

P311 在肾组织纤维化作用中的研究探讨

刘翔 蔡平平 综述 司国民 审校

【摘要】 P311 是一个胞浆蛋白,介导多种细胞的转化和形态发生。研究发现 P311 有抑制 TGF- β 1、TGF- β 2 的表达,降低胶原 I 和胶原 III 的表达以及改变肌成纤维细胞的迁移方式等作用,本文就 P311 在肾组织纤维化中的可能作用作一综述。

【关键词】 肾疾病;纤维化

[中图分类号]R692 [文献标识码] A [文章编号]1673-4416(2013)05-0706-04

P311,又被称为 PTZ17,是一个 8KDa 的胞浆蛋白,最初发现存在于神经元和肌肉组织中^[1]。可介导多种细胞的转化和形态发生,在瘢痕形成、组织修复、肿瘤的浸润和扩散、癫痫发生、胚胎发育、肺泡发生等方面发挥了重要的生物学功能。近年研究发现,P311 基因的编码蛋白 P311 能够不依赖于 TGF- β 1 诱导成纤维细胞向肌成纤维细胞转化,这种转化后的细胞并不表现致纤维化能力,因其抑制了 TGF- β 1、TGF- β 2 的表达,从而降低了胶原 I 和胶原 III 的表达,进而可能影响创伤修复甚至纤维化的发生发展过程。本文就 P311 在肾组织纤维化中的可能作用作一综述。

1 P311 的基本特征

P311 基因是 1993 年 Studler 等^[1]在发育中的小鼠脑组织中首次发现,该基因定位于 5 号染色体的

长臂 5q22 区,基因全长 2025bp,包含 3 个开放的阅读框架,第 1 个阅读框在人和小鼠之间高度保守^[1,2]。P311 的 3 个阅读框中仅第一个编码含 68 个氨基酸的蛋白 P311,分子量为 8kDa,P311 蛋白主要特点是在人、小鼠和鸡的 P311 N 末端存在一高度保守的 PEST 结构域(富含脯氨酸、谷氨酸、丝氨酸和酪氨酸的区域)^[2]。该区域既是泛素/蛋白酶通路(ubiquitin/proteasome pathway)的高效作用靶点,又是蛋白与蛋白的结合位点^[3,4],主要存在于转录因子、细胞因子及信号转导分子等短时表达蛋白中^[2]。

P311 主要存在于神经细胞、恶性胶质细胞、平滑肌细胞及软骨细胞中。因 P311 不属任一已知的蛋白家族,它的功能还不很清楚。目前研究认为 P311 基因可能作为一种细胞因子参与调控成纤维细胞在内的多种细胞的分化、表型转换等功能^[2]。

- [22] Kubes P. Nitric oxide affects microvascular permeability in the intact and inflamed vasculature. *Microcirculation*,1995,2(3):235-244.
- [23] Cook-Mills JM. VCAM-1 signals during lymphocyte migration: role of reactive oxygen species. *Mol Immunol*, 2002,39(9):499-508.
- [24] Akcay A, Micozkadioglu H, Atac FB, et al. Relationship of ENOS and RAS gene polymorphisms to initial peritoneal transport status in peritoneal dialysis patients. *Nephron Clin Pract*, 2006,104(1):e41-6.
- [25] Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci*,2008,121(13):2115-2122.
- [26] Li C, Ren Y, Jia X, et al. Twist overexpression promoted Epithelial-to-mesenchymal transition of human peritoneal mesothelial cells under high glucose. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, doi:10.

1093/ndt/gfs 049. [Epub ahead of print].

- [27] Liberek T, Topley N, Luttmann W, et al. Adherence of neutrophils to human peritoneal mesothelial cells: role of intercellular adhesion molecule-1. *J Am Soc Nephrol*,1996 Feb,7(2):208-217.
- [28] Clay MA, Pyle DH, Rye KA, et al. Time sequence of the inhibition of endothelial adhesion molecule expression by reconstituted high density lipoproteins. *Atherosclerosis*,2001 Jul,157(1):23-29.
- [29] Caballo C, Palomo M, Cases A, et al. NF κ B in the development of endothelial activation and damage in uremia: an in vitro approach. *PLoS One*,2012,7(8):e43374.
- [30] Boulanger E, Wautier MP, Wautier JL, et al. ACEs bind to mesothelial cells via RAGE and stimulate VCAM-1 expression. *Kidney Int*,2002,61(1):148-156.

