

# 去乙酰化蛋白酶 1 在马兜铃酸肾纤维化模型中对 TGF- $\beta$ 1/Smad7 信号通路的作用

杨 洋<sup>1,2</sup>, 张中文<sup>2\*</sup>, 姚 华<sup>2</sup>, 高 磊<sup>2</sup>, 李培锋<sup>1\*</sup>, 吴国娟<sup>2\*</sup>

(1. 内蒙古农业大学兽医学院, 呼和浩特 010018; 2. 北京农学院动物科学技术学院, 北京 102206)

**摘 要:** 检测马兜铃酸肾纤维化(AAN)模型肾组织中转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)、Smad7、去乙酰化蛋白酶 1(HDAC1)的 mRNA 和蛋白表达变化, 探讨 HDAC1 和 Smad7 的表达在 AAN 发展中的作用及两者间的联系。RT-PCR 检测 TGF- $\beta$ 1、Smad7 和 HDAC1 的 mRNA 表达, ELISA 检测 TGF- $\beta$ 1 的蛋白表达, 免疫组化定位和检测 HDAC1 和 Smad7 蛋白, HE 染色观察肾病理学改变。结果显示: AAN 模型肾组织中 TGF- $\beta$ 1 和 HDAC1 mRNA 表达呈时间依赖性升高, TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达较对照组有明显差异( $P < 0.05$ ), 28 d 开始 AAN 组中 HDAC1 mRNA 增加, 差异极显著( $P < 0.01$ ); Smad7 mRNA 和蛋白表达均呈下降趋势, HDAC1 蛋白免疫组化染色强度呈上调趋势, 与对照组比较 HDAC1 阳性着色主要分布于上皮细胞和间质细胞的细胞核; 肾脏病理表现为肾小管浊肿、变性和脱落等急性小管间质损伤, 并随用药时间的延长呈进行性加重。本研究表明肾组织中 Smad7 弱表达可促进 TGF- $\beta$ 1 信号转导, HDAC1 mRNA 和蛋白在肾组织中的高表达并参与 TGF- $\beta$ 1/Smad7 信号通路在肾纤维化发展中起重要作用, 可能是潜在的新作用靶点。

**关键词:** AAN; TGF- $\beta$ 1; Smad7; HDAC1

中图分类号: S852.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)03-0459-10

## The Role of HDAC1 in the Signal Pathway of TGF- $\beta$ 1 / Smad7 in AAN Model

YANG Yang<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhong-wen<sup>2\*</sup>, YAO Hua<sup>2</sup>, GAO Lei<sup>2</sup>, LI Pei-feng<sup>1\*</sup>, WU Guo-juan<sup>2\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; 2. Animal Science and Technology College, Beijing University of Agriculture,

Beijing 102206, China)

**Abstract:** The aim of this study was to study the changes in the expression of transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), the TGF- $\beta$ 1 receptor (T $\beta$ R-I), Smad7, and histone deacetylase 1 (HDAC1) in mice with aristolochic acid nephropathy (AAN), and analyze the relationship between HDAC1 and Smad7. RT-PCR was applied to detect the mRNA levels of TGF- $\beta$ 1, Smad7 and HDAC1 in kidneys. The TGF- $\beta$  concentrations were determined by ELISA. HDAC1 and Smad7 proteins were localized and detected by immunohistochemistry method. The tissue section technique was used to observe the histopathologic changes, such as kidney damage and renal tubules interstitial fibrosis degree. Results were as follows: In mice with induced AAN, the mRNA levels for TGF- $\beta$ 1 and HDAC1 were increased with treatment time. The mRNA levels for TGF- $\beta$ 1 were higher than that of their control (normal mice without treatment) ( $P < 0.05$ ). Starting from 28 day, mRNA of HDAC1 became significantly higher than the level of the control ( $P < 0.01$ ). The levels of Smad7 protein and its mRNA were decreased with time, and lower than that of con-

收稿日期: 2011-06-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31172362; 30972215); 北京市属高校人才强教计划资助项目(PHR); 北京市自然科学基金资助(6092004; 5102014); 北京市教委项目资助(KM 201010020008)

作者简介: 杨 洋(1982-), 女, 内蒙古巴彦淖尔人, 博士生, 主要从事信号通路研究, E-mail: yangyangsea@126.com

\* 通讯作者: 吴国娟, E-mail: wgj9288@sina.com; 李培锋, 教授, E-mail: lpfneimeng@163.com; 张中文, 教授, E-mail: zwzhang9288@sina.com

trol. HDAC1 protein expression was increased with time post treatment. Compared with the control group, HDAC1 positive stains were mainly distributed in the epithelial and stromal cell nucleus. Histopathologic changes of kidney showed acute tubular interstitial damage, such as turbidity, swollen, degeneration and fall off of renal tubular. With extension of treatment time, renal tubular damage was aggravated progressively. During the development of AAN in mice, Smad7 can cause renal tubular damage, impare renal tubular renewable repair ability, restrain Smad7 mRNA expression. The weak expression of Smad7 in renal tissues can promote TGF- $\beta$ 1 signal transduction, help the fibre formation and maintain the proliferation condition. One of the mechanism happened is about HDAC1, which mRNA and protein high expressions plays an important role in the development aristolochinc acid nephropathy, may be a new potential target.

