

# 血小板衍生生长因子DD刺激大鼠肾成纤维细胞增殖及向肌成纤维细胞的转化

赵佳<sup>1</sup>, 孙建平<sup>1</sup>, 高延霞<sup>2</sup>, 唐妮娜<sup>1</sup>, 牛蒙<sup>1</sup>, 崔萌<sup>1</sup>, 韩晓庆<sup>1</sup>, 隋爱华<sup>3</sup> (青岛大学附属医院, <sup>1</sup>肾内科, <sup>3</sup>中心实验室, 山东省青岛市 266003; <sup>2</sup>山东大学齐鲁医院(青岛)泌尿内科, 山东省青岛市 266035)

## 文章亮点:

1 血小板衍生生长因子最初从血小板中发现, 在损伤早期从血小板 $\alpha$ 颗粒释放出来, 启动并加速组织创伤修复。  
2 实验特点为从细胞水平上证实血小板衍生生长因子DD对于大鼠肾固有纤维细胞的增殖及向肌成纤维细胞表型转化的作用。结果提示血小板衍生生长因子DD/血小板衍生生长因子 $\beta$ R信号通路的激活可显著刺激NRK-49F的增殖及向肌成纤维细胞的转化。

## 关键词:

组织构建; 成纤维细胞; 肾间质纤维化; 大鼠; 肾成纤维细胞; 血小板衍生生长因子DD; 细胞增殖; 肌成纤维细胞;  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白

## 主题词:

肾; 纤维化; 成纤维细胞; 表型; 受体; 血小板源生长因子

## 基金资助:

青岛市科技计划基础研究项目[11-2-4-2-(12)-jch]

## 摘要

**背景:** 血小板衍生生长因子可诱导肾小球系膜细胞及肾间质多种细胞增殖、迁移、转化及细胞外基质的过表达。

**目的:** 观察血小板衍生生长因子DD/血小板衍生生长因子 $\beta$ R信号通路激活对大鼠肾成纤维细胞增殖及 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白表达的影响。

**方法:** 体外培养正常大鼠肾成纤维细胞(NRK-49F), 按照血小板衍生生长因子DD刺激质量浓度分为对照组、1  $\mu$ g/L组、10  $\mu$ g/L组、50  $\mu$ g/L组、100  $\mu$ g/L组, 然后根据50  $\mu$ g/L血小板衍生生长因子DD刺激不同时间分为对照组、12 h组、24 h组、48 h组。CCK8检测不同血小板衍生生长因子DD质量浓度及血小板衍生生长因子DD作用不同时间对NRK-49F增殖的影响; Real-time PCR检测各质量浓度组血小板衍生生长因子 $\beta$ R、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白mRNA变化; Western blot检测各浓度组血小板衍生生长因子 $\beta$ R、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白蛋白表达变化。

**结果与结论:** 与对照组相比, 血小板衍生生长因子DD可明显刺激NRK-49F细胞增殖, 呈现剂量依赖性及时间依赖性。血小板衍生生长因子DD可剂量依赖性刺激其相应血小板衍生生长因子 $\beta$ R及 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白在mRNA水平及蛋白水平上的表达增加。提示血小板衍生生长因子DD/血小板衍生生长因子 $\beta$ R信号通路的激活可显著刺激NRK-49F细胞的增殖及向肌成纤维细胞的转化。

赵佳, 孙建平, 高延霞, 唐妮娜, 牛蒙, 崔萌, 韩晓庆, 隋爱华. 血小板衍生生长因子DD刺激大鼠肾成纤维细胞增殖及向肌成纤维细胞的转化[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(11):1688-1693.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.11.010

## Platelet-derived growth factor-DD induces the proliferation and differentiation of rat renal fibroblasts into myofibroblasts

Zhao Jia<sup>1</sup>, Sun Jian-ping<sup>1</sup>, Gao Yan-xia<sup>2</sup>, Tang Ni-na<sup>1</sup>, Niu Meng<sup>1</sup>, Cui Meng<sup>1</sup>, Han Xiao-qing<sup>1</sup>, Sui Ai-hua<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Department of Nephrology, <sup>3</sup>Central Laboratory, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China; <sup>2</sup>Department of Urology, Qilu Hospital of Shandong University, Qingdao 266035, Shandong Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** Platelet-derived growth factors can induce proliferation, migration, transformation and extracellular matrix expression of glomerular mesangial cells and renal interstitial cells.

**OBJECTIVE:** To investigate the effect of activation of platelet-derived growth factor-DD/ $\beta$ R signaling pathway on the proliferation and  $\alpha$ -smooth muscle actin expression in rat renal fibroblasts.

