

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.18.003

文章编号: 1005-8982 (2018) 18-0014-05

## 梗阻性肾病肾组织中磷酸化黏着斑激酶的表达及意义\*

陈志, 李冰晟, 何焱, 王朝晖, 张波, 杜勇超, 刘雨杭, 陈湘

(中南大学湘雅医院, 湖南长沙 410008)

**摘要:** **目的** 探讨梗阻性肾病肾组织中磷酸化黏着斑激酶 (pFAK) 的表达变化及意义。**方法** 行单侧输尿管结扎术复制大鼠梗阻性肾病模型 (UUO 模型)。分为假手术组, 3 d、14 d 模型组共 3 组, 收集大鼠肾组织, 石蜡切片行免疫组织化学检测, 新鲜标本行 WB, 检测各组大鼠肾组织 pFAK、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 和整合素  $\beta_1$  (CD29) 的表达。**结果** 假手术组肾组织 pFAK 表达量低, 3 d 模型组肾组织 pFAK 表达升高, 14 d 模型组较 3 d 模型组升高。 $\alpha$ -SMA、整合素  $\beta_1$  的表达与 pFAK 一致。pFAK 的表达分别与  $\alpha$ -SMA 及整合素  $\beta_1$  的表达呈正相关。**结论** pFAK 在大鼠梗阻性肾病肾间质纤维化中表达升高, FAK 可能在梗阻性肾病肾间质纤维化过程中发挥促进作用, 并可能是作为整合素  $\beta_1$  的下游, 通过促进形成肌成纤维细胞而实现。

**关键词:** 肾纤维化; 纤维化; 整合素  $\beta_1$ ; 黏着斑激酶

**中图分类号:** R692.2

**文献标识码:** A

## Expression and significance of phosphorylated FAK in renal tissue of obstructive nephropathy\*

Zhi Chen, Bing-sheng Li, Yao He, Zhao-hui Wang, Bo Zhang, Yong-chao Du, Yu-hang Liu, Xiang Chen  
(Department of Urology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression and significance of FAK on renal fibrosis of obstructive nephropathy. **Methods** Unilateral ureteral ligation was performed to establish rat model of obstructive nephropathy (UUO model). The rats were divided into 3 groups: sham group, injury group (3 days) and injury group (14 days). The expression of FAK,  $\alpha$ -SMA and integrin  $\beta_1$  (CD29) in renal tissue of rats were detected by immunohistochemistry and western blot. **Results** Immunohistochemical staining and western blot showed that expression of FAK,  $\alpha$ -SMA and integrin  $\beta_1$  in injury group (3 d) was significantly increased compared with that in sham group ( $P < 0.05$ ) while expression of FAK in injury group (14 d) was higher than that in injury group (3 d) ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Increased expression of p-FAK in renal tissue promotes fibrosis through integrin  $\beta_1$  mediated formation of myofibroblast.

**Keywords:** renal fibrosis; fibrosis; integrin beta 1; FAK

肾间质纤维化是梗阻性肾病最显著的病理学特征<sup>[1-3]</sup>, 探讨梗阻性肾病引起肾间质纤维化的可能机制和靶点对于梗阻持续存在的情况下如何保护肾功能、在梗阻解除后如何减缓肾间质纤维化、对其他病因肾

病的治疗具有意义<sup>[1, 4-7]</sup>。黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 可以作为跨膜蛋白亚基整合素  $\beta_1$  的胞内连接酶发生自身磷酸化 (pFAK) 而被激活<sup>[8-10]</sup>, 而 FAK 的下游涉及与纤维化过程相关的多条通路, 且

收稿日期: 2017-07-26

\* 基金项目: 湖南省自然科学基金 (No: 2015JJ2152); 湖南省自然科学基金青年基金 (No: 2015JJ3162)

[通信作者] 陈湘, E-mail: cxiang1007@126.com

由于 FAK 介导多种脏器纤维化<sup>[11]</sup>, 笔者推测 FAK 可能在梗阻性肾病肾间质纤维化中发挥作用。肌成纤维细胞的形成被认为是肾间质纤维化的关键环节, 而  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 作为肌成纤维细胞的标志物<sup>[12]</sup>, 在肾间质纤维化研究中被广泛关注<sup>[13-14]</sup>。本研究通过复制单侧输尿管梗阻 (unilateral ureteral obstruction, UUO) 的 SD 大鼠模型, 并检测不同时间模型组及假手术组大鼠肾脏中 pFAK 的表达, 及与整合素  $\beta_1$ 、 $\alpha$ -SMA 的相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和分组

