

IL-17 抑制大鼠肾脏成纤维细胞 NRK-49F 向肌成纤维细胞转化

王 慧,王慧娟,季晓辉*

(南京医科大学微生物与免疫学系,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究白细胞介素-17(IL-17)对大鼠肾脏成纤维细胞(NRK-49F)转化为肌成纤维细胞、表达细胞外基质的影响,并进一步探讨该调节作用可能涉及的分子机制。方法:以转化生长因子 β (TGF- β)诱导培养 NRK-49F 细胞,采用 Western blot 检测 IL-17 对 NRK-49F 表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和细胞外基质 I 型胶原和纤连蛋白的影响;并运用 real-time PCR 分析 NRK-49F 在诱导培养 24、48、72 h 后细胞外基质 I 型胶原和纤连蛋白 mRNA 的表达水平及 IL-17 的调节作用。最后,运用 Western blot 检测细胞内 Smad 与非 Smad 通路中相关信号分子的表达及其磷酸化水平,以解释 IL-17 对 NRK-49F 调节作用的分子机制。结果:IL-17 抑制 NRK-49F 细胞表达 α -SMA,并抑制其表达细胞外基质 I 型胶原和纤连蛋白。当 IL-17 对 NRK-49F 发挥上述抑制作用时,并未影响经典 Smad 信号分子的表达,而是通过抑制非 Smad 通路 Akt-TSC2-p70S6K 的活化来实现的。结论:IL-17 通过抑制 TGF- β 的非 Smad 通路 Akt-TSC2-p70S6K 的活化,从而抑制 NRK-49F 转化为肌成纤维细胞,并抑制其表达细胞外基质。

[关键词] IL-17;肾脏成纤维细胞;TGF- β ;细胞外基质

[中图分类号] R692

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)04-464-06

doi:10.7655/NYDXBNS20150405

Transformation of rat renal kidney fibroblast NRK-49F to myfibroblast is inhibited by IL-17

Wang Hui, Wang Huijuan, Ji Xiaohui*

(Department of Microbiology and Immunology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of interleukin-17(IL-17) on rat renal fibroblast NRK-49F transforming into myfibroblast and expressing extracellular matrix (ECM) as well as the signal mechanism involved. **Methods:** Western blot detected the effect of IL-17 on NRK-49F cells which was induced by transforming growth factor- β (TGF- β) transforming into myfibroblasts and expressing alpha-smooth muscle actin (α -SMA) and I-collagen and fibronectin. The mRNA expression levels of ECM I-collagen and fibronectin as well as regulatory effect of IL-17 in NRK-49F cells were detected by real-time PCR after 24, 48 and 72 h, respectively. Western blot was performed to detect classical Smad-dependent and Smad-independent signaling of TGF- β and its phosphorylation level, in order to explain molecular mechanism of IL-17 on regulating NRK-49F. **Results:** IL-17 inhibited NRK-49F cell line transforming into myfibroblast and expressing α -SMA, I-collagen and fibronectin. IL-17 had no effects on the expression of classic Smad signaling molecule, however, it inhibited the activation of Akt-TSC2-p70S6K through Smad-independent signaling pathway. **Conclusion:** IL-17 inhibits NRK-49F cell line transforming into myfibroblast and expressing α -SMA, I-collagen, and fibronectin by blocking the activation of Akt-TSC2-p70S6K through Smad-independent signaling pathway.

[Key words] interleukin-17; renal fibroblast; TGF- β ; extracellular matrix

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(04):464-469, 489]

肾间质纤维化是所有慢性肾脏病走向终末期的共同病理改变。纤维化的程度决定肾功能状况,但制约肾间质纤维化发生发展的机制目前尚未完全明了。在肾间质纤维化的过程中,会发生炎性细胞浸润、

成纤维细胞活化、小管上皮细胞及内皮细胞转分化、肌成纤维细胞形成、细胞凋亡和细胞外基质合成等,其过程涉及多种细胞因子、趋化因子、生长因子、黏附分子以及信号传递^[1-2]。炎症与纤维化紧密联系,一方面炎症有利于损伤后的修复;另一方面,过度的炎症反应又会导致纤维化的发生^[3-4]。