**Key words:** aristolochic acid nephropathy; transforming growth factor- $\beta$ 1; Smad7; histone deacetylases 1

马兜铃酸(Aristolochic Acid, AA)可激活肾小管上皮细胞分泌大量 TGF- $\beta$ (Transforming growth factor- $\beta$ )等细胞因子,这些细胞因子作用于肾间质成纤维细胞,促其分泌细胞外基质。TGF- $\beta$ 超家族成员是上皮细胞—间充质细胞转化过程的经典调控因子<sup>[1]</sup>,是一种促纤维化因子<sup>[2]</sup>,可刺激上皮细胞向间质细胞转化。马兜铃酸 I (AA I)是 AA 的主要毒性成分,对肾组织有慢性毒性作用,可引起马兜铃酸肾纤维化(Aristolochic Acid Nephropathy, AAN),肾纤维化是各种形式肾脏病发展的最终共同途径,对肾脏功能有进行性不可逆转的损害,明确其作用机理对于防治肾纤维化具有重要意义。越来越多的研究揭示 TGF- $\beta$ 1 信号通路的调节机制<sup>[3-6]</sup>,特别是通过 Smad7 蛋白的泛素化或乙酰化修饰,调节 TGF- $\beta$ 1/Smad7 信号通路在不同生理病理状态下的功能<sup>[7]</sup>。TGF- $\beta$ 1/Smad7 信号通路参与了 AA I 诱导的小鼠肾小管上皮细胞转分化,且 AA I 显著抑制 TGF- $\beta$ 1 信号负调控因子 Smad7 的 mRNA 表达,这种抑制作用呈时间和剂量依赖性<sup>[8]</sup>。Smad7 的缺失导致小鼠发生肾纤维化和肾脏炎症<sup>[9]</sup>,研究发现,Smad7 是泛素化和乙酰化的靶点<sup>[10]</sup>。乙酰化通过阻止赖氨酸残基的泛素化避免蛋白降解,Smad7 的乙酰化与去乙酰化是一个动态平衡过程,共同调节 Smad7 的稳定性。基于以上论点,本研究的切入点为 AA I 可显著下调 Smad7 的 mRNA 表达,那么其蛋白表达是否也会下降,研究 Smad7 的表达下调是否因乙酰化不足而使蛋白质不稳定引起的;研究 AA I 对与 Smad7 蛋白相关的 HDAC1 的影响,分析 Smad7 蛋白表达的变化,找出 AA I 作用的新靶点;研究分析 AAN 模型肾组织中 HDAC1

的定位和基因蛋白表达量的变化,为 AAN 作用机制分子机理研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物分组及标本采集

SPF 级昆明鼠 40 只,雌雄各半,体质量(20 $\pm$ 2) g,3~4 周龄,由中国军事医学科学院实验动物中心提供,随机分为 AAN 模型组( $n=35$ )和正常对照组( $n=5$ ),自由饮食。AAN 组按 AAI 8 mg $\cdot$ (kg $\cdot$ d)<sup>-1</sup>灌胃,正常对照组等容量饮用水灌胃,分别于第 7(D7)、14(D14)、21(D21)、28(D27)、35(D35)、42(D42)和 49(D49)天断颈处死 AAN 模型组昆明鼠 5 只,对照组于第 28 天断颈处死,采取的肾组织样品一半置于液氮罐中保存用于提取 RNA,另一半做石蜡切片进行 HE 染色和免疫组化染色。

### 1.2 药品和试剂

AA I 购自中国药品监查所,抗小鼠 HDAC1 单克隆抗体(Abcam 公司)、抗兔 Smad7 多克隆抗体(Santa 公司),二抗分别为辣根过氧化酶标记的山羊抗小鼠 IgG(H+L)和山羊抗兔 IgG(H+L)、显色系统为辣根过氧化物酶(HRP)/二氨基丁酸(DAB)均购自北京中杉金桥生物技术开发公司,鼠 Streptavidin-HRP 试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司),山羊超敏二步法免疫组化检测试剂(GBI 公司),M-MLV 反转录酶(Promega 公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 肾脏组织 TGF- $\beta$ 1、Smad7 和 HDAC1 mRNA 表达的检测 半定量逆转录聚合酶链式反应法(RT-PCR)检测 TGF- $\beta$ 1、Smad7 和 HDAC1 mRNA 表

达。每组取一块组织, TRIzol 一步法提取肾组织总 RNA, 超微量核酸蛋白测定仪检测 RNA 含量, 所有样品 260 nm 和 280 nm 吸光度比值在 1.8~2.0。从 GenBank 中查基因序列, 根据引物设计原则, 利用 Primer 5 软件设计。引物序列由上海生工生物工程技术有限公司合成(详见表 1)。RNA 逆转录合成 cDNA 后进行 PCR 扩增, 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 53 °C 20 s, 72 °C 30 s, 35 个循环;

72 °C 10 min。以  $\beta$ -actin 为内参照。扩增反应完毕后, 分别取扩增产物各 5  $\mu$ L 加上样缓冲液 1  $\mu$ L, 用 1% 的琼脂糖凝胶在 100 V 电压下电泳 50 min, 用凝胶成像系统获取图片。用凝胶图像分析软件系统分析图片吸光度, 获得相应的吸光值, 以所获得的各指标的吸光度与内参照  $\beta$ -actin 吸光度的比值代表半定量值。

表 1 引物序列及 PCR 参数

Table 1 Primer sequences and the parameters of PCR

基因 Gene	引物序列(5'-3') Sequence	退火温度/°C Annealing temperature	产物大小/bp PCR fragment
TGF- $\beta$ 1	Forward: CGAAGCGGACTACTATGCTAAAGAG Reverse: GGTTCATAGATGGCGTTGTT	52.5	310
Smad7	Forward: CAGCTCAATTCGGACAACAA Reverse: AACCAGGGAACACTTTGTGC	59.0	307
HDAC1	Forward: TCCAACATGACCAACCAGAA Reverse: TTGTCAGGTCCTCATC	52.5	415
$\beta$ -actin	Forward: AGCCATGTACGTAGCCATCC Reverse: CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	59.8	228

