

· 基础研究 ·

CKIP-1 表达在前列腺部尿道少瘢痕愈合中的作用机制

陈 忠, 温志强, 李志广, 唐金琦, 纪梓良

(南方医科大学深圳医院泌尿外科, 广东深圳 518000)

Mechanism of CKIP-1 expression in the less scar healing of the prostatic urethra

CHEN Zhong, WEN Zhi-qiang, LI Zhi-guang, TANG Jin-qi, JI Zi-liang

(Department of Urology, Shenzhen Hospital, Southern Medical University, Shenzhen 518000, China)

ABSTRACT: **Objective** To explore the mechanism of casein kinase 2 interaction protein 1(CKIP-1) expression in the less scar healing of prostatic urethra. **Methods** Infant urethral scar tissues and normal urethral tissues were collected. Primary human urethral scar fibroblasts were established with enzyme digestion combined with tissue block method. CKIP-1 was silenced or overexpressed with plasmid transfection. The mRNA and protein expressions were detected with qPCR and Western blot. Cell viability was measured with CCK-8 method. The α -SMA expression was detected with immunofluorescence staining. **Results** Compared with normal urethral tissues, scar tissues showed decreased CKIP-1 level but increased ROCK($P < 0.05$). The CKIP-1 mRNA and protein levels of the OE-CKIP-1 group increased, and the levels of cell viability, α -SMA, COL I, COL III, TGF- β 1, and ROCK protein were significantly lower than those of the control group($P < 0.05$). The levels of CKIP-1 mRNA and protein in the siCKIP-1 group were decreased, and other above-mentioned indicators were significantly higher than those in the control group($P < 0.05$). **Conclusion** CKIP-1 protein may inhibit ROCK2-related pathway by down-regulating TGF- β 1, and inhibit the expressions of Col I, Col III and α -SMA, thereby inhibit the fibrosis of human urethral scar fibroblasts.

KEY WORDS: prostate; fibroblast; scar healing; casein kinase 2 interacting protein 1; transforming growth factor- β 1

摘要: **目的** 探究酪蛋白激酶 2 相互作用蛋白 1(CKIP-1)表达在前列腺部尿道少瘢痕愈合中的作用机制。 **方法** 收集小儿尿道瘢痕组织和正常尿道组织。通过酶消化法联合组织块法建立原代的人尿道瘢痕成纤维细胞。通过质粒转染沉默或过表达 CKIP-1。通过 qPCR 和 Western blot 检测 mRNA 和蛋白的表达水平。CCK-8 法检测细胞活力。免疫荧光染色检测 α -SMA 的表达。 **结果** 与正常尿道组织相比,瘢痕组织中 CKIP-1 水平降低而 ROCK 升高($P < 0.05$)。OE-CKIP-1 组的 CKIP-1 mRNA 和蛋白水平升高,细胞活力、 α -SMA、COL I、COL III、TGF- β 1 和 ROCK 蛋白水平均显著低于对照组($P < 0.05$)。siCKIP-1 组的 CKIP-1 mRNA 和蛋白水平降低,其他上述指标均显著高于对照组($P < 0.05$)。 **结论** CKIP-1 蛋白可能通过下调 TGF- β 1 抑制 ROCK2 相关通路,并抑制 COL I、COL III 和 α -SMA 的表达,从而抑制人尿道瘢痕成纤维细胞纤维化。

关键词: 前列腺; 成纤维细胞; 瘢痕愈合; 酪蛋白激酶 2 相互作用蛋白 1; 转化生长因子- β 1

中图分类号: R697.3

文献标志码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1009-8291.2020.04.016

良性前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)是老年男性最常见的疾病之一,研究发现约有 20% 的 BPH 患者最终接受了手术治疗^[1]。手术切口的愈合会引起瘢痕增生,从而影响膀胱颈和尿道平滑肌功能,影响预后和患者生活质量,实现少瘢痕愈合在促进 BPH 患者术后恢复中具有重要意义^[2]。瘢痕形成是一个复杂的过程,研究认为由转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β , TGF- β 1)引起的纤维细胞中 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)过表达以及胞外基质如胶原蛋白(Collagen, COL) I 和 III 的大量累积是瘢痕形成的重要机制^[3]。酪蛋白激酶 2 相互作用蛋白 1(casein kinase 2