**METHODS:** Normal rat kidney interstitial fibroblasts (NRK-49F) cultured *in vitro* were divided into the following groups by platelet-derived growth factor-DD concentrations: control, 1  $\mu$ g/L, 10  $\mu$ g/L, 50  $\mu$ g/L, 100  $\mu$ g/L. And NRK-49Fs were then divided into four groups according to the stimulation time of 50  $\mu$ g/L platelet-derived growth factor-DD: control, 12 hours, 24 hours, 48 hours. The cell viability of the NRK-49Fs was assessed by Cell Counting Kit-8 after platelet-derived growth factor-DD administration. The mRNA and protein expression levels of

赵佳, 女, 1990年生, 山东省聊城市人, 汉族, 青岛大学医学院在读硕士, 主要从事肾小管间质纤维化方面的研究。

并列第一作者: 孙建平, 硕士, 主任医师, 主要从事肾小管间质疾病方面的研究。

通讯作者: 孙建平, 青岛大学附属医院肾内科, 山东省青岛市 266003

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2015)11-01688-06

稿件接受: 2015-02-17

http://www.crter.org

Zhao Jia, Studying for master's degree, Department of Nephrology, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Sun Jian-ping, Master, Chief physician, Department of Nephrology, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Zhao Jia and Sun Jian-ping contributed equally to this work.

Corresponding author: Sun Jian-ping, Department of Nephrology, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Accepted: 2015-02-17

platelet-derived growth factor- $\beta$ R and  $\alpha$ -smooth muscle actin in all groups stimulated by different concentrations of platelet-derived growth factor-DD were determined by RT-PCR and western blot, respectively.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Platelet-derived growth factor-DD could facilitate the proliferation rates of the NRK-49Fs at a dose- and time-dependent manner as compared with the control groups. Platelet-derived growth factor-DD could stimulate the mRNA and protein expressions of platelet-derived growth factor- $\beta$ R and  $\alpha$ -smooth muscle actin in a dose-dependent manner. This suggest that the activation of platelet-derived growth factor-DD/ $\beta$ R signaling pathway can obviously promote the proliferation of NRK-49Fs as well as transformation into myofibroblasts.

**Subject headings:** Kidney; Fibrosis; Fibroblasts; Phenotype; Receptors, Platelet-Derived Growth Factor

**Funding:** the Basic Research Project of Qingdao Science and Technology Plan, No. 11-2-4-2-(12)-jch

Zhao J, Sun JP, Gao YX, Tang NN, Niu M, Cui M, Han XQ, Sui AH. Platelet-derived growth factor-DD induces the proliferation and differentiation of rat renal fibroblasts into myofibroblasts. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(11):1688-1693.

## 0 引言 Introduction

肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)是多种原因所致的肾小管间质病变的最终结局,也是多种慢性肾脏病走向终末期肾衰竭的最终通路<sup>[1-2]</sup>。大量证据表明,肾间质肌成纤维细胞(myofibroblasts, MyoF)的形成、不断增殖以及细胞外基质的过表达是肾间质纤维化发展的重要驱动力量<sup>[3]</sup>。

肌成纤维细胞主要来源于肾脏固有纤维细胞的转化或转分化、血管平滑肌细胞的迁移、肾小管上皮细胞转化和迁移、系膜细胞的增殖、转化等。其中,固有纤维细胞的活化被认为是肌成纤维细胞的重要来源<sup>[4]</sup>。 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白正常情况下几乎仅表达于肾脏血管中层,而在肾小球和肾间质无表达,目前众多研究者认为 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白是肌成纤维细胞的特异性标志<sup>[1, 5]</sup>。

血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)家族具有强大的促细胞分裂增殖作用,该家族已被证实于胚胎发育、恶性肿瘤形成、动脉粥样硬化及多脏器的纤维化过程中发挥重要作用<sup>[6]</sup>。

血小板衍生生长因子DD是血小板衍生生长因子家族中最晚被发现的亚型,而且对于血小板衍生生长因子DD对于肾间质纤维化发生及发展影响机制的研究亦较其他亚型少。

实验旨在揭示体外血小板衍生生长因子DD信号通路的激活对大鼠正常肾成纤维细胞(NRK-49F)促肾间质纤维化行为(包括细胞增殖、向肌成纤维细胞转化)的影响,为深入研究肾间质纤维化分子机制及药物干预提供理论依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 随机对照细胞学实验

**时间及地点:** 实验于2014年4至10月在青岛大学附属医院中心实验室完成。

**实验方法:**

**NRK-49F细胞的培养:** 用含体积分数10%FBS的1640培养基培养细胞,待细胞生长至90%融合,即弃去培养液,用PBS(不含钙,镁离子)洗一两次。然后加入1 mL消化液(0.25%Trypsin-0.53 mmol/L EDTA)于培养瓶中,在倒置显微镜下观察细胞消化情况,细胞开始皱缩,细胞之间的间

大鼠肾成纤维细胞增殖及转化实验用细胞、试剂及仪器:

