

RACK1 在肾脏纤维化中的作用*

冯婕¹ 孔冉冉² 解立怡¹ 余晓洋¹ 张亚莉¹

(1. 西安交通大学第一附属医院, 陕西 西安 710061; 2. 西安交通大学第二附属医院, 陕西 西安 710004)

【摘要】 目的 探讨活化的蛋白激酶 C 受体 1(RACK1)在肾纤维化中的作用。方法 选取 2017~2019 年西安交通大学第一附属医院住院肾肿瘤患者行肾切除后的正常肾组织 12 例;另选取同期经肾穿刺活检证实存在肾纤维化的患者 10 例。qRT-PCR 及 Western blot 分别检测正常肾组织和肾纤维化组织中 RACK1 的 mRNA 及蛋白水平,并比较两者间的差异;观察 RACK1 在转化生长因子 β 1(TGF- β 1)处理人近端肾小管上皮细胞(HK-2)中的作用。结果 与正常肾组织比较,肾纤维化组织中 RACK1 的蛋白及 mRNA 水平均明显上调,差异有统计学意义($P<0.05$);TGF- β 1 处理的 HK-2 细胞中 RACK1 的蛋白及 mRNA 水平明显上调,且具有时间依赖性($P<0.05$)。结论 RACK1 可能参与并促进了肾纤维化的过程,其可能成为一种新的肾纤维化调节子。

【关键词】 活化的蛋白激酶 C 受体 1;肾纤维化;转化生长因子 β 1

【中图分类号】 R692.9;R737.11 **【文献标志码】** A **doi:**10.3969/j.issn.1672-3511.2020.11.004

Mechanism of RACK1 in renal fibrosis

FENG Jie¹, KONG Ranran², XIE Liyi¹, YU Xiaoyang¹, ZHANG Yali¹

(1. The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China;

2. The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China)

【Abstract】 Objective To investigate the role of RACK1 (receptor for activated C-kinase 1) in renal fibrosis. **Methods** Western blot and qRT-PCR were used to detect the expression of RACK1 in normal renal tissue and renal fibrosis tissue. RACK1 was observed in human proximal tubular epithelial cells (HK-2) treated by transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1). **Results** In renal fibrosis tissues, RACK 1 protein and RNA level were significantly increased. Compared to control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). RACK1 protein and RNA level in HK-2 cells treated by TGF- β 1 were significantly up-regulated, and were time-dependent. The protein level of RACK1 in renal fibrosis tissue and HK-2 cells treated by TGF- β 1 was significantly up-regulated, and the level of RACK1 mRNA was significantly higher than that of control group. **Conclusion** RACK1 was significantly elevated in renal fibrosis tissue and HK-2 cells treated by TGF- β 1. RACK1 gradually increased as time progresses. RACK1 may participate in and promote the process of renal fibrosis and may become a new regulator of renal fibrosis.

【Key words】 Receptor for activated C kinase 1; Renal fibrosis; TGF- β 1

肾纤维化是所有进展至终末期肾衰竭的慢性肾脏疾病的一种病理生理改变,其以肾脏成纤维细胞的激活及大量细胞外基质蓄积为特点^[1-2]。活化的蛋白激酶 C 受体 1(receptor for activated C kinase 1, RACK1)是 WD40 重复蛋白家族中一员,参与肝纤维化的进展。但 RACK1 在肾纤维化中的作用仍不清楚。因此,本研究旨在观察 RACK1 在正常肾组织和

肾纤维化组织中表达的异同,阐明 RACK1 是否参与肾纤维化过程及其可能的作用。

1 材料与方法

1.1 标本收集 肾组织标本分别取自于 2017~2019 年西安交通大学第一附属医院住院肾肿瘤患者行肾切除后的正常肾组织 12 例;结合临床及实验室检查,选取双肾大小正常,24 小时尿蛋白定量大于 3.5 g/d,CKD4 期(eGFR 在 15~29 mL/min)患者,排除肾穿刺活检的禁忌证,经肾穿刺活检证实存在肾纤维化的患者 10 例。肾组织标本被立即储存在-80℃中备用。

