 TSSC3 的 HK-2 细胞系,通过 Western blot 检测 TSSC3 表达来证实 TSSC3 过表达细胞模型构建是否成功(图 5A)。检测 TSSC3 对 MyoFb 和 HK-2 细胞增殖率及失巢凋亡率的影响。结果显示,过表达 TSSC3 具有抑制 MyoFb 和 HK-2 细胞增殖(图 5B)及促进其失巢凋亡的作用(图 5C)。结果表明 TSSC3 抑制 MyoFb 的增殖活性及失巢凋亡抵抗能力。检测纤维化相关基因 mRNA 及蛋白表达水平,结果显示 TSSC3 明显抑制 MyoFb 和 HK-2 细胞中Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、纤连蛋白、PAI-1、MMP-2、MMP-9 的 mRNA 及蛋白的表达(图 5D、E),提示 TSSC3 具有抑制 TGF-β1 诱导的 MyoFb 的促纤维化能力的作用。



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$

A:Western blot 检测 TSSC3 表达来证实 TSSC3 过表达细胞模型的构建 1~3:HK-2 细胞;4~6:空载病毒转染的 HK-2 细胞;7~9:TSSC3 过表达慢病毒转染 HK-2 细胞;B:在 RGD 处理诱导的失巢凋亡模型中,采用 CCK-8 检测 TSSC3 过表达对不同细胞增殖的影响;C:在 GRGDS 培养法建立失巢凋亡模型中,采用流式细胞仪检测 TSSC3 过表达对不同细胞凋亡的影响;D、E: qRT-PCR (D)及 Western blot (E)检测不同组细胞纤维化相关基因的 mRNA 及蛋白表达水平

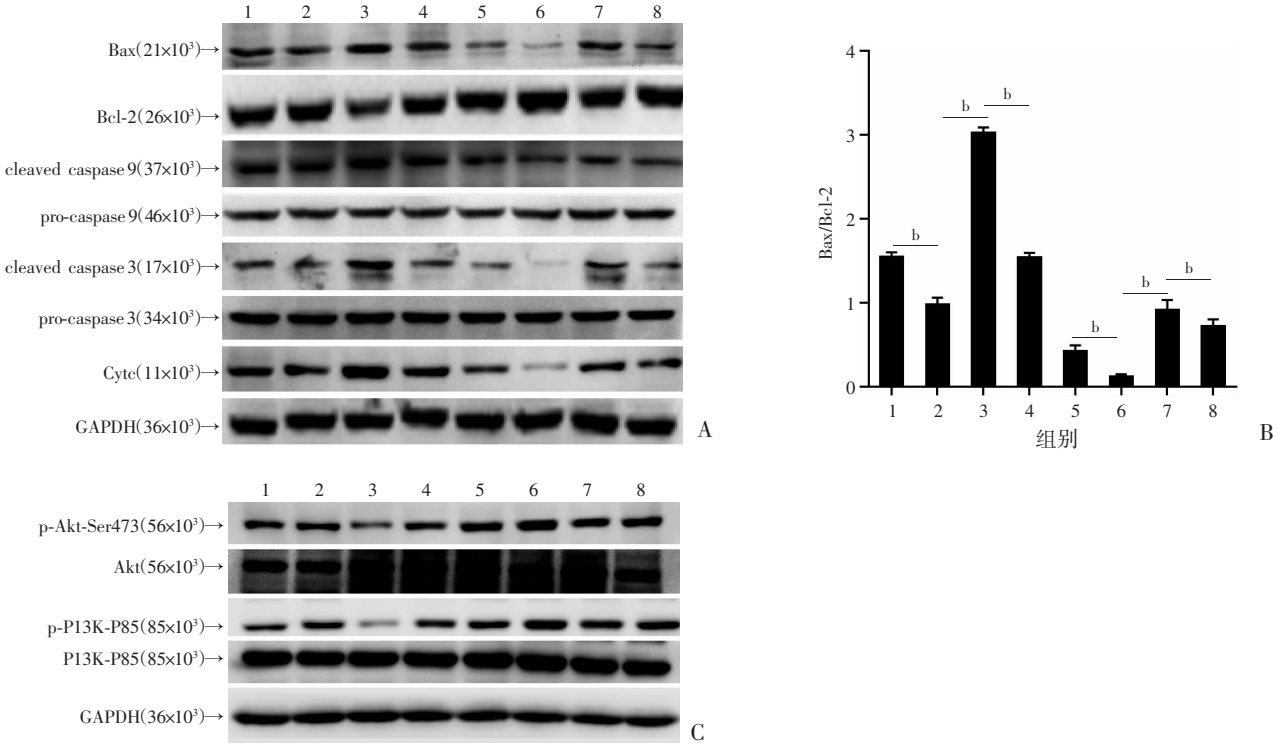
图 5 TSSC3 抑制 TGF-β1 诱导的 MyoFb 的增殖活性、失巢凋亡抵抗能力及促纤维化能力