细胞、试剂及仪器	来源
正常大鼠肾成纤维细胞(NRK-49F)	中国医学科学院细胞库
血小板衍生生长因子 DD	R&D system
胎牛血清	Gibco
1640 培养基	Hyclone
Trypsin EDTA、PBS、CCK-8	Solarbio
BCA 试剂盒	Pierce
一抗 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白、血小板衍生生长因子 $\beta$ R	Bioword
一抗 GAPDH、二抗 Rabbit anti-Goat IgG(H&L)-HRP	Santa Cruz
倒置荧光显微镜(CKX41SF)	Olympus
CO <sub>2</sub> 细胞培养箱(MCO-15AC)	SANYO
Real-timePCR 仪(LC480II)	Roche

隙开始变大后立即吸出消化液,用含体积分数10%FBS的1640培养基终止消化,按照1:2或1:3进行传代。取生长良好的第3-8代细胞进行实验。

**血小板衍生生长因子DD对NRK-49F增殖的浓度效应:**

取生长良好的3-8代细胞,消化后用含体积分数10%FBS的培养基重悬细胞,接种于96孔培养板上,每孔100  $\mu$ L,数量约 $1 \times 10^4$ /孔,37  $^{\circ}$ C,体积分数5%CO<sub>2</sub>恒温箱培养,待细胞贴壁24 h后弃掉板中培养基,每孔加入含体积分数0.1%FBS的培养基100  $\mu$ L至恒温箱中同步12 h,使细胞进入静止期。12 h后换用新的含体积分数10%FBS的培养基,按照血小板衍生生长因子DD终浓度分组,分别是对照组、1  $\mu$ g/L组、10  $\mu$ g/L组、50  $\mu$ g/L组、100  $\mu$ g/L组,每组设置5个复孔,同时设置空白调零孔(只含有培养液、CCK-8溶液),刺激24 h后每孔加入CCK-8溶液10  $\mu$ L,继续孵育4 h后于酶标仪上检测每孔450 nm处吸光度值,按下式将A值转换为增殖率:增殖率/(%)=[(实验-空白)-(对照-空白)]/[(对照-空白)] $\times$ 100%。

**血小板衍生生长因子DD对NRK-49F细胞增殖的时间效应:** 如血小板衍生生长因子DD对NRK-49F增殖的浓度效应研究所述重悬、接种细胞并同步化后,换用新的含体积

表1 RT-PCR引物序列

Table 1 RT-PCR primer sequences

基因	Forward primer	Reverse primer
血小板衍生生长因子βR	5'-AAT GAC CAC GGC GAT GAG A-3'	5'-TCT TCC AGT GTT TCC AGC AGC-3'
α-平滑肌肌动蛋白	5'-GGC ATC CAC GAA ACC ACC TAT-3'	5'-CCT TCT GCA TCC TGT CAG CAA-3'
GAPDH	5'-ACA AGA TGG TGA AGG TCG GTG-3'	5'-AGA AGG CAG CCC TGG TAA CC-3'

分数10%FBS培养基并加入血小板衍生生长因子DD干预, 每孔终浓度均为50 μg/L, 按照不同干预时间分为对照组, 12 h组、24 h组、48 h组, 每组5个复孔, 不同组分别培养上述时间后, 每孔加入CCK-8溶液10 μL, 继续孵育4 h后检测每孔450 nm处吸光度值, 同样方法计算细胞增殖率。

**RT-PCR检测不同质量浓度血小板衍生生长因子DD干预后血小板衍生生长因子βR、α-平滑肌肌动蛋白mRNA的表达:** 实验用对数生长期的3-8代细胞, 将细胞重悬于含体积分数10%FBS的培养基中, 取2 mL细胞悬液于6孔板中(数量约1×10<sup>5</sup>/孔), 按照上述方法同步化, 按照血小板衍生生长因子DD质量浓度分为对照组、1 μg/L组、10 μg/L组、50 μg/L组、100 μg/L组。加入不同质量浓度血小板衍生生长因子DD干预24 h后按照RNAiso Reagent说明书提取总RNA, 分光光度计测定总RNA浓度和纯度, A(260 nm)/A(280 nm)处于1.8-2.0之间符合要求。cDNA的合成采用20 μL反转录反应体系, 根据GenBank资料设计引物(见表1)。

用制备的标准品作为模板, 确定最佳反应体系和反应条件, 以GAPDH作为内参物, 进行SYBR Green-I 荧光定量PCR扩增, 总反应体系为20 μL, 其中包含SYBR Premix Ex Taq酶10 μL, cDNA 2 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各0.5 μL。PCR扩增条件: 95 °C 30 s, 95 °C、5 s, 60 °C、30 s扩增40个循环。

每0.2 °C读板1次, 绘制熔解曲线和扩增曲线, 收集数据, 结果根据2<sup>-ΔΔCt</sup>值反映出此基因在不同样本中的相对表达水平。另外取扩增产物5 μL, 在2.0%的琼脂糖凝胶上进行电泳, 紫外灯下观察。

