

17 β -雌二醇与氟维司群抑制蛋白激酶 C 刺激下系膜细胞纤维化

李一辰^{1,2}, 史传林², 丁选胜^{2*}

(¹南京大学医学院附属鼓楼医院药学部, 南京 210008; ²中国药科大学基础医学与临床药学院, 南京 211198)

摘要 为确定雌激素受体(ER)激动剂 17 β -雌二醇与 G 蛋白偶联雌激素受体(GPER)激动剂氟维司群在蛋白激酶 C (PKC)激活时对系膜细胞纤维化影响,本研究利用十四烷酰佛波醇乙酸酯(PMA)短期刺激以模拟激活 PKC,导致 IV 型胶原、纤连蛋白、结缔组织生长因子、转化生长因子- β 1 的基因转录水平上调至基线的 2.5 ± 0.5 、 1.4 ± 0.2 、 26 ± 11 和 1.9 ± 0.3 倍($P < 0.05$),而 17 β -雌二醇及氟维司群可显著抑制上述基因转录水平的上调($P < 0.05$),并通过抑制 Akt 磷酸化阻碍 PKC 下游信号;同时,应用受体抑制剂及基因敲低技术,可明确 17 β -雌二醇及氟维司群对上述基因表达、信号通过的影响依赖于 ER/GPER 的激活。研究表明,ER 与 GPER 激动剂可发挥肾小球保护功能,抑制肾小球系膜细胞在 PKC 激活后过度表达促纤维化因子及无用的细胞外基质。

关键词 雌激素受体; 17 β -雌二醇; 氟维司群; 蛋白激酶 C; 肾小球系膜细胞

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2017)02-0208-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170212

引用本文 李一辰,史传林,丁选胜. 17 β -雌二醇与氟维司群抑制蛋白激酶 C 刺激下系膜细胞纤维化[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(2):208-213.

Cite this article as: LI Yichen, SHI Chuanlin, DING Xuansheng. 17 β -Estradiol and fulvestrant inhibit glomerular mesangial cell fibrogenesis downstream of protein kinase C activation[J]. J China Pharm Univ, 2017, 48(2):208-213.

17 β -Estradiol and fulvestrant inhibit glomerular mesangial cell fibrogenesis downstream of protein kinase C activation

LI Yichen^{1,2}, SHI Chuanlin², DING Xuansheng^{2*}

¹Department of Pharmacy, Nanjing Drum Tower Hospital Affiliated to Nanjing University Medical School, Nanjing 210008; ²Department of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract To investigate the effect of estrogen receptor (ER) agonist 17 β -estradiol and G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) agonist fulvestrant on mesangial cell fibrogenesis under protein kinase C (PKC), we quantified type IV collagen (COL4A1), fibronectin (FN1), connective tissue growth factor (CTGF) and transforming growth factor- β 1 (TGF β 1) gene transcription and semi-quantified phosphorylation of Akt signal upon Phorbol 12-myristate 13-acetate stimulation (which increased COL4A1, FN1, CTGF and TGF β 1 gene transcription to 2.5 ± 0.5 , 1.4 ± 0.2 , 26 ± 11 and 1.9 ± 0.3 times compared with baseline, $P < 0.05$) when incubated with the two drugs. It was found that 17 β -estradiol and fulvestrant down-regulated COL4A1, FN1, CTGF and TGF β 1 genes transcription ($P < 0.05$) and Akt signaling under PKC activation via ER and GPER. ER and GPER agonists are beneficial in protecting the mesangial cells from fibrogenic stimuli by inhibiting PKC signaling and excessive extracellular matrix production.