2.5 TSSC3 通过 PI3K/Akt 通路抑制 TGF-β1 诱导的 MyoFb 的失巢凋亡抵抗能力

经 TGF-β1 处理的 HK-2 细胞,促凋亡蛋白 Bax 水平降低,抗凋亡蛋白 Bcl-2 水平升高,Bax/Bcl-2 比例下降,细胞色素 C 水平显著降低。而 TSSC3 过表达显著增加了 Bax/Bcl-2 比率($P<0.01$)。TSSC3 过表达通过上调 cleaved-caspase 9 和 cleaved-caspase 3 的水平显著促进 caspase 级联反应激活,相反,caspase 级联反应在 TGF-β1 诱导的 MyoFb 中受到抑制(图 6A、B)。Western blot 分析 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达,结果表明 TSSC3 过表达能够降低 MyoFb 中 PI3K-p85 及 AKt 水平。而将过表达 TSSC3 的 MyoFb 暴露于 500 μg/mL 的 740Y-P(PI3K 磷酸肽激活剂)24 h 后,可恢复磷酸化 PI3K 和 Akt 的水平(图 6C)。以上结果说明,TSSC3 通过 PI3K/Akt 通路抑制 TGF-β1 诱导的 MyoFb 的失巢凋亡抵抗能力。

3 讨论

肾间质纤维化是慢性肾脏病进展过程中十分重要的、共同的病理改变,其主要病理特征为炎症细胞浸润、小管萎缩,毛细血管丢失和大量 ECM 积聚。阻断肾脏 ECM 合成是治疗肾纤维化疾病的关键,在众多 ECM 的合成细胞中,MyoFb 是 ECM 的最为主要合成细胞[14-15]。而上皮细胞间充质转化(EMT)是 MyoFb 的主要来源,上皮细胞在损伤后会发生形态学改变,丢失上皮细胞的特征如细胞极性以及连接标记物的表达,却获得了成纤维细胞的标记(FSP-1,波形蛋白,α-SMA)[16]。若 MyoFb 能及时凋亡或转化为静止的 MyoFb,则纤维化消退完成组织修复,所以 MyoFb 的持续激活是不可逆性 RIF 形成的关键。PI3K/Akt 信号途径是多种致纤维化因素的共同作用通路,激活后使 MyoFb 获得失巢凋亡抵抗特性继而活化,活化的 MyoFb 分泌 TGF-β 等细胞因子通过自分泌作用使PI3K/Akt信号途径得



b:$P<0.01$

1:超低粘附板培养 24 h+空载病毒转染处理组;2:超低粘附板培养 24 h+空载病毒转染+50 ng/mL TGF-β1 处理组;3:超低粘附板培养 24 h+TSSC3 过表达慢病毒转染+50 ng/mL TGF-β1 处理组;4:超低粘附板培养 24 h+TSSC3 过表达慢病毒转染+50 ng/mL TGF-β1 处理+740-YP 处理组;5:空载病毒转染+ 4 mg/mL RGD 处理组;6:空载病毒转染+ 4 mg/mL RGD 处理+50 ng/mL TGF-β1 处理组;7:TSSC3 过表达慢病毒转染+ 4 mg/mL RGD 处理+50 ng/mL TGF-β1 处理组;8:TSSC3 过表达慢病毒转染+ 4 mg/mL RGD 处理+50 ng/mL TGF-β1 处理+740-YP 处理组