健康雄性无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级雄性 SD (Sprague Dawley) 大鼠 18 只 (湖南斯莱克景达实验动物有限公司), 体重 200 ~ 220 g, 寄养于中南大学实验动物学部 SPF 级屏障设备内。温度 ( $22 \pm 2$ ) °C, 相对湿度 ( $55 \pm 2$ ) %, 明暗交替 12/12 h。大鼠自由摄取水及饲料。大鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为假手术组、3 d 模型组及 14 d 模型组 3 组, 每组 6 只。在所有的实验操作过程中, 遵循实验动物的使用原则。

### 1.2 复制动物模型

模型组行单侧输尿管结扎术: 大鼠适应性饲养 1 周后开始建模, 禁食 24 h 后, 以 5% 水合氯醛 0.4 ml/100 g 腹腔注射将大鼠麻醉, 以俯卧位固定于大鼠手术台, 局部剃毛备皮, 皮肤消毒, 选择左侧背部脊柱旁 0.8 cm 肾区纵行切口, 依次切开各层组织至腹内, 游离肾脏、输尿管, 将左侧输尿管用玻璃分针挑起, 用双丝线结扎左侧输尿管上段靠近肾盂处, 于两线之间剪断输尿管。均匀喷涂庆大霉素后依次缝合肌肉、皮下组织及皮肤, 络合碘消毒皮肤, 酒精拭去切口周围血渍。在手术后, 密切关注各组小鼠的情况变化。假手术组: 手术入路方式同模型组, 游离出左侧输尿管后不结扎。在手术后, 密切关注各组小鼠的情况变化。假手术组假手术操作 14 d 后, 2 个模型组分别在大鼠输尿管结扎术后 3 d 和 14 d 后处死。

### 1.3 指标检测

1.3.1 免疫组织化学 (简称免疫组化) 检测 pFAK、整合素  $\beta_1$  (CD29)、 $\alpha$ -SMA 设计不同的时间处死大鼠, 切取左侧肾脏组织, 一部分 10% 多聚缓冲甲醛溶液固定 24 h, 制备切片, 免疫组化检测 CD29, pFAK,  $\alpha$ -SMA 的表达。石蜡切片脱蜡去水后滴加适量的胰

酶稀释液, 置于 37 °C 恒温箱中 30 min 行抗原修复。PBS 液充分洗涤后将切片置于 3% 过氧化氢溶液, 室温及避光下孵育 25 min, 阻断内源性过氧化物酶。均匀地滴加用 3% BSA 覆盖组织, 室温下封闭 30 min。在切片上滴加 PBS 与按一定比例配好的一抗, 湿盒内 4 °C 孵育过夜。后将玻片洗涤后滴加与一抗, 相应种属的二抗 (HRP 标记) 覆盖组织, 室温孵育 50 min。洗涤甩干后在滴加 DAB 显色液显色。Harris 苏木素复染细胞核后脱水封片。用图像分析软件 Image Pro Plus 6.0 进行分析, 根据公式累计光度值 / 像素点 = 平均光密度值 (optical density, OD), 计算 OD 值, 比较各组差异。

1.3.2 Western blot 检测 CD29、pFAK、 $\alpha$ -SMA 左侧肾脏皮质, 一部分放置入冻存管中, 液氮保存, 利用 WB 法分别检测假手术组, 3 d、14 d 模型组的表达情况。组织块用 PBS 洗涤后剪成小块匀浆, 转移离心管振荡并冰浴 30 min。11 372 r/min 离心 10 min, 收集上清为样品。BCA 法测蛋白浓度后电泳, 每孔加 50 ng 蛋白样品电泳, 浓缩胶电压 80 V, 分离胶电压 150 V。电泳结束后转膜, 300 mA 恒流转膜 0.5 h 或 25 V 恒压转膜过夜, 将转有蛋白的膜置于 5% BSA 封闭 1 h 后, 置于 I 抗 (CD29, pFAK,  $\alpha$ -SMA 抗用封闭液 1 : 1 000 稀释, GAPDH 作内参照按 1 : 5 000 稀释) 中, 置 4 °C 冰箱中振荡过夜, 1 × TBS 洗 3 次, 每次 10 min。置 HRP 标记的 II 抗 (用封闭液 1 : 5 000 稀释) 中孵育 2 h, 1 × TBS 洗 3 次, 每次 10 min, 将 ECL-A 及 ECL-B 1 : 1 体积比混合, 与膜孵育 3 min 后, 吸尽残液, 保鲜膜将膜包裹完全, 置入暗匣内曝光。使用显影和定影试剂显影和定影。将曝光的底片进行扫描并导出保存图片, 图像处理软件整理去色, 以 GAPDH 作为内参, Alpha 软件处理系统计算分析目标带的光密度值。条带相对灰度值 = 目的条带灰度值 / 同个样品 GAPDH 灰度值。

