

梗阻性肾病大鼠肾组织 periostin 的表达及意义

卞保平 万英 陈蓉 张春梅 唐华 罗娜 邹平

【摘要】 目的 研究梗阻性肾病大鼠肾组织 periostin 表达的变化及其与肾间质纤维化的相关性。方法 18 只 SD 雄性大鼠按随机数字法分成 3 组：假手术组、模型组和贝那普利组，每组 6 只。用单侧输尿管结扎法建立梗阻性肾病大鼠模型。RT-PCR 检测各组大鼠肾组织 periostin 和转化生长因子(TGF) β 1 的 mRNA 表达；ELISA 检测各组大鼠肾组织 periostin、血管紧张素 II (Ang II)、TGF- β 1 的蛋白水平；HE 及 Masson 染色观察肾间质变化；免疫组化检测肾组织 I 型胶原蛋白。结果 与假手术组比较，模型组大鼠肾组织 periostin、TGF- β 1、Ang II 蛋白表达显著升高(均 $P < 0.05$)。与模型组比较，贝那普利组上述蛋白表达显著降低，差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与假手术组比较，模型组大鼠肾组织 periostin 和 TGF- β 1 的 mRNA 表达显著上调，差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)，而贝那普利组 periostin 和 TGF- β 1 的 mRNA 表达则显著下调(均 $P < 0.05$)。肾组织 periostin 蛋白表达与 Ang II、TGF- β 1 和 I 型胶原的蛋白表达以及肾间质纤维化积分均呈正相关 (r 值分别为 0.652、0.781、0.776 和 0.825，均 $P < 0.05$)。结论 梗阻性肾病大鼠肾组织 periostin 呈高表达，其可能参与了梗阻性肾病肾间质纤维化进程。

【关键词】 纤维化； 血管紧张素 II； 转化生长因子 β 1； Periostin； 梗阻性肾病

Expression of periostin in the kidneys of rats with obstructive nephropathy and its significance BIAN Bao-ping, WAN Ying, CHEN Rong, ZHANG Chun-mei, TANG Hua, LUO Na, ZOU Ping. Department of Pathophysiology, Luzhou Medical College, Sichuan Luzhou 646000, China

Corresponding author: ZOU Ping, Email: lyzouping@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of periostin in the kidneys of rats with obstructive nephropathy and its relevance to renal interstitial fibrosis. **Methods** Eighteen male adult SD rats were randomly divided into sham group, model group and benazepril group (6 in each group). Unilateral ureteral obstruction (UUO) model was induced by ligating the left ureter of rats. RT-PCR was used to detect the mRNA expressions of periostin and TGF- β 1, and ELISA to detect the protein expression of periostin, Ang II, and TGF- β 1 in kidney tissue. Pathological changes of renal tissue were observed by HE and Masson staining. The protein expression of collagen I (Col I) in kidney tissue was examined by immunohistochemical staining. **Results** The mRNA expressions of periostin and TGF- β 1 in model group increased markedly as compared with sham group (all $P < 0.05$), and benazepril could decrease these mRNA expressions (all $P < 0.05$). The protein expressions of periostin, Ang II and TGF- β 1 in kidney tissue were significantly increased in model group as compared with sham group (all $P < 0.05$), and benazepril could decrease these protein expressions (all $P < 0.05$). The expression of periostin in kidney tissue was positively correlated with the expressions of Ang II, TGF- β 1 and Col I, as well as the degree of

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2012.08.009

基金项目:四川省泸州医学院科研基金重点项目(2009243)

作者单位:646000 四川省泸州医学院病理生理学教研室

通信作者:邹平, Email: lyzouping@163.com

renal interstitial fibrosis ($r = 0.652, 0.781, 0.776$ and 0.825 respectively, all $P < 0.05$).

Conclusion Periostin expression is up-regulated in kidney tissue of rats with obstructive nephropathy, which is associated to the over-deposition of extracellular matrix (ECM) in the kidneys of UUO rats.

