

NKCC1在慢性肾脏病大鼠主动脉纤维化中的作用研究

刘爽 刘怡晟 应思琦 潘林蓉 蒋更如*

(上海交通大学医学院附属新华医院肾内科, 上海 200092)

摘要 该文探讨了Na-K-2Cl协同转运蛋白1(Na-K-2Cl cotransporter 1, NKCC1)在慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)大鼠主动脉纤维化中的作用。采用5/6肾切除方法建立CKD大鼠模型, 尾套法测定大鼠血压, 脲酶法测定血清尿素氮(blood urea nitrogen, BUN), 肌氨酸氧化酶法测定血清肌酐(serum creatinine, Scr); 利用苏木素-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色观察组织形态, Masson染色观察组织纤维化情况; 利用Real-time PCR、Western blot和免疫组织化学染色法检测大鼠肾脏和主动脉组织中NKCC1的表达; 体外培养大鼠主动脉内皮细胞(endothelial cell, EC), 通过免疫荧光实验观察细胞中I型胶原(Collagen-I, Col-I)、III型胶原(Collagen-III, Col-III)的表达, 利用Western blot检测 α -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin, α -SMA)、血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)、钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(vimentin)的表达。结果显示, CKD大鼠的平均收缩压(systolic blood pressure, SBP)较术前和假手术组(sham)均明显升高($P<0.05$), BUN和Scr显著高于sham组($P<0.05$); CKD大鼠肾脏和主动脉组织损伤严重且纤维化明显, NKCC1的表达较sham组明显增加; 醛固酮(aldosterone)使EC中NKCC1、Col-I和Col-III增多, 间质细胞标志物 α -SMA和vimentin上调, 内皮细胞标志物CD31和E-cadherin下调, 在此基础上用布美他尼(bumetanide)使NKCC1、Col-I和Col-III减少, α -SMA和vimentin表达下降, CD31和E-cadherin升高。该研究表明, NKCC1可能通过增强内皮-间质转化(endothelial-to-mesenchymal transition, EndoMT)促进CKD主动脉纤维化。

关键词 Na-K-2Cl协同转运蛋白1; 慢性肾脏病; 纤维化; 主动脉; 内皮-间质转化

Function of NKCC1 in the Aortic Fibrosis of Rats with Chronic Kidney Disease

LIU Shuang, LIU Yisheng, YING Siqu, PAN Linrong, JIANG Gengru*

(Department of Nephrology, Xinhua Hospital affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

Abstract This work explored the role of NKCC1 (Na-K-2Cl cotransporter 1) in aortic fibrosis in CKD (chronic kidney disease) rats. The CKD rat model was established by 5/6 nephrectomy. Blood pressure was measured by tail cuff method. BUN (blood urea nitrogen) was measured by urease method. Scr (serum creatine) was measured by sarcosine oxidase method. Tissue morphology was observed by HE (hematoxylin and eosin) staining, and fibrosis was observed by Masson-trichrome staining. The expression of NKCC1 in rat kidney and aorta was detected by Real-time PCR, Western blot and immunohistochemical staining. Rat aortic EC (endothelial cell) was cultured *in vitro*. Immunofluorescence experiments were performed to observe the expression of Col-I (collagen-I) and Col-III (collagen-III) in the cells. Western blot was used to detect the expression of α -SMA (α -smooth muscle

收稿时间: 2019-11-11 接受日期: 2020-03-16

上海市卫生和计划生育委员会科研课题(批准号: 20144Y0145)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-25078819, E-mail: jianggeng-ru@hotmail.com

Received: November 11, 2019

Accepted: March 16, 2020

This work was supported by the Youth Scientific Research Grant from Shanghai Health Bureau (Grant No.20144Y0145)

*Corresponding author. Tel: +86-21-25078819, E-mail: jianggeng-ru@hotmail.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5239>

actin), CD31 (platelet-endothelial cell adhesion molecule), E-cadherin and vimentin. The results showed that the mean SBP (systolic blood pressure) of CKD rats was significantly higher than that of the preoperative and sham groups ($P<0.05$). The expression levels of BUN and Scr were significantly higher than those of the sham group ($P<0.05$). Kidney and aorta of CKD rats were severely damaged and showed obvious fibrosis. The expression of NKCC1 was significantly increased compared with that in the sham group. When NKCC1 in EC were activated by aldosterone, the expression levels of Col-I, Col-III and the interstitial cell markers α -SMA, vimentin were up-regulated, while the endothelial cell markers CD31 and E-cadherin were down-regulated. On this basis, when NKCC1 activity were inhibited by bumetanide, the expression of Col-I, Col-III, α -SMA and vimentin was down-regulated, while CD31 and E-cadherin were up-regulated. This study shows that NKCC1 may promote CKD aortic fibrosis by enhancing EndoMT (endothelial-to-mesenchymal transition).

