

骨活素在急性环孢素中毒 SD 大鼠肾组织中的表达 及其作用机制

叶明洁, 谢续标, 彭龙开, 谭亮, 蓝恭斌, 余少杰

(中南大学湘雅二医院泌尿外科移植科, 长沙 410011)

[摘要] 目的:探讨骨活素(osteostatin, OA)在急性环孢素(cyclosporine A, CsA)中毒 SD 大鼠肾组织中的表达及其作用机制。方法:在正常饮食 1 周后随机将 SD 大鼠分为 3 组:试验组(CsA + 橄榄油灌胃)、载体对照组(橄榄油灌胃)和空白对照组(生理盐水灌胃)。各组分别于灌药后 2 d、1 周、2 周分批处死,测定血肌酐(serum creatinine, SCr)及体质量变化;HE 染色评判肾组织病理学改变;免疫组织化学检测肾组织 OA 的着染情况;Western 印迹检测 OA 蛋白的表达;RT-PCR 检测 OA、基质金属蛋白酶-13(matrix metalloproteinase-13, MMP-13)、Ⅲ型胶原(collagen type III, Col III) mRNA 的表达。结果:试验组 SD 大鼠的体质量和 SCr 在灌胃 2 d 和 1 周末与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$), 2 周时体质量较对照组显著减轻($P < 0.001$), SCr 显著升高($P < 0.001$)。试验组 SD 大鼠病理组织学改变主要为炎性细胞浸润、肾小管上皮细胞、间质细胞空泡变性及肾小管上皮细胞坏死脱落等。免疫组织化学显示试验组 SD 大鼠肾组织内 OA 的表达随 CsA 灌胃时间的延长而增加,其表达部位主要位于肾小管上皮细胞及间质细胞,对照组基本不表达。RT-PCR 显示试验组 OA、MMP-13 及 Col III mRNA 的相对表达量随着 CsA 灌胃时间的延长而增加。Western 免疫印迹检测显示,OA 蛋白在空白对照组及载体对照组基本不表达,随着试验组 CsA 灌胃时间的延长,OA 蛋白的表达增强。结论:OA 在 SD 大鼠急性 CsA 肾中毒模型早、中期有表达且较 SCr 敏感,表达部位主要位于肾小管上皮细胞及间质细胞;在肾小管上皮细胞内早期反应性表达上调的 OA 可能通过激活 MMPs 的表达和胶原蛋白的重构从而在诱发肾间质纤维化中发挥关键作用。

[关键词] 骨活素; 急性环孢素中毒; 基质金属蛋白酶-13; Ⅲ型胶原

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2011.09.012

Expression and mechanism of osteostatin in the kidney of SD rats after acute cyclosporine A toxicity

YE Mingji, XIE Xubiao, PENG Longkai, TAN Liang, LAN Gongbin, YU Shaojie

(Department of Urological Organ Transplantation, Second Xiangya Hospital,
Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract: **Objective** To determine the expression and mechanism of osteostatin (OA) in the kidney by establishing SD rat model of acute cyclosporine A (CsA) toxicity. **Methods** SD rats were fed with normal diet for a week, which they were then randomly divided into 3 groups: an experimental group (gavage with cyclosporin A and olive oil), a vector group (gavage with olive oil),

收稿日期 (Date of reception) 2011-05-19

作者简介 (Biography) 叶明洁, 硕士, 主要从事泌尿外科和肾移植的基础与临床研究。

通信作者 (Corresponding author) 谢续标, E-mail: xiexubiao@yahoo.com.cn

基金项目 (Foundation items) 湖南省科技厅资助项目(2010FJ6034, 2011FJ6051)。 This work was supported by the Department of Science and Technology of Hunan Province, P. R. China (2010FJ6034, 2011FJ6051).

and a control group (gavage with normal saline). SD rats were killed 2 days, 1 week, or 2 weeks after the gavage to examine the serum creatinine (SCr) and body weight. HE staining was used to detect the kidney histopathological change. Immunohistochemistry was used to observe the staining degree and area of OA. Western blot was used to detect the OA protein. The mRNA expressions of the OA, matrix metalloproteinase-13 (MMP-13), and collagen type III (Col III) were examined by RT-PCR. **Results** The body weight and SCr of the rats in the experimental group 1 week and 2 days after the gavage had no significant difference compared with the vector group or the control group ($P > 0.05$). On the end of 2nd week, the rats' body weight was significantly reduced, and SCr significantly increased compared with the vector group or the control group ($P < 0.001$). The main histopathological changes in the experimental group were inflammatory cell infiltration, vacuolar degeneration of interstitial cells, or tubular epithelial cell necrosis. Intense OA expression located in the tubular epithelium and interstitial fibroblasts in the kidney of the experimental group was observed by immunohistochemistry. After CsA gavage, the relative mRNA expressions of OA, MMP-13, and Col III significantly increased with time. Western blot did not find the expression of OA protein in the control and the vector group, which increased with time in the experimental group. **Conclusion** OA expresses in the kidney of SD rats after acute CsA toxicity and mainly expresses in the tubular epithelial cells and renal interstitium. OA is more sensitive to the damage of kidney tissue caused by CsA than by SCr. The early-phase up-regulation of OA expression in the tubular epithelium in response to renal injury caused by acute CsA toxicity might play a key role in triggering the renal interstitial fibrosis via activating expression of MMPs and collagen remodeling in SD rats.