$\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{实验组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{对照组}$ 。

**Westernblot检测不同质量浓度血小板衍生生长因子DD对血小板衍生生长因子βR、α-平滑肌肌动蛋白的蛋白表达:** 血小板衍生生长因子DD干预与分组同RT-PCR检测, 干预24 h后提取总蛋白, 蛋白提取过程于冰上操作。BCA法测定蛋白浓度, 蛋白上样量为50 μg, 逐步进行12%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳, 电泳结束后转至PVDF膜上, 脱脂牛奶封闭2 h; 一抗4 °C过夜后, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育1.5 h, 加入ECL发光剂1 mL显像, 实验重复3次。

表2 不同质量浓度血小板衍生生长因子DD刺激后NRK-49F细胞的增殖率 (n=6)

Table 2 Proliferation rate of NRK-49F cells after stimulated by platelet-derived growth factor-DD of different concentrations

组别	剂量	A(450 nm) (x±s)	增殖率(%)
对照组	0	1.102±0.062	0
血小板衍生生长因子DD组	1 μg/L	1.192±0.044 <sup>a</sup>	8.17
	10 μg/L	1.312±0.104 <sup>a</sup>	19.17
	50 μg/L	1.447±0.044 <sup>ab</sup>	31.37
	100 μg/L	1.441±0.064 <sup>ab</sup>	30.77

表注: 与对照组比较, 不同质量浓度的血小板衍生生长因子DD均可明显促进NRK-49F细胞的增殖, 50 μg/L时促NRK-49F增殖作用最强。与对照组比较, <sup>a</sup>P < 0.05; 与1 μg/L组和10 μg/L组比较, <sup>b</sup>P < 0.05。

**主要观察指标:** ①血小板衍生生长因子DD刺激正常大鼠肾成纤维细胞增殖的浓度效应及时间效应。②不同质量浓度血小板衍生生长因子DD对该细胞血小板衍生生长因子βR及α-平滑肌肌动蛋白在mRNA及蛋白水平上表达的影响。

**统计学分析:** 实验数据均以x±s表示, 采用SPSS 19.0软件进行统计分析, 组间均数比较用方差分析, 两两比较应用LSD-t 检验, P < 0.05认为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 血小板衍生生长因子DD对NRK-49F增殖的影响** 与对照组比较, 不同质量浓度的血小板衍生生长因子DD均可明显促进NRK-49F的增殖, 差异有显著性意义(P < 0.05)。1 μg/L时即可促进细胞增殖, 50 μg/L时, 其促NRK-49F增殖作用最强, 50 μg/L组与100 μg/L组比较差异无显著性意义(P > 0.05, 表2)。

此外, 与对照组相比, 血小板衍生生长因子在作用12 h时即有明显促进NRK-49F增殖的作用, 随着时间延长, 致观察终点(48 h)细胞增殖效应最大, 呈现时间依赖性(P < 0.05, 表3)。

**2.2 不同质量浓度血小板衍生生长因子DD对血小板衍生生长因子βR、α-平滑肌肌动蛋白mRNA表达的影响** 血小板衍生生长因子DD主要与血小板衍生生长因子βR结合, 仅少量结合于血小板衍生生长因子αR与其相应血小板衍生生长因子βR结合后激活信号传导通路, 产生生物学效应。α-平滑肌肌动蛋白是活化的肌成纤维细胞的特异性标志, 少见正常肾间质细胞。

与对照组比较, 各质量浓度组血小板衍生生长因子βR及α-平滑肌肌动蛋白均高于对照组(P < 0.05); 除50 μg/L组与100 μg/L组之间比较差异无显著性意义(P > 0.05)外, 其余各处理组间比较血小板衍生生长因子βR及α-平滑肌肌动蛋白表达均不同(P < 0.05)。另外, 血小板衍生生长因子DD质量浓度在1 μg/L时即可明显上调血小板衍生生长因子βR及α-平滑肌肌动蛋白的mRNA表达, 并可剂量依赖性地上调血小板衍生生长因子βR、α-平滑肌肌动蛋白的