基金项目:陕西省自然科学基金研究计划一般项目(面上)(2017JM8046;2018JM7120)

通信作者:张亚莉, E-mail:619386343@qq.com

本研究经由西安交通大学第一附属医院伦理委员会批准,并与所有参与者签署知情同意书。

1.2 细胞与试剂 人近端肾小管上皮细胞(HK-2)购自于美国 American Type Cell Collection (ATCC, Manassas, VA)。一抗 RACK1 购自于英国 Abcam 公司,抗-GAPDH 购自于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司。

1.3 方法 Western blot 及 qRT-PCR 分别检测健康肾组织、肾纤维化组织以及 TGF- β 1 处理 HK-2 细胞中 RACK1 的蛋白及 mRNA 表达水平,并比较两者间的差异。

1.3.1 qRT-PCR 检测 RACK1 的 RNA 水平 Trizol 提取肾组织块中的总 RNA。SuperScript II 反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA。ABI-Prism 7500 行实时定量 PCR。引物见表 1。循环条件:预变性 95 $^{\circ}$ C, 15 min, 59 $^{\circ}$ C, 30 min, 35 个循环,延伸温度 72 $^{\circ}$ C, 10 min。 β -actin 为内参, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算相关基因的表达。

1.3.2 Western blot 检测 RACK1 蛋白水平 肾组织块中提取总蛋白,剪碎肾组织,用含有蛋白酶抑制剂的裂解液裂解组织,用玻璃匀浆器(冰上进行)充分匀浆,裂解 1 h 后,12000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 离心 5 min, 取上清。BCA 试剂盒测定蛋白浓度。10% SDS-PAGE 分离蛋白,转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶 PBST 液室温下封闭非特异抗原 1 h,用一抗 RACK1 (1:1000 稀释, ab62735), 抗-GAPDH (1:1000 稀释, sc47724), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜,辣根过氧化物酶标记二抗孵育。Gel-Pro Analyzer version 4.0 软件测定靶蛋白吸收值。

表 1 qRT-PCR 的引物序列

Table 1 The primer sequence of qRT-PCR

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
RACK1	TTTCCTCTGACAACCG GCA	GCCATCCTTGCCCTCCAG AA
β -actin	GGCAAATCAACGGCA CAGTC	GCTGACAATCTTGAGT GAGTT

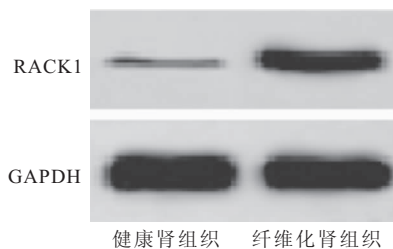


图 2 RACK1 在健康肾组织和纤维化肾组织中的蛋白表达变化

Figure 2 Changes of RACK1 protein expression between healthy renal tissues and fibrotic renal tissues

注:A. Western blot 检测 RACK1 蛋白表达量;B. Image J 软件定量分析比较;与健康肾组织比较,① $P < 0.05$

1.3.3 人近端肾小管上皮细胞(HK-2)的培养和处理 HK-2 细胞被置于加有 5% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素, 100 mg/mL 链霉素的 DMEM 培养基中, 孵育在含有 5% CO_2 的培养箱中。HK-2 细胞被接种于 6 孔板中, 24 h 后约 70% 融合, 用无血清的培养基培养 24 h, 用重组 TGF- β 1 5 ng/mL 孵育 0、3、6、12、24 h。Trizol 提取 HK-2 细胞的总 RNA。SuperScript II 反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA。ABI-Prism 7500 行实时定量 PCR。提取 HK-2 细胞总蛋白, 用抗 RACK1 (1:1000 稀释, ab62735), 抗-GAPDH (1:1000 稀释, sc47724), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗膜, 辣根过氧化物酶标记二抗孵育。Gel-Pro Analyzer version 4.0 软件测定靶蛋白吸收值。