### 1.3.2 免疫组化法检测 Smad7 和 HDAC1 表达

采用免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(SP)检测 HDAC1 和 Smad7 的蛋白表达。石蜡切片常规脱蜡至水, 枸橼酸盐缓冲液微波抗原修复后用 TritonX-100 细胞膜打孔, 灭活内源性酶后用非免疫血清封闭, 以上每一步骤之后均用 PBS 液充分漂洗, 继之按卵白素-生物素-过氧化物酶复合物法(SP法)进行免疫组织化学反应, 染色程序按试剂盒说明书进行, 滴加一抗 HDAC1/Smad7 抗体, 浓度为 1:300, 4 °C 孵育过夜, PBS 液漂洗, 滴加二抗(即用型), 经 DAB 显色, 苏木素复染。以 PBS 代替一抗为阴性对照, 镜下细胞核呈棕黄色为阳性表达细胞。用显微镜观察, 每组随机观察 10 个视野, 分析各视野下阳性目标光密度和阳性面积百分比, 以二者之积代表待测抗原的量。

1.3.3 双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)测定 TGF- $\beta$ 1 采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清中 TGF- $\beta$ 1 的水平。向预先包被了 TGF- $\beta$ 1 单克隆抗体的酶标孔中加入 TGF- $\beta$ 1, 温育; 洗涤后, 加入 HRP 标记过的 TGF- $\beta$ 1 抗体, 再经过温育和洗涤, 去除未结合的酶, 然后加入底物 A、

B, 产生蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色, 加入终止液, 450 nm 波长下测量各孔的吸光度值(OD 值)。根据标准品的浓度及对应的 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程, 再根据样品的 OD 值在回归方程上计算出对应的样品浓度。

### 1.3.4 苏木素-伊红(HE)染色检查肾脏病变

取肾脏组织, 常规制备 4  $\mu$ m 石蜡切片, 常规 HE 染色。采用 JD801 形态学图像分析系统进行分析。肾小管损伤程度采用“点计数”评估: 在高倍视野( $\times$ 200)下选取 20 个肾皮质视野, 观察显微镜目镜的标尺上出现肾小管损伤的点数, 计算损伤肾小管(小管扩张、变性、坏死和萎缩等)的数目占总肾小管数目的百分比。肾小管间质损伤(Tubulointerstitial injury, TI)指数判断标准包括: (1)皮质区肾间质纤维化程度; (2)炎性细胞浸润程度; (3)肾小管扩张或萎缩程度。损伤程度分为 6 级<sup>[11]</sup>: 0 级为正常; 1 级为病变范围 <10%; 2 级为病变范围 10%~24%; 3 级为病变范围 25%~50%; 4 级为病变范围 51%~75%; 5 级为病变范围 >75%。每张切片随机选取 20 个皮质区视野( $\times$ 100)。

## 1.4 统计分析

计量资料数据采用 SPSS Statistics 17.0 统计分析软件进行统计学处理,组间比较采用单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 HE 染色反应的病理变化

AAN 模型组用药后第 7 天肾小球未见损害,肾小管-间质、肾血管已发生轻微病变;第 14 天肾小球未见改变,部分肾小管上皮细胞发生空泡变性;第 21 天肾小管进行性扩张,上皮细胞胞质疏松、空泡变性,间质水肿伴有少量的淋巴细胞、单核细胞浸润;肿胀的小管上皮细胞逐渐缩小,部分远曲小管出现扩张,个别肾小管萎缩,但未见间质出现纤维化;第 28 天部分肾小管空泡变性呈片状分布,部分小管基底膜增厚、裸露和断裂,可见散在的小管灶性萎缩和肾间质纤维化,少数小动脉管壁增厚,管腔狭窄;第 35 天时可见较多肾小管出现萎缩,肾间质出现多灶性纤维化;第 42 天主要表现为皮质区弥漫性炎症细胞浸润,间质面积进一步增宽,其中可见大量的纤维组织增生,肾小管进一步扩张,部分肾小管萎缩,肾小管上皮细胞空泡变性;第 49 天 AAN 模型组肾小管结构严重破坏,代之以浸润的炎性细胞和弥漫增生的纤维组织,出现弥漫性小管上皮细胞损害,HE 染色可见大部分小管浊肿,刷状缘脱落,灶性小管上皮细胞崩解、脱落及空泡变性,偶见基底膜增厚和裸露;小血管周围及间质有散在炎细胞浸润,以单核细胞为主(图 1)。

### 2.2 免疫组化蛋白半定量分析 Smad7 和 HDAC1 蛋白表达

从免疫组化结果可以看出,在正常生理情况下肾小球和肾小管上皮细胞中 HDAC1 蛋白表达量很少,DAB 染色着色较浅,而 AAN 模型组小鼠在上述部位的 HDAC1 蛋白表达量增加,呈阳性表达,着色较深且有逐渐加深的趋势(图 2)。正常昆明鼠肾脏可见 Smad7 蛋白表达的阳性颗粒均匀分布,主要见于肾小球和肾小管,着色较深,表达量较多。与对照组相比,AAN 模型组在肾小管的 Smad7 蛋白的阳性颗粒明显减少,呈散在分布,表明模型组小鼠肾脏组织中 Smad7 蛋白表达减少。通过免疫组化灰度分析可以看出,随着 AAN 模型灌药时间的延长,Smad7 阳性表达呈下降趋势,肾小管上皮细胞胞质及胞核中 Smad7 阳性反应蛋白染色逐渐减弱(图 3)。JD801 形