Key words estrogen receptors; 17 β -estradiol; fulvestrant; protein kinase C; glomerular mesangial cell

This study was supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81274158); the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 021414380053)

肾小球系膜细胞结构功能变化贯穿慢性肾脏疾病 (chronic kidney disease, CKD) 的全过程。在有害刺激下,蛋白激酶 C (PKC) 激活下游 Akt (又称蛋白激酶 B, PKB) 蛋白磷酸化、上调转化生长因子 (TGF)- β 表达^[1], 从而导致结缔组织生长因子 (CTGF) 及细胞外基质 (ECM) 如 IV 型胶原和纤连蛋白的过度合成与分泌; 上述促纤维化刺激形成恶性循环, ECM 逐步替代正常肾脏组织, 肾脏逐步失去功能^[2]。

雌激素具有一定的肾脏保护作用, 也间接导致了 CKD 发生、发展、预后中的性别差异^[3]。17 β -雌二醇是经典雌激素受体 (ER) 的天然底物, 17 β -雌二醇及选择性雌激素受体调节剂可通过激活 ER, 防止化学或机械性刺激下的系膜细胞结构功能改变^[4-5]; 同时, 考虑到上述药物亦可激活另一种雌激素受体——G 蛋白偶联雌激素受体 (GPER)^[6], 可推测, GPER 也可能部分地参与了系膜细胞结构功能的保护作用。前期研究表明, 植物雌激素可通过 GPER 依赖的方式抑制在高糖水平或 TGF- β 刺激下肾小球系膜细胞外基质的过度合成^[7-8], 但上述两种雌激素受体激活对高糖刺激下游如 PKC 信号与靶基因的影响尚不明确。

本研究采用短时十四烷酰佛波醇乙酸酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 刺激激活 PKC^[9], 观察 ER 激动剂 17 β -雌二醇、GPER 激动剂/ER 下调剂氟维司群^[10] 处理系膜细胞后对其 PKC 下游信号及纤维化相关基因表达的影响, 说明 ER 与 GPER 在该作用中的贡献, 进一步阐述雌激素保护肾小球系膜细胞作用机制。

1 材 料

1.1 试 剂

17 β -雌二醇、GPER 拮抗剂 G-15 (英国 Tocris 公司); 十四烷酰佛波醇乙酸酯、氟维司群 (美国西格玛奥德里奇公司); GPER siRNA、ER α siRNA 及阴性对照 siRNA (美国圣克鲁斯生物技术公司); PepMuteTM siRNA 转染试剂 (美国 SignaGen Laboratories 公司); Phospho-Akt (Ser473) 兔多抗、Akt 兔多抗、TGF- β 兔多抗 (美国 Cell Signaling Technology 公司); β -actin 小鼠单抗 (上海明睿生物技术有限公司); TRIzol 试剂, qPCR 引物, ReverAid First Strand cDNA 合成试剂盒, SuperSignal West Pico 增

强型化学发光底物 (美国赛默飞世尔公司); Fast-Start Universal SYBR Green Master (瑞士罗氏诊断公司)。

1.2 细 胞

人肾细胞细胞株为应用 T-SV40 转染的永生化细胞株, 由东南大学医学院肾病研究所刘必成教授惠赠^[11]。

1.3 仪 器

超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); 台式高速低温离心机 (美国赛默飞世尔公司); Mastercycler ep Realplex 2 Thermal Cycler 定量 PCR 仪 (德国艾本德公司); 小型垂直电泳仪、转印仪、ChemiDoc XRS + 成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方 法

2.1 人肾系膜细胞细胞株培养及药物处理

人肾细胞细胞株置于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基、37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温且含 5% CO_2 的培养箱中生长。细胞生长至 70% ~ 80% 丰度时给予 17 β -雌二醇 (10^{-10} ~ 10^{-6} mol/L)、氟维司群 (10^{-10} ~ 10^{-6} mol/L)、G-15 (10^{-6} mol/L) 及 PMA (50 ng/mL) 刺激。药物及 PMA 溶解于二甲亚砜, 对照组给予溶剂。

2.2 siRNA 转染

细胞在约 60% 丰度时转染 5 nmol/L GPER siRNA、15 nmol/L ER α siRNA 或阴性对照 siRNA。转染 24 ~ 48 h 后进行药物处理。

2.3 细胞裂解、蛋白样品制备及免疫印迹实验

细胞给药指定时间后冰上裂解, 收集细胞裂解液, 电泳分离、转印、封闭过程后, 与抗 P-Akt (Ser473)、Akt、TGF- β 、 β -actin 抗体孵育, 蛋白条带用 Bio-Rad Image Lab 软件 4.0 版本或 ImageJ 软件 1.46r 版本进行光密度分析。免疫印迹实验设至少 3 个生物学重复、3 个技术重复。