Key words: osteoactivin; acute cyclosporine A toxicity; matrix metalloproteinase-13; collagen type III

环孢素(cyclosporine A, CsA)的问世是器官移植领域的一块里程碑,多年来,作为一种高效的免疫抑制药物能显著提高移植物的近期存活率。然而, CsA的长期应用所导致的许多毒副作用不容忽视,其中肾毒性倍受医学界关注。尽管如此, CsA目前仍是一线的免疫抑制药物,因此,如何发现和减轻其肾毒性,阻止或延缓慢性环孢素肾病(chronic cyclosporine nephropathy, CCN)已成为移植学界的研究热点。目前临床上的常用指标血肌酐(serum creatinine, SCr)和肌酐清除率(creatinine clearance, CCr),往往不能及时、准确地反映早期移植肾损伤,程序性移植肾活检是价值较大的一种监测手段,但这种定期的有创性检查患者往往难以接受,同时也存在监测真空期,且肾活检的病理结果受取材数量与部位的影响,难以标准化,故研究人员一直试图寻找相关特异性的生物学标志,以便于及时、准确预测移植肾损伤。

骨活素(osteoactivin, OA)是最先在骨硬化动物

模型中发现的近年来关注度较高的一种新型糖蛋白。研究^[1]表明:OA在骨、肝和肾等组织中均有不同程度的表达,人类OA位于染色体7p15.1上,由11个外显子组成;鼠类OA基因位于第6号染色体上,编码一种含572个氨基酸的糖蛋白。OA存在2种亚型:一种是65 kD(1 D=1 u)非糖基化的I型跨膜蛋白;另一种是高度糖化的115 kD的分泌糖蛋白^[2]。OA同时具有多种生物学功能,如在调节成纤维细胞分化、诱导成骨细胞生长及破骨细胞分化方面起着重要的作用^[3-4]。此外,在黑素瘤、神经胶质瘤、乳腺癌、肝癌、胰腺癌等与人类有关的侵袭性肿瘤中,OA也有高表达,其介导的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)如MMP-3和MMP-9,或许可以代表一种加速肿瘤细胞浸润与转移的机制^[5-7]。

研究^[8-10]发现OA在预测急性肾损伤方面有很大的价值。OA在七氟烷中毒、糖尿病肾病及老年人肾内表达量增加;OA及其mRNA在大鼠单侧输尿管

管梗阻后肾小管上皮细胞及肾间质内的表达量增加^[11]。本课题选取 SD 大鼠为试验对象,通过建立 SD 大鼠急性环孢素肾中毒模型,检测 OA 在肾组织中的表达,以期能为肾移植临床提供可能的移植肾损伤预警标志。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

54 只 8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 150 ~ 160 g,由长沙市开福区东创试验动物科技服务部提供,合格证号: SCXK (湘) 2009-0012。饲养于中南

大学湘雅二医院动物部,光照/暗时间为 12 h/12 h 循环,室温 22 ~ 25 °C,湿度 55% ~ 60%。

1.1.2 主要药品与试剂

CsA 口服溶液 (50 mL: 5 g) 系华北制药股份有限公司生产;食用橄榄油系西班牙奥立福公司产品;RNA 提取试剂系美国 Invitrogen 生物技术有限公司产品;逆转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 试剂系富酶泰斯生物技术(深圳)有限公司产品;引物(表 1)为 Invitrogen 生物技术(上海)有限公司产品;BCA 蛋白定量试剂盒系美国 Pierce 公司产品;兔抗大鼠 OA 多克隆一抗系美国 R&D Systems 产品;羊抗兔 IgG 二抗为美国 Santa Cruz 生物技术有限公司产品。

表 1 RT-PCR 引物列表

Tab. 1 Primers of RT-PCR

Genes	Accession No.	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
Osteoactivin	NM_133298	TTCAAACACCCCAGGACCTGCTGG	GGGAATGCTCCCTTGGCAGGTCA
<i>MMP-13</i>	XM_343345	AGACCTCCAGTTTGCAGAGCGCT	ACCCACATCAGGAACCCCGCAT
Collagen III	XM_343563	CTGCAGGCCCCAGAGGACCT	ATGGCAGCGGCTCCAACACC
β -actin	NM_031144	GTCAGGTCATCACTATCGGCAATG	AGAGGTCCTTACGGATGTCAACG