Keywords Na-K-2Cl cotransporter 1; chronic kidney disease; fibrosis; aorta; endothelial-to-mesenchymal transition

我国慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)患病率为10.85%, 其中约2%进展为终末期肾病(end stage renal disease, ESRD), 如不加以有效干预, 患者将长期承受痛苦, 对家属及社会产生极大压力^[1-3]。CKD患者肾功能进行性下降, 肾小球滤过率(glomerular filtration rate, GFR)降低导致毒素无法及时排出, 肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS)被过度激活。随着CKD病程的进展, 多靶器官受累, 心脑血管事件发生几率增加, 其中肾脏和血管的纤维化均为不可逆的、进行性病变。据统计, 约10% CKD患者死于肾衰竭, 而高达44%~51%的患者死于心脑血管疾病^[1,4-6]。因此, 探索CKD靶器官纤维化机制并进行针对性干预, 极有可能成为延缓CKD进展的关键。

组织纤维化的典型特征是肌成纤维细胞的过度增殖以及细胞外基质的异常增多和沉积。研究证实, 内皮细胞来源的成纤维细胞会导致心肌纤维化^[7]。内皮细胞是血管生理的重要调节因子, 参与维持血管收缩与舒张、调控大分子蛋白质以维持血管内渗透压^[8]。多种血管相关疾病的病理过程均与内皮细胞功能受损相关, 如动脉粥样硬化、血栓形成等; 而CKD患者常伴有的血压升高和RAAS系统过度激活等均会导致内皮细胞损伤, 由此可见, 内皮细胞与心血管事件风险密切相关^[9-12]。内皮细胞受损后, 内皮特性逐渐丢失并不断呈现间质特征, 向间质细胞转化的现象即内皮-间质转化(endothelial-to-mesenchymal transition, EndoMT), 这一复杂过程在纤维化病变中发挥重要作用^[13]。

Na-K-2Cl协同转运蛋白(Na-K-2Cl cotransporter,

NKCC)广泛存在于多种动物中, 正常生理状态下以Na:K:Cl为1:1:2的比例转运离子。NKCC有两个同源异构体, 其中NKCC2主要存在于肾脏髓质区域, 而NKCC1在多种组织和细胞中广泛表达^[14-16], 在维持内环境稳态中发挥重要的生理功能^[17-18]。研究表明, NKCC1的活性与血压稳态、血管张力、调节肾素等均密切相关^[19-22], 而KIM等^[23]进一步发现, NKCC1基因敲除(*Nkcc1*^{-/-})小鼠动脉血压表现出对Na⁺的高度敏感性, 提示NKCC1影响内皮细胞的功能。而对于NKCC1是否在CKD并发主动脉纤维化中发挥作用, 尚未见报道。

为了探究NKCC1在CKD并发主动脉纤维化中的作用, 我们利用CKD大鼠模型和主动脉内皮细胞开展体内体外研究, 以期控制CKD进展速度及减缓靶器官损伤进而减少心脑血管事件的发生寻找新的干预靶点, 具有较为重要的科研和临床意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物和样本采集

1.1.1 实验动物模型建立 实验动物为SPF级雄性SD大鼠, 体质量为(180±20) g, 购于西普尔-必凯实验动物有限公司, 动物使用许可证号为SYXK(沪)2018-0038。大鼠饲养于上海交通大学医学院附属新华医院实验动物中心, 实验开始前适应性喂养1周, 所有操作遵守上海交通大学医学院附属新华医院伦理委员会的规定。将实验大鼠随机分组, 每组10只。5/6肾切除CKD大鼠模型(实验组): 将大鼠剃毛备皮后局部消毒, 首次手术暴露左侧肾脏并分离肾包膜, 结扎去掉肾脏的上、下极各1/3组织, 剩余1/3肾脏组织复位并缝合;

1周后进行二次手术, 结扎摘除整个右肾。假手术组(sham, 对照组): 大鼠麻醉后, 仅暴露双侧肾脏、剥离肾周脂肪组织后复位并缝合。各组大鼠术后均常规饲养。

1.1.2 样本采集 实验组和对照组的大鼠均于造模手术完成后16周取样。大鼠麻醉后经心脏采集全血并分离血清; 用预冷的生理盐水灌洗后留取肾组织和主动脉血管组织, 各分成3份, 分别保存于预冷的4%多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)(1份)和液氮(2份)中, 用于后续实验。

1.2 主要仪器和试剂

NKCC1和 α -SMA抗体购于美国Santa Cruz公司; E-cadherin、vimentin、CD31、Col-I和Col-III抗体购于美国Abcam公司; 布美他尼、醛固酮购于美国Sigma公司; 辣根过氧化物酶标记的二抗、苯甲基磺酰氟(henylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、RIPA裂解溶液、BCA蛋白质定量试剂盒、胰酶细胞消化液等购于上海碧云天生物技术有限公司; 尿素氮和肌酐测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所; Trizol试剂购于美国Invitrogen公司; RNA逆转录试剂盒、荧光定量PCR试剂盒购于大连TaKaRa公司; PCR引物由生工生物工程(上海)有限公司合成; 内参引物GAPDH(B662204-0001)购于生工生物工程(上海)有限公司; 4%多聚甲醛、Bouin液、苏木素-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色试剂盒、Masson三色染色试剂盒购于武汉赛维尔生物科技有限公司; 细胞培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶等购于美国Thermo公司。Leica^{RM} 2025石蜡切片机和Leica DMI-3000B倒置荧光显微镜购于德国Leica公司; Nano Drop 2000购于美国Thermo公司; EPS200蛋白电泳仪购于上海天能科技有限公司; BP-98A型智能无创血压计购于北京软隆科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 一般情况观察和体质量、血压测量 每天观察实验大鼠的精神、活动和饮食情况, 检查有无打斗外伤, 术后切口有无感染、溃破等, 并做异常情况记录。在第一次手术开始前和取样前称量体质量、测量收缩压。血压采用清醒大鼠尾套法测定, 在恒温环境下, 将大鼠置于测量管套中露出尾部, 血压尾套套于大鼠尾中部, 记录4~6次尾部血压并计算。