interaction protein 1, CKIP-1)具有调节细胞活性、抑制肿瘤生长、调节细胞凋亡的作用,新近有研究显示 CKIP-1 对 TGF- β 具有负调控作用,并且这可能抑制瘢痕的生长^[4]。Rho/ROCK 信号通路是维持细胞正常形态和生物学行为的重要通路,研究已经证实 Rho/ROCK 信号通路的异常激活是引起瘢痕形成的重要原因^[5]。本次研究主要分析 CKIP-1 基因对人尿道瘢痕成纤维细胞 TGF- β 、 α -SMA、COL I、COL III 以及 Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶(Rho associated coiled-coil forming protein kinase, ROCK)蛋白表达的影响,探讨 CKIP-1 在少瘢痕愈合中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验试剂与仪器 小儿尿道瘢痕组织和正常尿道组织由南方医科大学深圳医院泌尿外科提供。OE-CKIP-1 过表达和 siCKIP-1 沉默质粒以及阴性

收稿日期: 2019-11-16

修回日期: 2020-01-06

通信作者: 纪梓良, 硕士, 主治医师, 研究方向: 肾肿瘤免疫治疗。

E-mail: chzhenong@qq.com

作者简介: 陈忠, 硕士, 主治医师, 研究方向: 泌尿系肿瘤。

E-mail: cyong725@sohu.com

对照由 Thermo Fisher 公司(美国)设计和合成。PCR 引物由 Genewiz 公司(中国)设计和合成。DMEM 培养基、胎牛血清、Trizol 试剂(Invitrogen 公司,美国),CCK-8 试剂盒(Beyotime 生物技术研究社),逆转录 cDNA 试剂盒、SYBR Green PCR Master Mix qPCR 试剂盒(Roche 公司,瑞士)。Anti-CKIP-1、anti-COL I、anti-COL III、anti-TGF- β 1 和 anti-ROCK、 α -SMA 免疫荧光试剂(Abcam 公司,美国),PVDF 膜(Bio-Rad 公司,美国)。显微镜(IX 71, Olympus 公司,日本),ABI 7500 PCR 检测系统(Life technology 公司,美国)。

1.2 细胞培养、分组和转染 根据参考文献[6],通过酶消化法联合组织块法建立原代的人尿道瘢痕成纤维细胞,将第 6 代细胞制作细胞爬片,通过免疫组化染色波形蛋白,并通过显微镜下观察人尿道瘢痕成纤维细胞形态^[6]。然后将人尿道瘢痕成纤维细胞分为 3 组,即对照组、OE-CKIP-1 组和 siCKIP-1 组。用 Lipofectamine 2000 试剂盒进行瞬时转染,3 组分别转染阴性对照、OE-CKIP-1 和 siCKIP-1 质粒以过表达和沉默 CKIP-1。在转染 48 h 后收集细胞进行后续实验。

1.3 定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)检测 CKIP-1 mRNA 表达 通过 Trizol 获得细胞总 RNA 并检测 RNA 的浓度和纯度。使用逆转录 cDNA 试剂盒逆转录 1 μ g RNA 用于合成 cDNA(42 $^{\circ}$ C 下 60 min, 70 $^{\circ}$ C 下 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存)。使用 SYBR Green PCR Master Mix 和 PCR 检测系统进行 qPCR 实验(在 95 $^{\circ}$ C/10 min, 40 个循环, 94 $^{\circ}$ C/15 s, 60 $^{\circ}$ C/1 min, 60 $^{\circ}$ C/1 min, 4 $^{\circ}$ C 保存)。比较循环阈值($\Delta\Delta$ Ct)用于分析 RNA 的表达。GAPDH 用于标准化。

1.4 蛋白质印迹法(Western blot)检测 CKIP-1、COL III、TGF- β 1 和 ROCK 蛋白表达 将组织或细胞清洗后裂解、离心,收集总蛋白并检测蛋白浓度。使用 10% 的 SDS-PAGE 凝胶用于电泳,电泳后使用 PVDF 膜进行转膜并在室温下用 5% 无脂牛奶封闭 2 h。分别加入相应的一抗(稀释 1:500)室温震荡 2 h,后 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,加入二抗(稀释 1:5 000),孵育 3 h。通过 Quantity One 软件分析条带的灰度值并计算目标蛋白质的表达量。