1.1.3 主要仪器与设备

普通 PCR 仪、紫外分光光度计、微量离心机 (5415C 型) 为德国 Eppendorf 公司产品;实时荧光定量 PCR 仪和 mini PROTEAN 3 cell SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳仪为美国 Bio-Rad 公司产品;Ettan DALT 垂直电泳槽为瑞典 Amersham Biosciences 公司产品;低温超高速离心机为美国 Beckman 公司产品;DYY-III 型电泳仪、水平和垂直以及电转移电泳槽为北京六一仪器厂产品;高速冷冻离心机 (16R 型) 为德国 Hettich 公司产品;光学显微镜和倒置显微镜系日本 Olympus 公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 动物饲养及分组

普通饮食饲养 7 d 后,将 54 只 SD 大鼠随机等分为 3 组。试验组 ($n = 18$): 将 CsA 用橄榄油稀释,按剂量为 25 mg/(kg · d) 灌胃,每天 1 次;按灌胃时间长短再分为 CsA 灌胃 2 d 组、灌胃 1 周组、灌胃 2 周组 (每组 $n = 6$)。载体对照组 ($n = 18$): 予橄榄油 2.5 mL/(kg · d) 灌胃,每天 1 次。空白对照组 ($n =$

18): 予生理盐水 2.5 mL/(kg · d) 灌胃,每天 1 次。每组动物均自由摄食,饮用自来水,每隔 2 d 称体质量 1 次,根据体质量及时调整 CsA 或橄榄油用量。实验中注意观察各组大鼠的精神、活动、饮食、饮水及毛发色泽和有无脱落、皮肤有无破溃等情况。

1.2.2 标本的采集与处理

分别于第 2 天末、第 1 周末、第 2 周末实验终点采用腹腔注射 1.5% 戊巴比妥钠溶液麻醉大鼠,下腔静脉采血,分离血浆和血清保存于 -80 °C 冰箱,采用全自动生化分析仪测定 SCr。左肾沿矢状面剖开,一半置于 10% 中性甲醛溶液中固定后作石蜡包埋,常规石蜡切片,HE 染色及免疫组织化学分别用于检测肾病理学变化及 OA 表达情况;另一半置于液氮,通过实时荧光定量 PCR (real-time PCR) 检测 OA, *MMP-13*, III 型胶原 (collagen type III, *Col III*) mRNA 的表达变化。右肾用于 Western 印迹检测 OA 蛋白的表达。

1.2.3 肾小管损伤评分

HE 染色切片在高倍镜 ($\times 200$) 下,每例随机选

择 20 个不同视野观察肾小管的变化,参考 Shihab 等^[12]的方法对本进行半定量评分,肾小管损伤标准:1)肾小管上皮细胞肿胀、小管扩张;2)小管萎缩或塌陷(与间质纤维化和小管膜增厚无关);3)细胞和细胞间空泡形成。

评分的标准:无小管损伤记为 0 分; <5% 的肾小管损伤记为 0.5 分; 5% ~ 20% 的肾小管损伤记为 1.0 分; 21% ~ 35% 的肾小管损伤记为 1.5 分; 36% ~ 50% 的肾小管损伤记为 2.0 分; 51% ~ 65% 的肾小管损伤记为 2.5 分; >65% 的肾小管损伤记为 3.0 分。

1.3 统计学处理

实验结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,应用 SPSS 15.0 版统计学软件对数据进行分析,各组之间的比较用方差分析,两两比较用 SNK-*q* 检验。病理检查评分采用 Kruskal-Wallis *H* 检验,两两比较用 Nemenyi 法检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

CsA 灌胃 2 d 组、1 周组与载体对照组及空白对照组大鼠在精神状态、饮食、皮毛、活动度等方面无明显改变。而 CsA 灌胃 2 周组大鼠精神萎靡,活动差,食量及饮水量下降,毛发开始变黄、松乱并脱落,体质量明显低于同时间点空白或载体对照组 ($P < 0.001$,表 2)。

表 2 3 组大鼠各时间点体质量比较 ($g, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of rats' body mass at different time points among 3 groups ($g, \bar{x} \pm s$)

组别	第 2 天末	第 1 周末	第 2 周末
空白对照组	152.7 ± 2.8	177.0 ± 5.6	207.3 ± 4.3
载体对照组	152.7 ± 2.7	176.2 ± 7.0	205.0 ± 5.3
试验组	152.5 ± 2.4	170.5 ± 4.2	164.8 ± 5.8*
<i>F</i>	0.008	2.296	115.780
<i>P</i>	0.992	0.135	<0.001

2.2 各组大鼠血生化指标的比较

大鼠肾小球滤过功能用 SCr 表示,试验组大鼠的 SCr 水平随 CsA 应用时间延长而显著升高,在第 2 周末显著高于载体或空白对照组 ($P < 0.001$,表 3)。

表 3 3 组大鼠各时间点 SCr 比较 ($\mu\text{mol/L}, \bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Comparison of rats' SCr at different time points among 3 groups ($\mu\text{mol/L}, \bar{x} \pm s$)