### 1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 两两比较用 SNK-*q* 检验, 变量的相关性用 Linear correction 分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组 CD29、pFAK、 $\alpha$ -SMA 的染色及 OD 值比较

免疫组化检测结果显示,  $\alpha$ -SMA 的表达主要

在间质，而 pFAK 及 CD29 在肾小管上皮细胞及间质均有表达，见图 1~3。随着建模时间的延长，pFAK、CD29 及  $\alpha$ -SMA 表达量逐步升高，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

### 2.2 各组 pFAK、 $\alpha$ -SMA 及 CD29 的蛋白表达情况

假手术组肾组织 pFAK、 $\alpha$ -SMA 及 CD29 表达量低，随着建模时间的延长，pFAK、CD29 及  $\alpha$ -SMA 表

达量逐步升高，差异有统计学意义 ( $F_{pFAK}=45.398, P_{pFAK}=0.000$ ;  $F_{CD29}=23.713, P_{CD29}=0.000$ ;  $F_{\alpha-SMA}=43.428, P_{\alpha-SMA}=0.000$ )。各组间 pFAK、 $\alpha$ -SMA 及 CD29 两两比较，差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 4 和表 2。

### 2.3 各组 pFAK 与 $\alpha$ -SMA 和 CD29 的相关性

pFAK 与  $\alpha$ -SMA 成正相关，差异有统计学意义 ( $r=0.852, P=0.000$ )，pFAK 与 CD29 呈正相关，差异有统计学意义 ( $r=0.800, P=0.000$ )。见图 5、6。

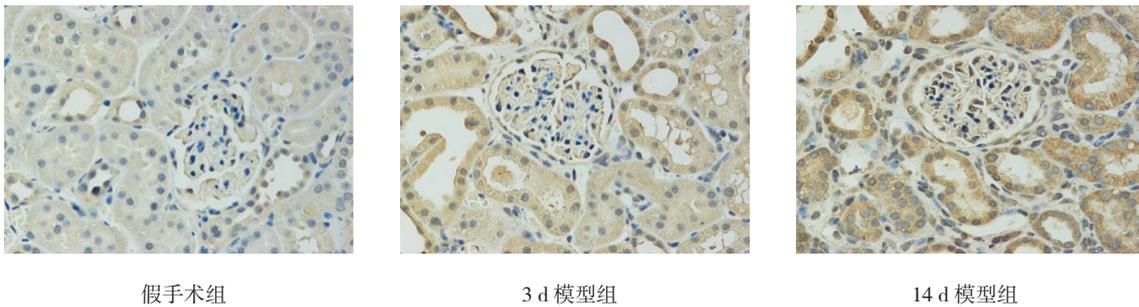


图 1 各组肾脏组织 pFAK 的表达 (×400)

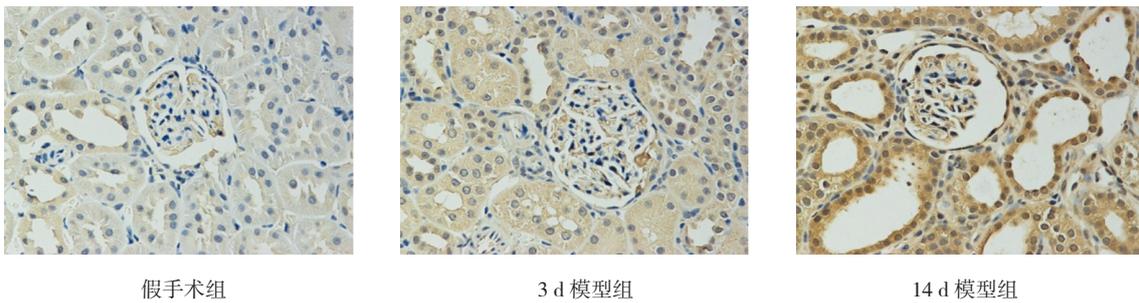


图 2 各组肾脏组织 CD29 的表达 (×400)

