

EMMPRIN 在大鼠肾间质纤维化过程中的表达变化

赵阿丽¹, 孙文娟¹, 杜锐¹, 孙世仁¹, 何丽洁¹, 黄晨^{1*} (第四军医大学西京医院肾脏内科, 陕西 西安 710032)

[摘要] 目的 检测细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(EMMPRIN)在大鼠肾间质纤维化模型中的表达变化。方法 64只 Sprague-Dawley 大鼠随机分为假手术组(Sham组)和模型组(UUO组), 每组16只。假手术组, 仅游离输尿管不结扎, 模型组, 行单侧输尿管结扎术, 分别于术后3、7、14 d处死大鼠并留取肾脏组织。肾脏标本行 HE、Masson 染色方法检测间质纤维化损伤的程度。应用免疫组织化学方法检测肾组织中 EMMPRIN, α -SMA, E-cadherin 的表达。结果 HE 染色显示: UUO 术后肾间质肾小管萎缩、扩张, 胞外基质沉积, 炎细胞浸润增加。Masson 染色显示: UUO 术后大鼠肾组织胶原纤维组织增生, 出现明显的间质纤维化改变。免疫组织化学结果显示: 与假手术组相比, UUO 模型3 d组的 EMMPRIN 表达显著增高, 同时有 α -SMA 表达升高和 E-cadherin 表达显著下降($P < 0.05$); 随着梗阻时间的延长, 模型7 d组 EMMPRIN 的表达逐渐减弱($P < 0.05$)。结论 EMMPRIN 可能参与了 UUO 大鼠肾间质纤维化的早期上皮间质转分化过程, 而随着纤维化程度加重, 后期表达逐渐减少。

[关键词] EMMPRIN; 梗阻性肾病; 肾间质纤维化; 上皮间质转分化

[中图分类号] R392-33, R692.6 **[文献标志码]** A

肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)是各种不同病因的慢性肾脏病(chronic kidney diseases, CKD)进展为终末期肾脏病(end-stage renal disease, ESRD)的共同病理过程^[1]。其主要病理特征包括肾小管上皮间质转分化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)、间质成纤维细胞的增生和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度积聚, 其中, EMT在肾间质纤维化的发生发展中起着决定性的作用^[2-3]。大量的临床和实验研究表明, RIF的程度是反映患者肾功能下降严重程度和判断预后最重要的指标。因此, 研究RIF的发病机制, 寻找能够延缓或逆转RIF进程的关键靶点对防治终末期肾脏病有重要意义。

细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPRIN), 又名CD147, 是一种表达于多种组织的单次跨膜糖蛋白, 属于免疫球蛋白超家族, 在体内分布很广, 并参与多种不同的生理和病理过程, 具有多种不同的生理功能, 如基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)的调节、组织重建、淋巴细胞应答、胚胎发育, 肿瘤的侵袭与转移等^[4]。有研究表明, EMMPRIN表达升高在肝纤维化和肺纤维化的发生发展过程中起重要作用^[5-6]。但其在肾脏纤维化中的作用还不清楚。本研究通过观察单侧输尿管结扎(unilateral ure-

teral obstruction, UUO)大鼠肾组织中 EMMPRIN 的表达, 为进一步探讨 EMMPRIN 在肾间质纤维化 EMT 过程中的作用提供一定的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 64 只(由第四军医大学实验动物中心提供), 体质量 200~220 g。随机分为假手术组(Sham组)、模型组(UUO组)。给予大鼠标准饲料、自由进水, 每周记录体质量。兔抗鼠 E-cadherin 多克隆抗体购于 Bioworld 公司; 兔抗人 α -SMA 多克隆抗体购于 Abcam 公司; 兔抗人 EMMPRIN 多克隆抗体购于 Bioworld 公司。二步法抗兔/鼠通用型免疫组化检测试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的构建 腹腔内注射戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉后, 常规消毒, 行腹正中纵行切口, 逐层切开皮肤至腹腔, 游离左肾及输尿管, 分别在左侧输尿管近肾盂处和输尿管上 1/3 处用 4-0 丝线双重结扎, 于两结扎点中间剪断输尿管, 然后逐层缝合皮肤, 清洁伤口。假手术组仅游离左侧输尿管, 未行结扎。

1.2.2 肾组织病理学检查 动物于术后第 3、7、14 天处死。提取左侧肾组织标本, 经福尔马林液固定, 常规石蜡包埋, 连续切片, 分别行 HE、Masson 及免疫组织化学检测。