图 6 在失巢凋亡模型中通过 WB 检测 TGFβ1 处理和 TSSC3 过表达对凋亡相关(A)或 PI3K/Akt 通路相关(C)蛋白表达和 Bax/Bcl-2 比值(B)的影响

以持续的激活,造成 MyoFb 大量积聚和 ECM 过度沉积,最终形成不可逆性肾间质纤维化。

MyoFb 的激活是 RIF 发生发展的中心环节,其持续的活化决定了 RIF 的不可逆性。研究表明 MyoFb 活化的重要标志是获得失巢凋亡抵抗特性。正常细胞依赖粘附而存活,“失巢凋亡”是由于细胞与细胞外基质或相邻细胞脱离接触而诱发的一种特殊的细胞程序性死亡,在机体发育、组织自身平衡、疾病发生和肿瘤转移中起重要作用[17-20]。在各种致纤维化因素作用下产生的 MyoFb,整合素相关蛋白复合物 integrin-FAK/Src 处于持续活化的状态,激活下游的 PI3K/AKT 信号途径。PI3K/AKT 信号通路的激活能引起以下生物学效应[18-19, 21]:①抑制凋亡信号途径使细胞抵抗凋亡;②上调转录因子(Jun/Fos/NF-κB)的表达,促进细胞的存活和增殖;③激活不依赖于 Ras 的丝裂原活化蛋白激酶 MAPK 途径调控细胞周期,参与细胞分化调节;④抑制糖原合成酶 GSK-3β,通过上调 β-catenin 的表达及调控 MMPs-TIMPs 系统,使 ECM 大量沉积并促进细胞的迁移、侵袭;⑤通过调节 integrin 与细胞骨架的相互作用,影响细胞的收缩、粘附和运动。PI3K/AKT 的激活引起细胞活力和运动相关的多种生物学功能发生改变,使 MyoFb 获得失巢凋亡抵抗特性并活化,即在收缩运动(粘附力降低/失粘附)的过程中凋亡不足、过度增殖、迁移/侵袭力增强。同时,MyoFb 具有分泌功能,所分泌的炎症介质(TGF-β)、粘附因子以及 ECM 等通过自分泌作用使 PI3K/AKT 信号途径得以持续的激活,MyoFb 大量积聚和 ECM 过度沉积导致病理性的组织重构,形成不可逆性纤维化[8-9, 22-23]。IEKUSHI 等[24]通过体内外实验表明,下调 TGF-β 的表达通过抑制 FAK/Src 激酶活性诱导

MyoFb 失巢凋亡从而延缓了肾间质纤维化。这些结果说明,MyoFb 获得失巢凋亡抵抗能力是其活化的重要标志,PI3K/AKT 信号通路的激活是 MyoFb 获得失巢凋亡抵抗特性继而活化的重要分子机制。本研究结果表明,给予 TGF-β1 处理增强 PI3K/Akt 通路活性的同时增加了失巢凋亡抵抗,给予 PI3K/AKt 抑制剂(LY294002)处理抑制了 TGF-β1 介导的失巢凋亡抵抗。PI3K/Akt 激活剂(740Y-P)在调节失巢凋亡抵抗、细胞生长等方面显示出与 TGF-β1 诱导相似的趋势。证实 TGF-β1 诱导的 MyoFb 具有失巢凋亡抵抗表型,并且依赖于 PI3K/Akt 信号通路。