态学图像分析系统分析免疫组化结果见图 4。

### 2.3 ELISA 检测 TGF- $\beta$ 1 表达水平

如图 5 所示,血清中的 TGF- $\beta$ 1 蛋白表达从灌胃的第 28 天开始呈现升高趋势,差异极显著( $P < 0.01$ ),表明 AAN 小鼠模型造模成功至少需要 4 周(28 d),TGF- $\beta$ 1 蛋白含量的增多表明 AAI 作用于该信号通路,其具体机制还需要进一步研究。

### 2.4 RT-PCR 半定量分析相关基因表达变化

Quantity One 软件分析电泳条带得到各因子在不同时间 mRNA 的相对表达量如图 6 所示:在 AAN 模型组肾组织中的 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达量与对照组相比明显增加,差异显著( $P < 0.05$ ),不同时期的模型组之间差异不显著;Smad7 mRNA 表达量则较对照组随着不同的时间逐渐降低,差异不显著;HDAC1 mRNA 在第 28—42 天表达量与对照组比较显著增加,差异极显著( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

### 3.1 AA 与 AAN 的病理学作用关系

肾纤维化指在各种致病因子(如炎症、损伤、药物等)的作用下,细胞外基质(ECM)大量堆积导致的肾小管间质纤维化<sup>[12]</sup>。肾纤维化是各种形式的肾脏疾病进展到慢性肾衰竭的共同途径和主要病理基础,其最终结果是对肾脏功能造成进行性的不可逆转的损害,因此建立较好的肾纤维化模型对于研究肾纤维化的发病机制有相当重要的意义。肾纤维化模型的种类有很多,由马兜铃酸(AA)诱导的肾纤维化模型(马兜铃酸肾病模型,AAN)就是其中一个可提供研究肾纤维化病理生理途径的有用模型<sup>[13]</sup>,AA 对肾组织有慢性毒性作用,可引起慢性肾间质纤维化<sup>[14]</sup>。本试验中 AAN 组小鼠与正常对照组小鼠病理切片比较,损伤部位主要发生在皮质部和皮质髓质交界处,主要为近段肾小管上皮细胞损伤,肾小管上皮细胞损伤主要表现为肾小管上皮细胞变性、坏死、崩解,变性的细胞出现细胞核变化;AA 对肾小球和微血管的损伤比肾小管小,肾小球仅见轻微出血和炎性细胞浸润,仅肾小球微血管出现管壁增厚和炎性细胞浸润。AA 对肾脏皮质髓质交界部的损伤,可见小管增宽、大量炎性细胞浸润、肾小管上皮细胞核变性聚集呈现纤维化趋势<sup>[15]</sup>。AAN 模型组按照给药时间由低到高对肾脏组织损伤呈现时间依赖性趋势,给药时间越长造成的肾脏损伤就越严重。