2.4 总 RNA 提取、逆转录及定量 PCR

细胞给药后应用 TRIzol 试剂提取 RNA; 经处理的 RNA 逆转录出 cDNA 第一链。定量 PCR 体系为 25 μL , 应用含 SYBR Green 荧光染料的定量 PCR 试剂进行。引物序列见表 1。引物序列由 PrimerBank 或 RT PrimerDB 等数据库获得, 或根据 NCBI 提供的 mRNA 序列用 Primer-Blast 工具设计。用于实验的引物均经过温度优化, 并证明其扩增效

率在 90% ~ 110% 之间。目的基因为Ⅳ型胶原(编码基因 COL4A1)、纤连蛋白(编码基因 FN1)、结缔组织生长因子(编码基因 CTGF)、转化生长因子-β1(编码基因 TGFβ1)。每个基因的定量循环数

(Cq 值)与内参基因 β-actin(编码基因 ACTB)的 Cq 值进行均一化^[12],用 Livak 法(2^{-ΔΔCt}法)进行相对定量。定量 PCR 实验至少设 3 个生物学重复、3 个技术重复。

Table 1 qPCR primers for quantification of genes expression

Gene	Forward(5'→3')	Reverse(5'→3')
TGFβ1	GCAACAATTCTCTGGCGATACC	AAAGCCCTCAATTTCCCTCC
COL4A1	CCGTGGGACCTGCAATTACT	ACGGCGTAGGCTTCTTGAAC
FN1	AGGAAGCCGAGGTTTAACTG	AGGACGCTCATAAGTGCACC
CTGF	TGGAAGAGAACATTAAGAAGGCA	TGCAGCCAGAAAGCTCAAAC
ACTB	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT

2.5 统计分析

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。PMA 刺激下模型组细胞的基因表达情况与正常组的比较应用独立样本 *t* 检验进行统计;模型组与不同剂量处理组的数据等多组与单一组别的比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)及 Dunnett post hoc test;其他多组比较采用单因素方差分析及 Scheffe post hoc test。数据统计应用 SPSS 11.5 软件,作图应用 Graphpad Prism 5 软件。*P* 均为双侧,*P* < 0.05 认为有显著性差异。

3 结果

3.1 PMA 增加系膜细胞促纤维化因子的表达

系膜细胞中,短期 PMA 刺激可激活蛋白激酶

C(PKC)并提高 COL4A1、FN1、CTGF 和 TGFβ1 基因对应的 mRNA 水平至 2.5 ± 0.5 、 1.4 ± 0.2 、 26 ± 11 和 1.9 ± 0.3 倍(*P* = 0.028, 0.028, 0.017 和 0.009)。

3.2 17β-雌二醇及氟维司群抑制 PMA 诱导的促纤维化因子表达

17β-雌二醇或氟维司群可显著下调 PMA 刺激下的 COL4A1、FN1、CTGF 和 TGFβ1 基因转录;然而在 PKC 激活时, 10^{-6} mol/L 剂量的 17β-雌二醇无法降低 FN1 或 COL4A1 的 mRNA 水平, 10^{-6} mol/L 剂量的氟维司群无法降低 FN1 或 TGFβ1 的 mRNA 水平;上述药物对细胞外基质及生长因子的表达影响与剂量相关,不同剂量会产生不同甚至相反的作用(图 1)。