1.2.3 肾脏组织中 E-cadherin、 α -SMA、EMMPRIN 表达水平的测定 肾组织切片经二甲苯脱蜡、梯度酒精水化, 30 mL/L 过氧化氢灭活内源性过氧化酶, 枸橼酸盐缓冲液高温高压修复, 正常山羊血清封闭, 滴加一抗(1:100 稀释的兔抗鼠 E-

收稿日期: 2012-09-24; 接受日期: 2012-10-16

基金项目: 西京医院学科助推计划(XJZT09D06)

作者简介: 赵阿丽(1986-), 女, 陕西咸阳人, 硕士

Tel: 18710931004; E-mail: zal0609@163.com

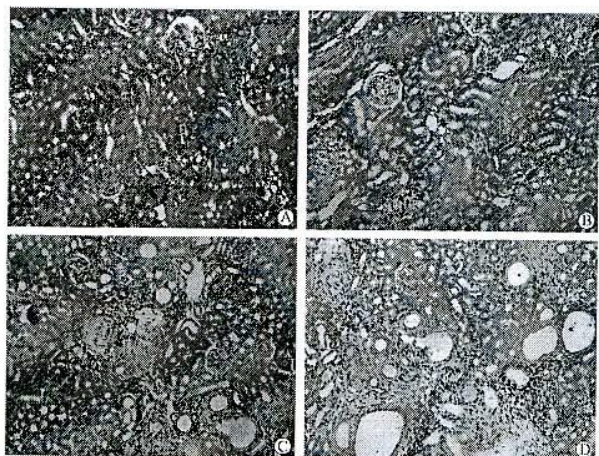
*Corresponding author, 黄晨, E-mail: huangchen@fmmu.edu.cn

cadherin 多克隆抗体、1:200 稀释的兔抗人 α -SMA 多克隆抗体、1:100 稀释的兔抗人 EMMPRIN 多克隆抗体), 4℃ 过夜, 滴加 HRP 标记的山羊抗兔 IgG, 室温孵育 20 min、DAB 显色。苏木精复染, 梯度酒精脱水, 中性树脂封片。以 EMMPRIN 阳性细胞的百分率及阳性细胞染色强度的乘积进行评分。百分率判断: 0 分: 阳性细胞 $\leq 1\%$; 1 分: 2% ~ 25%; 2 分: 26% ~ 50%; 3 分: 51% ~ 75%; 4 分: $> 75\%$ 。染色强度判断: 0 分: 无染色; 1 分: 染色弱; 2 分: 棕黄色。最终的评分是两个指标的乘积, 阴性(-): 0~1 分; 弱阳性(+): 2~4 分; 强阳性(++): 5~8 分。

1.2.4 统计学分析 所有数据应用 SPSS17.0 和 GraphPad Prism 5 软件进行处理, 组间差异采用 Kruskal-Wallis H 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肾组织病理变化 HE 染色显示, Sham 组大鼠肾组织肾小管和肾小球的结构正常, 未见明显组织学改变, UUO 术后 3 d, 肾组织出现肾小管轻度扩张, 肾间质仅少量炎性细胞浸润; UUO 术后 7 d, 肾间质炎性细胞数量增多; UUO 术后 14 d, 肾间质炎性细胞弥漫浸润, 局灶性加重, 纤维化明显(图 1)。



A: 假手术组(Sham 组); B: UUO 术后 3 d; C: UUO 术后 7 d; D: UUO 术后 14 d。

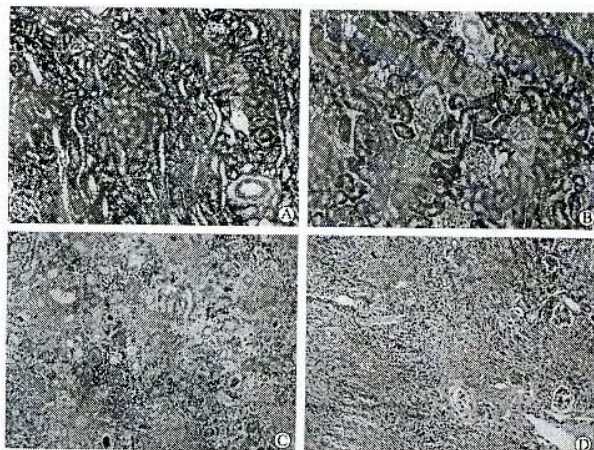
图 1 HE 染色显示单侧输尿管结扎术后大鼠肾组织的病理学改变($\times 200$)

Masson 染色显示, Sham 组肾组织未见明显改变, UUO 术后 3 d 开始出现肾小管扩张, 肾间质胶原纤维增多, 肾小管萎缩, 肾间质增宽, 肾小管间质纤维化明显, 7、14 d 病变进一步加重(图 2)。

