

· 基础研究 ·

表面活性蛋白 A 及 D 在小鼠尿路感染中的作用及机制

胡凤琪 袁海 王桂荣 丁国华

【摘要】 目的 研究表面活性蛋白(SP)A 及 SP-D 在尿路感染(UTI)中的作用和机制,评价 SP-A 及 SP-D 缺失对 UTI 的影响。方法 免疫组化评估 SP-A 及 SP-D 在野生型(WT) C57BL/6 雌性小鼠肾脏内的表达及分布;Western 印迹评价 SP-A 及 SP-D 双重敲除(SP-A/D KO)与 WT 小鼠肾脏 p38 磷酸化水平。应用 SP-A/D KO 小鼠和 WT 雌性小鼠构建逆行性小鼠 UTI 模型,小鼠分为 2 组:SP-A/D KO + UTI 组和 WT + UTI 组,分别实验 24 h 和 48 h。进行细菌培养及计数各组肾脏及尿液中的细菌含量,HE 染色评价各组病理改变;免疫组化及计数肾脏及尿液内中性粒细胞的数量。体外细菌培养观察 SP-A 及 SP-D 对致尿路感染大肠杆菌(UPEC)生长的影响。结果 WT 小鼠肾脏内 SP-A 及 SP-D 主要分布于近曲小管及集合管。SP-A/D KO 小鼠肾脏内 p38 磷酸化水平显著高于 WT 小鼠($P < 0.05$)。SP-A/D KO 小鼠在发生 UTI 时,其肾脏病理改变更重,中性粒细胞浸润更多。SP-A/D KO 小鼠肾脏内及尿液内细菌量在 24 h 及 48 h 均显著高于 WT 小鼠(均 $P < 0.01$)。体外实验显示,SP-A 及 SP-D 均可显著抑制 UPEC 的生长(均 $P < 0.05$)。结论 肾脏内表达 SP-A 及 SP-D;SP-A/D KO 小鼠与 WT 小鼠相比,其对 UTI 更易感,其机制可能与 UTI 时炎症因子分泌不足及 SP-A 和 SP-D 对致尿路感染大肠杆菌生长的直接抑制有关。

【关键词】 表面活性蛋白 A; 表面活性蛋白 D; 尿路感染; 天然免疫

Innate immunity of surfactant protein A and D in urinary tract infection with uropathogenic

Escherichia coli HU Feng - qi, YUAN Hai, WANG Gui - rong, DING Guo - hua. Department of Nephrology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: DING Guo-hua, Email: ghxding@gmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the role of surfactant protein (SP) - A and SP - D in urinary tract infection mouse model, and evaluate the effects of SP - A and SP - D absence on urinary tract infection. **Methods** SP - A and SP - D double knockout (SP - A/D KO) mice were made. SP - A/D KO and wild-type (WT) C57BL/6 female mice were used for this study. The expression of SP - A and SP - D in kidney was detected by immunohistochemistry (IHC). The levels of p - p38 and p38 protein in kidneys were measured by Western blotting. Uropathogenic *Escherichia coli* or buffer was delivered into the bladder of female mice. At 24 and 48 h after inoculation, CFU of *Escherichia coli* in the kidney and urine of the treated and control mice were measured. Histological, cellular and molecular analysis were performed by several methods of H/E staining, IHC and Western blotting. The effects of SP - A and SP - D on bacterial growth were studied *in vitro*. **Results** SP - A and SP - D in kidney were located in the proximal tubules and collecting tubules. Compared with WT mice, infected SP - A/D KO mice with UPEC had higher CFU in kidneys and urine at 24 h and 48 h, increased inflammatory cells infiltration

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2013.06.008

基金项目: 国家自然科学基金(30670985, 81070556)

作者单位: 430060 武汉大学人民医院肾内科(胡凤琪, 现在襄阳市中心医院肾内科); 襄阳市中心医院肾内科(袁海); 美国纽约州立大学上州医学院(王桂荣)

通信作者: 丁国华, Email: ghxding@gmail.com

in kidneys ($P < 0.05$). Compared with WT mice, SP - A/D KO mice had higher p38 MAPK phosphorylation levels in kidneys ($P < 0.05$). Growth of *Escherichia coli* was greatly inhibited by both SP-A and SP-D ($P < 0.05$). **Conclusions** Both SP-A and SP-D are expressed in kidney. SP-A and SP-D can attenuate UTI induced by UPEC which may be through inhibiting bacterial growth and modulating renal inflammation.