组别	第 2 天末	第 1 周末	第 2 周末
空白对照组	46.80 ± 1.34	47.20 ± 1.32	47.60 ± 2.35
载体对照组	46.38 ± 1.59	47.13 ± 2.00	45.23 ± 1.72
试验组	46.37 ± 1.12	48.95 ± 2.81	72.60 ± 3.04*
<i>F</i>	0.195	1.401	215.035
<i>P</i>	0.825	0.277	<0.001

2.3 肾病理学检查

空白对照组、载体对照组肾小球、肾小管和间质未见明显病理学改变;CsA 灌胃 2 d 组部分肾小管上皮细胞浊肿、轻度空泡变性,少量肾小管刷状缘脱落及炎性细胞少量浸润;CsA 灌胃 1 周组可见肾小管上皮细胞中度空泡变性和部分坏死,特别是肾髓质受累更为严重,在变性的小管周围出现间质细胞增多、肿胀,肾间质炎症细胞散在浸润;CsA 灌胃 2 周组表现为明显的肾小管上皮细胞空泡变性、颗粒样变,肾小管刷状缘脱落,部分小管细胞脱落严重,基底膜裸露,炎性细胞呈灶性浸润。空白对照组与载体对照组在肾小管损伤评分上差异无统计学意义 ($P > 0.05$),试验组肾小管损伤评分明显高于对照组 ($P < 0.05$,图 1,表 4)。

表 4 各组大鼠肾小管损伤评分 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Semiquantitative score of tubular injure in 3 groups of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	第 2 天末	第 1 周末	第 2 周末
空白对照组	0.13 ± 0.20	0.15 ± 0.10	0.21 ± 0.15
载体对照组	0.34 ± 0.13	0.38 ± 0.13	0.44 ± 0.18
试验组	1.36 ± 0.22*	2.15 ± 0.26**	2.86 ± 0.32**

同一时间点,两两比较用 Nemenyi 检验,与空白或载体对照组同时点比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