【Key words】 Fibrosis; Angiotensin II; Transforming growth factor β 1; Periostin; Obstructive nephropathy

包括梗阻性肾病在内的各种进展性肾病均存在肾间质纤维化(RIF)的病理过程,而且肾间质纤维化的程度与肾功能密切相关^[1-2]。各种细胞、细胞因子、炎性介质等相互作用导致细胞外基质(ECM)在间质中异常积聚是引起肾间质纤维化的主要机制^[3]。periostin 是近年发现的一种分泌型可溶性基质蛋白,是细胞外基质蛋白家族的成员之一。在细胞间基质代谢异常过程中,periostin 与组织纤维化和细胞外基质沉积有着密切的关系^[4]。Darren 等^[5]发现 periostin 具有加速囊壁上皮细胞的增值和促进人常染色体显性多囊肾间质的重塑。在梗阻性肾病肾间质纤维化形成的过程中,periostin 基因的表达情况尚不清楚。本实验观察梗阻性肾病肾组织 periostin 表达的变化及其与肾间质纤维化的相关性,为肾间质纤维化发生、发展的分子机制提供新认识。

材料与方法

一、实验动物

健康雄性 SD 大鼠 18 只,体质量 250~300 g,由泸州医学院实验动物中心提供 [使用许可证 SYXK(川)2008-065,生产许可证 SYXK(川)2008-17]。饲养环境按常规温度和灯光控制,自由进食饮水。

二、主要试剂

贝那普利(北京诺华),ELISA 试剂盒(上海西塘),RNA 提取试剂盒(北京天根),RT-PCR 试剂盒(成都博瑞克),兔抗大鼠 I 型胶原多克隆抗体(南京巴傲得),SP 免疫组化试剂盒(北京中杉金桥)。

三、方法

1. 建模与取材:将 18 只雄性 SD 大鼠按随机数字法分为假手术组、模型组和贝那普利组,每组 6 只。3%戊巴比妥钠(2 ml/kg)腹腔注射麻醉,仰卧固定,75%乙醇消毒,腹部正中左侧纵行切口,分离左侧输尿管,在肾盂和肾下极处分别

结扎,但并不离断输尿管,术后逐层缝合腹壁。假手术组仅开腹、游离左侧输尿管后关腹。术后腹腔注射青霉素(10 U/d,连续 5 d)预防感染。术前 2 d 贝那普利组每日予贝那普利(20 mg/kg)灌胃;模型组和假手术组予等体积生理盐水灌胃。术后各组连续灌胃 14 d 后处死大鼠,快速取出左肾。

2. 肾组织病理检查:肾组织标本用 4%甲醛溶液固定,常规脱水,石蜡包埋,切片 4 μ m,行 HE 和 Masson 染色。HE 染色切片在 200 倍镜下,单盲依序观察左上、右上、左下、右下、中间 5 个肾小管间质视野,依据肾小管上皮细胞空泡变性、肾小管扩张、肾小管萎缩、红细胞管型、蛋白管型、间质水肿、间质纤维化、间质炎性细胞浸润等 8 项指标进行肾小管间质损伤指数评分。Masson 染色观察肾组织胶原沉积,在 200 倍镜下观察 30 个不重叠的区域,拍照,用 IPP 软件计算纤维化面积与肾间质总面积(取出肾小管管腔面积)比值,并取平均值。

3. 肾组织 Col I 检测:采用免疫组化 SP 试剂盒染色。3%过氧化氢溶液阻断内源性过氧化物酶,室温孵育 10 min,PBS 浸洗。正常山羊血清室温 15 min,一抗(1:200)室温下放置 3 h,PBS 浸洗。二抗室温 15 min,PBS 浸洗。三抗室温 15 min,PBS 浸洗。DAB 显色,显微镜观察,棕黄色细颗粒状为阳性表达。免疫组化半定量分析:1 张切片在 200 倍倒置显微镜下随机选取 30 个不重叠视野,拍照,用 IPP 软件计算视野阳性积分吸光度 A 值。