1.4 统计学分析 应用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾纤维化组织中 RACK1 mRNA 表达水平 与健康肾组织比较, 肾纤维化组织中 RACK1 mRNA 水平明显增高($P < 0.05$), 见图 1。

2.2 肾纤维化组织中 RACK1 蛋白水平 与健康肾组织比较, 肾纤维化组织中 RACK1 的蛋白水平明显上调($P < 0.05$), 见图 2。

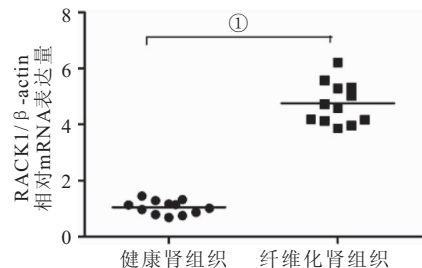


图 1 RACK1 在健康肾组织和纤维化肾组织中的 mRNA 表达变化

Figure 1 Changes of RACK1 mRNA expression between healthy renal tissues and fibrotic renal tissues

注:与健康肾组织比较,① $P < 0.05$

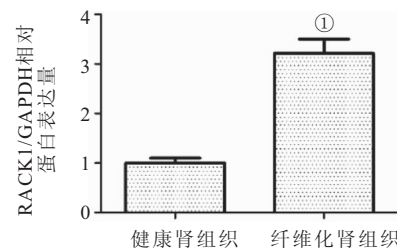


图 2 RACK1 在健康肾组织和纤维化肾组织中的蛋白表达变化

Figure 2 Changes of RACK1 protein expression between healthy renal tissues and fibrotic renal tissues

注:A. Western blot 检测 RACK1 蛋白表达量;B. Image J 软件定量分析比较;与健康肾组织比较,① $P < 0.05$

2.3 TGF-β1 处理 HK-2 细胞中 RACK1 的 mRNA 表达水平 与 0 h 比较, TGF-β1 处理 HK-2 细胞后 RACK1 的 mRNA 水平升高, 6 h 时开始升高, 24 h 时最高(P<0.05), 见图 3。

2.4 TGF-β1 处理 HK-2 细胞中 RACK1 蛋白水平 与 0 h 比较, TGF-β1 处理 HK-2 细胞中 RACK1 蛋白明显上调, 且具有时间依赖性(P<0.05), 见图 4。

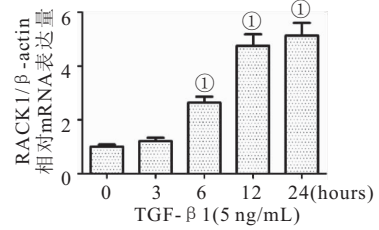


图 3 RACK1 在 TGF-β1 刺激 HK2 细胞不同时间点 RACK1 的 mRNA 表达变化

Figure 3 Changes of RACK1 mRNA expression in the HK2 cells with absence or presence of TGF-β1 (5ng/mL) for various periods of time

注:与 0 h 比较, ①P<0.05

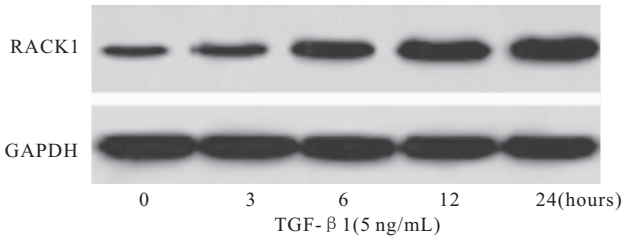
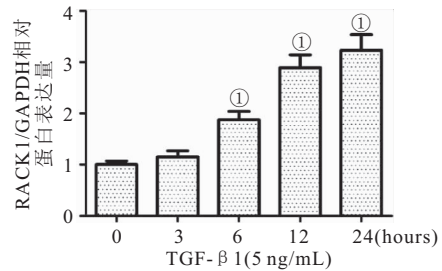