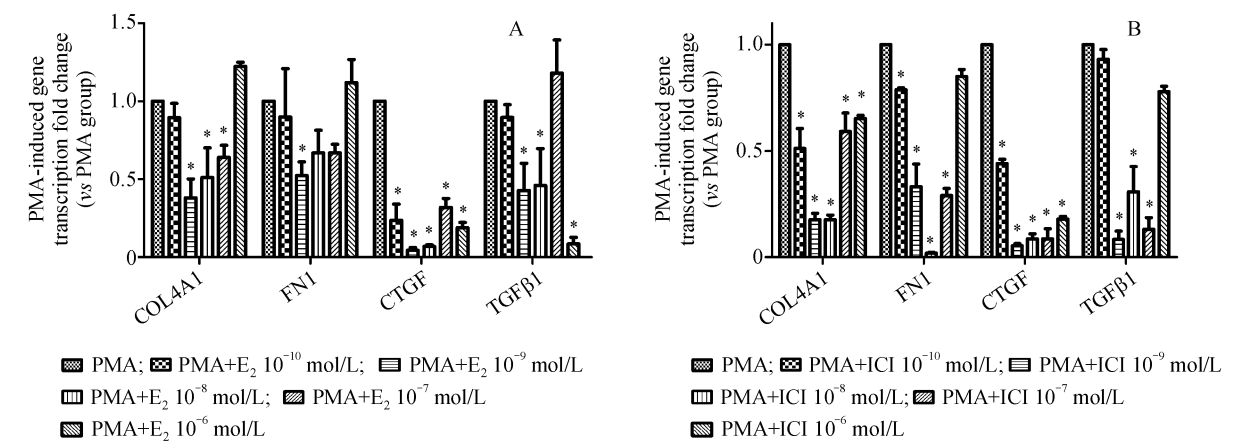


Figure 1 Effect of 17β-estradiol (E₂) (A) and fulvestrant (ICI) (B) on phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced COL4A1, FN1, CTGF and TGFβ1 gene transcription ($\bar{x} \pm s$, *n* = 3)

Gene expression of groups treated with vehicles stimulated with PMA was set to 100%. COL4A1: Collagen type IV, alpha 1; FN1: Fibronectin 1; CTGF: Connective tissue growth factor; TGFβ1: transforming growth factor-beta 1

* *P* < 0.05 vs PMA-treated group

3.3 17β-雌二醇及氟维司群抑制 PKC 下游 Akt 磷酸化、TGF-β 表达

为明确人肾系膜细胞株在 PKC 激活时对其下游 Akt 磷酸化、TGF-β 表达的影响,本研究应用不

同剂量 17β-雌二醇或氟维司群预处理细胞 30 min 后予 PMA 刺激 15 min,17β-雌二醇和氟维司群可抑制 Akt(Ser473 位点)磷酸化激活及 TGF-β 表达,且其作用呈剂量相关性(图 2)。

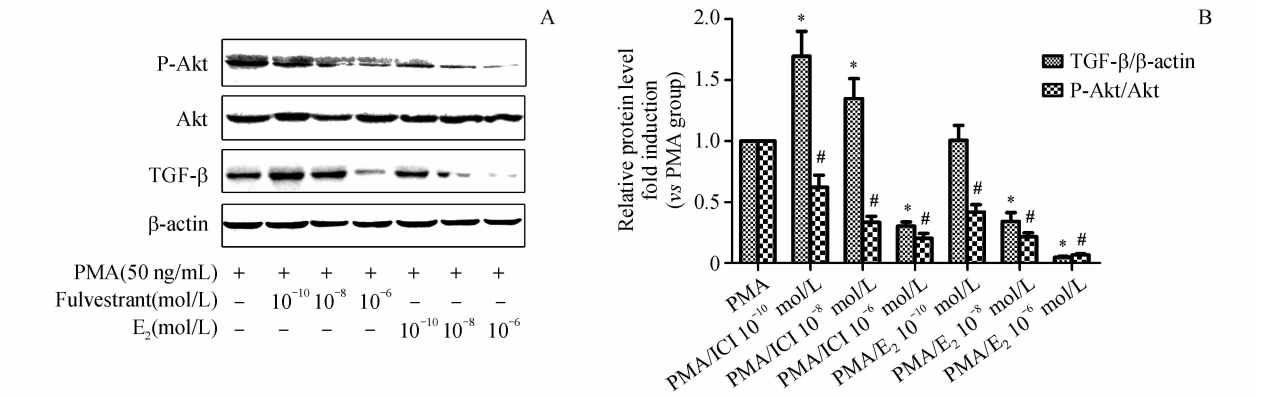


Figure 2 Effect of E₂ (A) and ICI (B) on PMA-induced Akt signaling and TGF-β expression ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
*# $P < 0.05$ vs PMA-treated cells