2.2 免疫组织化学染色结果

2.2.1 E-cadherin 表达的变化 假手术组大鼠肾组织中 E-cadherin 主要在肾小管上皮细胞胞膜表达, 在肾小球中无表达, UUO 模型术后 3 d E-cadherin 表达较假手术组减少, 且随着时间延长, 变化更加明显,

术后第 14 天 E-cadherin 的表达最弱(图 3A-D), 与假手术组相比有统计学差异($P < 0.05$, 图 4)。

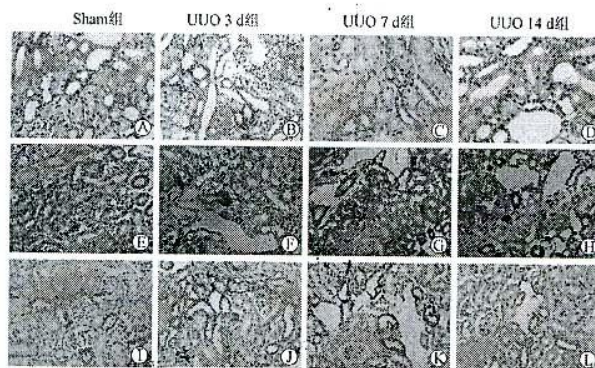


A: 假手术组(Sham 组); B: UUO 术后 3 d; C: UUO 术后 7 d; D: UUO 术后 14 d。

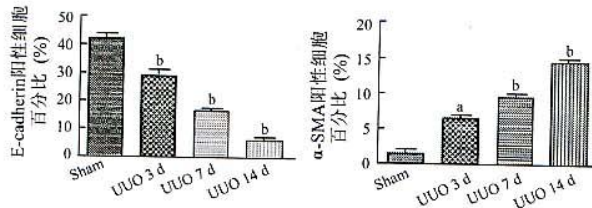
图 2 肾组织 Masson 染色($\times 200$)

2.2.2 α -SMA 表达的变化 假手术组肾间质血管壁 α -SMA 呈阳性表达, 在肾小球和肾间质中无表达, UUO 模型组肾小管上皮细胞内仅少量 α -SMA 表达, 而肾小管周围及间质内 α -SMA 表达随梗阻时间的延长逐渐增加(图 3E-H), 均高于假手术组($P < 0.05$, 图 4)。

2.2.3 EMMPRIN 表达的变化 EMMPRIN 在假手术组的大鼠肾脏组织中表达很少, UUO 组 EMMPRIN 的表达在术后 3 d 时表达最多。主要表达于肾小管上皮细胞的基底处, 胞质中也有少量表达(图 3I-L), 其阳性表达率为 93.75%, 随着梗阻时间的延长, EMMPRIN 的表达逐渐下降, 于术后 7 d 和 14 d 的阳性表达率分别为 87.5%, 75%(表 1), 但均高于假手术组($P < 0.05$)。



A-D: E-cadherin 的表达; E-H: α -SMA 的表达; I-L: EMMPRIN 的表达。图 3 各组肾组织中 E-cadherin, α -SMA, EMMPRIN 的表达($\times 400$)



* $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs sham.

图4 各组肾组织 E-cadherin, α -SMA 阳性细胞百分比

表1 各组大鼠肾组织 EMMPRIN 表达比较 ($n = 16$)

组别	EMMPRIN		
	-	+	++
假手术组	15/16(93.75%)	1/16(6.25%)	0/16(0.00%)
UUO 3 d 组	1/16(6.25%) ^b	5/16(31.25%) ^b	10/16(62.50%) ^b
UUO 7 d 组	2/16(12.50%) ^a	8/16(50.00%) ^a	6/16(37.50%) ^a
UUO14 d 组	4/16(25.00%) ^a	8/16(50.00%) ^a	4/16(25.00%) ^a

* $P < 0.05$ vs UUO 3 d 组; ^b $P < 0.01$ vs 假手术组.