1.5 CCK-8 法检测细胞活力 将细胞悬液(2×10^4 个细胞/mL)接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,培养 48 h 后加入 10 μ L CCK-8 试剂并在 37 $^{\circ}$ C 下培养,测定酶标仪 450 nm 处的吸光度值计算相对细胞活力。

1.6 免疫荧光染色检测 α -SMA 的表达 按照试剂盒说明书在细胞中加入 α -SMA(1:200 稀释),孵育

后洗涤,加入 FITC 小鼠抗羊 IgG 二抗,后碘化丙啶染色细胞核,免疫荧光显微镜观察(Ex=488 nm),细胞核应为红色荧光,蛋白为绿色荧光,检测 α -SMA 的相对荧光强度,分析 α -SMA 的表达水平。

1.7 统计学方法 使用 SPSS 19.0 对数据进行分析,所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小儿尿道瘢痕组织和正常尿道组织中 CKIP-1 水平比较 正常尿道组织中 CKIP-1 和 ROCK 蛋白水平分别为(1.67 ± 0.15)和(1.89 ± 0.17),瘢痕组织中 CKIP-1 和 ROCK 蛋白水平分别为(0.78 ± 0.11)和(2.81 ± 0.35),与正常尿道组织相比,瘢痕组织中 CKIP-1 水平降低而 ROCK 升高($P < 0.05$)。

2.2 人尿道瘢痕成纤维细胞鉴定结果 免疫组化染色检测发现本次研究中建立的人尿道瘢痕成纤维细胞在波形的蛋白中表达,并且细胞呈纤维状(图 1)。

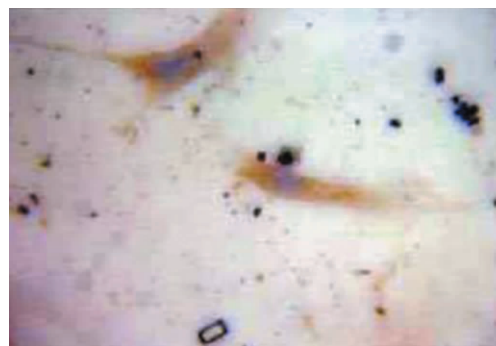


图 1 免疫组化染色检测波形蛋白鉴定人尿道瘢痕成纤维细胞(免疫组化, $\times 400$)

2.3 各组细胞转染结果比较 OE-CKIP-1 组的 CKIP-1 mRNA 和蛋白水平显著高于对照组($P < 0.05$),siCKIP-1 组的 CKIP-1 mRNA 和蛋白水平显著低于对照组($P < 0.05$),提示转染试验成功(表 1)。

表 1 各组细胞 CKIP-1 mRNA 和蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

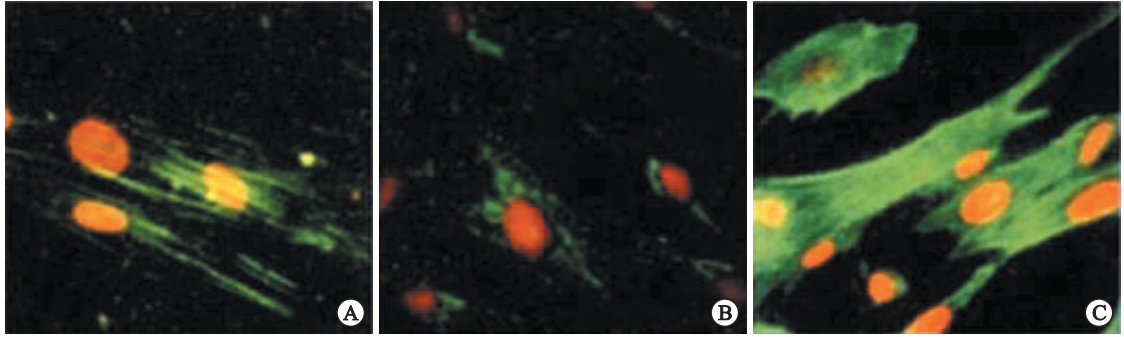
组别	CKIP-1 mRNA	CKIP-1 蛋白
对照组	1.28 ± 0.15	1.10 ± 0.11
OE-CKIP-1 组	5.64 ± 0.58	3.17 ± 0.47
siCKIP-1 组	0.31 ± 0.04	0.49 ± 0.05
t 值	30.154^* , $27.052^{\#}$	18.754^* , $16.224^{\#}$
P 值	0.000^* , $0.000^{\#}$	0.000^* , $0.000^{\#}$