【Key words】 Surfactant protein A; Surfactant protein D; Urinary tract infection; Innate immunity

尿路感染(UTI)是人类最常见的感染之一,而近来的研究表明肾脏表达的天然免疫分子在UTI中发挥着重要作用^[1]。本课题组先前的研究表明,天然免疫分子表面活性蛋白A(SP-A)及表面活性蛋白D(SP-D)在肾脏天然免疫中发挥重要作用,SP-D参与了脂多糖诱导的肾小管上皮细胞的炎性改变^[2];肾盂肾炎易感者与SP-A的基因多态性有关,其尿液内SP-A及SP-D的含量也较健康人低^[3],提示SP-A及SP-D可能在UTI及肾脏天然免疫中发挥作用,但其具体机制尚不清楚,值得进一步研究。本研究采用雌性SP-A/D基因敲除(SP-A/D KO)小鼠,并与野生型(WT)小鼠对比,采用致UTI大肠杆菌(*uropathogenic Escherichia coli*, UPEC)构建小鼠逆行性UTI模型,探讨SP-A及SP-D在UTI中的作用及其可能机制。

材料和方法

1. 材料: 8~10周野生型C57BL/6雌性小鼠: 购自美国Jackson实验室; 8~10周雌性SP-A/D KO小鼠: 美国纽约州立大学动物中心于无病原体条件下繁殖和培育,原始育种系由美国加利福尼亚大学Hawgood教授提供。UPEC CFT073(美国ATCC),聚乙烯管导管PE10(美国BD),DAB试剂盒(美国Vector),人SP-A蛋白、人SP-D蛋白(美国纽约州立大学王桂荣教授制备),SP-A抗体(美国辛辛那提儿童医学中心McCormack教授提供),SP-D抗体、 β -actin抗体、p-p38抗体、p38抗体(美国Santa Cruz),生物素标记中性粒细胞抗体(美国Hybult)。

2. 分组及UTI小鼠模型制备: 小鼠分为2组: SP-A/D KO+UTI组和WT+UTI组,分别实验24 h和48 h。各组均设阴性对照组,每组6~10只小鼠,对照组以无菌PBS代替菌液。UTI模型制备过程参照文献[4],具体如下:挑取UPEC单克隆,加入

LB培养基中,37℃连续静置过夜培养。5000 g 4℃离心5 min,无菌PBS重悬沉淀。调整细菌浓度至吸光度($A_{600\text{ nm}}$) = 0.5,采用该浓度的细菌来制备动物模型。SP-A/D KO或WT小鼠常规麻醉后,轻轻压迫膀胱以使膀胱内残留的尿液排出。采用PE10导管行小鼠尿道插管至膀胱,用1 ml注射器注射50 μ l菌液至膀胱,对照组采用等量的无菌PBS代替菌液,小心拔出导管,将小鼠放回笼内,正常饮食。待24 h或48 h后,麻醉后处死小鼠,留取尿液及肾组织供检测。

3. Western印迹检测肾组织p38、p-p38蛋白表达: 各组肾组织取5 mg加入RIPA裂解液,4℃ 12 000 \times g离心10 min,收集上清。BCA法测定蛋白质浓度。取30 μ g组织总蛋白,行SDS-PAGE电泳,电转至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭1 h,加第一抗体(β -actin抗体1:1000; SP-A抗体1:2000; SP-D抗体1:200; p38抗体1:500; p-p38抗体1:500),脱色摇床4℃过夜,加对应HRP二抗(1:1500),室温孵育1 h,ECL显色。凝胶成像分析系统扫描并测量条带的灰度值,测定各组的相对比值。