1.3.2 肾功能检测 采用脲酶法尿素氮试剂盒检测血清尿素氮(blood urea nitrogen, BUN), 按照说明书操

作, 即在空白管、标准管和测定管中加入双蒸水, 再分别加入标准液、样本和缓冲酶液, 混匀后于37℃水浴10 min, 加入酚显色剂和碱性次氯酸钠, 充分混匀并水浴, 于波长640 nm处测定 D 值并计算。使用肌氨酸氧化酶法肌酐测定试剂盒检测血清肌酐(serum creatine, Scr), 按照说明书操作, 即在测定孔、标准孔、空白孔中依次加入样本、标准品和双蒸水后, 分别加酶溶液A, 孵育后于546 nm波长测定 D_1 值; 再分别加入酶溶液B, 孵育后测定 D_2 值, 计算Scr值。

1.3.3 RNA提取及Real-time PCR检测NKCC1 mRNA的表达 用Trizol分别裂解肾脏和主动脉血管组织, 加入1/5 Trizol体积的氯仿, 振荡混匀, 室温静置15 min后于4℃、12 000 $\times g$ 离心15 min, 收集上清液并加入等体积的异丙醇混匀, 室温静置15 min沉淀RNA, 4℃、12 000 $\times g$ 离心15 min收集RNA沉淀, 使用75%乙醇漂洗RNA沉淀2次, 室温晾干后使用无RNase的水将其溶解, 用Nano Drop 2000检测RNA浓度及纯度。取1 μg RNA为模板, 使用RNA逆转录试剂盒逆转录为cDNA。采用SYBR Green染料法, 严格按照TaKaRa公司说明书配制Real-time PCR反应体系和设定反应程序, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析实验结果。NKCC1引物序列: 上游引物5'-CCA CAC CAA CAC CTA CTA C-3', 下游引物5'-TGC GAC CAC AGC ATC TCT-3'。以GAPDH为内参。

1.3.4 Western blot检测NKCC1、 α -SMA、CD31、E-cadherin、vimentin等蛋白的表达 在冰上用RIPA裂解液进行组织匀浆或细胞裂解, 离心后转移上清液至新管, 提取总蛋白。用BCA法测定蛋白浓度。配制蛋白浓缩胶和合适浓度的分离胶, 进行SDS-PAGE凝胶电泳。每孔蛋白上样量为30 μg , 首先以80 V电压电泳约30 min, 使各孔的蛋白跑至浓缩胶与分离胶交界处, 然后调整电压至120 V电泳1~2 h; 通过湿转法将蛋白转至PVDF膜上, 用5%牛奶于室温封闭2 h, 分别加对应蛋白的一抗于4℃孵育过夜(12~16 h)。用TBST洗膜3次后, 分别加入对应的二抗于室温摇床上孵育2 h, 用TBST洗膜3次, 利用ECL显色液发光并用凝胶成像仪成像。以GAPDH为内参。使用Image Lab分析条带灰度值。

1.3.5 HE染色 取PFA固定的组织, 经梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡并包埋, 制作4 μm 连续石蜡切片。切片经二甲苯和梯度酒精脱蜡, 进行苏木素-伊红染色后, 依次经梯度酒精脱水、二甲苯透明, 用

中性树胶封片,在光学显微镜下观察并拍照。

1.3.6 Masson染色 石蜡切片常规脱蜡至水,切片入Bouin液于37℃温箱中处理2 h,冲洗后进行染色。切片浸入乙醇乙酸(2:1)溶液后用蒸馏水稍冲洗,浸入丽春红酸性品红染色液染色,用蒸馏水快速冲洗浮色,再经1%磷钼酸水溶液分化后,不经水洗直接用1%亮绿染色液复染,再经蒸馏水冲洗后,用0.2%冰醋酸浸洗片刻,依次进行脱水、透明、中性树胶封片,在显微镜观察下并拍照。

1.3.7 免疫组化实验 石蜡切片常规脱蜡至水,用3% H₂O₂处理10 min,蒸馏水洗3次,将切片放入枸橼酸盐缓冲溶液中,用微波炉加热修复抗原15 min,室温冷却30 min, PBS洗涤后擦干组织周围液体,用10% BSA室温封闭2 h,放入孵育盒并滴加NKCC1一抗4℃孵育过夜。PBS漂洗3次,擦干组织周围液体,室温环境孵育辣根过氧化物酶标记的二抗1 h, PBS漂洗3次, DAB显色液显色后,置于去离子水中终止显色,用苏木素复染细胞核,1%盐酸酒精溶液分化,流水漂洗返蓝,常规脱水、透明,中性树胶封片,观察并拍照。

1.3.8 免疫荧光实验 主动脉内皮细胞(endothelial cell, EC)培养于含10%灭活胎牛血清、100 U/mL青霉素/链霉素(penicillin/streptomycin, P/S)的DMEM/F12培养基中,置于37℃、5% CO₂的培养箱中培养。细胞爬片,用4% PFA固定,经PBS漂洗后用0.5% Triton X-100溶液孵育穿孔,再用PBS漂洗后1% BSA封闭1 h,加一抗(Col-I或Col-III)于4℃孵育过夜,洗涤后加入荧光二抗,于室温环境避光孵育1 h,再经PBS漂洗后DAPI染色细胞核,用防淬灭封片剂封片后,在荧光显微镜下观察并拍照。

1.4 统计学方法

使用GraphPad Prism 7统计软件对实验取得的数据进行处理和分析,所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 t 检验分析组间的差异。以概率值