CKIP-1: 酪蛋白激酶 2 相互作用蛋白 1; * : OE-CKIP-1 组与对照组比较; $\#$: siCKIP-1 组与对照组比较。

2.4 各组细胞活力比较 OE-CKIP-1 组的细胞活力(86.15 ± 2.51)% 显著低于对照组(100.00 ± 2.47)% ($P < 0.05$),siCKIP-1 组的细胞活力(124.96

±4.08)%显著高于对照组($P < 0.05$,表2)。OE-CKIP-1组的 α -SMA的相对荧光强度(0.22 ± 0.03)显著低于对照组(1.00 ± 0.11)($P < 0.05$),siCKIP-1组的 α -SMA的相对荧光强度(5.41 ± 0.82)显著高于对照组($P < 0.05$,表2、图2)。

2.5 各组 TGF- β 1 和 ROCK 蛋白水平比较 OE-CKIP-1组的Collagen I、Collagen III、TGF- β 1和ROCK蛋白水平显著低于对照组($P < 0.05$),siCKIP-1组的Collagen I、Collagen III、TGF- β 1和ROCK蛋白水平显著高于对照组($P < 0.05$,表3、图3)。



A:对照组;B:OE-CKIP-1组;C:siCKIP-1组。

图2 免疫荧光染色检测各组细胞中 α -SMA的表达水平

表3 各组Collagen I、Collagen III、TGF- β 1和ROCK蛋白水平比较

组别	Collagen I	Collagen III	TGF- β 1	ROCK
对照组	2.45 ± 0.21	2.08 ± 0.24	1.85 ± 0.19	1.54 ± 0.13
OE-CKIP-1组	$1.17 \pm 0.15^*$	$0.95 \pm 0.18^*$	$0.87 \pm 0.10^*$	$0.75 \pm 0.08^*$
siCKIP-1组	$5.41 \pm 0.57^*$	$4.87 \pm 0.59^*$	$3.71 \pm 0.42^*$	$3.50 \pm 0.32^*$

CKIP-1:酪蛋白激酶2相互作用蛋白1;Collagen:胶原蛋白;TGF:转化生长因子;ROCK:Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶;与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

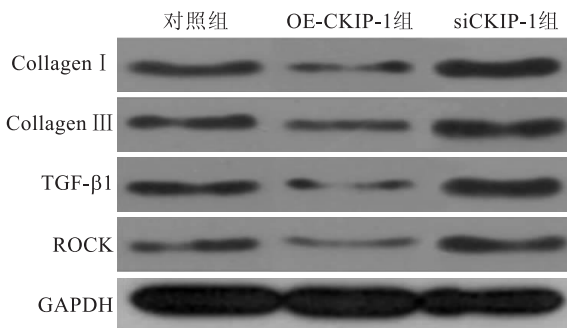


图3 Western blot检测各组Collagen I、Collagen III、TGF- β 1和ROCK蛋白水平

3 讨论

手术是治疗BPH等疾病的重要方法,手术后伤口修复机制立即激活以修复由手术损伤引起的组织缺损,在伤口愈合过程中,通常会形成更多的疤痕组织,从而影响膀胱颈和尿道平滑肌功能,影响预后和患者生活质量,而疤痕形成的确切机制仍不清楚。研究发现某些患者的伤口没有或仅有少量疤痕组织出

表2 各组细胞的相对细胞活力和 α -SMA的表达水平比较

组别	相对细胞活力(%)	α -SMA的相对荧光强度
对照组	100.00 ± 2.47	1.00 ± 0.11
OE-CKIP-1组	86.15 ± 2.51	0.22 ± 0.03
siCKIP-1组	124.96 ± 4.08	5.41 ± 0.82
t值	$9.125^*, 9.547^\#$	$24.864^*, 31.021^\#$
P值	$0.000^*, 0.000^\#$	$0.000^*, 0.000^\#$

α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白;CKIP-1:酪蛋白激酶2相互作用蛋白1;* :OE-CKIP-1组与对照组比较;#: siCKIP-1组与对照组比较。