白细胞介素-17(IL-17)是新近备受关注的炎性

[基金项目] 江苏省病原生物学重点实验室开放课题

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jixiaohui@njmu.edu.cn

细胞因子,其家族有 IL-17A、B、C、D、E 和 F 6 个成员,其中 IL-17A 亦称 IL-17。IL-17 由 Th17 细胞、 $\gamma\delta$ +T 细胞、中性粒细胞等免疫细胞产生^[5-7],其受体(IL-17R)广泛表达于免疫细胞及非免疫细胞表面,如上皮细胞、内皮细胞、滑膜细胞和成纤维细胞等^[8]。已知 IL-17 能够趋化中性粒细胞、诱导其他炎性细胞因子、参与抗菌免疫,在多发性硬化、银屑病等多种自身免疫病的发病中具有重要作用。

目前,已有多篇文献报道 IL-17 可促进心肌、肺和肝等组织的纤维化^[9-13]。IL-17 通过促进心肌成纤维细胞增殖和迁移而加速心肌纤维化的发展^[9];在博来霉素或 IL-1 β 诱导的肺纤维化中,IL-17 促进成纤维细胞大量合成细胞外基质,阻断 IL-17 可以显著降低肺纤维化的严重程度^[10-11];IL-17 既可以通过诱导炎性细胞因子和转化生长因子 β 1(TGF- β 1)的表达促进肝纤维化,又可直接上调胶原的合成、促进肌成纤维细胞的活化^[13]。然而 IL-17 与肾间质纤维化的关系目前尚未见报道。

本实验室在前期研究中发现,IL-17 基因敲除鼠的肾间质纤维化病理改变比野生型小鼠严重^[14],这与文献报道的 IL-17 可促进心肌、肺和肝等组织纤维化并不一致。这就需要进一步在体外细胞培养体系中确认 IL-17 对肾脏成纤维细胞的作用特点,并找出其作用所涉及的分子机制。为此,本研究建立体外细胞培养体系,选择应用肾脏成纤维细胞株,观察 IL-17 对其向肌成纤维细胞转化的调节作用并探讨相关分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

肾脏成纤维细胞株 NRK-49F 细胞(ATCC,美国);DMEM/F12(1:1)培养基(Hyclone 公司,美国);胎牛血清(Gibco-BRL 公司,美国);胰酶-EDTA(Hyclone 公司,美国);TRIzol 及 PCR mix(Roche 公司,德国);反转录试剂盒(Lifetech 公司,美国);PCR 引物由美国 Lifetech 公司合成;重组人 TGF- β 1(Pe-protech 公司,美国);重组鼠 IL-17(R&D 公司,美国);小鼠源性 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)单抗(Abcam 公司,美国);HRP 标记的大鼠抗小鼠 IgG 二抗(CST 公司,美国);兔源性 I 型胶原单抗(Rockland 公司,美国);兔源性纤连蛋白单抗(Abcam 公司,美国);兔源性 Smad2、p-Smad2、Smad3、p-Smad3、TSC2、AKT、p-AKT、p-TSC2、p70S6K、p-p70S6K、GAPDH 单抗(CST 公司,美国);HRP 标记

的羊抗兔 IgG 二抗(Rockland 公司,美国);蛋白定量试剂盒(Beyotime 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 肾脏成纤维细胞株 NRK-49F 的诱导培养

离心收集对数生长期的 NRK-49F 细胞,加入含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,以 1×10^6 个/孔种于 6 孔板中,培养 24 h 后弃去上清,用无菌 D-Hanks 洗涤 2 次后,换无血清培养基饥饿培养 18 h。按照空白对照组(Meidum),对照组(TGF- β 10 ng/ml),实验组(TGF- β 10 ng/ml 和 IL-17 10 ng/ml)分组,诱导培养细胞 48 h。收取细胞,提取蛋白进行 Western blot 实验,检测 α -SMA 的表达,并在培养的 24、48、72 h 分别收取细胞,提取 RNA 检测细胞外基质 I 型胶原和纤连蛋白 mRNA 的表达。另外,在 TGF- β 刺激 48 h 之后,再加入 IL-17 刺激 45 min 后提取蛋白检测信号蛋白的表达。

1.2.2 蛋白质印迹检测(Western blot)

细胞经 RIPA 裂解液裂解提取蛋白,运用 BCA 蛋白检测法对蛋白进行定量检测,经 SDS-PAGE 电泳后转 PVDF 膜,室温 5%脱脂奶粉封闭 1 h。然后加入一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,再加入 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h。化学发光凝胶成像系统检测,Adobe Photoshop CS4 软件对条带进行灰度扫描检测。目的蛋白的灰度值除以内参灰度值以校正误差,所得结果代表目的蛋白相对表达量。