(本文编辑:李乐德) (收稿日期:2013-01-22)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4416.2013.05.038

基金项目:国家自然科学基金(No.81273682);山东省科技发展计划项目(No.2010G0020220)

作者单位:250021 山东,济南 山东大学附属省立医院肾内科

由于 P311 基因在平滑肌细胞和神经细胞分化和转化过程中出现明显的表达差异, Taylor 等^[5]认为该蛋白可作为细胞表面标志物来区分正常和转化的平滑肌细胞或神经细胞。P311 还可以促进损伤神经原的修复及轴突的再生, 并且在促进创伤愈合、肿瘤的浸润和扩散、癫痫发生、胚胎发育、肺泡发生等方面均发挥了重要的生物学功能^[6,7-10]。

2 肾间质纤维化的发生机制

肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)的发生、发展过程非常复杂, 概括起来有以下几个方面:(1)炎症细胞浸润 炎症是慢性肾脏疾病的基本病理改变, 也是肾纤维化的启动因素, 主要表现为免疫细胞浸润和分泌炎性介质。(2)细胞因子的作用 其中, TGF- β 被公认为最重要的致纤维化因子^[11]。TGF- β 在肾脏分布最多, 大量证据表明 TGF- β 的增多与组织纤维化存在因果关系^[12]。许多细胞因子通过 TGF- β 介导胶原在肾小球沉积引起 RIF, TGF- β 是 RIF 的核心因子, 而 TGF- β 介导的 Smad 信号通路在 RIF 中起主要作用^[13,14]。TGF- β 致 RIF 的作用主要表现在以下几个方面:①促进炎症细胞的浸润;②刺激成纤维细胞增加细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分的合成;通过抑制多种 ECM 降解酶的活性, 抑制 ECM 的降解;③能诱导肾小管上皮细胞凋亡或肾小管上皮细胞-间充质细胞转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)。因此, TGF- β 一直被认为是肾纤维化治疗的靶点。(3)肾小管上皮细胞表型转化 肾小管上皮细胞在炎症、损伤、急性缺血、变性和坏死时可发生 EMT。多种细胞因子参与了 EMT 过程, 如 TGF- β 、PDGF、CTGF 等能够促进 EMT, 而 BMP-7、HGF 等则有抑制 EMT 的作用^[15]。(4)肾间质成纤维细胞增殖、活化和表型转化 肾间质成纤维细胞是纤维形成的主要效应细胞, 其大量增殖、活化是产生过量 ECM 的先导, 在增加 ECM 成分合成中发挥重要作用。(5)凋亡 这是肾纤维化的另一细胞机制, 与肾脏实质结构的破坏密不可分。凋亡可发生于肾脏的固有细胞, 也可发生于浸润的免疫细胞。多种因素可诱导凋亡, 如缺氧、缺血、细胞因子、生长因子、氧自由基等。(6)细胞外基质转换失衡 ECM 在维持正常组织结构与功能及细胞生长、分化过程中起着非常重要的作用, 它处于不断代谢更新和降解重塑的动态平衡之中, 当这种动态平衡失调, ECM 降解受抑亦是 RIF 的形成机制之一^[16]。

3 P311 在组织纤维化中的作用探讨

3.1 P311 诱导肌成纤维细胞非致纤维化表现

肌成纤维细胞除了在损伤修复中起作用, 还参与了许多病理过程如组织纤维化和重塑, 包括肺特发性纤维化、慢性肾小球肾炎、肝硬化、慢性胰腺炎、动脉粥样硬化等。肌成纤维细胞可产生胶原和其他的 ECM 蛋白。肌成纤维细胞的产生部分来源于局部成纤维细胞和转化, 而旁分泌/自分泌的 TGF- β 1 则诱导和保持了这种转化。Pan 等^[17]发现, 未分化的小鼠胚胎间充质细胞在体外培养过程中当形态上出现伸展、拉长表现时, 可以自发地转化为平滑肌细胞^[18-20]。应用这两种细胞, 他们通过消减抑制杂交方法建立了平滑肌细胞生成相关基因的 cDNA 文库, 这其中就包括 P311 基因。将该基因导入两种成纤维细胞系 NIH3T3 和 C3H10T1/2 中, 发现细胞出现了类似肌成纤维细胞样转化的表型改变, 包括细胞出现 α -actin、SM22、FGF-2、VEGF、PDGF 及 PDGF 受体及整合素 α 3、 α 5 的表达上调, 并且其细胞增殖率显著增高。然而, 成纤维细胞通过 P311 介导转化生成的肌成纤维细胞不同于特征性的肌成纤维细胞, 其在于 P311 抑制了 TGF- β 1、TGF- β 受体 2 以及 TGF- β 1 激活的 MMP-2、MMP-9 的表达, 从而降低了胶原 1 和胶原 3 的表达。通过对人创面的免疫组织化学检查发现, P311 仅存在于肌成纤维细胞和其激活的前体细胞中。因此, 此研究阐明了 P311 在肌成纤维细胞转化中的作用, 证实了这种转化可不依赖于 TGF- β 1, 提示了 P311 可阻止纤维化。