3.4 ERα 与 GPER 介导 17β-雌二醇及氟维司群对 PKC 下游信号的抑制作用

17β-雌二醇 (10⁻⁸ mol/L) 及氟维司群 (10⁻⁸ mol/L) 抑制 PMA 诱导下过量表达的 COL4A1、FN1、CTGF、TGFβ1 基因转录,此作用可被 ERα/GPER RNAi 阻断,提示其作用依赖于 ERα 及 GPER (图 4)。

mol/L)的处理所阻断(图 3)。此外,17β-雌二醇 (10⁻⁸ mol/L) 与氟维司群 (10⁻⁶ mol/L) 对 PMA 诱导 Akt 磷酸化及对 TGF-β 表达的抑制作用可被 ERα/GPER RNAi 阻断,提示其作用依赖于 ERα 及 GPER (图 4)。

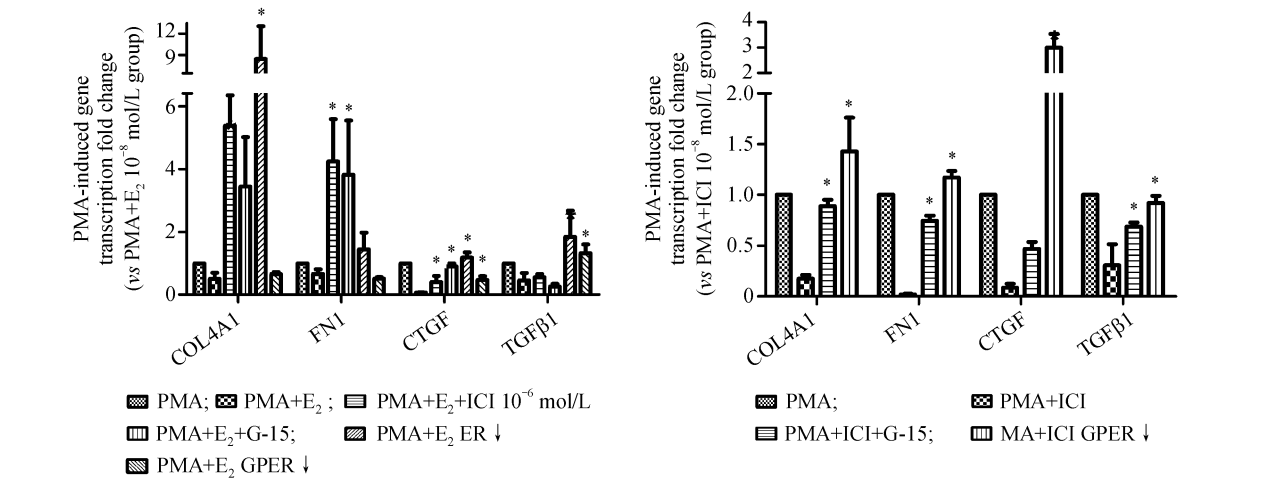


Figure 3 ECM gene transcription upon E₂ (10⁻⁸ mol/L) (A) or ICI (10⁻⁸ mol/L) (B) treatment after ERα/GPER blockade (G-15) or knock-down (↓) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
* $P < 0.05$ vs PMA + E₂/ICI-treated group