1.2.3 RNA 提取和 real-time RT-PCR

TRIzol 法分别提取 TGF- β (10 ng/ml)和 IL-17(10 ng/ml)刺激 NRK-49F 24、48、72 h 后细胞的总 RNA,按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录获得 cDNA,以 cDNA 为模板进行 RT-PCR,检测细胞外基质 I 型胶原和纤连蛋白 mRNA 表达水平,并检测刺激 48 h 后,IL-17RA 和 IL-17RC 的表达水平。

引物序列为: α -SMA 上游引物:5'-GTCCCAGACATCAGGGAGTAA-3',下游引物:5'-TCGGATACTTCAGCGTCAGGA-3';I 型胶原(I-collagen)上游引物:5'-GCTCCTCTTAGGGGCCACT-3',下游引物:5'-ATTGGGGACCCTTAGGCCAT-3';纤连蛋白(Fibronectin)上游引物:5'-GTGACACTTATGAGCGCCCTA-3',下游引物:5'-CCACTTGTCCCAATCTTGTATA-3';IL-17RA 上游引物:5'-TCCAGTTTCTGTCATGCTG-3',下游引物:5'-GCTCACGCATGAGGTAGTCA-3';IL-17RC 上游引物:5'-GAGCTCAACCTCACACAGCA-3',下游引物:5'-GCAGAATTCGACCCTCTCAG-3'; β -actin 上游引物:5'-GTGACGTTGA-

CATCCGTAAGA-3', 下游引物:5'-GCCGGACT-CATCGTACTCC-3'。real-time RT-PCR 按照 Roche FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) 说明书进行,相对基因表达采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算。

1.3 统计学方法

实验数据应用 SPSS 20.0 进行统计学分析。多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行比较,组内两两之间比较采用 q 检验, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NRK-49F 细胞表达 IL-17 受体(IL-17RA/IL-

17RC)且能被 IL-17 上调

体外培养 NRK-49F 细胞,观察 TGF- β 和 IL-17 与 RK-49F 细胞共培养 48 h,对其 IL-17 受体(IL-17RA、IL-17RC)表达的影响。real-time PCR 的结果显示,NRK-49F 细胞表达一定量的 IL-17RA 和 IL-17RC mRNA,TGF- β 对 IL-17RA/C mRNA 的表达并无明显影响,而 IL-17 却能显著增加 NRK-19F 细胞 IL-17RA 和 IL-17RC mRNA 的表达水平,形成一种正反馈调节作用(图 1)。

2.2 IL-17 抑制 TGF- β 所诱导的 NRK-49F 细胞表达纤维化相关蛋白

为研究 IL-17 对 NRK-49F 转化为肌成纤维细

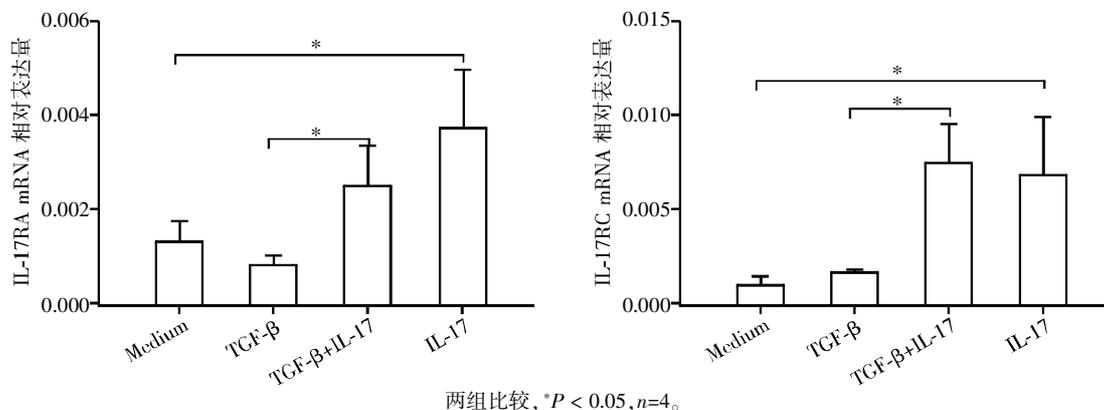
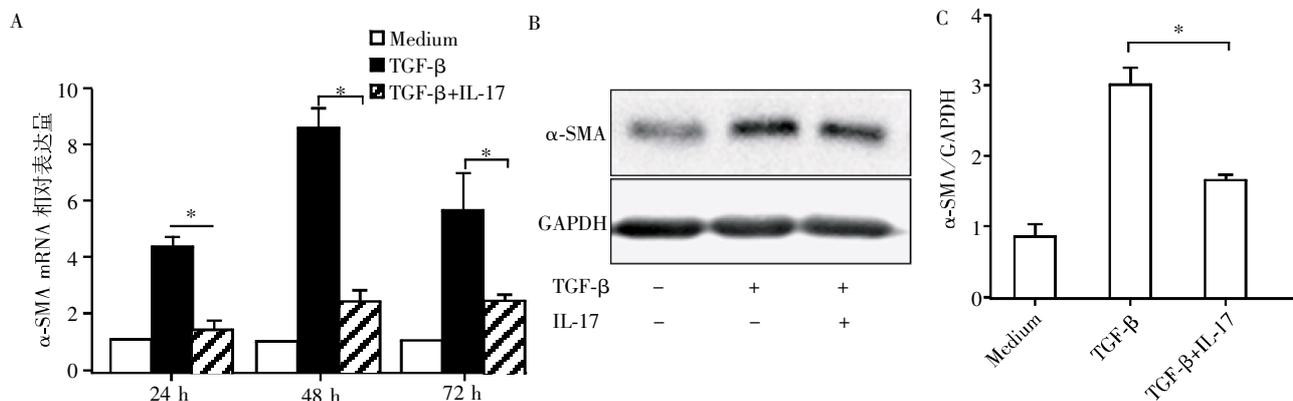