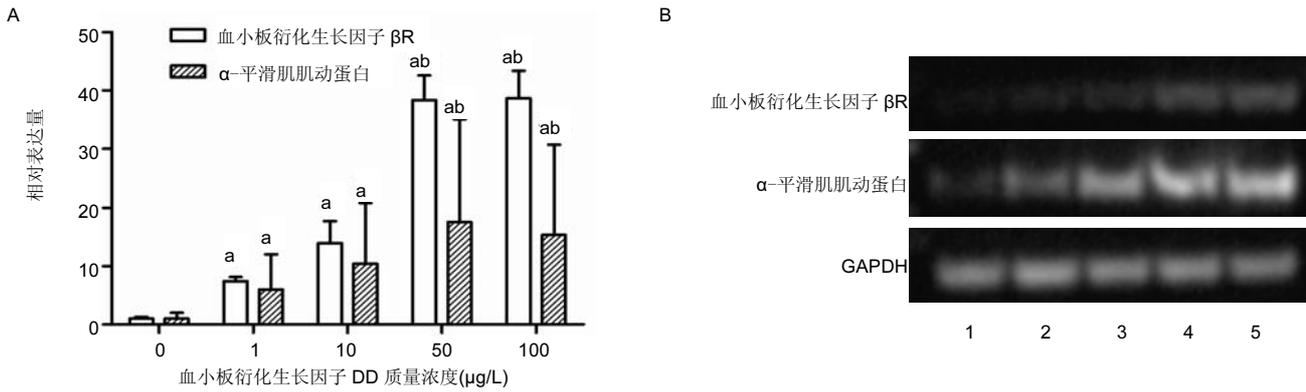


图 1 不同质量浓度血小板衍生生长因子 DD 刺激 NRK-49Fs 细胞血小板衍生生长因子  $\beta$ R 及  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 mRNA 的表达  
 Figure 1 mRNA expression of platelet-derived growth factor- $\beta$ R and  $\alpha$ -smooth muscle actin in NRK-49Fs after stimulated by platelet-derived growth factor-DD of different concentrations  
 图注: 图 A 为 RT-PCR 结果分析, 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , 与 1  $\mu$ g/L 组和 10  $\mu$ g/L 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 图 B 为 RT-PCR 产物电泳图, 1: 对照组; 2: 血小板衍生生长因子 DD 1  $\mu$ g/L 组; 3: 血小板衍生生长因子 DD 10  $\mu$ g/L 组; 4: 血小板衍生生长因子 DD 50  $\mu$ g/L 组; 5: 血小板衍生生长因子 DD 100  $\mu$ g/L 组。

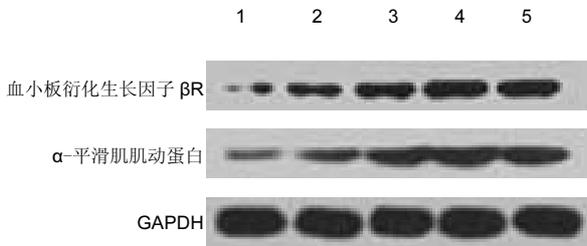


图 2 不同质量浓度血小板衍生生长因子 DD 刺激 NRK-49Fs 细胞血小板衍生生长因子  $\beta$ R 及  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白的蛋白表达  
 Figure 2 Protein expression of platelet-derived growth factor- $\beta$ R and  $\alpha$ -smooth muscle actin in NRK-49Fs after stimulated by platelet-derived growth factor-DD of different concentrations  
 图注: 1: 对照组; 2: 血小板衍生生长因子 DD 1  $\mu$ g/L 组; 3: 血小板衍生生长因子 DD 10  $\mu$ g/L 组; 4: 血小板衍生生长因子 DD 50  $\mu$ g/L 组; 5: 血小板衍生生长因子 DD 100  $\mu$ g/L 组。

mRNA 表达, 维持该通路的活化状态, 随血小板衍生生长因子 DD 质量浓度增大, 表达量逐渐增多 ( $P < 0.05$ ), 50  $\mu$ g/L 与 100  $\mu$ g/L 组比较无明显差异 (图 1A)。RT-PCR 电泳图 (图 1B) 呈现与上述一致的结果, 随血小板衍生生长因子 DD 质量浓度增大, 血小板衍生生长因子  $\beta$ R 及  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 mRNA 表达量增加, 至血小板衍生生长因子 DD 50  $\mu$ g/L 时 mRNA 表达量最大, 50  $\mu$ g/L 与 100  $\mu$ g/L 组比较差异无显著性意义。

2.3 血小板衍生生长因子 DD 对血小板衍生生长因子  $\beta$ R、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白的蛋白表达影响 与对照组相比, 血小板衍生生长因子 DD 可剂量依赖性地上调血小板衍生生长因子  $\beta$ R、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白的蛋白表达。1  $\mu$ g/L 血小板衍生生长因子 DD 即可明显上调血小板衍生生长因子  $\beta$ R 及  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白的蛋白表达, 随血小板衍生生长因子 DD 质量浓度增大, 血小板衍生生长因子  $\beta$ R 及  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白表达量逐渐增多 (图 2), 至 50  $\mu$ g/L 时血小板衍生生长因子  $\beta$ 、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白表达最多, 50  $\mu$ g/L 与

表 3 血小板衍生生长因子 DD 剂量 50  $\mu$ g/L 刺激不同时间后 NRK-49F 的增殖率 (n=6)  
 Table 3 Proliferation rate of NRK-49F cells after stimulated by 50  $\mu$ g/L platelet-derived growth factor-DD for different time