4. 免疫组化检测SP-A及SP-D及中性粒细胞在肾脏内的分布: 将小鼠肾组织浸入10%中性多聚甲醛过夜固定,常规石蜡包埋,制成4 μ m切片,SABC法行免疫组化,滴加一抗(SP-A 1:100; SP-D 1:50; NIMP-R14 1:100),DAB显色。

5. 尿液内中性粒细胞计数: 小鼠麻醉后,膀胱穿刺收集小鼠尿液,锥虫蓝染色计数尿液中性粒细胞数,具体方法如下:将10 μ l小鼠尿液标本与10 μ l锥虫蓝染液1:1混合,震荡混匀。加10 μ l上述混匀液至细胞自动计数仪中计数。

6. SP-A及SP-D对UPEC生长的作用: 调整UPEC浓度为 $A_{600\text{ nm}}$ = 0.2,将菌液加入40 mg/L SP-A或20 mg/L SP-D,以BSA为对照,每小时于酶标仪上检测 $A_{600\text{ nm}}$,至5 h。作用5 h后,以无菌TBS稀释菌液,取100 μ l菌液涂板。37℃过夜培养后,

Quantity One 软件计数细菌数量。

7. 统计学处理：计量资料数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义，采用 Sigmastat 软件行统计学分析。

结 果

1. SP-A 及 SP-D 在小鼠肾脏中的表达及分布：Western 印迹显示，小鼠肾脏表达 SP-A 及 SP-D，见图 1。免疫组织化学显示，小鼠肾脏内 SP-A 及 SP-D 主要分布于近曲小管及集合管，见图 2。

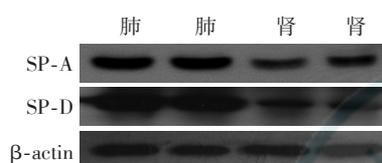
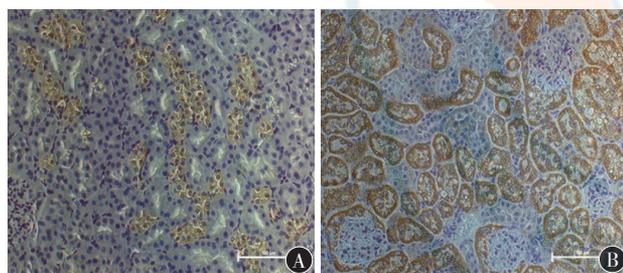


图 1 SP-A 及 SP-D 在小鼠肺及肾脏中的表达 (Western 印迹)

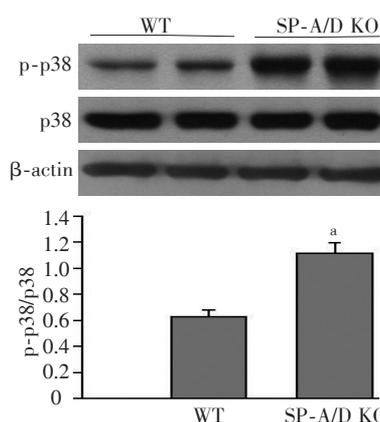


注：A：SP-A；B：SP-D

图 2 SP-A 及 SP-D 在肾脏内的表达及分布 (免疫组化 $\times 200$)