Figure 1 Expressions of IL-17RA and IL-17RC mRNA in NRK-49F cell line and the effect of IL-17 on them

胞的调节作用,以 TGF- β 诱导培养 NRK-49F,加入 IL-17,观察 IL-17 的作用。当 NRK-49F 单受 TGF- β 诱导时,则表达较高水平的 α -SMA,而 TGF- β 和 IL-17 共作用时, α -SMA 表达量显著减少,本结果表明 IL-17 抑制 NRK-49F 表达 α -SMA(图 2)。

为了观察 IL-17 在肾脏肌成纤维细胞合成细胞

外基质中所发挥的调节作用,对 NRK-49F 予以 TGF- β 单独诱导培养和 TGF- β 与 IL-17 共培养,来分析 IL-17 对 NRK-49F 转化为肌成纤维细胞后其合成细胞外基质的影响。结果发现,与 TGF- β 单独诱导相比,在 TGF- β 诱导之后加入 IL-17 导致 NRK-49F 所合成的 I 型胶原和纤连蛋白显著减少,在不同时间



A:培养 NRK-49F 细胞 24、48、72 h 后 α -SMA mRNA 表达水平;B:Western blot 代表性照片;C:半定量统计分析结果。* $P < 0.05, n=4$ 。

图 2 IL-17 抑制 TGF- β 所诱导的 NRK-49F 细胞表达 α -SMA

Figure 2 IL-17 inhibits the expression of α -SMA in NRK-49F cell line induced by TGF- β