4. 肾组织 TGF- β 1 和 periostin mRNA 检测:用 RT-PCR 法。肾组织总 RNA 按 Trizol 说明书步骤提取。用紫外分光光度计测 260 nm、280 nm 吸光度 A 值,计算 RNA 浓度。用 SuperScriptTM RnaseH 反转录试剂盒合成 cDNA 第 1 链。以此为模板用引物经 PCR 方法进行扩增。引物由上海生工合成,见表 1。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 3 min,94 $^{\circ}$ C

表 1 PCR 引物序列及扩增产物长度

引物名称	引物序列		产物长度
GAPDH	上游 5'-TTGGTATCGAAGGACTCATG-3'	下游 5'-TAGCCCAGGATGCCCTTGAG-3'	330 bp
β-actin	上游 5'-GAGGAAATCGTGCCTGAC-3'	下游 5'-CTGGAAGGTGGACACTGAG-3'	445 bp
TGF-β1	上游 5'-AATGGTGGACCGCAACAAC-3'	下游 5'-TGAGCACTGAAGCGAAGC-3'	330 bp
periostin	上游 5'-GTGACAGAAGTGATCCACGGAG-3'	下游 5'-CTCTTGATCGCCTTCTAGACCC-3'	253 bp

30 s, 61℃ 30 s, 30 个循环, 72℃ 延伸 5 min。2% 琼脂糖凝胶电泳后, 应用凝胶成像系统分析。

5. 肾组织 Ang II、TGF-β1 和 periostin 蛋白检测: 用 ELISA 法。大鼠肾组织匀浆, 1:100 稀释, 分别加入预先包被了大鼠 Ang II、TGF-β1 和 periostin 单克隆抗体的酶标孔中, 温育 60 min, 洗涤后加入 HRP 标记过的 Ang II、TGF-β1 和 periostin 抗体。温育、洗涤, 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。以空白孔调零, 在 450 nm 波长下测量各孔的吸光度 A 值。根据标准品的浓度及对应的 A 值计算出标准曲线的直线回归方程, 再根据样品的 A 值在回归方程上计算出对应的样品浓度, 乘以 5, 即得原标本中 Ang II、TGF-β1 和 periostin 浓度。每组各设 4 个复孔, 重复实验 3 次, 取各组平均值。

四、统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计数据处理。计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 两变量相关性采用 Pearson 分析。

结 果

1. 肾组织病理: HE 染色中, 假手术组肾小球、肾小管无明显异常; 模型组肾小管明显扩张, 部分毁损、结构消失, 可见管型, 肾间质大量炎细胞浸润, 明显纤维化; 贝那普利组肾小管稍增宽, 少量炎细胞浸润, 纤维化改变较模型组明显减轻, 肾小管间质损伤指数下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但仍高于假手术组的水平。Masson 染色见假手术组大鼠肾脏胶原染色主要位于肾小球基底膜、Bowman 囊、系膜区和肾小管间的毛细血管周围, 而小管周围间质部分基本正常。模型组肾间质宽度增加, 肾小管上皮细胞萎缩, 管腔扩张, 弥漫的单核、淋巴细胞浸润和成纤维细胞增生, 肾间质亮绿色胶原沉积显著, 肾间质纤维化积分增高, 与假手术组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。贝那普利组与模型组比较,

肾小管扩张、间质增宽程度及肾间质纤维化积分降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1, 表 2。

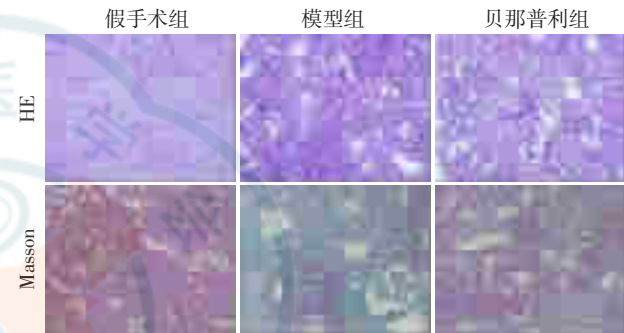


图 1 各组大鼠肾组织病理(×200)