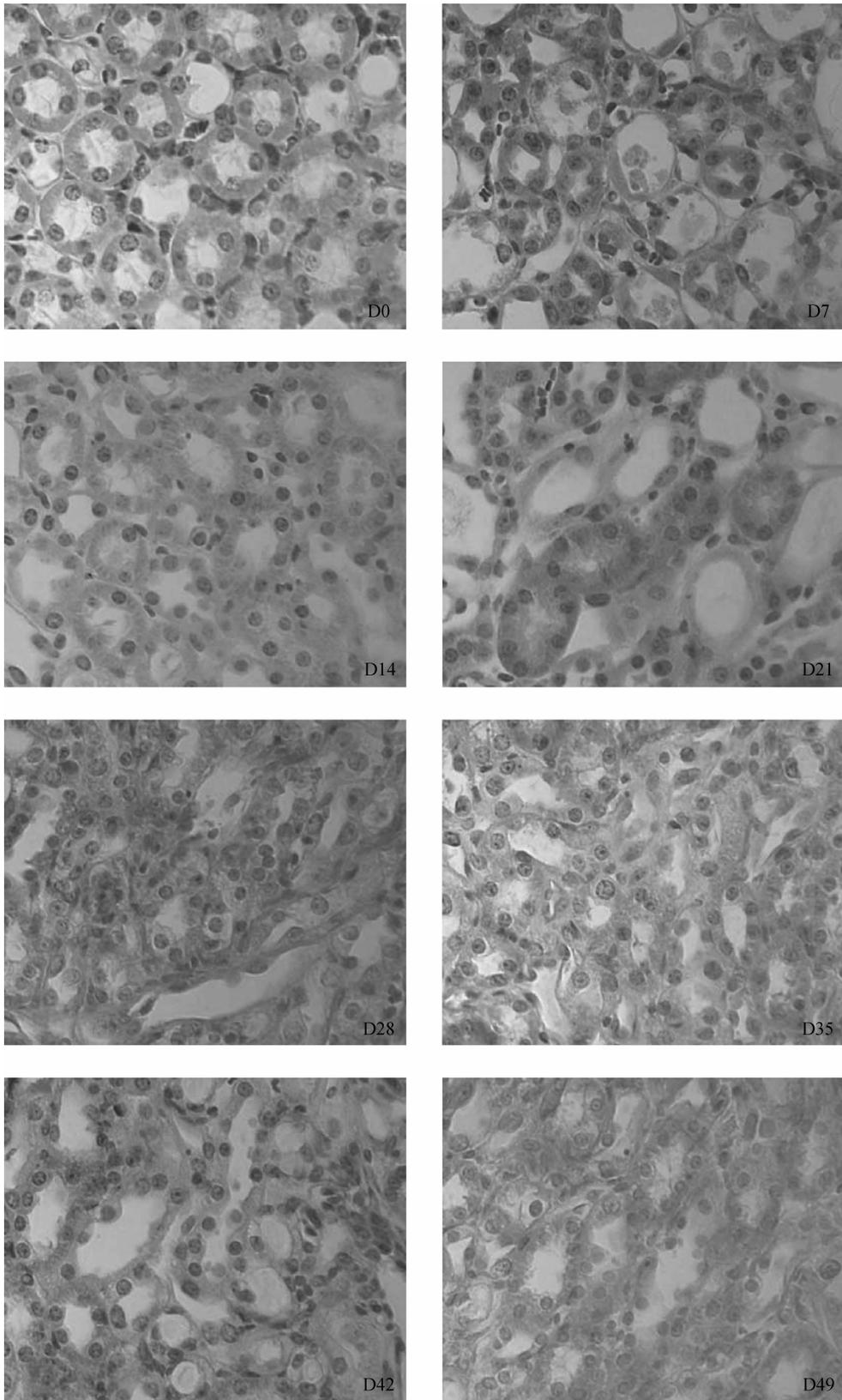


图 1 AAN 小鼠模型肾脏病理(HE 染色, 200 $\times$ )

Fig. 1 Pathological section of renal tissue of AAN in mouse in eight groups (HE staining, 200 $\times$ )

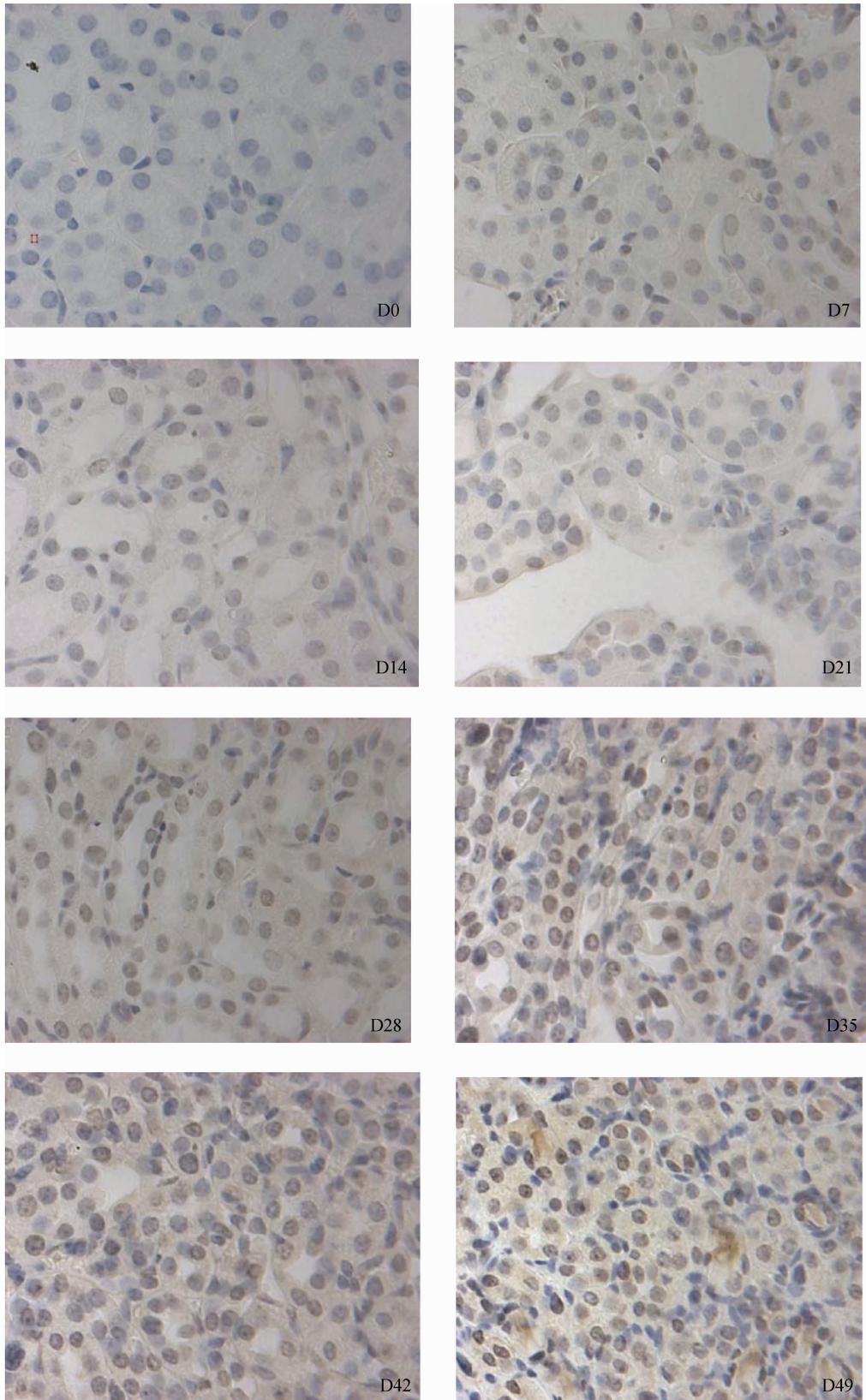


图 2 AAN 小鼠肾组织 HDAC1 表达(免疫组织化学染色, 200×)

Fig. 2 Expression of HDAC1 of AAN in mouse in eight groups (immunohistochemical staining, 200×)