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠体质量与收缩压比较

于大鼠造模开始前和造模手术后16周即取样前,分别测量各组大鼠体质量。结果显示,造模前对照组和实验组大鼠体质量接近,分别为(193.34±6.49) g和(192.44±8.65) g,同样条件常规饲养至术后16周,取样前实验组大鼠平均体质量为(477.13±17.52) g,略高于对照组的(468.31±26.24) g,但无显著性差异(表1)。

造模前对照组和实验组大鼠的平均收缩压无差异,分别为(122.55±5.83) mmHg、(123.57±5.71) mmHg;而术后16周即取样前实验组大鼠的平均收缩压较术前明显升高,为(168.14±4.81) mmHg($P < 0.05$),且显著高于取样前对照组(128.44±4.93) mmHg($P < 0.05$)(表1)。

2.2 大鼠的肾功能指标检测

为了检测实验大鼠的肾功能情况,测定Scr和BUN。结果显示,实验组Scr为(73.19±4.61) μmol/L,显著高于对照组(29.49±2.62) μmol/L($P < 0.05$);实验组BUN为(26.57±3.15) mmol/L,显著高于对照组的(6.84±1.32) mmol/L($P < 0.05$)(表2)。

2.3 大鼠肾脏和主动脉组织形态变化和纤维化情况

为了考察实验组大鼠肾脏组织和主动脉血管组织的损伤情况,采用HE染色观察组织形态结构变化,采用Masson染色考察组织纤维化情况。结果(图1)表明,实验组大鼠肾脏组织可见大量肾小管上皮细胞空泡样变性、肾小球系膜细胞增多,结合Masson染色可见呈蓝色的胶原纤维染色区域广泛且明显多于对照组,而对照组肾小球、肾小管、肾间质细胞排列及分布基本正常,且无明显纤维化;实验组大鼠主动脉可见内膜、中膜节段增生,伴有空泡细胞形成,有明显的纤维化,而对照组主动脉血管内

表1 造模前后大鼠体质量及收缩压变化

Table1 Changes of body weight and systolic blood pressure in rats before and after modeling

动物分组 Animal group	体质量/g Weight /g		收缩压/mmHg Systolic blood pressure /mmHg	
	造模前 Before modeling	16周后 After 16 weeks	造模前 Before modeling	16周后 After 16 weeks
Sham	193.34±6.49	468.31±26.24	122.55±5.83	128.44±4.93
CKD	192.44±8.65	477.13±17.52	123.57±5.71	168.14±4.81*

$n=8$, * $P < 0.05$, 与假手术组比较。

$n=8$, * $P < 0.05$ compared with the sham group.

皮较为光滑,可见细胞整齐排列的内膜细胞,结构未见异常且无明显纤维化。

2.4 NKCC1在肾脏和主动脉组织中的变化

为了考察随着CKD发生,肾脏和主动脉组织中

NKCC1的变化情况,分别采用Real-time PCR、Western blot和免疫组织化学染色法,从mRNA水平、蛋白水平和抗原抗体特异性结合情况等方面开展实验。结果(图2)可见,实验组肾脏、主动脉组织中

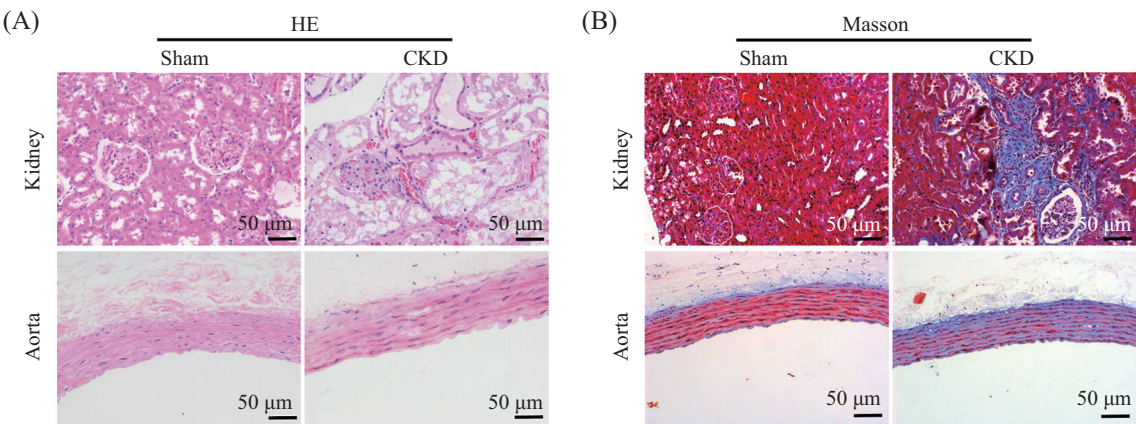
表2 造模前后大鼠肌酐及尿素氮变化

Table 2 Changes of creatinine and urea nitrogen in rats before and after modeling