表 2 各组大鼠肾小管间质纤维化指标($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	肾小管间质损伤指数	间质纤维化积分	I 型胶原(A)
假手术组	0.68±0.31	2.90%±1.03%	2591±363
模型组	7.25±1.21 ^a	37.50%±1.62% ^a	62 400±291 ^a
贝那普利组	4.23±0.89 ^{ab}	22.59%±2.14% ^{ab}	26 418±334 ^{ab}

注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

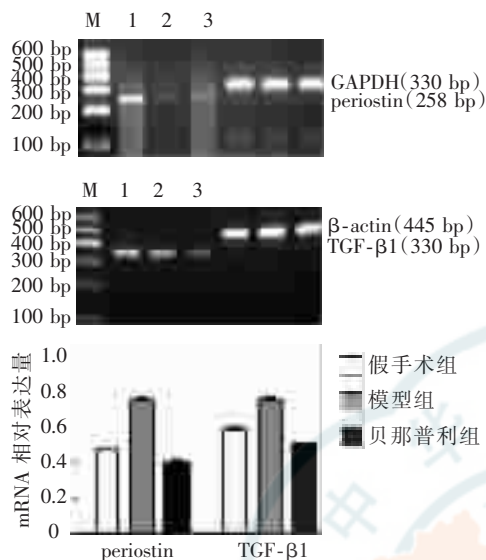
2. I 型胶原蛋白: 免疫组化结果显示, 肾间质 I 型胶原蛋白表达较肾小球中表达明显, 模型组术后 2 周肾小管间质可见明显棕黄色物质表达, 显著高于假手术组 ($P < 0.05$); 贝那普利组显著低于模型组 ($P < 0.05$)。见图 2, 表 2。

3. TGF-β1 mRNA、periostin mRNA 表达: RT-PCR 结果显示, 与假手术组相比, 模型组大鼠肾组织 periostin mRNA、TGF-β1 mRNA 表达量显著



图 2 大鼠肾间质 I 型胶原表达(免疫组化 ×200)

升高(均 $P < 0.05$)。与模型组相比,贝那普利组上述指标显著降低,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图3。



注:M:分子量标记;1:模型组;2:假手术组;3:贝那普利组
图3 各组大鼠肾组织 periostin 和 TGF-β1 mRNA 的表达(RT-PCR)

4. 肾组织 Ang II、TGF-β1、periostin 蛋白的表达:ELISA 结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠肾组织 priostin 蛋白、TGF-β1 蛋白和 Ang II 蛋白表达量显著增多(均 $P < 0.05$),而贝那普利组和模型组相比上述指标表达量显著降低,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见表3。

表3 各组大鼠肾组织中 Ang II、TGF-β1 和 periostin 的蛋白表达量($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Ang II (ng/L)	TGF-β1 (ng/L)	periostin (ng/L)
假手术组	335.39±55.15	61.33±13.15	411.65±64.53
模型组	1010.05±69.49 ^a	182.79±15.34 ^a	1025.58±76.24 ^a
贝那普利组	593.05±38.03 ^{ab}	110.78±11.30 ^{ab}	610.27±56.28 ^{ab}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

5. 相关性分析:肾组织 periostin 蛋白表达量与 Ang II、TGF-β1、I 型胶原、肾间质纤维化积分均呈正相关, r 值分别为 0.652、0.781、0.776 和 0.825(均 $P < 0.05$)。肾组织 periostin mRNA 表达量与 TGF-β1 mRNA 表达量呈正相关($r = 0.876, P < 0.01$)。