2.4 各组大鼠肾组织 OA 免疫组织化学检测

空白对照组和载体对照组大鼠肾组织未见 OA 表达;试验组大鼠肾组织 OA 表达随 CsA 应用时间延长而明显增强,主要表达于肾间质和肾小管上皮细胞(图 2)。

2.5 各组大鼠肾组织 RT-PCR 检测 OA, MMP-13 及 Col III mRNA 的表达变化

在试验组,CsA 灌胃 2 d 后,大鼠肾组织中 OA

和 *MMP-13* 较空白对照组的相对表达量分别有 3.5 倍和 2.7 倍升高,但 *Col III* mRNA 表达量没有增加,

随着 CsA 作用时间的延长, *OA*, *MMP-13* 及 *Col III* mRNA 的相对表达量均逐渐增加(图 3)。

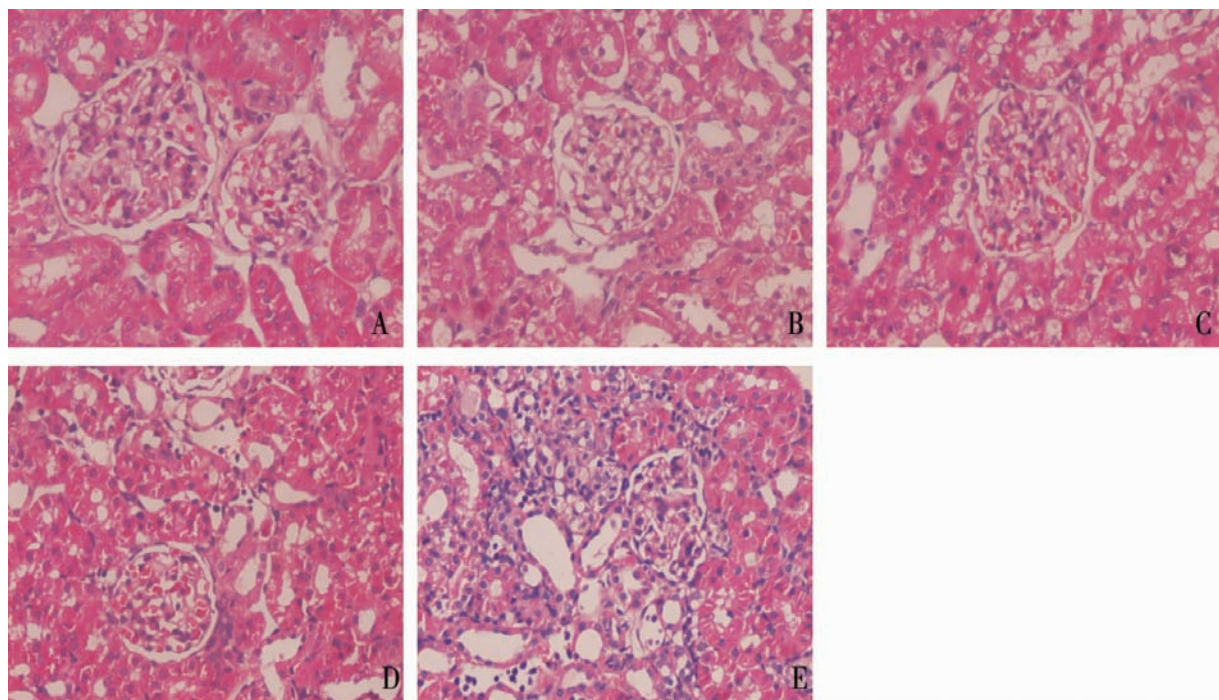


图 1 各组大鼠肾组织病理学检查(HE, $\times 200$)。A:空白对照组肾小球、肾小管和间质未见明显病理学改变;B:载体对照组肾小球、肾小管和间质基本正常,个别肾小管上皮细胞有轻微空泡样变性;C:CsA 灌胃 2 d 组部分肾小管上皮细胞肿胀、轻度空泡样变性,少量肾小管刷状缘脱落及炎性细胞浸润;D:CsA 灌胃 1 周组肾小管上皮细胞中度空泡变性和部分坏死,特别是肾髓质受累更为严重,在变性的肾小管周围出现间质细胞增多、肿胀,肾间质炎症细胞散在浸润;E:CsA 灌胃 2 周组肾小管上皮细胞明显空泡变性、颗粒样变,肾小管刷状缘脱落,部分小管细胞脱落严重,基底膜裸露,炎性细胞呈灶性浸润。

Fig. 1 Pathological examination by Hematoxylin-Eosin staining($\times 200$). A: There are no obvious pathological changes in glomerular, tubular, and interstitial cells of the control group; B: Glomerular, tubular, and interstitial cells are basically normal in the vector group. There is a minor vacuolar degeneration in a few renal tubular epithelial cells; C: On the end of 2nd day after gavage, some renal tubular epithelial cells were swelling and had a mild vacuolar degeneration. A few renal brush border cells and mild inflammatory cell infiltration are seen in renal interstitium; D: On the end of 1st week after gavage, tubular epithelial cells were vacuolar degeneration and moderate necrosis, especially in renal inner medulla. Increased and swelling interstitial cells around renal tubules of degeneration, and scattered inflammatory cell infiltration in renal interstitium are seen; E: On the end of 2nd week after gavage, there was a vacuolar degeneration in tubular epithelial cells, granular degeneration, and falling of tubular brush border. In addition, partial tubular epithelial cells had serious falling to cause the basement membrane revealed. The infiltration of inflammatory cells was focal in renal interstitium.