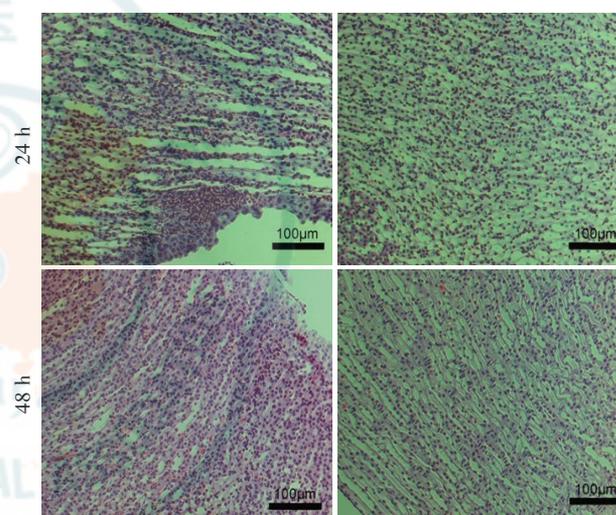
2. SP-A/D KO 及 WT 小鼠肾脏 p38 磷酸化水平：Western 印迹示，制备 UTI 模型之前，SP-A/D KO 小鼠肾脏 p38 磷酸化水平显著高于 WT 小鼠 ($P < 0.05$)，见图 3。

3. 各组肾脏病理改变及中性粒细胞含量：HE 染色显示，WT+UTI 组 24 h 可见散在肾小管上皮细胞脱落及基底膜裸露，肾脏集合管可见中性粒细胞浸润；SP-A/D KO+UTI 组 24 h 可见散在肾小管上皮细胞脱落，散在基底膜裸露，集合管可见大量中性粒细胞浸润，可见炎性细胞以及脱落的肾小管上皮细胞形成的细胞管型以及炎性肉芽肿，见图 4。两组 48 h 时中性粒细胞浸润均较 24 h 时减少。应用抗中性粒细胞抗体行免疫组织化学及尿液中性粒细胞计数证实，在制备 UTI 模型后 24 h 时，SP-A/D KO 组尿液中性粒细胞计数高于 WT 组，见图 5。其肾脏内中性粒细胞计数也



注：与 WT 组比较，^a $P < 0.05$

图 3 SP-A/D 基因敲除小鼠肾脏内 p-p38 表达水平 (Western 印迹)



SP-A/D KO + UTI 组

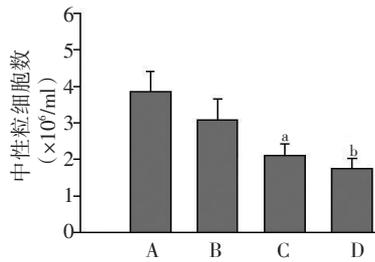
WT + UTI 组

图 4 各组肾脏病理改变 (HE 染色 $\times 200$)

高于 WT 组，见图 6。两组肾脏内及尿液中性粒细胞计数在 48 h 时均低于 24 h 时，见图 5，图 6。对照组尿液及肾脏内未见中性粒细胞。

4. 肾脏内及尿液细菌定量：细菌培养显示，SP-A/D KO+UTI 组及 WT+UTI 组 24 h 及 48 h 肾脏及尿液细菌培养均阳性。细菌计数示，SP-A/D KO+UTI 组小鼠肾脏及尿液内细菌量在 24 h 及 48 h 均高于 WT+UTI 组 [肾脏：24 h ($\lg 5.7 \pm \lg 0.4$) CFU/mg 比 ($\lg 4.4 \pm \lg 0.4$) CFU/mg, 48 h ($\lg 6.4 \pm \lg 0.2$) CFU/mg 比 ($\lg 5.6 \pm \lg 0.2$) CFU/mg；尿液：24 h ($\lg 7.6 \pm \lg 0.2$) CFU/ml 比 ($\lg 6.7 \pm \lg 0.1$) CFU/ml, 48 h ($\lg 7.3 \pm \lg 0.2$) CFU/ml 比 ($\lg 6.1 \pm \lg 0.3$) CFU/ml, 均 $P < 0.01$]，对照组肾脏及尿液细菌培养均阴性。