3 讨论

肾间质纤维化是各种慢性肾脏疾病进展至终末期肾病的共同途径和主要病理表现^[7],其主要病理特点为肾小管上皮细胞上皮间质转分化,肾间质成纤维细胞活化增生,ECM 过度沉积及炎性细胞的浸润增加,而且肾间质的病变程度对慢性肾脏病的预后起着决定性的作用。因此,探讨肾间质纤维化的分子调控机制是目前研究的热点。

单侧输尿管结扎模型做为研究肾间质纤维化的理想模型,在本实验中,HE 和 Masson 染色结果均可见假手术组大鼠肾组织肾小球和肾小管无明显改变,模型组肾小管扩张,小管上皮细胞变性坏死,炎细胞浸润,肾间质增宽,且随着梗阻时间的延长,肾间质纤维化加重,提示模型构建成功。

EMMPRIN,属于黏附分子免疫球蛋白超家族的一员,在体内分布广泛,如造血细胞,内皮细胞,近端肾小管上皮细胞^[8],参与多种生理及病理功能的活化。有研究表明,EMMPRIN 在多种癌细胞中表达升高,如卵巢癌,子宫内膜癌等,参与肿瘤的浸润与转移^[9-10]。TGF- β (transforming growth factor- β)做为主要的促纤维化因子之一,已被证实 EMMPRIN 在 TGF- β 诱导的肝细胞 EMT 过程中表达明显增多,同时伴有上皮细胞标记分子 E-cadherin 的表达降低,说明 EMMPRIN 可以通过 TGF- β 信号通路促进 EMT 的发生^[11]。此外,四氯化碳诱导的肝纤维化小鼠静脉注射 EMMPRIN 特异性抗体后可以明显抑制小鼠的肝脏纤维化。有研究发现,在系统性硬皮病患者的血清中可溶性 EMMPRIN 水平升高,且与硬皮病相关性肾硬化相关^[12]。但是否与肾脏间质纤维化相关尚不清楚。

本研究是在大鼠单侧输尿管结扎模型中研究了

EMMPRIN 在肾间质纤维化的 EMT 过程中发挥的作用。结果发现:EMMPRIN 在发生 EMT 的大鼠肾小管上皮细胞中表达升高,尤以 UUO 模型 3 d 组明显,并伴有上皮细胞标记分子 E-cadherin 表达减少,间质细胞标记分子 α -SMA 表达增高,提示 EMMPRIN 可能与上皮间质转分化的发生相关。同时发现,随着梗阻时间的延长,EMMPRIN 的表达却逐渐减少,这可能与肾小管上皮细胞的损伤增多及死亡有关。本研究通过体内实验证实了 EMMPRIN 参与了肾小管上皮细胞的间质转分化,可能是通过 TGF- β 信号通路参与调节下游的 E-cadherin 和 α -SMA 的表达来实现。可见肾间质纤维化是一个复杂的病理过程,有多种分子机制参与了它的发生发展,而这一过程中 EMMPRIN 的表达增加很可能是肾间质纤维化的形成机制之一。

参考文献:

- [1] Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis[J]. *Pediatr Nephrol*, 2000, 15(3-4): 290-301.
- [2] Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(12): 1776-1784.
- [3] Rastaldi MP. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for the development of renal tubulointerstitial fibrosis[J]. *J Nephrol*, 2006, 19(4): 407-412.
- [4] Tang Y, Kesavan P, Nakada MT, et al. Tumor-stroma interaction: positive feedback regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression and matrix metalloproteinase-dependent generation of soluble EMMPRIN[J]. *Mol Cancer Res*, 2004, 2(2): 73-80.
- [5] Shackel NA, McGuinness PH, Abbott CA, et al. Insights into the pathobiology of hepatitis C virus-associated cirrhosis; analysis of intrahepatic differential gene expression[J]. *Am J Pathol*, 2002, 160(2): 641-654.
- [6] Guillot S, Delaval P, Brinchault G, et al. Increased extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression in pulmonary fibrosis[J]. *Exp Lung Res*, 2006, 32(3-4): 81-97.
- [7] 孙剑,陶立坚,宁旺斌,等. p27 和 TGF- β 在大鼠肾间质纤维化中的表达及关系[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(8): 808-810.
- [8] Shimada M, Yamabe H, Osawa H, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer is expressed in the proximal tubular epithelial cells of the human kidney[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2009, 14(2): 171-178.
- [9] Fukuoka M, Hamasaki M, Koga K, et al. Expression patterns of emmprin and monocarboxylate transporter-1 in ovarian epithelial tumors[J]. *Virchows Arch*, 2012, 461(4): 457-466.
- [10] Nakamura K, Kodama J, Hongo A, et al. Role of emmprin in endometrial cancer[J/OA]. *BMC Cancer*, 2012, 12(1): 191.
- [11] Wu J, Ru NY, Zhang Y, et al. HAB18G/CD147 promotes epithelial-mesenchymal transition through TGF- β signaling and is transcriptionally regulated by Slug[J]. *Oncogene*, 2011, 30(43): 4410-4427.
- [12] Yanaba K, Asano Y, Tada Y, et al. Increased serum soluble CD147 levels in patients with systemic sclerosis; association with scleroderma renal crisis[J]. *Llin Rheumatol*, 2012, 31(5): 835-839.