动物分组	肌酐/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	尿素氮/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
Animal group	Creatinine / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Urea nitrogen / $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
Sham	29.49 $\pm$ 2.62	6.84 $\pm$ 1.32
CKD	73.19 $\pm$ 4.61*	26.57 $\pm$ 3.15*

n=8, *P<0.05, 与假手术组比较。

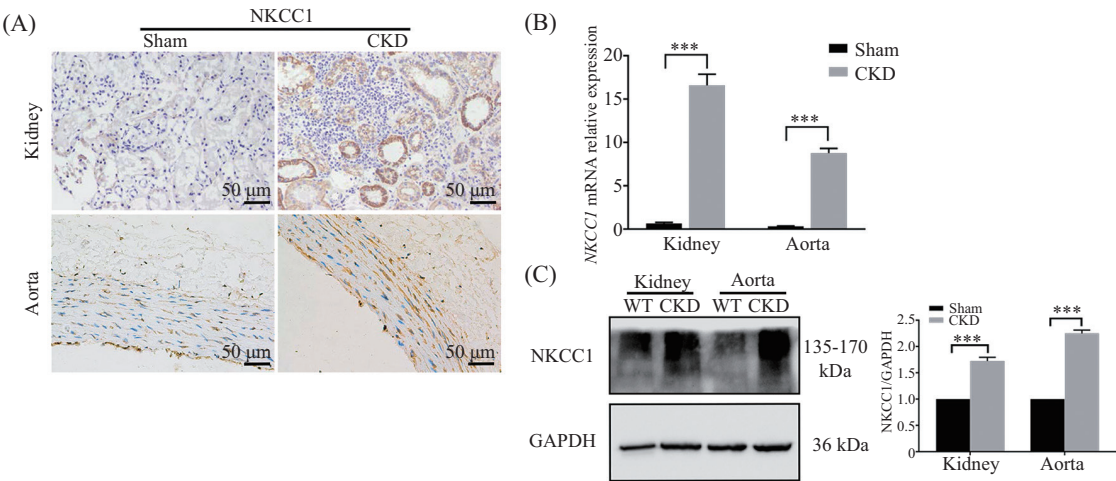
n=8, *P<0.05 compared with sham group.



CKD大鼠建模16周后肾脏及主动脉组织形态变化(HE染色)(A)和纤维化情况(Masson染色)(B)比较。
Morphological changes (HE staining) (A) and fibrosis (Masson staining) (B) of rat kidney and aorta after 16 weeks of modeling.

图1 CKD大鼠肾脏和主动脉组织形态及纤维化情况

Fig.1 Morphology and fibrosis of the kidney and aorta of CKD rat



A: NKCC1在CKD大鼠肾脏及主动脉组织中特异性结合明显(棕黄色为NKCC1阳性, 蓝色为细胞核); B、C: NKCC1 mRNA及蛋白水平的表达在纤维化的肾脏及主动脉中上调。n=3, ***P<0.001。

A: pefic binding of NKCC1 in kidney and aorta of CKD rats (brown is NKCC1 positive, and blue is the nucleus); B,C: mRNA and protein levels of NKCC1 are up-regulated in fibrotic kidney and aorta. n=3, ***P<0.001.

图2 NKCC1在CKD大鼠的肾脏和主动脉组织中表达上调

Fig.2 Expression of NKCC1 is up-regulated in kidney and aorta of CKD rats

NKCC1的mRNA水平、蛋白水平均显著高于对照组($P<0.001$)(图2B和图2C), 免疫组化结果显示, 实验组肾脏和主动脉组织中明显可见大面积的NKCC1阳性结合, 且在组织损伤严重区域尤其明显。而对照组鲜有阳性表达(图2A)。