点 24、48、72 h 均呈现一致的趋势(图 3)。

2.3 IL-17 抑制非 Smad 依赖途径信号分子的活化, 而对 Smad 信号分子活化无明显影响

2.3.1 IL-17 信号未能改变 TGF- β 刺激后 NRK-49F 细胞 Smad2 和 Smad3 信号分子的活化水平

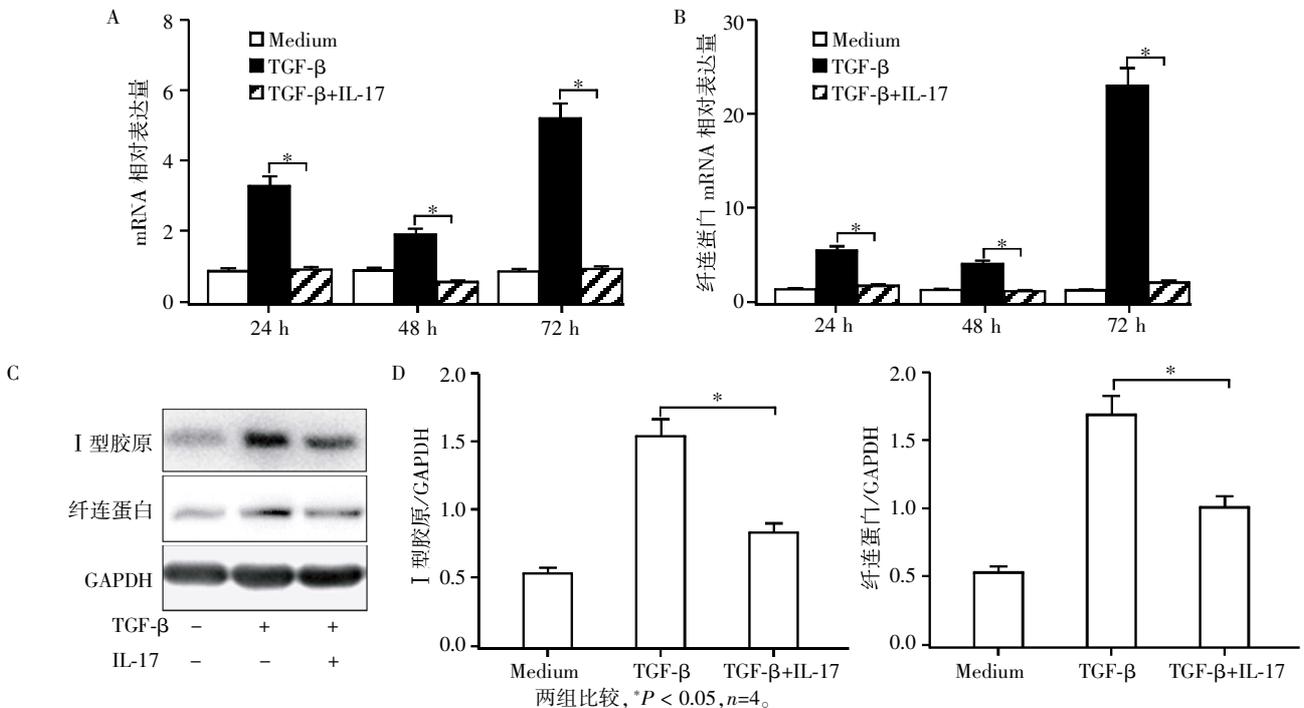


图 3 IL-17 抑制 TGF- β 所诱导的 NRK-49F 细胞 I 型胶原和纤连蛋白 mRNA 的表达

Figure 3 IL-17 inhibits the expression of type I collagen and FN mRNA in NRK-49F cell line induced by TGF- β

维细胞 48 h 后, 再加入 IL-17 诱导 45 min, 检测 Smad2、Smad3 及其磷酸化的表达水平, 与单加 TGF- β 诱导相比并无统计学差异($n=5$)。提示 IL-17 抑制 TGF- β 所诱导的 NRK-49F 转化为肌成纤维细胞以及合成细胞外基质的作用可能不涉及 Smad 胞内信号途径(图 4)。

2.3.2 IL-17 抑制 TGF- β 所诱导的 NRK-49F 细胞非 Smad 途径信号分子 Akt、TSC2 和 p70S6K 的活化水平

在 TGF- β 的促纤维化信号通路中, 除了经典的依赖 Smad2/3 的通路之外, 不依赖 Smad2/3 的非经典信号级联通路 PI3K/Akt/TSC2/p70S6K 也能够促进成纤维细胞增殖。因此, 实验中也观察了 IL-17 对 TGF- β 所诱导的 NRK-49F 细胞的非经典信号分子的表达和活化的影响。结果发现, 与单纯 TGF- β 诱导相比, IL-17 和 TGF- β 共同培养组的活性 TSC2 (非磷酸化形式) 表达增多, 而磷酸化的 TSC2 有所减少。对于 Akt 和 p70S6K, 它们的表达水平在 TGF- β 加 IL-17 共同培养组并未降低; 但二者磷酸化之后的活化形式 p-p70S6K (Ser371) 和 p-Akt 在 IL-17 与 TGF- β 共同培养时, 较之于单独 TGF- β 诱

为了阐释 IL-17 对 NRK-49F 抑制作用的分子机制, 分析 TGF- β 诱导培养 NRK-49F 的胞内信号通路是否受到 IL-17 的调控, 在 NRK-49F 细胞培养体系中分析经典的 TGF- β /Smad 信号分子表达量、磷酸化水平。结果显示, TGF- β 诱导 NRK-49F 成纤