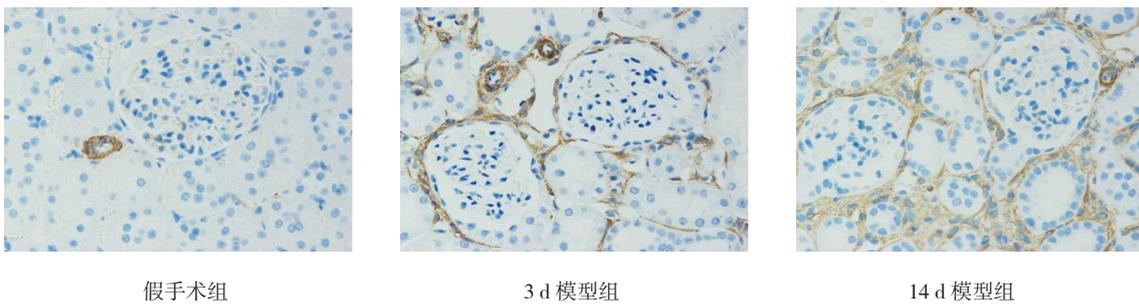


图 3 各组肾脏组织  $\alpha$ -SMA 的表达 (×400)

表 1 各组 pFAK、CD29、 $\alpha$ -SMA 表达的 OD 值 ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	pFAK	CD29	$\alpha$ -SMA
假手术组	0.001 3 ± 0.000 4	0.001 0 ± 0.001 0	0.002 1 ± 0.001 0
3 d 模型组	0.004 2 ± 0.000 4 <sup>1)</sup>	0.003 2 ± 0.000 8 <sup>1)</sup>	0.009 0 ± 0.002 0 <sup>1)</sup>
14 d 模型组	0.007 8 ± 0.000 5 <sup>2)</sup>	0.018 3 ± 0.002 2 <sup>2)</sup>	0.019 4 ± 0.001 4 <sup>2)</sup>

注：1) 与假手术组比较， $P < 0.05$ ；2) 与 UUO 3 d 模型组比较， $P < 0.05$

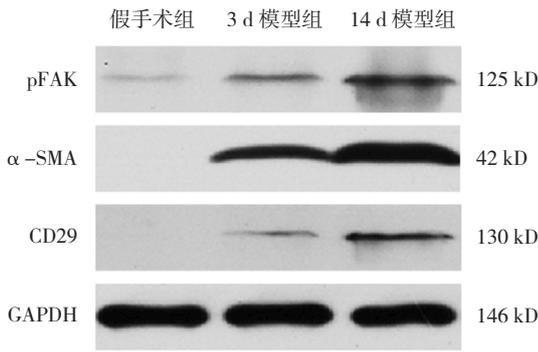


图 4 各组肾脏组织 CD29、pFAK、α-SMA 的蛋白表达

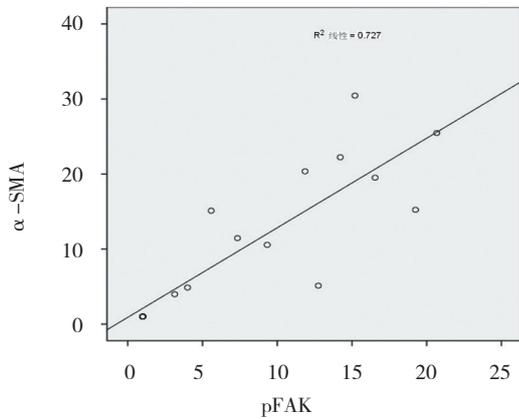


图 5 pFAK 与 α-SMA 的相关性

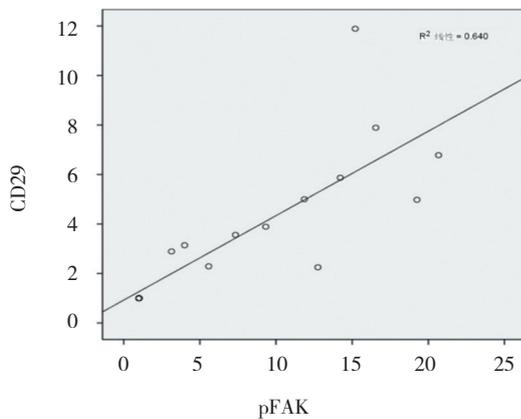


图 6 pFAK 与 CD29 的相关性

表 2 各组肾脏组织 CD29, pFAK, α-SMA 的蛋白表达 (n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	pFAK	CD29	α-SMA
假手术组	1	1	1
3 d 模型组	7.02 ± 3.59 <sup>1)</sup>	3.00 ± 0.66 <sup>1)</sup>	8.52 ± 4.51 <sup>1)</sup>
14 d 模型组	16.29 ± 3.26 <sup>2)</sup>	7.07 ± 2.61 <sup>2)</sup>	22.21 ± 5.25 <sup>2)</sup>