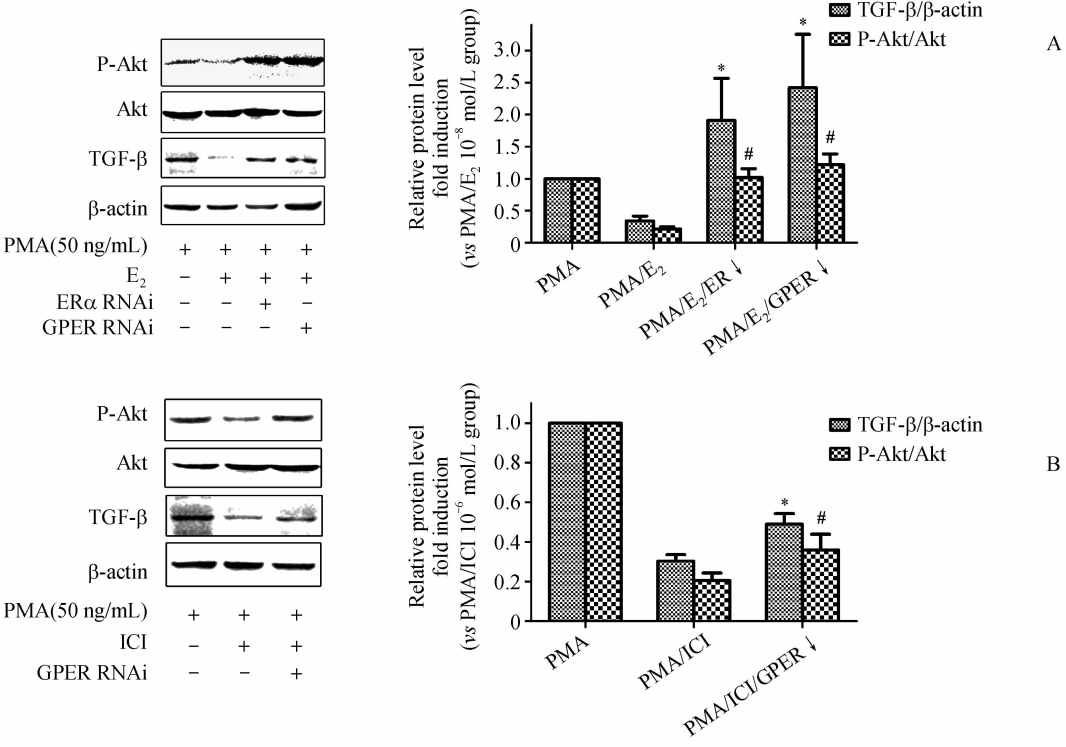


Figure 4 Akt signaling and TGF-β expression upon E₂ (10⁻⁸ mol/L) (A) or ICI (10⁻⁶ mol/L) (B) treatment after ERα/GPER knockdown (↓) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
*# $P < 0.05$ vs PMA + E₂/ICI-treated group

4 讨论

本研究表明,17β-雌二醇与氟维司群均可通过削弱 PKC 激活下游的 Akt 磷酸化,抑制 PKC 激活所诱导的过度细胞外基质和促纤维化生长因子表达;ER 与 GPER 在调节肾小球系膜细胞功能上有着重要的作用。

已有研究表明,17β-雌二醇可以下调由高葡萄糖或其他有害因素诱导的系膜细胞细胞外基质累积;然而雌激素受体及 G 蛋白偶联雌激素受体在 17β-雌二醇作用中的地位尚不明确。氟维司群常用于 ER 阳性的乳腺癌患者术后抗雌激素内分泌治疗,而该药物在本研究中却可发挥类似雌激素的作用,似乎与其经典的抗雌激素作用不一致。根据文献报道,氟维司群除具有抗雌激素、雌激素受体下调作用外,亦可以结合 G 蛋白偶联雌激素受体并激活此受体。据此推测其对 PKC 激活刺激下细胞外基质过度表达的抑制作用很可能与 GPER 激活有关,GPER 的激活也可部分解释 17β-雌二醇的作用。已有研究表明,在体外培养人肾小球系膜细胞株中,雌激素受体 ER 与 GPER 的激活可通过抑

制 TGF-β 诱导的 Smad 信号及 ERK1/2 信号,从而减少结缔组织生长因子、IV 型胶原和纤连蛋白的表达^[19]。本研究正是基于此原理而开展的研究。本研究中,17β-雌二醇和氟维司群通过对 PKC 下游信号及靶基因的调节,抑制系膜细胞的纤维化过程,终止该过程中的恶性循环,可作为慢性肾脏疾病治疗药物研发的参考。