图 4 RACK1 在 TGF-β1 HK2 细胞不同时间点的 RACK1 蛋白水平

Figure 4 Changes of RACK1 protein expression in the HK2 cells with absence or presence of TGF-β1 (5ng/mL) for various periods of time

注:与 0 h 比较, ①P<0.05



3 讨论

色氨酸-天冬氨酸 40(WD40)重复蛋白是一种高度保守的蛋白大家族,参与各种生物过程,包括信号转导、基因转录调节、蛋白修饰、细胞骨架重塑、囊泡运输、DNA 损伤与修复、细胞死亡、细胞周期的调控^[3-4]。RACK1 是 WD40 重复蛋白家族一员,其参与多种疾病的进展^[5-8]。研究表明 RACK1 过表达抑制成年鼠心肌缺血再灌注的心肌细胞凋亡^[9]。RACK1 下调可抑制食管鳞状细胞癌体外和体内实验中细胞增殖、侵袭及转移^[10]。也有研究报道 RACK1 能促进 TGF-β1 调节前纤维通路的激活和肝星状细胞(HSCs)的转分化、增殖和迁移, TGF-β1 通过激活 NF-κb 通路引起 RACK1 表达升高,参与肝脏纤维化, RACK1 敲除后抑制硫代乙酰胺诱导的肝纤维化^[11-12]。

正常人的 RNA-seq 数据提示 RACK1 在肾组织中有表达^[13],进一步查询 Nephroseq 数据库提示 RACK1 随肾小球滤过率的下降而升高^[14]。糖尿病肾病中 RACK1 肾小管的表达高于肾小球^[15],说明 RACK1 与肾小管病变、肾脏纤维化密切相关。目前 RACK1 在肾纤维化中的作用鲜见文献报道。

肾纤维化以肾小管间质纤维化、肾小球硬化、肾实质丧失和炎症细胞浸润为特征,是慢性肾脏病的最终表现^[16]。在肾纤维化中, TGF-β1 是调节肾小管上

皮细胞分化为肌成纤维细胞最重要的生长因子^[17]。文献报道,在肾纤维化的动物模型和肾小球肾炎的患者中 TGF-β1 高度表达^[18-19]。因此本实验采用 TGF-β1 刺激人 HK-2 细胞进一步观察 RACK1 在肾纤维化中的作用。

RACK1 在激活的肝星形细胞表达增加^[20]。RACK1 也被发现参与皮肤的纤维化, RACK1 在瘢痕纤维母细胞中表达明显下降^[21]。因此, RACK1 是促纤维化还是抗纤维化依赖于细胞的类型和环境。本实验研究结果显示, RACK1 在人肾纤维化组织中的表达明显升高,说明 RACK1 参与肾纤维化的过程。为进一步明确其机制,通过采用 TGF-β1 刺激 HK-2 细胞,在 RNA 和蛋白水平上证实 RACK1 明显上调,且具有时间依赖性,说明 RACK1 可能参与并促进肾纤维化的进展,为下一步明确其机制奠定了基础。

4 结论

RACK1 可能作为一种肾纤维化的新调节子,参与并促进了肾纤维化的发生、发展。

【参考文献】

[1] BOOR P, OSTENDORF T, FLOEGE J. Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets[J]. Nature Reviews Nephrology, 2010, (6): 643-656.

[2] 孟晓明, 蓝辉耀. 转化生长因子-β与肾脏纤维化的研究进展[J]. 生理学报, 2018, 70(6): 612-622.