注: 1) 与假手术组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与 3 d 模型组比较,  $P < 0.05$

### 3 讨论

FAK 是一种酪氨酸激酶, 被磷酸化以后活化。FAK 可与整合素  $\beta_1$  或作为细胞因子受体 RTKs(受体酪氨酸激酶) 下游激酶在 Tyr397 位点被磷酸化, 进而激活其他的磷酸化位点<sup>[15]</sup>。Tyr397 磷酸化的 FAK 可以与多种含 SH2 结构域的蛋白质分子相结合, 如 src 家族、细胞信号抑制因子、生长因子连接蛋白、多种激酶等, 从而产生各种生物学效应<sup>[16]</sup>。

本实验通过体内实验 UUO 大鼠模型发现梗阻性肾病肾组织 pFAK 表达升高, 且随处理时间增加而升高。且发现在梗阻性肾病肾间质纤维化模型中 pFAK 的表达与 α-SMA 表达呈正相关。α-SMA 是 ACTA2 基因编码的蛋白质, 是参与细胞运动, 结构和完整性的高度保守的蛋白质<sup>[17]</sup>。肌成纤维细胞的生成是纤维化过程的重要环节, 研究显示肌成纤维化能力是成纤维细胞的 4~6 倍, 而 α-SMA 通常被看成肌成纤维细胞形成的标志物<sup>[12]</sup>。本实验通过体内实验 UUO 大鼠模型发现梗阻性肾病肾组织 α-SMA 表达升高, 且基本趋势为随处理时间增加而升高, 从免疫组化图片可看到 α-SMA 主要表达于肾小管周围间质, 这些均与现有研究一致, 辅证造模成功, 及梗阻性肾病的确存在肌成纤维细胞生成增加这一纤维化过程中的重要环节。而在梗阻性肾病肾间质纤维化模型中 pFAK 的表达与 α-SMA 表达呈正相关, 提示 FAK 在在梗阻性肾病肾间质纤维化过程中发挥促进作用, 有可能是通过促进形成肌成纤维细胞而发挥作用。

通过相关性分析, 同样发现在梗阻性肾病肾间质纤维化模型中 pFAK 的表达与整合素  $\beta_1$  (CD29) 表达呈正相关。整合素是广泛的细胞表面黏附和信号分子, 由 α-亚基和 β-亚基组成, 将细胞内骨架连接到细胞外基质, 并双向跨膜传递信号。在整合素家族成员中, 整合素  $\beta_1$  是最关键的, 因为整合素  $\beta_1$  可以与不同 α 亚基配对, 使其成为不同刺激因子的受体。整合素  $\beta_1$  可以作为力传感器, 将机械刺激转化为生化信号<sup>[18]</sup>。在正常条件下, 整合素对维持细胞内稳态至关重要, 可以启动多条信号通路, 其中一些信号通路主要与细胞迁移和细胞黏附相关, 而另一些信号传递调节细胞分化、增殖、存活和凋亡。整合素  $\beta_1$  介导细胞外基质合成, 纤维化相关细胞转化激活<sup>[18-19]</sup>, 与包括阻塞性肾病等不同病因所致多种肾脏纤维化有关<sup>[20-22]</sup>。逆行压力增加引起的肾小管上皮及间质细胞的机械拉

伸在阻塞性肾病过程中被认为是非常显著的, 本研究显示 UUO 模型中整合素  $\beta_1$  表达上调, 且在梗阻性肾病肾间质纤维化模型中 pFAK 的表达与整合素  $\beta_1$  表达呈正相关, 结合文献, 提示 FAK 可能是作为整合素  $\beta_1$  的下游<sup>[10-11]</sup>, 在梗阻性肾病肾间质纤维化过程中发挥促进作用。