5. SP-A 及 SP-D 对 UPEC 生长的作用：SP-A 作用 UPEC 2 ~ 5 h，与 BSA 组相比，其吸光度显著



注: A: SP-A/D KO + UTI 组 24 h; B: WT + UTI 组 24 h; C: SP-A/D KO + UTI 组 48 h; D: WT + UTI 组 48 h; 与 SP-A/D KO + UTI 组 24 h 比较, ^a $P < 0.05$; 与 SP-A/D KO + UTI 组 48 h 比较, ^b $P < 0.05$

图 5 各组尿液中性粒细胞计数

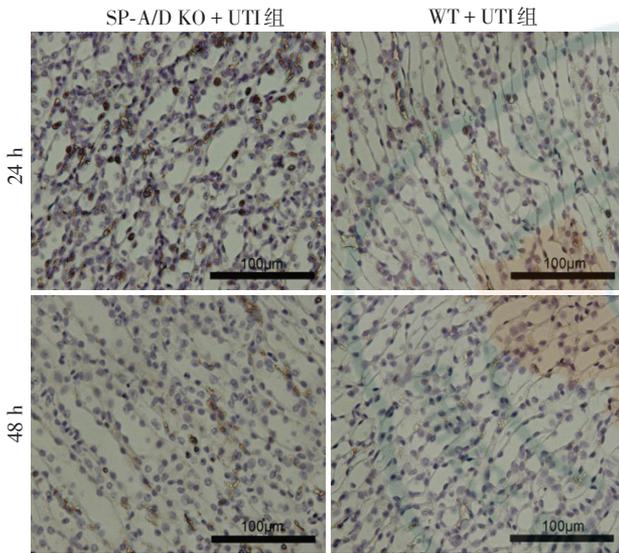
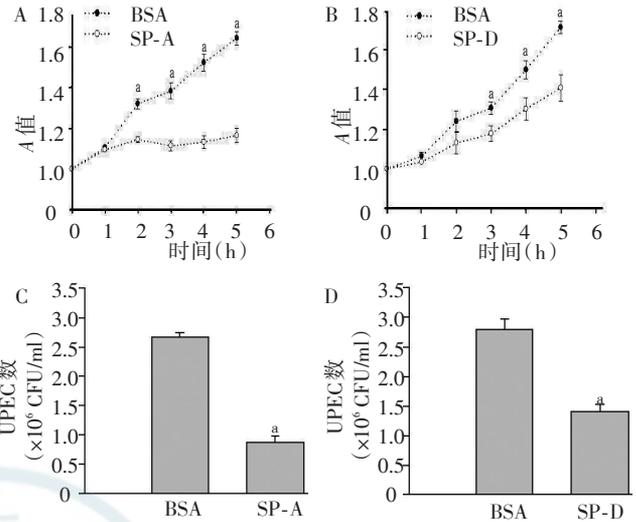


图 6 各组肾脏中性粒细胞含量(免疫组化 $\times 400$)

降低 ($P < 0.05$), 提示 SP-A 组细菌量降低; SP-D 作用 UPEC 3 ~ 5 h, 与 BSA 组相比, 其吸光度亦显著降低 ($P < 0.05$)。细菌定量显示 SP-A 及 SP-D 与 UPEC 作用 5 h 后均可见 UPEC 数量显著减少 (均 $P < 0.05$)。见图 7。

讨 论

近年来, 尿路上皮细胞的天然免疫能力在 UTI 发生中的作用逐渐引起人们的注意。尿路上皮细胞除了可以作为病原体进入的物理屏障, 还可以在对抗微生物的天然免疫中发挥重要作用。其天然免疫能力主要体现在: 分泌可快速作用于微生物的抗菌肽及蛋白; 产生细胞因子及趋化因子, 并募集吞噬细胞^[5]。在感染过程中, 尿路上皮细胞表达的天然免疫分子发挥着重要作用, 如天然免疫分子如 Toll 样受体 (TLR) 4、TLR5、