组别	时间	A(450 nm) ( $\bar{x} \pm s$ )	增殖率 (%)
对照组		1.132 $\pm$ 0.098	0
50 $\mu$ g/L 血小板衍生生长因子 DD 组	12 h	1.276 $\pm$ 0.036 <sup>ab</sup>	12.70
	24 h	1.416 $\pm$ 0.032 <sup>ab</sup>	25.07
	48 h	1.503 $\pm$ 0.063 <sup>ab</sup>	32.79

表注: 随着时间延长, 细胞增殖效应越大, 呈现时间依赖性。与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 各时间点间比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

100  $\mu$ g/L 组比较无明显差异。

### 3 讨论 Discussion

肾间质纤维化是以肾小管萎缩或扩张, 肾间质炎性细胞浸润, 肌成纤维细胞形成与积聚以及细胞外基质在肾间质中过度沉积为特征的不可逆的发展过程<sup>[7]</sup>, 被认为是比肾小球硬化更能引起肾脏功能不断恶化的驱动力量<sup>[8]</sup>。肌成纤维细胞是肾间质中过度积聚的细胞外基质的主要来源<sup>[5-9]</sup>。阐明肌成纤维细胞的活化机制并以此为靶目标实施干预, 是目前阻遏肾间质纤维化的重要研究内容。

血小板衍生生长因子家族是强有力的促有丝分裂剂, 属于细胞生长因子范畴, 包括血小板衍生生长因子 AA、AB、BB、CC、DD 5 种亚型及血小板衍生生长因子  $\alpha$ 、 $\beta$  两种受体<sup>[6-10]</sup>。血小板衍生生长因子最先在血小板  $\alpha$  颗粒中发现, 血小板衍生生长因子 DD 是较晚发现的一种亚型, 其主要与血小板衍生生长因子  $\beta\beta$  受体结合, 也可少量结合于血小板衍生生长因子  $\alpha\beta$  受体。

在人类正常肾脏中, 血小板衍生生长因子 DD 主要由系膜细胞、血管平滑肌细胞、小管上皮细胞等表达, 当组织

受到损伤后, 这些细胞可过量表达血小板衍化生长因子DD并通过自分泌或者旁分泌形式发挥作用, 与相应合成增多的受体相结合后, 通过激活下游信号通路, 导致肾间质纤维化的发生、发展<sup>[11-12]</sup>。

本课题前期研究发现, 在建立单侧输尿管梗阻(UUO)模型3 d后大鼠肾脏中, 血小板衍化生长因子DD即可表达于肾间质, 尤以萎缩、膨胀的肾小管周围显著, 并随梗阻时间延长表达增多<sup>[11]</sup>, 证实在肾间质纤维化早期即有血小板衍化生长因子DD参与, 随着肾纤维化程度的加重, 其作用更加显著。

Ostendorf等<sup>[12]</sup>提出血小板衍化生长因子DD可以促进肾小球系膜细胞增殖。本实验通过细胞培养发现, NRK-49F在受到不同质量浓度血小板衍化生长因子DD刺激后, 呈现浓度依赖性的细胞增殖表现, 另外给予血小板衍化生长因子DD干预12 h后, NRK-49F即呈现明显增殖, 并呈现时间依赖性, 致观察终点48 h时, 细胞增殖率最大。说明血小板衍化生长因子DD在肾间质纤维化早期即可发挥促进NRK-49F增殖的作用, 并随肾间质纤维化时间延长, 细胞数量不断增加。

血小板衍化生长因子 $\beta$ R正常情况下仅少量表达于系膜细胞、间质细胞、肾小球上皮细胞等, 血小板衍化生长因子DD与血小板衍化生长因子 $\beta$ R结合后, 主要通过PI3-K、Ras-MAPK、PLC、JAK-STAT等信号通路发挥生物学效应。

本实验发现应用1  $\mu$ g/L血小板衍化生长因子DD刺激细胞, 即出现血小板衍化生长因子 $\beta$ R mRNA水平及蛋白水平的明显提高, 随着血小板衍化生长因子DD干预质量浓度增大, 血小板衍化生长因子 $\beta$ R表达增强。说明血小板衍化生长因子DD可上调血小板衍化生长因子 $\beta$ R表达并与之结合, 进而通过血小板衍化生长因子DD/血小板衍化生长因子 $\beta$ R信号转导通路的激活促进NRK-49F的增殖与活化。

生理状态下, 肾固有纤维细胞主要存在于肾间质中并维持间质及邻近组织的动态平衡(细胞增殖、细胞外基质分泌等), 多种因素可刺激固有纤维细胞活化, 使之转变为肌成纤维细胞<sup>[13]</sup>。活化的肌成纤维细胞可侵入肾小球及肾小管周围区域, 获得更强的细胞增殖和分泌细胞外基质的能力, 成为肾间质纤维化过程中细胞外基质的主要来源, 因兼具平滑肌细胞的特性而具有收缩性<sup>[14]</sup>。