导组有显著减少, 提示 IL-17 对 Akt-TSC2-p70S6K 信号途径的活化具有抑制作用(图 5)。

3 讨论

肾间质纤维化是各种慢性肾脏疾病最后导致肾功能衰竭的主要病理变化, 其主要表现为肾脏成纤维细胞转化为肌成纤维细胞, 并合成大量的细胞外基质, 最后导致细胞外基质的过度沉积^[15-16]。目前, TGF- β 是公认的重要的促纤维化分子。关于 TGF- β 的胞内信号途径的研究广泛而深入。TGF- β 与受体结合之后, 其下游的信号通路可分为经典的 Smad 信号通路和非 Smad 信号通路。经典通路是 TGF- β 与其 II 受体聚合物 ALK5 (Activin-like kinase 5)/TBR II 结合, 诱导 Smad2/Smad3 的丝氨酸/苏氨酸磷酸化, 转位至核内, 结合转录因子, 引起相应基因的表达, 促进成纤维细胞转化为肌成纤维细胞, 并促进肌成纤维细胞合成细胞外基质^[17-19]。

非经典的 TGF- β 信号通路指不依赖 Smad 蛋白, 而是起始于 PI3K。PI3K 活化之后又分为 2 个主

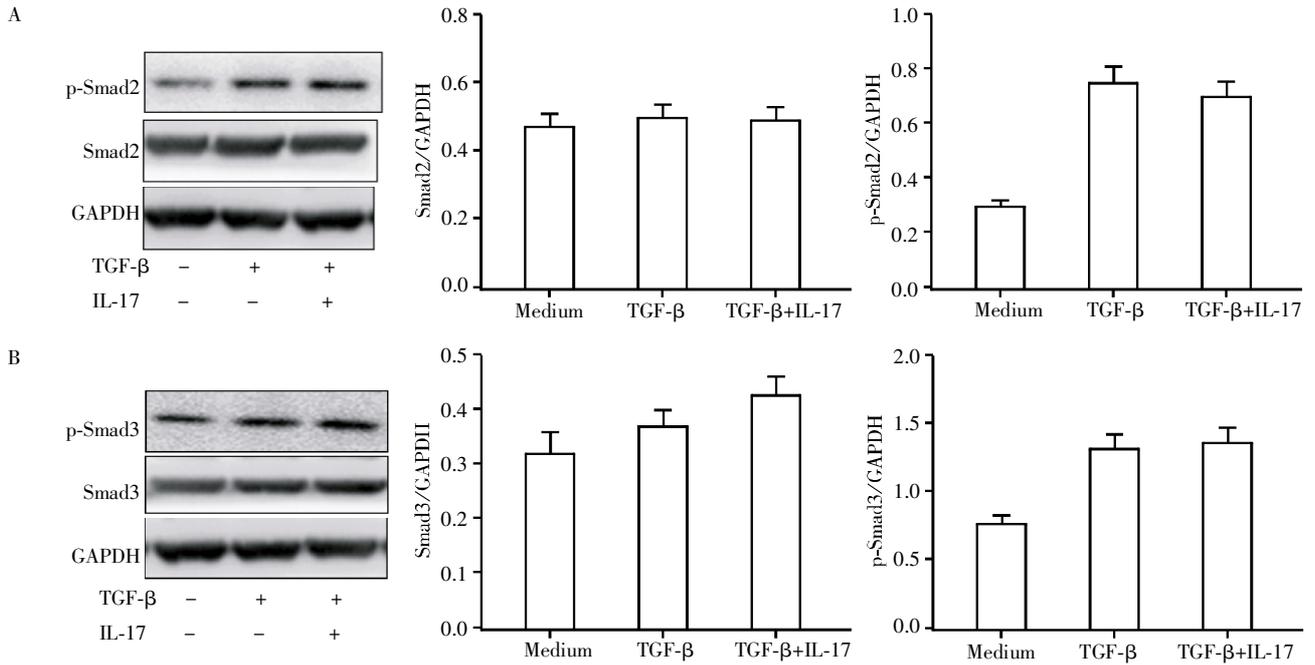
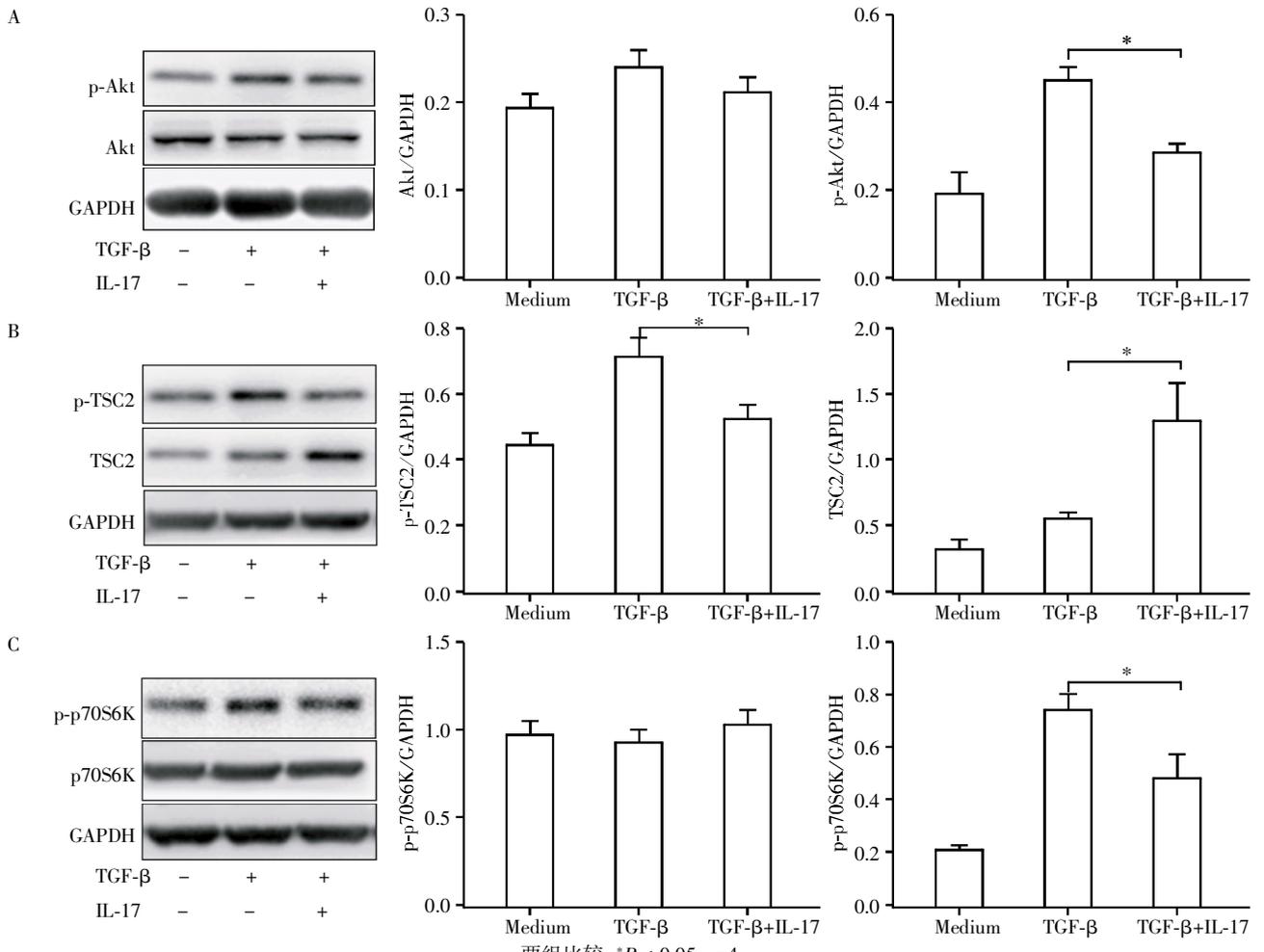