注: A: SP-A 对 CFT073 生长曲线的影响; B: SP-D 对 CFT073 生长曲线的影响; C: SP-A 对 CFT073 数的影响; D: SP-D 对 CFT073 数的影响; 与 BSA 组比较, ^a $P < 0.05$

图 7 SP-A 及 SP-D 对 UPEC 生长的作用

TLR11、尿溶蛋白 IIIa 等在肾脏和(或)膀胱表达的改变或缺失均可导致 UTI 易感性增加^[1,6]。本研究组此前的研究也发现, 尿路上皮细胞天然免疫分子 SP-A 及 SP-D 的表达水平与肾盂肾炎易感性相关^[3]。UTI 通常由细菌通过尿道上行至膀胱所致, 而超过 70% 的 UTI 是由 UPEC 导致的。既往研究表明 SP-A 及 SP-D 可以直接抑制 *E.coli* 生长^[7]。因此, 研究 SP-A 及 SP-D 在 UPEC 导致的 UTI 中的潜在作用及其机制显得尤为重要。

SP-A 及 SP-D 同属于凝集素蛋白家族成员, 二者的结构相似, 其在功能上也相近, 其对于降低肺泡表面张力、维持肺的动态平衡有重要作用; 同时, SP-A 及 SP-D 在肺天然免疫中也发挥着重要作用^[7]。SP-A 及 SP-D 可以与一系列微生物如病毒、细菌、真菌等相互作用, 其对细菌生长有直接抑制作用。更为重要的是, 其可以通过作用于不同的受体, 调节 p38 的磷酸化及下游炎症因子的表达^[8]。例如, 既往在肺内的研究发现, 在肺正常环境下 SP-A 及 SP-D 可以与其受体信号调节蛋白 α 结合, 抑制 p38 磷酸化依赖的 NF- κ B 通路的过度激活, 从而防止过度的炎症因子对正常机体的损伤; 而在受感染时, SP-A 及 SP-D 可与其受体钙网织蛋白或 CD91 结合, 通过上调 p38 磷酸化依赖的 NF- κ B 途径, 刺激下游炎症因子的释放, 进而促进病原体的清除。正因为 SP-A 和 SP-D 在肺天然免疫中发挥如此巨大的作用, SP-A 及 SP-D

已经作为肺天然免疫的标志物之一^[7]。由于 SP-A 及 SP-D 在功能上存在很多重叠,为了更好的研究 SP-A 及 SP-D 在体内的功能,有研究者在 2002 年构建了 SP-A/D KO 小鼠,该小鼠以 C57BL 小鼠为背景,不表达 SP-A 及 SP-D^[9]。通过 SP-A/D KO 小鼠,研究者进一步论证了其在天然免疫中的作用^[10]。

近年来,在肺外也发现存在 SP-A 及 SP-D 的分布,SP-A 及 SP-D 在肺外比如女性生殖道的天然免疫中也发挥重要作用^[11]。但其在肾脏中的作用,目前尚不明确,值得进一步研究。SP-A 及 SP-D 在肾脏内也有发现^[12],我们采用免疫组化及 Western 印迹证实,SP-A 及 SP-D 在肾脏表达,主要分布在集合管及近曲小管。

在本研究中我们发现,SP-A/D KO 小鼠肾脏内 p38 磷酸化水平显著高于 WT 小鼠,这可能与 WT 小鼠 SP-A 及 SP-D 在正常环境下与其受体信号调节蛋白 α 结合,抑制 p38 的过度磷酸化有关。信号调节蛋白 α 在肾脏中也有表达,但其在肾脏天然免疫中的作用目前尚不明确。SP-A/D KO 小鼠肾脏 p38 磷酸化水平增高可能与其不表达 SP-A 及 SP-D,从而有可能失去了正常环境下其对于 p38 活化的抑制作用有关。