2.6 Western 印迹分析

Western 印迹检测显示, *OA* 蛋白在空白对照组

及载体对照组基本不表达;随着 CsA 灌胃时间的延长, *OA* 蛋白的表达增强(图 4)。

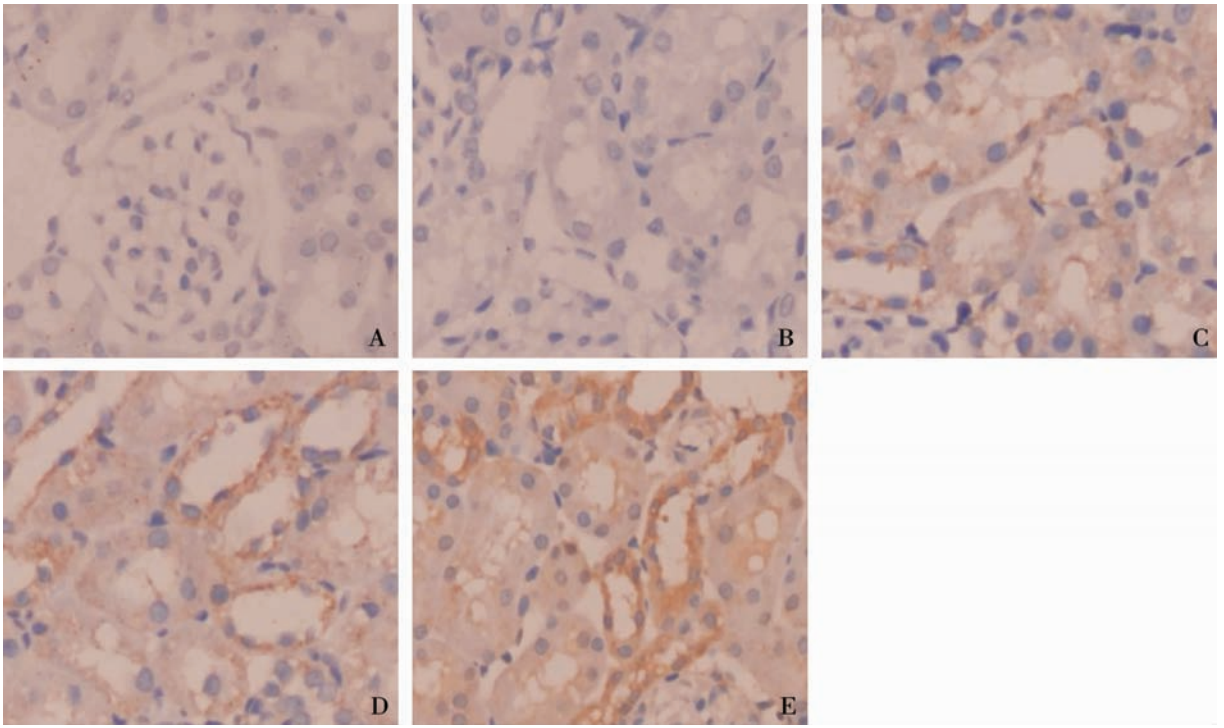


图 2 各组大鼠肾组织 OA 免疫组织化学结果(×200)。肾小管上皮细胞和间质内棕褐色区域为 OA 阳性表达部位。A: 空白对照组肾小管和间质未见 OA 表达; B:载体对照组肾小管和间质未见 OA 表达; C:CsA 灌胃 2 天组肾小管上皮细胞和间质可见少量 OA 表达; D:CsA 灌胃 1 周组肾小管上皮细胞和间质可见中量 OA 表达; E:CsA 灌胃 2 周组肾小管上皮细胞和间质可见大量 OA 表达。

Fig. 2 Osteoactivin protein expression by immunohistochemistry (×200). Positive OA expression are in brown. A:No OA expression in tubular and interstitial cells in the control group; B:No OA expression in tubular and interstitial cells in the vector group; C:A few OA expression in tubular and interstitial cells after 2 days gavage; D:A middle number of OA expression in tubular and interstitial cells after a week gavage; E:A lot of OA expression in tubular and interstitial cells after 2 weeks gavage.

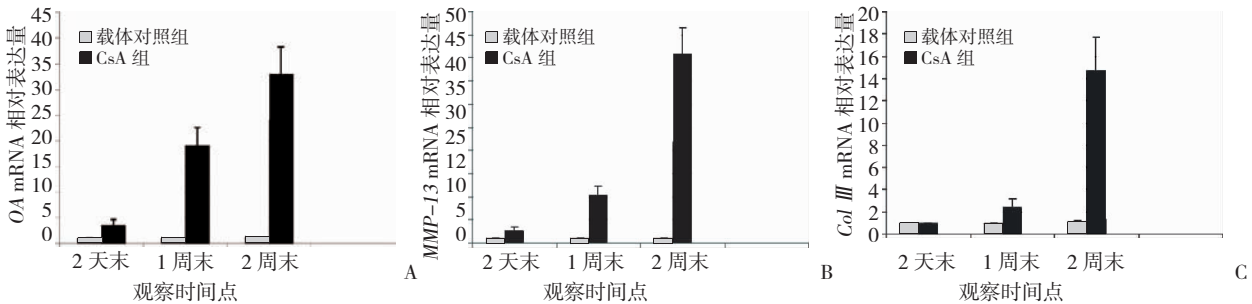


图 3 各组大鼠肾 OA, MMP-13 及 Col III mRNA 表达柱状图。A:OA mRNA; B: MMP-13 mRNA; C:Col III mRNA。每个指标的表达水平以同 β-actin 之比作为相对表达量来体现;为了在样本中进行比较,空白对照组中每个指标的的表达水平设为 1.0。

Fig. 3 Expression of OA, MMP-13, and Col III mRNA by real-time PCR. A: OA mRNA; B: MMP-13 mRNA; C: Col III mRNA. The expression level of each target gene was expressed as a ratio to that of β-actin. For comparison among samples, the expression level of each gene in the control group was set as 1.0. Bars represent mean ± standard deviation.

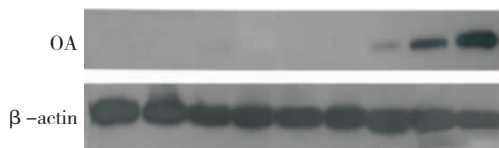


图4 CsA对OA蛋白表达的影响。

Fig. 4 Influence of CsA on the expression of OA.