讨 论

periostin 又名成骨细胞特异因子 2(osteoblast specific factor 2, OSF-2),包含 4 个重复的神经束蛋白样结构域,具有细胞黏附分子样功能。在以基质细胞增殖和迁移为特征的病理过程中可出现 periostin 的过表达,如肿瘤、瘢痕组织、血管损伤、心室重塑等^[6-7]。Ang II 可促进成年大鼠心脏成纤维细胞 periostin 高表达^[8]。高表达的 periostin 通过结合多个胶原单体,层连蛋白和纤连蛋白参与胶原的交联成熟,增加胶原交联和纤维组织发生^[9]。目前对 periostin 在肾组织表达及其作用的研究尚少。本实验 UUO 模型大鼠肾组织纤维化明显, I 型胶原蛋白表达显著增高,肾组织 periostin 的蛋白和 mRNA 表达量均明显高于假手术组,且 periostin 的表达量与肾小管间质纤维化的评分和肾组织 I 型胶原蛋白表达均呈正相关,提示在梗阻性肾病大鼠中,periostin 和肾间质纤维化有密切关联,periostin 可能是影响胶原表达和肾间质纤维化发生的因子之一。

肾脏损伤过程中,肾素-血管紧张素系统(RAS)活性上调,Ang II 水平增加,促进多种因子的表达和活化,从而增加肾脏细胞外基质蓄积,最终导致肾纤维化的发生。研究表明,在 UUO 模型和抗基底膜肾病模型中 Ang II 基因缺陷小鼠与非基因缺陷小鼠相比,肾脏纤维化程度明显减轻^[10]。体外研究提示,Ang II 可直接刺激小管上皮细胞的肥大、刺激成纤维细胞增生并促进这两种细胞的胶原合成。Ang II 能够通过活化 NADPH 氧化酶来增加肾小管上皮细胞 ROS 的生成,从而激活 TGF-β1,加重肾间质纤维化^[11]。TGF-β1 是 Ang II 下游最重要的促纤维化生长因子。UUO 模型大鼠中 TGF-β1 表达增强,解除梗阻后肾小管间质纤维化缓解,TGF-β1 表达也下调;抑制 TGF-β1 的高表达能够改善或延缓肾小管间质纤维化^[12-13]。periostin 作为 TGF-β1 的下游因子参与心脏重塑。对心肌成纤维细胞给予外源性 TGF-β1,可见 periostin 的表达上调;相反,在应用 TGF-β1 中和性抗体或 TGF-β1 受体阻断剂时,periostin 的表达下降^[14-15]。有关心肌梗死的研究发现 Ang II-TGF-β1 信号系统诱导 periostin 生成,使基质蛋白合成增加^[16]。本实验结果表明,在 UUO 大鼠肾组织中 periostin mRNA 和蛋白表达明显上调,与 TGF-β1

表达呈正相关; 贝那普利可抑制肾组织 Ang II 的生成, 下调 TGF- β 1 mRNA 和蛋白表达, periostin 也相应下调, 肾间质纤维化程度得到明显改善。由此可推测, UUO 大鼠肾间质纤维化过程中 Ang II-TGF- β 1 信号系统可能调控或诱导 periostin 的表达, 肾组织持续的 periostin 表达上调则可能是导致肾间质纤维化发生、发展的机制之一。

综上所述, periostin 参与了梗阻性肾病肾间质纤维化发生、发展的过程, 其机制可能是通过 Ang II-TGF- β 1 信号系统的激活而诱导 periostin 的高表达有关。