印记基因 STF cDNA 3(TSSC3)作为一种人类癌症尤其是骨肉瘤的抑制因子被广泛研究。它同时也是肾纤维化的抑制因子,通过抑制失巢凋亡抵抗起作用。课题组前期的研究发现,RanBP9/TSSC3 复合物通过下调 Src 依赖的 Akt 通路来协同抑制肿瘤转移,加速线粒体相关的失巢凋亡[12, 25]。TSSC3 过表达明显抑制细胞迁移、侵袭,抑制骨肉瘤细胞的间充质转化,通过涉及 Snail、Wnt-β-catenin/TCF 和 GSK-3β 的信号转导途径调节 EMT 标志物,从而促进骨肉瘤细胞的 EMT[26]。以上研究提示 TSSC3 具有强大的诱导细胞失巢凋亡的能力。而 MyoFb 是一群增殖力强、失巢凋亡抵抗、迁移侵袭性高的类肿瘤样增生细胞,提示 TSSC3 可能在肾脏发挥同样的诱导 MyoFb 失巢凋亡的作用,达到延缓 RIF 的目的。本研究证实,TSSC3 过表达通过抑制 PI3K/Akt 通路的活性抑制失巢凋亡抵抗,同时抑制了 MyoFb 的增殖活性及促纤维化能力。过表达 TSSC3 对 MyoFb 生长、细胞迁移、细胞侵袭、收缩能力的影响是我们下一步研究的方向。

综上所述,本研究揭示了靶向 MyoFb 转染 TSSC3 介导其失巢凋亡抑制肾间质纤维化的作用及分子机制。研究结果有望为靶向 MyoFb 的抗纤维化治疗策略提供新思路和有效靶点。

参考文献:

[1] NOGUEIRA A, PIRES M J, OLIVEIRA P A. Pathophysiological mechanisms of renal fibrosis: A review of animal models and therapeutic strategies[J]. In Vivo, 2017, 31(1): 1-22. DOI: 10.21873/invivo.11019.

[2] SUN Y B, QU X, CARUANA G, *et al*. The origin of renal fibroblasts/myofibroblasts and the signals that trigger fibrosis [J]. Differentiation, 2016, 92(3): 102-107. DOI: 10.1016/j.diff.2016.05.008.

[3] MENG X M, NIKOLIC-PATERSON D J, LAN H Y. TGF-beta: the master regulator of fibrosis[J]. Nat Rev Nephrol, 2016, 12(6): 325-338. DOI:10.1038/nrneph.2016.48.

[4] HUMPHREYS B D. Mechanisms of renal fibrosis[J]. Annu Rev Physiol, 2018, 80: 309-326. DOI:10.1146/annurev-physiol-022516-034227.

[5] LIU Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis [J]. Nat Rev Nephrol, 2011, 7(12): 684-696. DOI: 10.1038/nrneph.2011.149.

[6] MERAN S, STEADMAN R. Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis[J]. Int J Exp Pathol, 2011, 92(3): 158-167. DOI: 10.1111/j.1365-2613.2011.00764.x.

[7] KLINGBERG F, HINZ B, WHITE E S. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis [J]. J Pathol, 2013, 229(2): 298-309. DOI: 10.1002/path.4104.

[8] GRANESS A, CICHA I, GOPPELT-STRUEBE M. Contribution of Src-FAK signaling to the induction of connective tissue growth factor in renal fibroblasts [J]. Kidney Int, 2006, 69(8): 1341-1349. DOI: 10.1038/sj.ki.5000296.

[9] HOROWITZ J C, ROGERS D S, SHARMA V, *et al*. Combinatorial activation of FAK and AKT by transforming growth factor-beta1 confers an anoikis-resistant phenotype to myofibroblasts[J]. Cell Signal, 2007, 19(4): 761-771. DOI: 10.1016/j.cellsig.2006.10.001.

[10] IEKUSHI K, TANIYAMA Y, AZUMA J, *et al*. Hepatocyte growth factor attenuates renal fibrosis through TGF-beta1 suppression by apoptosis of myofibroblasts[J]. J Hypertens, 2010, 28(12): 2454-2461. DOI: 10.1097/HJH.0b013e32833e4149.