3.2 P311 下调 TGF- β 1、TGF- β 2 表达

多种细胞因子参与了 RIF 的发生, TGF- β 1 就是控制此过程最重要的细胞因子之一。TGF- β 1 水平和小管间质纤维化的进展密切相关。TGF- β 1 促进小管上皮向肌成纤维细胞转分化并能增加 ECM 蛋白的合成和聚集。Seema 等^[21]的研究证实, P311 不仅能下调 TGF- β 1 表达^[17], 还能下调 TGF- β 2 表达, 但是对于 TGF- β 3 没有影响。通过酵母双杂交系统实验发现 P311 蛋白可以与 TGF- β 1 的隐性相关蛋白(Latent associated protein, LAP)及成熟 TGF- β 的部分结构直接结合。免疫共沉淀实验证实, P311 能与 TGF- β 1 和 TGF- β 2 直接结合, 而与 TGF- β 3 没有相互作用。虽然导致这种不同效应的分子机制仍不清楚, 但从作用机制上讲 TGF- β 1 和 TGF- β 2 是促纤维化的生长因子, 而 TGF

- $\beta 3$ 是抗纤维化的生长因子^[22]。此外,免疫共沉淀实验还发现 P311 能与 LAP 结合,而不能与成熟的 TGF- β 发生相互作用。P311 存在的保守 PEST 结构域,是泛素/蛋白酶系统的靶点,可以使 P311 蛋白发生快速降解。Seema 等^[23]发现敲除该结构域可以消除 P311 基因对 TGF- β 的生物学作用,但不影响 P311 与 LAP 的结合。在 TGF- β /Smad 信号系统中,Smad3 介导了 TGF- $\beta 1$ 的自身诱导,本研究则发现在表达 P311 基因的细胞中出现了 Smad3 活性降低,但是在给予外源性 TGF- β 后可以促进 Smad3 活性恢复及 TGF- $\beta 1$ mRNA 水平提高。提示 P311 基因部分通过阻断 TGF- $\beta 1$ 的自身诱导而下调 TGF- $\beta 1$ 、TGF- $\beta 2$ 表达。

3.3 P311 诱导肌成纤维细胞变形虫样的快速迁移

基于不同的细胞类型、整合素衔接、细胞骨架结构和蛋白酶产生,单个细胞迁移表现两种不同的形式:间质细胞样运动和变形虫样运动^[24]。间质细胞样运动是成纤维细胞和其他间质细胞的特征。Shi 等^[25]在转染了 P311 的 NIH3T3 成纤维细胞系中发现,P311 可以引起肌成纤维细胞类似变形虫样而不是间质细胞样的移动。变形虫样移动的特点是没有局灶粘着和张力丝,没有整合素和 MMPs 的聚集微活,没有小 GTP 酶活性的改变,这些特点都增加了细胞的运动性^[26,27],与间质细胞样运动相反^[28-31]。P311 诱导的这种变形虫样移动依赖于 GTP 酶 RalA 的激活并且当被 RalA RNA 干扰时又可恢复为间质细胞样移动。变形虫样移动可保持于培养在纤维蛋白上以及创口早期的基质,但在胶原 I 和 TGF- $\beta 1$ 的作用下又可转变成间质细胞样移动。同时发现,胶原 I 及 TGF- $\beta 1$ 亦可抑制 RalA 酶的活性,但对 P311 的表达无作用,表明胶原 I 及 TGF- $\beta 1$ 可以抵消 P311 的作用。我们知道,在创伤早期局部形成纤维蛋白凝块,为激活的成纤维细胞和肌成纤维细胞的前体提供了局部定居的基质^[32];随后,损伤局部的基质成分变得复杂,胶原 I、III 以及肌成纤维细胞和炎性细胞等聚集增加,并出现了大量的细胞因子、生长因子包括 TGF- $\beta 1$ ^[33],TGF- $\beta 1$ 又是胶原产生的主要刺激物,最终胶原 I 成为疤痕最主要的 ECM 成分。因此 Shi 等的研究表明,P311 通过激活 RalA 促进激活的肌成纤维细胞及其前体以变形虫样的移动方式快速聚集在早期创伤部位,而表达 P311 的肌成纤维细胞又可抑制 TGF- $\beta 1$,降低胶原 I 和胶原 III 的表达^[31],因此在创伤修复早期起着有