图 4 IL-17 对 TGF-β 所诱导的 NRK-49F 细胞的 p-Smad2/p-Smad3 水平的影响

Figure 4 Effect of IL-17 treatment on the levels of p-Smad2 and p-Smad3 in NRK-49F cell line after TGF-β stimulation



两组比较, *P < 0.05, n=4。

图 5 IL-17 对 TGF-β 所诱导的 NRK-49F 细胞 Akt, TSC2 和 p70S6K 磷酸化水平的影响

Figure 5 Effects of IL-17 on the phosphorylation levels of Akt, TSC2 and p70S6K molecule in NRK-49F cell line after TGF-β stimulation

要的通路,一是引起 PAK2-Abl 的激活,从而诱导成纤维细胞增殖。二是 PI3K 同时可以活化 Akt, Akt 的下游靶点之一是 TSC2。与其他磷酸化分子不同的是,磷酸化的 TSC2 为失活状态。而非磷酸化的 TSC2 具有活性,它是一种 GTP 酶激活蛋白(GTPase-activating protein, GAP),能够灭活 mTORC1,因此有活性的 TSC2 是 mTORC1 的抑制剂。Akt 活化,作用于 TSC2,使 TSC2 磷酸化,形成较多的 p-TSC2,使得 TSC2 减少,从而减少了 mTORC1 的抑制作用,使得 mTORC1 的活性增加。而 mTORC1 又作用于 p70S6K,使其磷酸化,导致成纤维细胞增殖和转化^[20-22]。