3 讨论

自上世纪八十年代, CsA 作为一种有效的免疫抑制药物用于移植临床以来, 器官移植中、早期急性排斥反应的发生率明显降低, 移植受者与移植物的存活率明显提高, 但其毒副作用一直是移植界关注的焦点。越来越多的研究^[13]表明, CsA 的肾毒性作用是引起慢性移植肾肾病 (chronic allograft nephropathy, CAN) 的一个重要原因, 也是影响移植肾长期存活的重要因素之一。近年来, 国内外许多学者致力于减轻 CsA 的毒副作用, 但到目前为止尚未有理想的解决方案, 故早期发现 CsA 引起的肾组织损伤有利于临床进行免疫抑制药物调整、转换或采取其他干预措施。

本研究发现: 在 CsA 灌胃 2 周组大鼠出现体质量下降, 精神萎靡, 活动度差, 饮食、饮水量下降, 毛发变黄、松乱, 肾功能恶化; 组织病理学检查发现肾小管上皮细胞空泡样变性、小管细胞及肾小管刷状缘脱落、炎性细胞灶性浸润, 提示急性 CsA 肾中毒模型已被成功复制。

在试验组 SD 大鼠的肾组织中, 各时段 OA mRNA 的含量均高于对照组 SD 大鼠的肾组织。Col III 是评价肾间质纤维化 (renal interstitial fibrosis, RIF) 的重要指标, 其含量在 CsA 2 d 及 1 周组大鼠肾组织中与同时段对照组大鼠肾组织相比差异无统计学意义, CsA 2 周组较同时段对照组显著升高, 说明在急性 CsA 肾中毒模型中, OA 的表达先于 Col III 在细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的沉积。SCr 是临床上评价肾功能的指标, 其在 CsA 2 d、1 周组大鼠中浓度与同时段对照组相比没有明显差别; 而 CsA 组 2 周组大鼠 SCr 显著高于同时段对照组, 这说明与 SCr 相比, OA 能更灵敏地反映 CsA 引起的肾组织损害。

近年来, 关于 ECM 解降系统, 尤其是 MMPs 及其组织抑制因子 (tissue inhibitors of metalloproteinases,

TIMPs) 在肾纤维化中的作用日渐受到关注。在大鼠体内, MMP-13 是一种重要的间质胶原酶, 主要降解 I, II, III 型间质胶原及蛋白多糖的核心蛋白; 而在人体内, 与 MMP-13 同源的 MMP-2, -9 参与肿瘤、关节炎及酒精性肝硬化的发病^[14-16]。研究^[17]证实巨细胞病毒启动子控制的 OA 在体外的过度表达诱导 NIH-3T3 成纤维细胞中 MMPs 的产生, 提示 OA 诱导产生的 MMPs 可能在纤维重塑中发挥重要作用。在本研究中, 试验组各时段大鼠肾组织中 MMP-13 的表达均较对照组高, 这说明同 OA 一样, MMP-13 在大鼠急性 CsA 肾中毒的起始、进展及组织重塑等阶段均有表达。OA 表达增加所诱导产生的 MMP-13 可能在包括肾在内的多器官纤维化的病理机制中发挥重要作用。

肾小管上皮细胞被认为在肾间质纤维化的发生、发展中起重要作用^[18]。Nakamura 等^[11]用原位杂交技术发现单侧输尿管梗阻 6 h 后在 SD 大鼠肾小管上皮细胞即有新生的 OA 表达。由于 OA 蛋白在其 N 末端含有一段“MESLCGVLVFLLLAAGL”组成的信号序列 (NIH accession: NP_579832), 他们用抗-V5 抗体标记的人胚胎肾细胞 (HEK293) 成功表达了含 V5 标记的大鼠 OA 蛋白, 且证实在培养上清液及转化细胞匀浆中均发现了 65 kD 的蛋白。因此, 他们认为, 在单侧输尿管梗阻 6 h 后, 由肾小管上皮细胞产生和分泌的 OA 即开始诱导 MMP 的活化。笔者通过免疫组织化学也发现 CsA 中毒模型中 OA 在肾小管上皮细胞和肾间质部位表达明显, 进一步说明 OA 可能加重肾纤维化。

Nakamura 等^[11]用明胶酶谱电泳并没有使 OA 显示出清晰条带, 说明 OA 可能本身并不具备胶原酶的活性, 且在预实验中, 使用各自特异性抗体, OA 不能诱导 MMP-1, -2, -3, -9, MT-MMP-1, -2 及 TIMP-1 和 2 在 HEK293 中的产生。因此笔者推测, 不同细胞对 OA 的反应可能不尽相同, 在 CsA 引起 SD 大鼠急性肾损伤的早期, 位于肾小管上皮细胞内表达增加的 OA 可能是激活 MMP-13 从而启动并加剧肾纤维化的重要因素。通过 OA 表达上调介导的 MMP 基因的活化与表达, 可能涉及信号转导系统, Furochi 等^[3]认为胞外域脱落产生的 OA 片段通过细胞外信号调节激酶通路, 诱导小鼠 NIH-3T3 成纤维细胞中 MMP-3 表达。Nakamura 等^[11]认为可能存在 OA 受体, 但目前尚未得到证实。