[11] SCHWIENBACHER C, ANGIONI A, SCELFO R, *et al*. Abnormal RNA expression of 11p15 imprinted genes and kidney developmental genes in Wilms´ tumor[J]. Cancer Res, 2000, 60(6): 1521-1525.

[12] DAI H, LV Y F, YAN G N, *et al*. RanBP9/TSSC3 complex cooperates to suppress anoikis resistance and metastasis via inhibiting Src-mediated Akt signaling in osteosarcoma[J]. Cell Death Dis, 2016, 7(12): e2572. DOI: 10.1038/cddis.2016.436.

[13] CAO Y, DENG C, TOWNSEND C J, *et al*. TGF-beta inhibits Akt-induced transformation in intestinal epithelial cells[J]. Surgery, 2006, 140(2): 322-329. DOI: 10.1016/j.surg.2006.05.006.

[14] TARBIT E, SINGH I, PEART J N, *et al*. Biomarkers for the identification of cardiac fibroblast and myofibroblast cells [J]. Heart Fail Rev, 2019, 24(1): 1-15. DOI: 10.1007/s10741-018-9720-1.

[15] LI X, ZHANG W, CAO Q, *et al*. Mitochondrial dysfunction in fibrotic diseases[J]. Cell Death Discov, 2020, 6(1): 80. DOI: 10.1038/s 14420-020-00316-9.

[16] SHENG L, ZHUANG S. New insights into the role and mechanism of partial epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis[J]. Front Physiol, 2020, 11: 569322. DOI: 10.3389/fphys.2020.569322.

[17] LEE H Y, SON S W, MOENG S, *et al*. The role of noncoding rnas in the regulation of anoikis and anchorage-independent growth in cancer[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2). DOI: 10.3390/ijms22020627.

[18] TADDEI M L, GIANNONI E, FIASCHI T, *et al*. Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases[J]. J Pathol, 2012, 226(2): 380-393. DOI: 10.1002/path.3000.

[19] FRISCH S M, SCREATON R A. Anoikis mechanisms[J]. Curr Opin Cell Biol, 2001, 13(5): 555-562. DOI: 10.1016/s0955-0674(00)00251-9.

[20] GROSSMANN J. Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis—Anoikis"[J]. Apoptosis, 2002, 7(3): 247-260. DOI: 10.1023/a:1015312119693.

[21] DJUDJAJ S, BOOR P. Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis[J]. Mol Aspects Med, 2019, 65: 16-36. DOI: 10.1016/j.mam.2018.06.002.

[22] KOZLOVA N I, MOROZEVICH G E, GEVORKIAN N M, *et al*. Implication of integrins alpha3beta1 and alpha5beta1 in invasion and anoikis of SK-Mel-147 human melanoma cells: non-canonical functions of protein kinase Akt[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(23): 24345-24356. DOI: 10.18632/aging.202243.

[23] RODRIGUEZ-PENA A B, GRANDE M T, ELENO N, *et al*. Activation of Erk1/2 and Akt following unilateral ureteral obstruction[J]. Kidney Int, 2008, 74(2): 196-209. DOI: 10.1038/ki.2008.160.

[24] IEKUSHI K, TANIYAMA Y, AZUMA J, *et al*. Hepatocyte growth factor attenuates renal fibrosis through TGF-beta1 suppression by apoptosis of myofibroblasts[J]. J Hypertens, 2010, 28(12): 2454-2461. DOI: 10.1097/HJH.0b013e32833e4149.

[25] SONG M, BODE A M, DONG Z, *et al*. AKT as a Therapeutic Target for Cancer[J]. Cancer Res, 2019, 79(6): 1019-1031. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2738.

[26] LV Y F, DAI H, YAN G N, *et al*. Downregulation of tumor suppressing STF cDNA 3 promotes epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis of osteosarcoma by the Wnt/GSK-3beta/beta-catenin/Snail signaling pathway[J]. Cancer Lett, 2016, 373(2): 164-173. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.01.046.

(**收稿**:2021-07-24;**修回**:2021-10-17)

(编辑 吴培红)