核糖体 40S 小亚基 S6 蛋白激酶(p70S6K)是 mTORC1 的直接底物,调控细胞生长、增殖和细胞周期^[23]。Akt-mTORC1-p70S6K 通路在促进成纤维细胞增殖上发挥重要作用。由此,在成纤维细胞内,非经典的信号途径和经典的信号途径密切合作,诱导成纤维细胞增殖、成纤维细胞转化为活化的肌成纤维细胞并合成大量细胞外基质且抑制其降解^[20]。有文献报道,microRNA-29b 通过抑制 PI3K-Akt 信号通路,而抑制肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)表达细胞外基质^[24-25]。

本实验中,运用 TGF- β 诱导肾脏成纤维细胞株 NRK-49F 转化为肌成纤维细胞,表达高水平的 α -SMA;并证实 IL-17 可以抑制 TGF- β 诱导 NRK-49F 细胞表达 α -SMA 转化为肌成纤维细胞;而且,IL-17 可以抑制 TGF- β 所诱导的 NRK-49F 细胞表达细胞外基质 I 型胶原和纤连蛋白。这进一步证实了 IL-17 对肾脏成纤维细胞的增殖、转化和胞外基质表达的抑制作用。

接下来进一步寻找 IL-17 调节 TGF- β 所诱导的 NRK-49F 细胞转化为肌成纤维细胞的分子机制。研究发现,IL-17 通过抑制 p70S6K 及 Akt 的磷酸化、保持 TSC2 的非磷酸化状态,从而抑制成纤维细胞的活化与功能。即 IL-17 通过抑制 TGF- β 的非 Smad 信号途径(Akt-mTORC1-p70S6K)而实现其抑制肾脏成纤维细胞的作用。

本实验利用大鼠成纤维细胞株 NRK-49F,在体外初步探讨了 IL-17 调节 NRK-49F 转化为肌成纤维细胞,并诱导其表达细胞外基质的分子机制,为进一步研究 IL-17 在组织纤维化中的意义提供更有价值的证据。

[参考文献]

[1] Kisseleva T, Brenner DA. Mechanisms of fibrogenesis[J].

Exp Biol Med(Maywood),2008,233(2):109-122

[2] Blank U, Essig M, Scanduzzi L, et al. Mast cells and inflammatory kidney disease[J]. Immunol Rev, 2007, 217(0):79-95

[3] Kluth DC, Erwig LP, Rees AJ. Multiple facets of macrophages in renal injury[J]. Kidney Int, 2004, 66(2): 542-557

[4] Martin P, Parkhurst SM. Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis[J]. Development, 2004, 131(13):3021-3034

[5] Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, et al. Interleukin-17 family and IL-17 receptors[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2003, 14(2):155-174

[6] Hirota K, Ahlfors H, Duarte JH, et al. Regulation and function of innate and adaptive interleukin-17-producing cells[J]. EMBO Rep, 2012, 13(2):113-120

[7] Li L, Huang L, Vergis AL, et al. IL-17 produced by neutrophils regulates IFN- γ -mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury[J]. J Clin Invest, 2010, 120(1):331-342

[8] Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, et al. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor[J]. Immunity, 1995, 3(6):811-821

[9] Valente AJ, Yoshida T, Gardner JD, et al. Interleukin-17A stimulates cardiac fibroblast proliferation and migration via negative regulation of the dual-specificity phosphatase MKP-1/DUSP-1[J]. Cell Signal, 2012, 24(2):560-568

[10] Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, et al. Bleomycin and IL-1 β -mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent[J]. J Exp Med, 2010, 207(3):535-552

[11] Mi S, Li Z, Yang HZ, et al. Blocking IL-17A promotes the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis via TGF- β 1-dependent and -independent mechanisms[J]. J Immunol, 2011, 187(6):3003-3014

[12] Meng F, Wang K, Aoyama T, et al. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice[J]. Gastroenterology, 2012, 143(3):765-776

[13] Sato M, Muragaki Y, Saika S, et al. Targeted disruption of TGF- β 1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction[J]. J Clin Invest, 2003, 112(10):1486-1494

[14] 张璐,王慧娟,孙可一,等. IL-17 在肾间质纤维化中的作用初探[J]. 现代免疫学, 2012, 32(4):293-296

[15] Eddy AA. Molecular insights into renal interstitial fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 1996, 7(12):2495-2508

[16] Boor P, Ostendorf T, Floege J. Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets[J]. Nat Rev