$\alpha$ -平滑肌肌动蛋白是肌成纤维细胞的特异性标志物, 被认为是判断肾间质纤维化的发生、发展和多种慢性肾脏病预后的重要指标。与固有纤维细胞相比, 肌成纤维细胞除了细胞外基质表达增加、细胞外基质降解酶合成减少之外, 最显著的差异在于其表达 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白明显高于固有纤维细胞<sup>[15-16]</sup>。另外, 一些IgA肾病、糖尿病肾病、肾移植后排斥、新月体肾炎的研究证实肌成纤维细胞的出现、持续存在、数量以及 $\alpha$ -平滑肌

肌动蛋白的表达量直接影响肾间质纤维化的程度, 并呈现正相关。 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白表达越多, 肾功能下降的速度越快, 预后越差<sup>[17]</sup>。

对经典单侧输尿管梗阻模型(UUO)肾间质纤维化初始阶段固有纤维细胞的归宿研究发现, UUO模型建立后第1天大鼠肾脏固有纤维细胞表达 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白, 随着时间延长, 逐渐获得肌成纤维细胞表型, 细胞增殖分裂速度明显增加。

本实验通过体外研究发现,  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白在mRNA及蛋白表达水平上均随血小板衍化生长因子DD刺激质量浓度的增大而不断增加, 在1  $\mu$ g/L水平即可出现明显统计学差异, 提示血小板衍化生长因子DD可剂量依赖性的刺激固有纤维细胞向肌成纤维细胞转变, 加速了肾间质纤维化的发展。因其肾脏病早期即可明显增加, 早前即有人提出可以将 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白作为监测慢性肾脏疾病发生的重要指标<sup>[18]</sup>。

通过本实验可以明确的是在肾间质纤维化发生、发展过程中, NRK-49F血小板衍化生长因子DD/血小板衍化生长因子 $\beta$ R信号通路是一条重要的促纤维化途径, 因而通过阻断这一转导途径, 可降低固有纤维细胞的增殖、向肌成纤维细胞的转化, 减少细胞外基质的沉积, 从而延缓肾间质纤维化的发展。

Boor等<sup>[19]</sup>首次发现应用血小板衍化生长因子DD特异性抗体CR002可显著降低血小板衍化生长因子DD所致NRK-49F增殖及I、III型胶原等细胞外基质表达, 但CR002对血小板衍化生长因子BB无明显拮抗作用。然而, CR002虽可下调大鼠血小板衍化生长因子DD的表达, 但对于血小板衍化生长因子 $\beta$ 受体无明显抑制作用。

另外, 早期的一项研究表明, 曲匹地尔作为一种非特异性的血小板衍化生长因子拮抗药物, 使得肾毒性肾炎的兔子模型或者缺血再灌注的大鼠模型的肾脏损伤更为严重, 表现出明显的肾毒副作用<sup>[20]</sup>。一些血小板衍化生长因子受体的酪氨酸激酶抑制剂疗效也并非理想, 几乎所有的酪氨酸激酶拮抗剂仅仅是相对地对于血小板衍化生长因子信号通路的拮抗有一定疗效, 例如像伊马替尼这类药物主要还是发挥拮抗c-Abl激酶的作用, 而对于酪氨酸激酶的抑制作用相对较弱<sup>[20]</sup>, 就其所带来的心肌毒性以及其作为多靶点酪氨酸激酶拮抗剂潜在的肾毒性来说, 这些副反应确实阻碍了该类药物在临床治疗肾纤维化中的广泛应用<sup>[21]</sup>。

因此, 寻找更为有效且靶向作用强的血小板衍化生长因子DD/血小板衍化生长因子 $\beta$ R信号通路阻断剂成为当下研究的难题。本课题前期研究已证实丹参酮II A磺酸钠与依那普利治疗可抑制大鼠肾组织中血小板衍化生长因子DD表达, 并使对肾脏具有保护作用的血红素加氧酶1表达量上调, 从而抑制肾纤维化的进展<sup>[22]</sup>, 另有研究表明丹参酮II A磺酸钠可抑制肾间质纤维化来源的成纤维细胞的体

外增殖<sup>[23]</sup>, 提示或许在中医中药领域也可以获得更为有效的延缓肾间质纤维化发展的治疗方法。

**致谢:** 感谢课题组所有成员对本实验的帮助。

**作者贡献:** 实验设计、评估主要由通讯作者孙建平完成; 实验实施、资料收集主要由第一作者赵佳完成; 在实验实施过程中得到高延霞、唐妮娜、牛蒙、崔萌、韩晓庆、隋爱华的帮助。文章主要由赵佳撰写, 孙建平负责审校, 并对文章负责。由于孙建平与赵佳对文章及实验贡献相同, 为并列第一作者。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 没有与相关伦理道德冲突的内容。