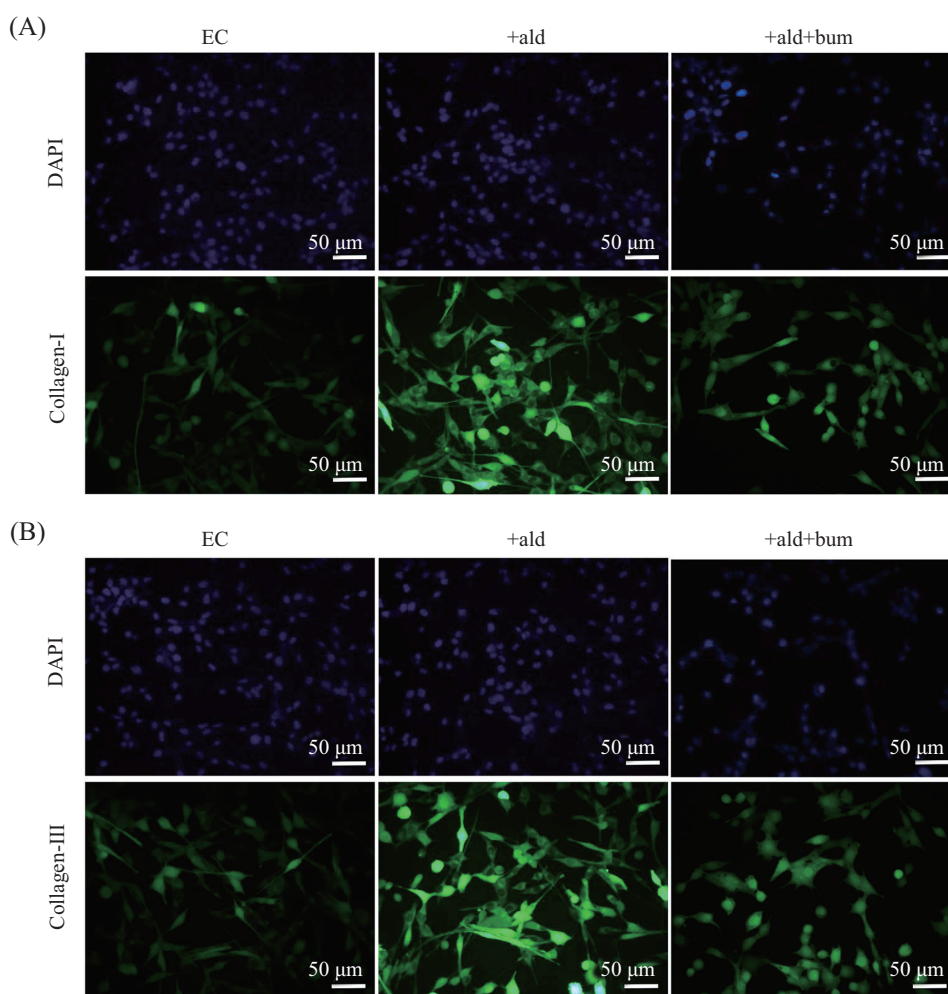
2.5 NKCC1在EC中的激活和抑制

在纤维化过程中往往产生大量胶原等细胞外基质, 通过细胞免疫荧光实验, 可见NKCC1激活的EC中Col-I、Col-III的表达均明显增多, 再经布美他尼干预后, 表达明显减少(图3)。为进一步明确NKCC1在CKD进展及主动脉纤维化过程中发挥的作用, 利用醛固酮处理EC, 激活NKCC1, Western blot实验结果显示, NKCC1表达明显上升($P<0.001$);

在此基础上使用NKCC1特异性抑制剂布美他尼干预后, NKCC1的表达水平明显下降($P<0.001$)(图4A)。

2.6 检测CD31和E-cadherin以及 α -SMA和vimentin蛋白的表达

分别收集未处理的EC、醛固酮处理的EC、醛固酮和布美他尼依次处理的EC并提取总蛋白, Western blot实验结果显示加入醛固酮后, CD31和E-cadherin表达明显下降($P<0.001$), 而 α -SMA和vimentin明显增加($P<0.001$, $P<0.01$); 进而用布美他尼干预后, CD31和E-cadherin表达量较之前明显上升($P<0.05$, $P<0.001$), α -SMA和vimentin表达量较之前明显下降($P<0.01$)(图4B和图4C)。

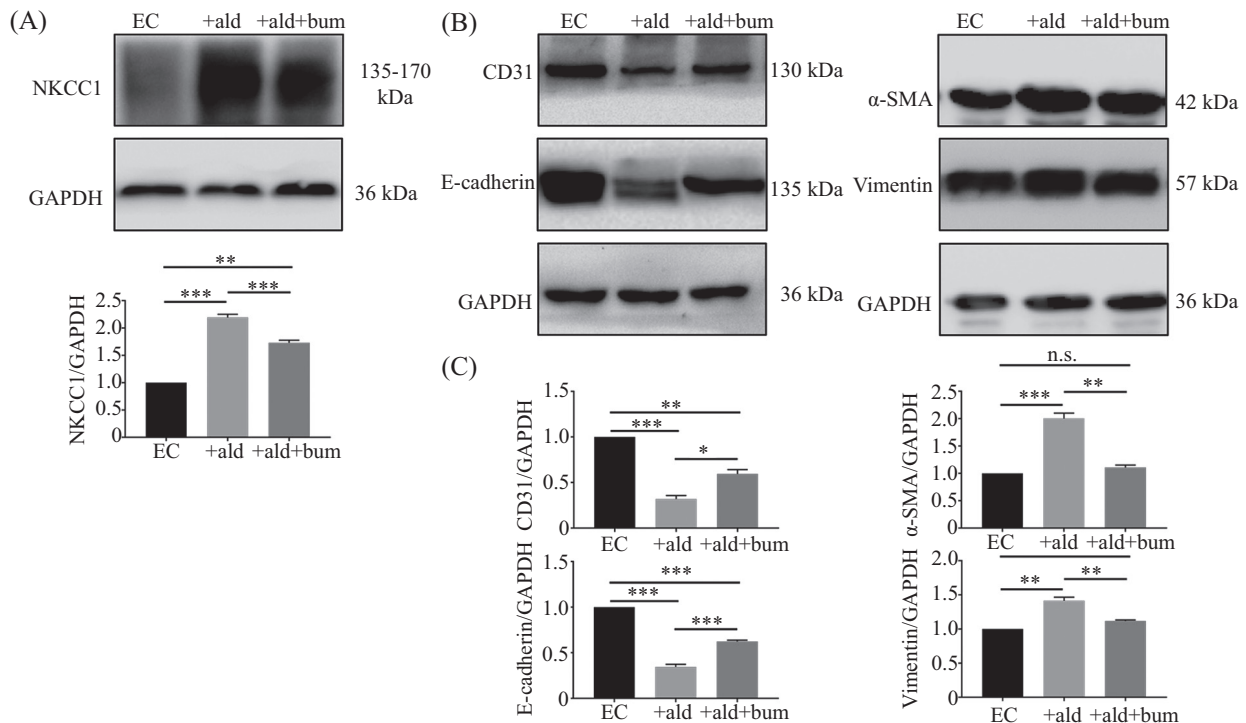


A: 激活NKCC1促进了大鼠主动脉内皮细胞Col-I表达, 抑制NKCC1减弱了Col-I的表达; B: 激活NKCC1促进了大鼠主动脉内皮细胞Col-III表达, 抑制NKCC1减弱了Col-III的表达。绿色荧光信号为蛋白表达; 蓝紫色为细胞核; ald: 醛固酮; bum: 布美他尼。

A: activation of NKCC1 promotes Col-I expression in rat aortic endothelial cells, and inhibition of NKCC1 attenuates Col-I expression; B: activation of NKCC1 promotes Col-III expression in rat aortic endothelial cells, and inhibition of NKCC1 attenuates Col-III expression. Green fluorescent signal represents protein expression; blue represents the nucleus; ald: aldosterone; bum: bumetanide.