#### 参 考 文 献:

- [1] CHEVALIER R L. Congenital urinary tract obstruction: the long view[J]. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 2015, 22(4): 312-319.
- [2] STOKES M B, HUDKINS K L, ZAHARIA V, et al. Up-regulation of extracellular matrix proteoglycans and collagen type I in human crescentic glomerulonephritis[J]. *Kidney International*, 2001, 59(2): 532-542.
- [3] ROBERTSON C M, COOPERSMITH C M. The systemic inflammatory response syndrome[J]. *Microbes & Infection*, 2006, 8(5): 1382.
- [4] BAUE A E. MOF, MODS, and SIRS: what is in a name or an acronym[J]. *Shock*, 2006, 26(5): 438.
- [5] TRUONG L D, GABER L, EKNOYAN G. Obstructive Uropathy[J]. *Contributions to Nephrology*, 2011, 169: 311-326.
- [6] ITO K, CHEN J, EL C M, et al. Renal damage progresses despite improvement of renal function after relief of unilateral ureteral obstruction in adult rats[J]. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2004, 287(6): F1283.
- [7] TANG Y, ZHANG F, HUANG L, et al. The protective mechanism of fluorofenidone in renal interstitial inflammation and fibrosis[J]. *Am J Med Sci*, 2015, 350(3): 195-203.
- [8] HONG S Y, JEON Y M, LEE H J, et al. Activation of RhoA and FAK induces ERK-mediated osteopontin expression in mechanical force-subjected periodontal ligament fibroblasts[J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 335(1/2): 263-272.
- [9] DALLA COSTA A P, CLEMENTE C F, CARVALHO H F, et al. FAK mediates the activation of cardiac fibroblasts induced by mechanical stress through regulation of the mTOR complex[J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 104(3): 512.
- [10] ZHAO X K, CHENG Y, MING L C, et al. Focal adhesion kinase regulates fibroblast migration via integrin beta-1 and plays a central role in fibrosis[J]. *Scientific Reports*, 2016(6): 19276.
- [11] FRANCHINI K G. Focal adhesion kinase. The basis of local hypertrophic signaling domains[J]. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*, 2012, 52(2):485.
- [12] MENG X M, HUANG X R, CHUNG A C, et al. Smad2 protects against TGF-beta/Smad3-mediated renal fibrosis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(9): 1477-1487.
- [13] INA K, KITAMURA H, TATSUKAWA S, et al. Significance of  $\alpha$ -SMA in myofibroblasts emerging in renal tubulointerstitial fibrosis[J]. *Histology & Histopathology*, 2011, 26(7): 855-866.
- [14] 奚易云, 李华, 李军, 等. 蛋白磷酸酶 2A 在肾间质纤维化中的作用[J]. *中南大学学报 (医学版)*, 2015, 40(6): 569-578.
- [15] UEYAMA H, BRUNS G, KANDA N. Assignment of the vascular smooth muscle actin gene ACTSA to human chromosome 10[J]. *Jinrui Idengaku Zasshi*, 1990, 35(2): 145-150.
- [16] NAGAMOTO T, EGUCHI G, BEEBE D C. Alpha-smooth muscle actin expression in cultured lens epithelial cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(5): 1122-1129.
- [17] LOPEZ-HERNANDEZ F J, LOPEZ-NOVOA J M. Role of TGF-beta in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects[J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 347(1): 141-154.
- [18] ECKES B, ZWEERS M C, ZHANG Z G, et al. Mechanical tension and integrin alpha 2 beta 1 regulate fibroblast functions[J]. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2006, 11(1): 66-72.
- [19] ZENG Q, GUO Y, LIU Y, et al. Integrin-beta1, not integrin-beta5, mediates osteoblastic differentiation and ECM formation promoted by mechanical tensile strain[J]. *Biol Res*, 2015, 48(1): 25.
- [20] BARALDI A, ZAMBRUNO G, FURCI L, et al. Beta 1 and beta 3 integrin upregulation in rapidly progressive glomerulonephritis[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 1995, 10(7): 1155-1161.
- [21] CHEN X, ABAIR T D, IBANEZ M R, et al. Integrin alpha1beta1 controls reactive oxygen species synthesis by negatively regulating epidermal growth factor receptor-mediated Rac activation[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(9): 3313-3326.
- [22] KAGAMI S, BORDER W A, RUOSLAHTI E, et al. Coordinated expression of beta 1 integrins and transforming growth factor-beta-induced matrix proteins in glomerulonephritis[J]. *Lab Invest*, 1993, 69(1): 68-76.

(王荣兵 编辑)