另一种观点认为肾小管上皮细胞与间质纤维细

胞的相互作用与肾小管肾间质纤维化的发生密切相关。在正常肾组织中,肾小管上皮细胞、间质纤维细胞和 ECM 按生理结构排列分布,相互间存在着密切的信息交流与功能协同,以维持肾组织的正常结构和功能,一旦这种正常的生理结构被打破,如肾小管损伤,基底膜异常基质蛋白插入等即可导致肾组织纤维化的发生^[18]。在本实验中,急性 CsA 中毒导致肾小管及其上皮细胞损害,引起 OA 反应性表达上调,从而诱发 MMP-13 的产生及 Col III 在 ECM 的堆积,细胞与细胞、细胞与基质之间的结构和信号转导紊乱,可能为肾组织纤维化发生机制之一,而 OA/MMPs/Col III 参与了这一作用。

总之,本研究表明:OA 是急性环孢素肾毒性致肾小管上皮细胞损伤的一个敏感的生物标志物,在肾小管上皮细胞内早期反应性表达上调的 OA 可能通过肾小管上皮细胞与间质纤维细胞之间的调节信号诱导 MMP-13 的产生和 Col III 蛋白的重构,从而在诱发肾间质纤维化中发挥关键作用。其具体的生物学作用及引起肾纤维化的机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Owen T A, Smock S L, Prakash S, et al. Identification and characterization of the genes encoding human and mouse osteoactivin[J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Exp*,2003,13(2/4):205-220.
- [2] Wetermann M A, Ajubin N, van Dinter I M, et al. *Nmb*, a novel gene, is expressed in low-metastatic human melanoma cell lines and xenografts[J]. *Int J Cancer*,1995,60(1):73-81.
- [3] Furochi H, Tamura S, Mameoka M, et al. Osteoactivin fragments produced by ectodomain shedding induce MMP-3 expression via ERK pathway in mouse NIH-3T3 fibroblasts [J]. *FEBS Lett*,2007,581(30):5743-5750.
- [4] Sheng M H, Wergedal J E, Mohan S, et al. Osteoactivin is a novel osteoclastic protein and plays a key role in osteoclast differentiation and activity[J]. *FEBS Lett*,2008,582(10):1451-1458.
- [5] Rose A A, Pepin F, Russo C, et al. Osteoactivin promotes breast cancer metastasis to bone[J]. *Mol Cancer Res*,2007,5(10):1001-1014.
- [6] Rich J N, Shi Q, Hjelmeland M, et al. bone-related genes expressed in advanced malignancies induce invasion and metastasis in a genetically defined human cancer model [J]. *J Biol Chem*,2003,278(18):15951-15957.
- [7] Ogawa T, Nikawa T, Furochi H, et al. Osteoactivin upregulates expression of MMP-3 and MMP-9 in fibroblasts infiltrated into denervated skeletal muscle in mice [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*,2005,289(3):C697-707.
- [8] Kharasch E D, Schroeder J L, Bammler T, et al. Gene expression profiling of nephrotoxicity from the sevoflurane degradation product fluoromethyl-2, 2-difluoro-1-(trifluoromethyl) vinyl ether ('compound A') in rats [J]. *Toxicol Sci*,2006,90(2):419-431.
- [9] Rodwell G E, Sonu R, Zahn J M, et al. A transcriptional profile of aging in the human kidney [J]. *PLoS Biol*,2004,2(12):2191-2201.
- [10] Schmid H, Boucherot A, Yasuda Y, et al. Modular activation of nuclear factor- κ B transcriptional programs in human diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*,2006,55(1):2993-3003.
- [11] Nakamura A, Ishii A, Ohata C, et al. Early induction of osteoactivin expression in rat renal tubular epithelial cells after unilateral ureteral obstruction [J]. *Exp Toxicol Pathol*,2007,59(1):53-59.
- [12] Shihab F S, Andoh T F, Tanner A M, et al. Role of transforming growth factor-beta 1 in experimental chronic cyclosporine nephropathy[J]. *Kidney Int*,1996,49(4):1141-1151.
- [13] Nankivell B J, Borrows R J, Fung C L, et al. The natural history of chronic allograft nephropathy [J]. *N Engl J Med*,2003,349(24):2326-2333.
- [14] Kanayama H. Matrix metalloproteinases and bladder cancer [J]. *J Med Invest*,2001,48(1/2):31-43.
- [15] Fosang A J, Last K, Knauper V, et al. Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13) [J]. *FEBS Lett*,1996,380(1/2):17-20.
- [16] Yan S, Ghen G M, Yu C H, et al. Expression pattern of matrix metalloproteinases-13 in a rat model of alcoholic liver fibrosis [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*,2005,4(4):569-572.
- [17] Abbate M, Zoja C, Rottoli D, et al. Proximal tubular cells promote fibrogenesis by TGF-beta 1-mediated induction of peritubular myofibroblasts [J]. *Kidney Int*,2002,61(6):2066-2077.
- [18] 汤珣. MMPs/TIMPs 与肾脏纤维化[J]. *国外医学·泌尿系统分册*,2001,21(s1):149-152.
- TANG Xun. MMPs/TIMPs and renal fibrosis [J]. *Foreign Medical Sciences · Urological System*,2001,21(s1):149-152.

(本文编辑 陈丽文)