我们的研究表明,SP-A/D KO 小鼠 UTI 模型中肾脏及尿液内的细菌量及中性粒细胞数均显著高于 WT 小鼠,其病理改变也较野生型小鼠更重。这提示 SP-A 及 SP-D 可能在 UPEC 导致的 UTI 中起保护作用,在敲除了 SP-A 及 SP-D 基因后,小鼠失去了 SP-A 及 SP-D 的保护作用,从而出现更重的肾脏病理改变及更多的细菌和中性粒细胞浸润。其机制可能与 UPEC 感染 SP-A/D KO 小鼠后炎症因子的表达不足及缺乏 SP-A 及 SP-D 对 UPEC 生长的直接抑制作用有关。

另一方面,SP-A/D KO 小鼠对 UTI 的易感性增加,可能与 SP-A 及 SP-D 直接抑制 UPEC 的生长有关。既往研究表明,SP-A 及 SP-D 可以在体外直接抑制大肠杆菌的生长^[7],但对于 UPEC 的作用尚不明确,本研究发现 SP-A 及 SP-D 与阴性对照相比,其均可以显著抑制 UPEC 的生长。提示肾脏被 UPEC 感染后,肾脏内表达的 SP-A 及 SP-D 可能如同在体外一样,可以直接抑制 UPEC 的生长,从而发挥保护作用。而 SP-A/D KO 小鼠缺乏这种保护作用,这可能是其肾脏内细菌数量显著高于 WT 小鼠的原因之一。

综上所述,SP-A 及 SP-D 在肾脏天然免疫中发挥重要作用,SP-A/D 基因敲除的小鼠对于 UTI 的易感性增加,其机制可能与调节 UTI 时炎症因子的分泌及直接抑制 UPEC 生长。

参 考 文 献

- [1] Ben Mkaddem S, Chassin C, Vewalle A. Contribution of renal tubule epithelial cells in the innate immune response during renal bacterial infections and ischemia - reperfusion injury. *Chang Gung Med J*, 2010, 33: 225-240.
- [2] Hu F, Liang W, Ren Z, et al. Surfactant protein D inhibits lipopolysaccharide-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in human renal tubular epithelial cells: implication for tubulointerstitial fibrosis. *Clin Exp Immunol*, 2012, 167: 514-522.
- [3] 刘娇, 梁伟, 丁国华, 等. 表面活性蛋白 A 基因单核苷酸多态性与成年女性尿路感染易感性的关系. *中华肾脏病杂志*, 2009, 25: 943-945.
- [4] Hung CS, Dodson KW, Hultgren SJ. A murine model of urinary tract infection. *Nat Protoc*, 2009, 4: 1230-1243.
- [5] 吕金雷, 丁国华. 天然免疫分子在肾脏炎症反应及间质纤维化中的作用. *中华肾脏病杂志*, 2007, 23: 943-945.
- [6] Zasloff M. Antimicrobial peptides, innate immunity, and the normally sterile urinary tract. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18: 2810-2816.
- [7] Wright JR. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5: 58-68.
- [8] Gardai SJ, Xiao YQ, Dickinson M, et al. By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell*, 2003, 115: 13-23.
- [9] Hawgood S, Ochs M, Jung A, et al. Sequential targeted deficiency of SP - A and - D leads to progressive alveolar lipoproteinosis and emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 283: L1002-L1010.
- [10] Lemos MP, McKinney J, Rhee KY. Dispensability of surfactant proteins A and D in immune control of Mycobacterium tuberculosis infection following aerosol challenge of mice. *Infect Immun*, 2011, 79: 1077-1085.
- [11] Yadav AK, Madan T, Bernal AL. Surfactant proteins A and D in pregnancy and parturition. *Front Biosci*, 2011, 3:291-300.
- [12] Kankavi O. Immunodetection of surfactant proteins in human organ of Corti, Eustachian tube and kidney. *Acta Biochim Pol*, 2003, 50: 1057-1064.

(收稿日期:2013-01-28)

(本文编辑:王欣)