图3 在激活或抑制NKCC1表达情况下大鼠主动脉内皮细胞Col-I及Col-III表达变化

Fig.3 Expression changes of Col-I and Col-III in rat aortic endothelial cells after activating or inhibiting NKCC1



A: 激活和抑制NKCC1的表达; B、C激活NKCC1抑制了大鼠主动脉内皮细胞CD31、E-cadherin(内皮细胞标志物)的表达,促进了 α -SMA、vimentin(间质细胞标志物)的表达,进而抑制NKCC1增加CD31、E-cadherin的表达,而降低 α -SMA、vimentin的表达。 $n=3$, n.s.: $P>0.05$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

A: activation and inhibition of NKCC1 expression; B,C: activation of NKCC1 inhibits expression of CD31 and E-cadherin (endothelial cell markers) in rat aortic endothelial cells, and promotes expression of α -SMA and vimentin (mesenchymal cell markers). Inhibition of NKCC1 increases the expression of CD31 and E-cadherin, and decreases the expression of α -SMA and vimentin. $n=3$, n.s.: $P>0.05$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$.

图4 在激活或抑制NKCC1表达情况下大鼠主动脉内皮细胞表面标志物表达变化

Fig.4 Expression changes of surface markers in rat aortic endothelial cells after activating or inhibiting NKCC1

3 讨论

CKD在全球范围内的发病率和死亡率呈逐年上升趋势,受到各国广泛关注^[1-2]。CKD患者肾功能进行性下降、尿素氮不断积累,也往往伴随高血压、糖尿病以及多种靶器官损伤等。心血管病变是CKD患者的主要并发症之一和首位死因,肾小球滤过率(glomerular filtration rate, GFR)小于 $60 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1.73 \text{ m}^{-2}$ 的CKD患者心血管死亡风险增加57%^[4]。CKD 3期患者的心血管死亡率约为普通人群的2倍,CKD 4期患者的心血管死亡率约为普通人群的4倍,进入透析阶段的患者心血管死亡率高达普通人群的10~20倍。因此,开展CKD并发心血管系统损伤的相关研究,对于延缓CKD进展具有重要意义^[24-25]。本研究采用5/6肾切除方法建立了CKD大鼠模型,发现其血压显著升高、肌酐和尿素氮含量明显上升,表明其肾功能异常,且HE染色结果显示,其肾脏和主动脉组织病理损伤严重,这与CKD患者主要临床表现和病理表

现相符。

CKD患者RAAS系统过度激活,其中血管紧张素II在肾脏损伤中发挥核心调控作用,能够引起肾小球毛细血管压力升高,进而导致肾小球上皮、内皮及系膜细胞的受损;此外血管紧张素II及醛固酮能够促进炎症、纤维化、细胞外基质积累、活性氧产生及内皮细胞功能障碍等相关信号的活化,加速CKD进展^[26-28]。Masson染色实验结果说明,CKD大鼠的肾脏及主动脉组织损伤严重且均发生了明显的纤维化。NKCC1作为细胞内外 Na^+ 、 K^+ 浓度的重要调控因子,在心脏、血管、肾脏、神经系统等多种组织中发挥重要的生理功能,NKCC1表达或功能的失调会导致多种疾病发生^[29]。JIANG等^[19]利用肾上腺切除大鼠的主动脉研究发现,醛固酮通过盐皮质激素刺激加强NKCC1活性;KIM等^[23]和WALL等^[30]均发现,NKCC1敲除的小鼠对醛固酮响应异常;DING等^[31]进一步研究发现,醛固酮能够精确灵敏地

上调NKCC1表达。为研究CKD中激活的RAAS是否影响NKCC1的表达,我们通过免疫组化、Real time-PCR及Western blot实验检测发现, NKCC1在CKD大鼠纤维化的肾脏及主动脉中表达明显升高,进而提示, NKCC1可能参与CKD靶器官肾脏和主动脉等的纤维化。

纤维化在肾脏疾病发生发展中扮演着重要的角色,约45%的CKD患者死于肾纤维化^[32]。纤维化典型特征为肌成纤维细胞过度增殖及细胞外基质异常沉积,PIERA等^[33]研究发现,血管内皮细胞是肌成纤维细胞的重要来源,损伤后的内皮细胞连接减弱,并经EndoMT转为间质细胞,促进了纤维化的发生;SUN等^[34]在人的主动脉内皮细胞中检测到NKCC1的表达;而KOUMANGOYE等^[35]发现, NKCC1-DFX突变的小鼠中细胞紧密连接蛋白claudin-2表达下调,导致Na⁺及H₂O转运异常。这些研究结果提示,内皮细胞中NKCC1可能参与EndoMT。本研究利用醛固酮处理内皮细胞,结果显示,激活NKCC1促进了大鼠主动脉内皮细胞细胞外基质成分Col-I、Col-III及间质细胞标志蛋白 α -SMA、vimentin的表达,而内皮细胞标志蛋白CD31、E-cadherin表达下调;布美他尼抑制NKCC1后, Col-I、Col-III及间质细胞标志蛋白 α -SMA、vimentin的表达降低,而内皮细胞标志蛋白CD31、E-cadherin表达升高。这与QUYYUMI等^[10]和PIERA等^[33]的报道一致,即当细胞外基质堆积、细胞间紧密连接减弱时,内皮细胞逐渐失去自身表型和特异性;同时细胞增殖和迁移能力逐渐增强,呈现间质细胞表型,细胞发生EndoMT,促进纤维化的形成。