益的生物学作用。在创伤后期,随着 TGF- $\beta 1$ 和胶原 I 产生的增加,变形虫样的移动又转变为间质细胞类型的移动,可使创伤后期创伤部位的肌成纤维细胞数量的减少,使创伤修复及时终止,从而减少病理性瘢痕和纤维化的形成。

3.4 P311 在 IgA 肾病中的表达情况

关于 P311 在体内组织纤维化中的作用研究还较少。Wang 等^[34]收集了临床经肾活检病理检查诊断为 IgA 肾病的患者 57 例及正常对照 5 例,通过免疫组织化学方法检测 P311 和 TGF- $\beta 1$ 在不同肾组织中的表达情况,并分析与尿蛋白、血清肌酐值、eGFR 和病理指数等临床指标的相关性。结果发现,P311 表达水平在 IgA 肾病患者的肾组织中明显高于正常肾组织,在 IgA 肾病病理改变级别高的肾组织中明显高于级别低的肾组织。P311 在小管间质的表达水平与 TGF- $\beta 1$ 和蛋白尿水平相关。另外,P311 在肌酐 $> 133 \mu\text{mol/L}$ 的患者中的表达水平要高于 $< 133 \mu\text{mol/L}$ 的患者。虽然此研究仅证明了 P311 与 IgA 肾病疾病进展的相关性,但鉴于体外研究中,P311 对肌成纤维细胞分泌因子的调控作用,对 TGF- $\beta 1$ 的抑制作用,提示 P311 可能是肾纤维化发展中一个关键细胞因子,并可能与 IgA 肾病的进展相关。

肾间质纤维化是各种慢性肾脏病进展为终末期肾衰竭的共同通路,是多种原因共同作用的结果。要阻止慢性肾脏病的进展,对抗肾纤维化是关键的一环。P311 可使创伤早期的肌成纤维细胞及其前体改变移动方式并使肌成纤维细胞表现出非致纤维化作用,可抑制 TGF- $\beta 1$ 、TGF- $\beta 2$ 表达,降低胶原 I、III 的产生。综上所述,虽然 P311 在肾脏纤维化中的作用研究较少,但其在组织纤维化过程中已显示出重要作用,对 P311 作用机制的进一步研究将有助于对慢性肾脏病的防治提供新思路。

参 考 文 献

- [1] Studler JM, Glowinski J, Levi - Strauss M. An abundant mRNA of the embryonic brain persists at a high level in cerebellum, hippocampus and olfactory bulb during adulthood. *Eur J Neurosci*, 1993, 5(6):614 - 623.
- [2] Pan D, Zhe X, Jakkaraju S, et al. P311 induces a TGF- β independent, nonfibrogenic myofibroblast phenotype. *J Clin Invest*, 2002, 110(9):1349 - 1358.
- [3] Ghose R, Shekhnagan A, Goger MJ, et al. novel, specific interaction involving the Csk SH3 domain and its natural ligand. *Nat Struct Biol*, 2001, 8(11):998 - 1004.