**学术术语:** 血小板衍生生长因子-是贮存于血小板 $\alpha$ 颗粒中的一种碱性蛋白质。是低分子量促细胞分裂素。血小板衍生生长因子家族包括血小板生长因子(血小板衍生生长因子)和血管内皮因子。每种生长因子均可由多种细胞产生, 其受体均为酪氨酸激酶(RTK)型受体。血小板衍生的生长因子家族成员包括: 血小板衍生生长因子A、血小板衍生生长因子B、血小板衍生生长因子C、血小板衍生生长因子D、胎盘生长因子(Placental growth factor, PGF)以及血管内皮生长因子血管内皮生长因子、血管内皮生长因子41、血管内皮细胞因子B、血管内皮细胞因子C、FIGF(血管内皮生长因子D)等。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] Nicolas P, Oliver B, Alexander V, et al. Origin of renal myofibroblasts in the model of unilateral ureter obstruction in the rat. *Histochem Cell Biol.*2008;130:141-155.
- [2] Chuang PY, Memon MC, He JC. Molecular targets for treatment of kidney fibrosis. *J Mol Med.*2013;91:549-559.
- [3] Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.*2012;18(7):1028-1040.
- [4] Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *J Pathol.*2008; 214(2):199-200.
- [5] 叶琨,刘伏友,刘映红.肾间质纤维化发生机制的研究进展[J]. 国外医学泌尿系统分册, 2005,1(1):94-98.
- [6] Ostendorf T, Eitner F, Floege J. The PDGF family in renal fibrosis. *Pediatr Nephrol.*2012; 27:1041-1050.
- [7] Ina K, Kitamura H, Tatsukawa S, et al. Significance of  $\alpha$ -SMA in myofibroblasts emerging in renal tubulointerstitial fibrosis. *Histol Histopathol.*2011; 26(7):1041-1050.
- [8] Zeisberg M, Strutz F, Müller GA. Renal fibrosis: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens.*2001;10(3):315-320.
- [9] Farris AB, Colvin RB. Renal interstitial fibrosis: mechanisms and evaluation. *Curr Opin Nephrol Hypertens.*2012;21(3):289-300
- [10] van Roeyen CR, Ostendorf T, Floege J. The platelet-derived growth factor system in renal disease: an emerging role of endogenous inhibitors. *Eur J Cell Biol.* 2012, 91:542-551.
- [11] 张倩倩,孙建平,高延霞,等.单侧输尿管梗阻模型大鼠肾间质纤维化过程中血小板衍生生长因子D的表达[J].中国组织工程研究与临床康复, 2011,15(24):4444-4447.
- [12] Ostendorf T, van Roeyen CR, Peterson JD, et al. A fully human monoclonal antibody (CR002) identifies PDGF-D as a novel mediator of mesangioproliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.*2003;14(9):2237-2247.
- [13] Hu K, Lin L, Tan X, et al. tPA protects renal interstitial fibroblasts and myofibroblasts from apoptosis. *J Am Soc Nephrol.*2008;19(3):503-514.
- [14] Hinz B. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *J Biomech.* 2010;43(1):146-155.
- [15] Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen.* 2005;13(1):7-12.
- [16] Hinz B, Plan SH, Thannickal VJ, et al. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol.*2007; 170(6): 1807-1816.
- [17] Yang J, Dai C, Liu Y. A novel mechanism by which hepatocyte growth factor blocks tubular epithelial to mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol.*2005;16(1):68-78.
- [18] Badid C, Vincent M, Fouque D. Myofibroblast: a prognostic marker and target cell in progressive renal disease. *Ren Fail.*2001; 23(3-4):543-549.
- [19] Boor P, Konieczny A, Villa L, et al. PDGF-D inhibition by CR002 ameliorates tubulointerstitial fibrosis following experimental glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* Nephrol Dial Transplant.2007; 24(25):1323-1331.
- [20] Floege J, Eitner F, CE A. A new look at platelet-derived growth factor in renal disease. *J Am Soc Nephrol.*2008; 19(1):12-23.
- [21] Jhaveri KD, Flombaum CD, Kroog G. Nephrotoxicities associated with the use of tyrosine kinase inhibitors: a single-center experience and review of the literature. *Nephron Clin Pract.*2011;117(4):c312-c319.
- [22] 吕彦洁,孙建平,高延霞,等.丹参酮IIA磺酸钠对大鼠肾间质纤维化的影响及机制探讨[J].山东医药,2014,54(10):30-32.
- [23] 孙兴旺,曹灵,于国华,等.丹参酮IIA磺酸钠对纤维化间充质成纤维细胞体外增殖及cyclin E蛋白表达的影响[J].第三军医大学学报,2007,29(7):585-587.