- [3] ZHANG C, ZHANG F. The Multifunctions of WD40 Proteins in Genome Integrity and Cell Cycle Progression[J]. Journal of genomics, 2015,(3): 40-50.
- [4] 郑舒丹,程诗萌,董亚兵,等. RACK1 与肿瘤细胞的侵袭和转移相关性研究进展[J]. 中国美容整形外科杂, 2019, 30(8): 500-511.
- [5] KIELY PA, SANT A, O'CONNOR R. RACK1 is an insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor-interacting protein that can regulate IGF-1-mediated Akt activation and protection from cell death[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002,(277): 22581-22589.
- [6] BERNS H, HENGERER B, KIEFER F N, *et al.* RACK1 is up-regulated in angiogenesis and human carcinomas [J]. The FASEB Journal, 2000,(14):2549-2558.
- [7] BATTAINI F, PASCALE A, PAOLETTI R, *et al.* The role of anchoring protein RACK1 in PKC activation in the ageing rat brain[J]. Trends in neurosciences, 1997,(20):410-415.
- [8] NIELSEN M H, FLYGAARD R K, JENNER L B. Structural analysis of ribosomal RACK1 and its role in translational control [J]. Cell Signal, 2017, 35:272-281.
- [9] QIAN L, SHI J, ZHANG C, *et al.* Downregulation of RACK1 is associated with cardiomyocyte apoptosis after myocardial ischemia/reperfusion injury in adult rats[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 2016, 52(3): 305-313.
- [10] WANG N, LIU F, CAO F, *et al.* RACK1 predicts poor prognosis and regulates progression of esophageal squamous cell carcinoma through its epithelial-mesenchymal transition[J]. Cancer biology & therapy, 2015, 16(4): 528-540.
- [11] JIA D, DUAN F, PENG P, *et al.* Up-regulation of RACK1 by TGF- β 1 promotes hepatic fibrosis in mice[J]. PloS one, 2013, (8): e60115.
- [12] LIU M, PENG P, WANG J, *et al.* RACK1 mediated teanslation control promotes liver fibrogenesis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 463(3):255-261.
- [13] FACERBERG L, HALLSTRÖM B M, OKSVOLD P, *et al.* Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics [J]. Mol Cell Proteomics, 2014, 13(2):397-406.
- [14] JU W, NAIR V, SMITH S, *et al.* Tissue transcriptome-driven identification of epidermal growth factor as a chronic kidney disease biomarker[J]. Sci Transl Med, 2015, 7(316):316ra193.
- [15] NA J, SWEETWYNE M T, PARK A S, *et al.* Diet-Induced Podocyte Dysfunction in Drosophila and Mammals[J]. Cell Rep, 2015, 12(4):636-647.
- [16] 杨萍芬,牛艳芬. TGF- β 1/Smad 信号通路在组织纤维化中的研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2019, 46(10):738-744.
- [17] STAHL P J, FELSEN D. Transforming growth factor- β , basement membrane, and epithelial-mesenchymal transdifferentiation: implications for fibrosis in kidney disease[J]. The American journal of pathology, 2001, 159(4): 1187-1192.
- [18] LÓPEZ-HERNÁNDEZ F J, LÓPEZ-NOVOA J M. Role of TGF- β in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects[J]. Cell and tissue research, 2012, 347(1): 141-154.
- [19] 贾利宁,马晓桃,杨阳. Sorafenib 通过抑制 TGF - β /Smad 途径延缓肾纤维化的研究[J]. 西安交通大学学报, 2016, 3(3): 378-382.
- [20] 颜小明,张立婷,李敏,等. TGF- β 1/Smad 信号通路在肝纤维化中的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(9):1778-1781.
- [21] ZHOU P, SHI L, LI Q, *et al.* Overexpression of RACK1 inhibits collagen synthesis in keloid fibroblasts via inhibition of transforming growth factor- β 1/Smad signaling pathway[J]. International journal of clinical and experimental medicine. 2015, 8(9): 15262-15268.

(收稿日期:2019-10-22;修回日期:2020-08-25;编辑:黎仕娟)