- [4] Fisher RC, Olson MC, Pongubala JM, et al. Normal myeloid development requires both the glutamine-rich transactivation domain and the PEST region of transcription factor PU.1 but not the potent acidic transactivation domain. *Mol Cell Biol*, 1998, 18(7):4347-4357.
- [5] Taylor GA, Hudson E, Resau JH, et al. Regulation of P311 expression by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor and the ubiquitin/proteasome system. *J Bio Chem*, 2000, 275(6):4215-4219.
- [6] Miura N, Naganuma A. Metallothionein mediates gene expression of 3.1 mRNA (PTZ17) related to epileptic seizure. *FEBS Lett*, 2000, 479(3):146-148.
- [7] Fuitani M, Yamagishi S, Che YH, et al. P311 accelerates nerve regeneration of the axotomized facial nerve. *J Neurochem*, 2004, 91(3):733-744.
- [8] Mariani L, McDonough WS, Hoelzinger DB, et al. Identification and validation of P311 as a glioblastoma invasion gene using laser capture microdissection. *Cancer Res*, 2001, 61(15):4190-4196.
- [9] Roschier M, Kumbm E, Kyrylenko S, et al. Expression of seizure-related PTZ17 is induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 252(1):10-13.
- [10] Zhao L, Vu TH. Embryonic lung cell allografts under the renal capsule - a new model for the study of lung development. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*, 2004, 7(4):303-309.
- [11] Yang J, Liu YL. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implication in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol*, 2001, 159(4):1465-1475.
- [12] Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int*, 2006, 69(2):213-217.
- [13] Bottinger EP, Bitzer M. TGF-beta signaling in renal diseases. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(1):2600-2610.
- [14] Schnaper HW, Hayashida T, Hubchak SC, et al. TGF-beta signal transduction and mesangial cell fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, 284(2):F243-252.
- [15] Liu YH. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(1):1-12.
- [16] Razzaque MS, Taguchi T. Cellular and molecular events leading to renal tubulointerstitial fibrosis. *Med Electron Microsc*, 2002, 35(2):68-80.
- [17] Pan D, Zhe X, Jakkaraju S, et al. P311 induces a TGF-beta1-independent, nonfibrogenic myofibroblast phenotype. *J Clin Invest*, 2002, 110:1349-1358.
- [18] Relan NK, Yang Y, Beqaj S, et al. Cell elongation induces laminin alpha2 chain expression in mouse embryonic mesenchymal cells. Role in visceral myogenesis. *J Cell Biol*, 1999, 147:1341-1350.
- [19] Yang Y, Relan NK, Przywara DA, et al. Embryonic mesenchymal cells share the potential for smooth muscle differentiation: myogenesis is controlled by the cell's shape. *Development*, 1999, 126:3027-3033.
- [20] Yang Y, Beqaj S, Kemp P, et al. Stretch-induced alternative splicing of serum response factor promotes bronchial myogenesis and is defective in lung hypoplasia. *J Clin Invest*, 2000, 106:1321-1330.
- [21] Paliwal S, Shi J, Dhru U, et al. P311 binds to the latency-associated protein and downregulates the expression of TGF-beta1 and TGF-beta2. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 315(4):1104-1109.
- [22] Martin P. Wound healing - aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 1997, 276:75-81.
- [23] Piek E, Ju WJ, Heyer J, et al. Functional characterization of transforming growth factor beta signaling in Smad2 and Smad3 deficient fibroblasts. *J Biol Chem*, 2001, 276:19945-19953.
- [24] Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3:362-374.
- [25] Shi J, Badri KR, Choudhury R, et al. P311-induced myofibroblasts exhibit amoeboid-like migration through RalA activation. *Experimental Cell Research*, 2006, 312(17):3432-3442.
- [26] Friedl P, Borgmann S, Brocker EB, et al. Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement. *J Leukocyte Biol*, 2001, 70:491-509.
- [27] Friedl P, Zanker KS, Brocker EB. Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microsc Res Tech*, 1998, 43:369-378.
- [28] Sameni M, Moin K, Sloane BF. Imaging proteolysis by living human breast cancer cells. *Neoplasia*, 2000, 2:496-504.
- [29] Wolf K, Mazo I, Leung H, et al. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol*, 2003, 160:267-277.
- [30] d'Ortho MP, Stanton H, Butler M, et al. MT1-MMP on the cell surface causes focal degradation of gelatin films. *FEBS Lett*, 1998, 421:159-164.
- [31] Zamir E, Katz M, Posen Y, et al. Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat Cell Biol*, 2000, 2:191-196.
- [32] Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, et al. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol*, 2001, 159:1009-1020.
- [33] Frank S, Madlener M, Werner S. Transforming growth factors beta1, beta2, and beta3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*, 1996, 271:10188-10193.
- [34] Wang FP, Xie XS, Fan JM, et al. Expression of P311, a transforming growth factor beta latency-associated protein-binding protein, in human kidneys with IgA nephropathy. *Int Urol Nephrol*, 2010, 42:811-819.

(本文编辑:李乐德) (收稿日期:2013-01-10)