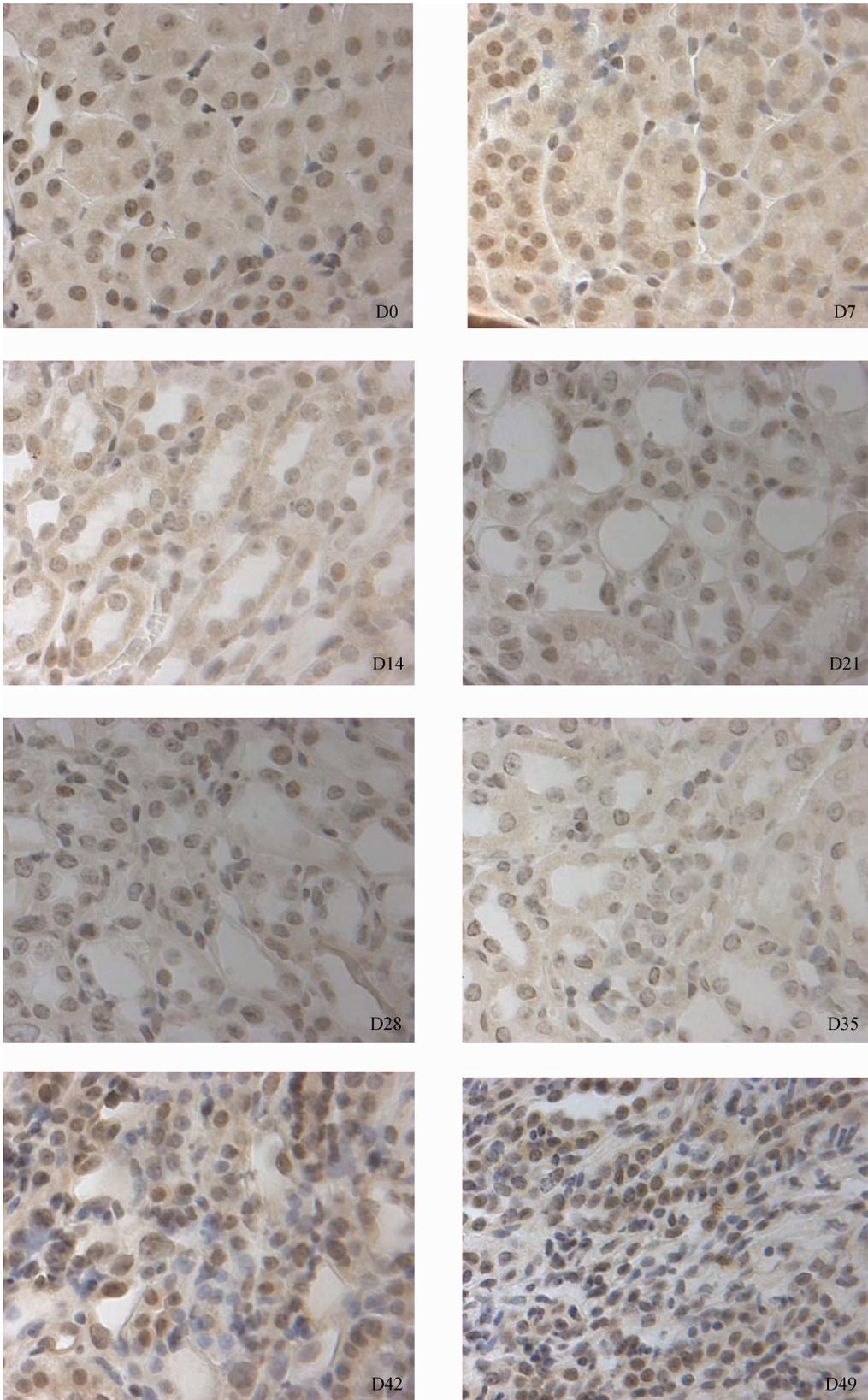


图 3 AAN 小鼠肾组织 Smad7 表达(免疫组织化学染色, 200 $\times$ )

Fig. 3 Expression of Smad7 of AAN in mouse in eight groups (immunohistochemical staining, 200 $\times$ )

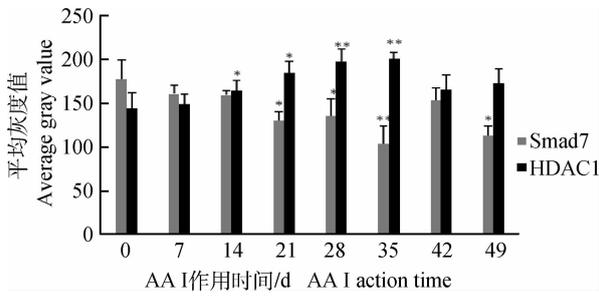


图4 免疫组化灰度值

Fig. 4 Immunohistochemical analysis of gray value

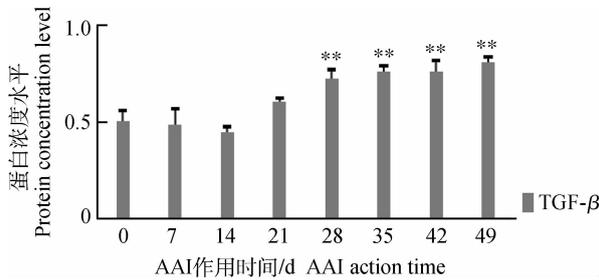


图5 ELISA 检测 TGF-β1 蛋白水平

Fig. 5 ELISA test TGF-beta protein level

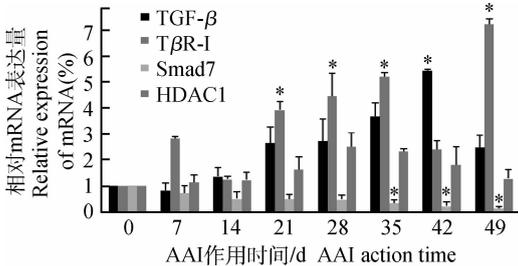
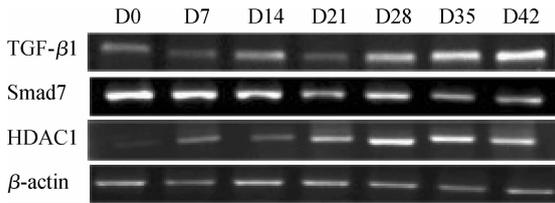