现,这种现象被称为少瘢痕愈合,前列腺部尿道少瘢痕愈合对提高前列腺相关手术的预后十分重要^[7]。

病理性瘢痕的主要特征是成纤维细胞增殖和细胞外基质的过度积累。成纤维细胞的活化以及其中 α -SMA的过量表达会使细胞表型向肌成纤维细胞转化,从而诱导瘢痕组织的形成^[8]。另一方面,成纤维细胞的活化和生长会分泌Collagen I和Collagen III,Collagen在细胞外累积,从而引起纤维增生和瘢痕形成^[9-10]。CKIP-1可通过与肌动蛋白“加帽”蛋白相互作用调节肌动蛋白细胞骨架,在维持细胞存活和稳定形态中发挥重要作用,在上皮肿瘤细胞中,CKIP-1具有抑制肿瘤细胞增殖的作用,研究还显示细胞间的粘附增加与CKIP-1水平的降低有关,CKIP-1具有调节胞外基质的作用^[11]。有研究显示上调CKIP-1具有缓解高糖诱导肾小球系膜细胞纤维化的作用^[12]。本研究为分析CKIP-1对前列腺部尿道少瘢痕愈合的作用,首先根据文献通过酶消化法联合组织块法建立人尿道瘢痕成纤维细胞,然后通过质粒转染

的方法建立 CKIP-1 过表达和低表达的细胞系, qPCR 和 Western blot 实验结果显示 OE-CKIP-1 组的 CKIP-1 mRNA 和蛋白水平显著高于对照组, siCKIP-1 组的 CKIP-1 mRNA 和蛋白水平显著低于对照组, 说明转染试验成功。进一步的研究结果显示 OE-CKIP-1 组的细胞活力和 α -SMA 表达水平显著低于对照组, siCKIP-1 组则显著高于对照组。这提示 CKIP-1 具有抑制成纤维细胞的细胞活力和 α -SMA 表达的作用, 从而发挥抑制瘢痕生成的作用。

为进一步探究 CKIP-1 在瘢痕形成中的机制, 我们检测了 Collagen I、Collagen III、TGF- β 1 和 ROCK 蛋白的表达。在瘢痕形成过程中, TGF- β 1 是目前公认与瘢痕形成关系最密切的细胞因子, 而抑制 TGF- β 1 相关通路的表达是抑制瘢痕形成的重要方法^[13-14]。本次研究结果显示 OE-CKIP-1 组的 Collagen I、Collagen III、TGF- β 1 和 ROCK 蛋白水平显著低于对照组, siCKIP-1 组的 Collagen I、Collagen III、TGF- β 1 和 ROCK 蛋白水平显著高于对照组。有体内研究发现过表达 CKIP-1 可通过抑制 TGF- β 1 减少手术切口的瘢痕形成^[15]。胡奥等^[16]的研究发现过表达 CKIP-1 可通过抑制小鼠 TGF- β 1 和 Collagen I 改善皮肤切口愈合和减轻皮肤纤维化。而 TGF- β 1 可通过激活 RhoA/ROCK 通路调节晶状体的上皮-间充质转化, 并通过 α -SMA 的表达引起纤维化和瘢痕的生成^[17]。NAGAI 等^[18]研究也发现 TGF β 通过调节 ROCK2 诱导肾小球膜细胞的细胞骨架动态和纤维化转变。这提示在人尿道瘢痕成纤维细胞中, 上调 CKIP-1 的水平可能通过抑制 TGF- β 1 和 ROCK 的水平, 减少 Collagen I、Collagen III 的生成, 并抑制细胞活力, 从而发挥抑制瘢痕生成的作用。并且沉默 CKIP-1 得到了相反的结果, 提示 CKIP-1 在前列腺部尿道少瘢痕愈合中的作用。接下来关于 CKIP-1 对前列腺瘢痕生成的影响值得进一步的体内实验研究。此外, 但是关于 CKIP-1 调控 RhoA/ROCK 通路的机制和 RhoA/ROCK 通路在瘢痕形成中的作用机制仍需要进一步研究。

综上所述, CKIP-1 蛋白可能通过下调 TGF- β 1 抑制 ROCK2 相关通路, 并抑制 Collagen I、Collagen III 和 α -SMA 的表达, 从而抑制人尿道瘢痕成纤维细胞纤维化。这提示 CKIP-1 可能成为实现膀胱前列腺手术少瘢痕愈合的新靶点, 但是关于 CKIP-1 的作用机制仍需要进一步研究。

参考文献:

[1] ABDUL-MUHSIN HM, TYSON MD, ANDREWS PE, et al. Analysis of benign prostatic hyperplasia patients' perspective through a third party-administered survey[J]. Urology, 2016, 88

- (1):155-160.
- [2] 王鹏桥, 郑人源. 膀胱造瘘与留置尿管保守治疗前列腺增生尿潴留的对比研究[J]. 成都医学院学报, 2015, 10(3):307-309.
- [3] CHEN H, XU Y, YANG G, et al. Mast cell chymase promotes hypertrophic scar fibroblast proliferation and collagen synthesis by activating TGF- β 1/Smads signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(5):4438-4440.
- [4] 张永强. CKIP-1 在小鼠皮肤创伤愈合中的作用[D]. 第四军医大学, 2014.
- [5] HSIEH SC, WU CC, HSU SL, et al. Gallic acid attenuates TGF- β 1-stimulated collagen gel contraction via suppression of RhoA/Rho-kinase pathway in hypertrophic scar fibroblasts[J]. Life Sci, 2016, 161:19-26.
- [6] 姜大朋, 杨墨文, 李昭铸, 等. TGF- β 1 经 Rho/ROCK 信号途径诱导尿道瘢痕成纤维细胞表型转化及细胞外基质合成[J]. 中华小儿外科杂志, 2012, 33(10):759-762.
- [7] 杨宇峰, 刘荣福, 陈斌, 等. 经尿道前列腺电切术治疗前列腺增生合并膀胱逼尿肌无反射的临床疗效观察[J]. 中国内镜杂志, 2014, 20(2):180-182.
- [8] FANG X, HU X, ZHENG Z, et al. Smad interacting protein 1 influences transforming growth factor- β 1/Smad signaling in extracellular matrix protein production and hypertrophic scar formation[J]. J Mol Histol, 2019, 50(6):503-514.
- [9] TEO Z, CHAN JSK, CHONG HC, et al. Angiotensin-like 4 induces a β -catenin-mediated upregulation of ID3 in fibroblasts to reduce scar collagen expression[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):6303-6064.
- [10] LI Y, ZHANG W, GAO J, et al. Adipose tissue-derived stem cells suppress hypertrophic scar fibrosis via the p38/MAPK signaling pathway[J]. Stem Cell Res Ther, 2016, 7(1):102-104.
- [11] ZHU X, OUYANG Y, ZHONG F, et al. Silencing of CKIP-1 promotes tumor proliferation and cell adhesion-mediated drug resistance via regulating AKT activity in non-Hodgkin's lymphoma[J]. Oncol Rep, 2016, 37(1):622-630.
- [12] 公文艳. 丹皮酚激活 CKIP-1 对高糖诱导的肾小球系膜细胞纤维化的影响[J]. 中国药理学通报, 2018, 5(5):645-650.
- [13] ZHAI XX, TANG ZM, DING JC, et al. Expression of TGF- β 1/mTOR signaling pathway in pathological scar fibroblasts[J]. Mol Med Rep, 2017, 15(6):3467-3472.
- [14] 欧阳云, 彭俊, 彭清华, 等. 青光安缓释剂对抗青光眼术后滤过道瘢痕化 TGF- β /Smad 信号传导通路相关 mRNA 的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019, 5(5):1075-1078.
- [15] WANG L, CAO Y, GUAN Z, et al. Prostatic epithelial cells and their high expressions of CKIP-1 affect the TGF- β 1 expression levels which might reduce the scar formation in remodeling stage at prostatic urethral wounds after wound repair[J]. Int Urol Nephrol, 2019, 9(21):1-7.
- [16] 胡奥, 刘富伟, 李云鹏, 等. CKIP-1 对小鼠皮肤纤维化及 TGF- β 1 和 collagen-1 表达的影响[J]. 实用口腔医学杂志, 2019, 35(2):6-10.
- [17] KOROL A, TAIYAB A, WEST-MAYS JA. RhoA/ROCK signaling regulates TGF β -induced epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells through MRTF-A[J]. Mol Med, 2016, 22(1):713-723.
- [18] NAGAI Y, MATOBA K, KAWANAMI D, et al. ROCK2 regulates TGF- β -induced expression of CTGF and profibrotic genes via NF- κ B and cytoskeleton dynamics in mesangial cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2019, 317(4):F839-F851.