参 考 文 献

- [1] Okada H, Watanabe Y, Kikuta T, et al. Bradykinin decreases plasminogen activator inhibitor-1 expression and facilitates matrix degradation in the renal tubulointerstitium under angiotensin-converting enzyme blockade. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15: 2404-2413.
- [2] Koo JW, Kim Y, Rozen S, et al. Enalapril accelerates remodeling of the renal interstitium after release of unilateral ureteral obstruction in rats. *J Nephrol*, 2003, 16: 203-209.
- [3] 王晓莹, 王继明. 肾小管间质纤维化与细胞因子调控异常相关性研究. *吉林医学*, 2007, 28: 1913-1916.
- [4] Kudo Y, Ogawa I, Kitajima S, et al. Periostin promotes invasion and anchorage-independent growth in the metastatic process of head and neck cancer. *Cancer Res*, 2006, 66: 6928-6935.
- [5] Wallace DP, Quante MT, Reif GA, et al. Periostin induces proliferation of human autosomal dominant polycystic kidney cells through α V-integrin receptor. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 295: F1463-F1471.
- [6] Li JS, Sun GW, Wei XY, et al. Expression of periostin and its clinicopathological relevance in gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 2007, 13: 5261-5266.
- [7] Pohjolainen V, Rys J, Näpänkangas J, et al. Left ventricular periostin gene expression is associated with fibrogenesis in experimental renal insufficiency. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 27: 115-122.
- [8] 邹平, 吴丹, 吴立玲, 等. Ang II 促进成年大鼠心脏成纤维细胞 periostin 表达的信号通路研究. *现代预防医学杂志*, 2011, 38: 3265-3269.
- [9] Norris RA, Damon B, Mironov V, et al. Periostin regulates collagen fibrillogenesis and biomechanical properties of connective tissues. *J Cell Biochem*, 2007, 101: 695-711.
- [10] Taal MW, Brenner BM. Renoprotective benefits of RAS inhibition: from ACEI to angiotensin II antagonists. *Kidney Int*, 2000, 57: 1803-1817.
- [11] 彭张哲, 陶立坚, 王菱, 等. 氯沙坦对血管紧张素 II 诱导大鼠肾小管上皮细胞氧化应激反应的作用. *中华肾脏病杂志*, 2009, 25: 204-209.
- [12] Morrissey J, Guo G, Moridaira K, et al. Transforming growth factor- β induces renal epithelial jagged-1 expression in Fibrotic disease. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13: 1499-1508.
- [13] 张和平, 谢席胜, 张蕾, 等. TGF- β 1 对肾间质成纤维细胞 SDF-1 表达的影响. *四川大学学报 (医学版)*, 2010, 41: 453-457.
- [14] Snider P, Hinton RB, Moreno-Rodriguez RA, et al. Periostin is required for maturation and extracellular matrix stabilization of noncardiomyocyte lineages of the heart. *Circ Res*. 2008, 102: 752-760.
- [15] Chen YF, Feng JA, Li P, et al. Dominant negative mutation of the TGF-beta receptor blocks hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling. *J Appl Physiol*, 2006, 100: 564-571.
- [16] Shimazaki M, Nakamura K, Kii I, et al. Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction. *J Exp Med*, 2008, 205: 295-303.

(收稿日期: 2011-10-08)

(本文编辑: 王欣)

· 读者·作者·编者 ·

本刊对如何鉴定重复发表论文的声明

近年来, 学术论文主要研究内容重复发表的现象越来越多。这里说的重复发表指的是将同一研究的课题的结果总结成多篇论文, 先后投寄到多个杂志发表的现象。在我们日常的来稿中, 有一部分论文属于这种情况。国外学者将这种稿件成为“腊肠切片”(salami slicing), 而国内学者将这类论文叫做“变相重复发表”。实际上这也是属于一稿多投的一种。本刊结合国内外学者及专家的意见, 将“重复发表”稿件定义为 (1) 作者单位相同, 或大部分作者相同, 包括第一作者相同或者不同、作者排名顺序相同或者不同; (2) 主要的研究方法相同; (3) 半数以上内容 (包括资料或讨论部分) 相同; (4) 结论类似。

本刊对上述这类论文均作退稿处理。在此提醒作者, 如您所投的稿件与以前刊出的文章可能被认为是重复发表时要加以说明, 以便本编辑部正确判断和处理。

本刊编辑部