图6 各时间点肾组织相关因子的 mRNA 表达

Fig. 6 Expressions of different related factors mRNA in renal tissues in seven groups

### 3.2 TGF-β、Smad7 和 HDAC1 的基因和蛋白表达变化在 AAN 中作用

TGF-β 是已知作用最强的一种促肾纤维化的细胞因子,具有调节细胞的增殖、分泌、迁移和凋亡等多种生物学活性。在肾纤维化过程中 TGF-β 起着关键作用,涉及到细胞外基质(ECM)、细胞增殖

及转分化、炎症浸润等各个环节,既能促进 ECM 的生成,又能通过直接或间接途径抑制 ECM 的降解,能诱导小管上皮细胞凋亡或转分化为成纤维细胞而破坏小管细胞的完整性,使其正常表型丧失,分泌一系列炎症因子和分子,积极参与小管间质微炎症状态和纤维化进展。TGF-β 通过激活细胞膜表面相应 I 型及 II 型受体,形成复合体激活细胞内 Smad2 和 Smad3,后者再与 Smad4 结合并转入核内启动相关基因表达。活化的 TGF-β1 磷酸化 R-Smads (Smad2、Smad3)启动了 TGF-β1 信号转导通路的同时也激活了抑制因子 Smad7, TGF-β 对 Smad7 的诱导能力揭示了 Smad7 是具有负反馈调节 TGF-β 功能的细胞分泌因子,可抑制 TβR-I 对 R-Smads 的磷酸化<sup>[16]</sup>,增加泛素介导的 TβR-I 自身的降解<sup>[17]</sup>,阻抗 TGF-β 的信号转导。

Smad7 是 TGF-β 功能特有的内源性抑制因子,能抑制 R-Smads 的磷酸化从而抑制 TGF-β 的效应<sup>[18-19]</sup>,因此对其表达的调控可能成为阻断肾小球 TGF-β 效应的生理学基础。Schiffer 等<sup>[20]</sup>建立的肾纤维化模型中,Smad7 转基因治疗可以明显阻止 TGF-β1 的信号转导,抑制肾纤维化。乙酰化的 Smad7 在 HDAC1 的作用下去乙酰化后与泛素连接酶结合,加速 Smad7 的降解<sup>[21]</sup>,非组蛋白 Smad7 直接募集 HDAC1,促进组蛋白去乙酰化,导致染色质凝缩,阻碍转录起始复合物的形成而抑制转录,且这种作用可被 HDACs 蛋白酶抑制剂所阻断,故推断 HDAC1 在肾纤维化中是一个极佳的抗纤维化作用靶位。

HDAC1 是 I 型 HDACs 成员之一,广泛在各组织中表达,并参与多种细胞活动过程。有资料报道在胃癌、前列腺癌等肿瘤组织中 HDAC1 mRNA 水平和蛋白水平均高表达,并显示肿瘤细胞中 HDAC1 高表达可明显增加肿瘤细胞的增殖能力,而 HDAC1 高表达可影响细胞外基质而使肿瘤细胞移行和侵袭力明显加强。Halkidou 等<sup>[22]</sup>、Patra 等<sup>[23]</sup>报道,在前列腺癌及癌前病变中 HDAC1 mRNA 和蛋白表达明显增高,并且 HDAC1 的高表达可使肿瘤的增殖明显升高。另外 Wilson 等报道,在结肠肿瘤中 HDAC1 和 HDAC3 均高表达<sup>[24]</sup>。本研究同样发现 HDAC1 的表达存在差异,AAN 模型组的 HDAC1 mRNA 水平明显比正常组织的高,这与 HDAC1 在其他疾病中的表达相似,HDAC1 在肾纤维化组织中高表达,提示其在 AAN 过程中可能起

到重要作用,其机制可能与 HDAC1 高表达引起 Smad7 蛋白乙酰化状态的失衡,Smad7 过度去乙酰化从而导致抑纤维化基因表达抑制或促纤维化基因激活和过度表达、细胞过度增殖及染色质重构等机制有关,需进一步的研究来证实。

免疫组织化学方法检测靶蛋白表达可以反映 90% 以上的对应靶基因状态<sup>[25]</sup>。本试验采用免疫组织化学方法,检测了模型组和正常组肾组织中 Smad7 和 HDAC1 蛋白表达情况,结果显示 Smad7 主要表达于肾小管上皮细胞,除在损伤肾小管呈明显阳性表达外,浸润的炎细胞区域也呈阳性表达,随着时间延长,Smad7 阳性表达呈下降趋势; AAN 模型组从第 28 天开始,HDAC1 阳性表达明显上调,强度增加,主要表达于损伤的肾小管上皮细胞,在正常组织中几乎不表达。Choi 等<sup>[26]</sup>报道在 68% (17/25) 的胃癌组织中有 HDAC1 mRNA 的高表达,免疫组化提示在 61% (11/18) 胃癌组织中高表达,并且主要在肿瘤细胞核中表达,而在正常的腺上皮细胞仅有局灶分布的微弱的 Hall 表达,这同本文的结论一致。

#### 4 结 论

TGF- $\beta$ 1 是肾纤维化的关键因素,Smad 蛋白是 TGF- $\beta$  家族信号从受体到核的细胞内转导分子,Smad7 是 TGF- $\beta$  信号通路的负反馈调节因子,故 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号转导通路在肾纤维化的发生发展中起重要作用,因此 TGF- $\beta$ 1 信号转导级联成为研究肾脏病变的潜在靶点,有效切断 TGF- $\beta$  的信号转导,是终止和减轻肾纤维化的关键。通过对 AAN 模型组和正常组的肾组织进行检测,得出在 mRNA 水平上 AAN 模型肾组织中 HDAC1 表达明显高于正常组织,这提示 HDAC1 过表达可能在 AAN 的发生发展中起到重要的作用。

#### 参考文献:

[1] KALLURI R, NEILSON E G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis [J]. *Clin Invest*, 2003, 112:1776-1784.