为确定 ER 及 GPER 激活在系膜细胞功能调节中的作用及地位,本研究使用 ERα siRNA 及 GPER siRNA 转染细胞从而分别沉默 ERα 及 GPER 两种受体的表达,通过比较受体沉默前后 17β-雌二醇及氟维司群的作用,判断两种药物对两种雌激素受体的依赖性。另外设立 GPER 拮抗剂 G-15 与 10⁻⁸ mol/L 剂量雌激素、氟维司群合用的给药组,对 RNAi 结果进行补充。

ERα 基因敲低可取消 17β-雌二醇对 PKC 激活导致的细胞外基质、生长因子合成的抑制,说明 ERα 参与上述刺激中雌激素的作用,雌激素受体激活是雌激素有益作用得以发挥的重要环节。

值得注意的是,17β-雌二醇及氟维司群对 PKC 激活下游 COL4A1、FN1、CTGF、TGFB1 过量表达的

抑制作用可被 GPER 的基因沉默所取消,表明 GPER 在雌激素作用中亦有着不可或缺的作用。此外,GPER 沉默会导致一些基因表达的上调,甚至高出正常水平(图 3,CTGF),表明 GPER 可能存在于与其他通路的交叉与互话,这些通路在 GPER 被沉默之前可能被 GPER 所抑制。

综上所述,17 β -雌二醇及氟维司群可通过调节 ER/GPER,达到抑制 PKC/Akt 信号并减少下游促纤维化因子、细胞外基质表达的目标;ER 与 GPER 在对系膜细胞功能的调节中均有着至关重要的地位与作用。

参 考 文 献

- [1] Wu D, Peng F, Zhang B, *et al.* PKC- β 1 mediates glucose-induced Akt activation and TGF- β 1 upregulation in mesangial cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, **20**(3): 554 – 566.
- [2] Abboud HE. Mesangial cell biology[J]. *Exp Cell Res*, 2012, **318**(9): 979 – 985.
- [3] Silbiger S, Neugarten J. Gender and human chronic renal disease [J]. *Gender Med*, 2008, **5**(Suppl A): S3 – S10.
- [4] Krepinsky J, Ingram AJ, James L, *et al.* 17 β -Estradiol modulates mechanical strain-induced MAPK activation in mesangial cells [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**(11): 9387 – 9394.
- [5] Mankhey RW, Bhatti F, Maric C. 17 β -Estradiol replacement improves renal function and pathology associated with diabetic nephropathy[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, **288**(2): F399 – F405.
- [6] Fliardo EJ, Quinn JA, Frackelton Jr. AR, *et al.* Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis[J]. *Mol Endocrinol*, 2002, **16**(1): 70 – 84.
- [7] Li YC, Ding XS, Li HM, *et al.* Role of G protein-coupled estrogen receptor 1 in modulating transforming growth factor- β stimulated mesangial cell extracellular matrix synthesis and migration[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, **391**(1/2): 50 – 59.
- [8] Li YC, Ding XS, Li HM, *et al.* Icaritin attenuates high glucose-induced type IV collagen and fibronectin accumulation in glomerular mesangial cells by inhibiting transforming growth factor- β production and signalling through G protein-coupled oestrogen receptor 1[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2013, **40**(9): 635 – 643.
- [9] Kapor-Drezgic J, Zhou X, Babazono T, *et al.* Effect of high glucose on mesangial cell protein kinase C- δ and - ϵ is polyol pathway-dependent [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1999, **10**(6): 1193 – 1203.
- [10] Qu YK, Li X, Chen T, *et al.* Effects of fulvestrant on the estrogen receptor expression in uterus and vagina of immature mice[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2016, **47**(2): 210 – 214.
- [11] Sraer JD, Delarue F, Hagege J, *et al.* Stable cell lines of T-SV40 immortalized human glomerular mesangial cells[J]. *Kidney Int*, 1996, **49**(1): 267 – 270.
- [12] Biederman J, Yee J, Cortes P. Validation of internal control genes for gene expression analysis in diabetic glomerulosclerosis[J]. *Kidney Int*, 2004, **66**(6): 2308 – 2314.