[2] SCHNAPER H W, HAYASHIDA T, HUBCHAK S C, et al. TGF-beta signal transduction and mesangial cell fibrogenesis[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, 284:F243-F252.

[3] ITOH S, TEN DIJKE P. Negative regulation of

TGF- $\beta$  receptor/Smad signal transduction[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19: 176-184.

- [4] GLASGOW E, MISHRA L. Transforming growth factor- $\beta$  signaling and ubiquitinators in cancer [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2008, 15: 59-72.
- [5] IZZI L, ATTISANO L. Regulation of the TGF- $\beta$  signaling pathway by ubiquitin-mediated degradation[J]. *Oncogene*, 2004, 23: 2071-2078.
- [6] IZZI L, ATTISANO L. Ubiquitin-dependent regulation of TGF- $\beta$  signaling in cancer[J]. *Neoplasia*, 2006, 8: 677-688.
- [7] LÖNN P, MORÉN A, RAJA E, et al. Regulating the stability of TGF- $\beta$  receptors and Smads[J]. *Cell Res*, 2009, 19(1): 21-35.
- [8] WANG Y, ZHANG Z, WU G, et al. TGF-beta1/Smad7 signaling stimulates renal tubulointerstitial fibrosis induced by AA I [J]. *Recept Signal Transduct Res*, 2008, 28(4): 413-428.
- [9] CHUNG A C, HUANG X R, ZHOU L, et al. Disruption of the Smad7 gene promotes renal fibrosis and inflammation in unilateral ureteral obstruction (UUO) in mice[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 24(5): 1443-1454.
- [10] GRÖNROOS E, HELLMAN U, HELDIN C H, et al. Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination[J]. *Mol Cell*, 2002, 10: 483-493.
- [11] ZEISBERG M, SHAH A A, KALLURI R. Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney[J]. *Biol Chem*, 2005, 280(9):8094-8100.
- [12] 黄 彬. 肾纤维化中上皮间充质转化的最新研究进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(3):264-269.
- [13] DEBELLE F D, NORTIER J L, DE PREZ E G, et al. Aristolochic acids induce chronic renal failure with interstitial fibrosis in salt-depleted rats[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(2):431-436.
- [14] ZHENG F, ZHANG X, HANG Q. Establishment of model of aristolochic acid-induced chronic renal interstitial fibrosis in rats[J]. *Zhanghua Yi Xue Za Zhi*, 2001, 81(18):1095-1100.
- [15] YANG W M, YAO Y L, SUN J M, et al. Isolation and characterization of cDNAs corresponding to an additional member of the human histone deacetylase gene family [J]. *Biol Chem*, 1997, 272(44): 28001-28007.
- [16] HAYASHI H, ABDOLLAH S, QIU Y, et al. The

- MAD-related protein Smad7 associates with the TGF beta receptor and functions as an antagonist of TGF beta signaling[J]. *Cell*, 1997, 89(7):1165-1173.
- [17] KAVSAK P, RASMUSSEN R K, CAUSING C G, et al. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF-beta receptor for degradation[J]. *Mol Cell*, 2000, 6(6):1365-1375.
- [18] JYOJI Y, MASANORI K, MITSURU K, et al. Differential immunoexpressions of cytoskeletons in renal epithelial and interstitial cells in rat and canine fibrotic kidneys, and in kidney-related cell lines under fibrogenic stimuli [J]. *Exp Toxc Pathol*, 2005, 57(2):135.
- [19] WANG S N, HIRSCHBERG R. BMP<sub>7</sub> antagonizes TGF-β-dependent fibrogenesis in mesangial cells[J]. *Am J Phy Ren Phy*, 2003, 284(5):F1006
- [20] SCHIFFER M, VON GERSDORFF G, BILZER M, et al. Smad proteins and transforming growth factor-beta signaling[J]. *Kidney Int Suppl*, 2000, (77): 45-52.
- [21] SIMONSSON M, HELDIN C H, ERICSSON J, et al. The balance between acetylation and deacetylation controls Smad7 stability[J]. *Biol Chem*, 2005, 280: 21797-21803.
- [22] HALKIDOU K, GAUGHAN L, COOK S, et al. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC 1 in hormone refractory prostate [J]. *Prostate*, 2004, 59(2):177-189.
- [23] PATRA S K, PATRA A, DAHIYA R. Histone deacetase and DNA methyltransferase in human prostate cancer [J]. *BiochemBiophys Res Commun*, 2001, 287(3):705-713.
- [24] WILSON A J, BYUN D S, POPOVA N, et al. Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer [J]. *Biol Chem*, 2006, 281(19): 13548-13558.
- [25] MELHEM M F, LAW J C, EL-ASHMAWY L, et al. Assessment of sensitivity and specificity of immunohistochemical staining of p53 in lung and head and neck cancers [J]. *Am J Pathol*, 1995, 146(5): 1170-1177.
- [26] CHOI J H, KWON K H, YOON B I, et al. Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues[J]. *Jpn J Cancer Res*, 2001, 92(12):1300-1304.

(编辑 白永平)