综上所述,本研究结果表明, NKCC1在CKD大鼠纤维化的主动脉中的表达显著增加,且NKCC1促进了主动脉内皮细胞EndoMT的发生,因而NKCC1可能通过增强EndoMT参与CKD主动脉纤维化。而对于NKCC1在CKD大鼠乃至患者主动脉纤维化进展中的具体调控机制,有待后续深入研究和完善。

参考文献 (References)

- [1] NUGENT R A, FATHIMA S F, FEIGL A B, et al. The burden of chronic kidney disease on developing nations: a 21st century challenge in global health [J]. *Nephron Clin Pract*, 2011, 118(3): c269-77.
- [2] EKNOYAN G, LAMEIRE N, BARSOUM R, et al. The burden of kidney disease: improving global outcomes [J]. *Kidney Int*, 2004, 66(4): 1310-4.
- [3] ZHANG L X, WANG F, WANG L, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China: a cross-sectional survey [J]. *Lancet*, 2012, 379(9818): 815-22.
- [4] WEBSTER AC, NAGLER EV, MORTON RL, et al. Chronic kidney disease [J]. *Lancet*, 2017, 389(10075): 1238-52.
- [5] DRAWZ P, RAHMAN M. Chronic kidney disease [J]. *Ann Int Med*, 2015, 162(11): ITC1-14.
- [6] MATHEW R O, BANGALORE S, LAVELLE M P, et al. Diagnosis and management of atherosclerotic cardiovascular disease in chronic kidney disease: a review [J]. *Kidney Int*, 2017, 91(4): 797-807.
- [7] ZEISBERG E M, TARNAVSKI O, ZEISBERG M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis [J]. *Nat Med*, 2007, 13(8): 952-61.
- [8] 郭益民, 韩丽萍, 刘重斌(译). 生理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009, 199.
- [9] NAYOR M, LARSON M G, WANG N, et al. The association of chronic kidney disease and microalbuminuria with heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction [J]. *European J Heart Failure*, 2017, 19(5): 615-23.
- [10] QUYYUMI A A, PATEL R S. Endothelial dysfunction and hypertension: cause or effect [J]? *Hypertension*, 2010, 55(5): 1092-4.
- [11] VERSARI D, DAGHINI E, VIRDIS A, et al. Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 157(4): 527-36.
- [12] YU F P, ZHAO Y C, GU B, et al. Chronic kidney disease and carotid atherosclerosis in patients with acute stroke [J]. *Neurologist*, 2015, 20(2): 23-6.
- [13] BISCHOFF J. Endothelial-to-mesenchymal transition: purposeful versus maladaptive differentiation [J]. *Circulation Res*, 2019, 124(8): 1163-5.
- [14] GAMBA G, MIYANOSHITA A, LOMBARDI M, et al. Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(26): 17713-22.
- [15] BRUNET G M, GAGNON E, SIMARD C F, et al. Novel insights regarding the operational characteristics and teleological purpose of the renal Na⁺-K⁺-Cl₂ cotransporter (NKCC2s) splice variants [J]. *J General Physiol*, 2005, 126(4): 325-37.
- [16] LIONETTO M G, GIORDANO M E, DE NUCCIO F, et al. Hypotonicity induced K⁺ and anion conductive pathways activation in eel intestinal epithelium [J]. *J Exp Biol*, 2005, 208(4): 749-60.
- [17] SHEN B, FU J, GUO J Z, et al. Role of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter 1 in phenylephrine-induced rhythmic contraction in the mouse aorta: regulation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter 1 by Ca²⁺ sparks and KCa channels [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(2): 747-58.
- [18] JIANG G R, KLEIN J D, O'NEILL W C. Growth factors stimulate the Na-K-2Cl cotransporter through a novel Cl⁻-dependent mechanism [J]. *Am J Physiol*, 2001, 281(6): C1948-53.
- [19] JIANG G R, COBBS S, KLEIN J D, et al. Aldosterone regulates the Na-K-2Cl cotransporter in vascular smooth muscle [J]. *Hypertension*, 2003, 41(5): 1131-5.
- [10] JIANG G R, AKAR F, COBBS S L, et al. Blood pressure regu-

- lates the activity and function of the Na-K-2Cl cotransporter in vascular smooth muscle [J]. *Am J Physiol*, 2004, 286(4): H1552-7.
- [21] AKAR F, JIANG G R, PAUL R J, et al. Contractile regulation of the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter in vascular smooth muscle [J]. *Am J Physiol*, 2001, 281(2): C579-84.
- [22] FLAGELLA M, CLARKE L L, MILLER M L, et al. Mice lacking the basolateral Na-K-2Cl cotransporter have impaired epithelial chloride secretion and are profoundly deaf [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(38): 26946-55.
- [23] KIM S M, EISNER C, FAULHABER-WALTER R, et al. Salt sensitivity of blood pressure in NKCC1-deficient mice [J]. *Am J Physiol*, 2008, 295(4): F1230-8.
- [24] GANSEVOORT R T, CORREA-ROTTER R, HEMMELGARN B R, et al. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention [J]. *Lancet*, 2013, 382(9889): 339-52.
- [25] CHEUNG A K, SARNAK M J, YAN G F, et al. Cardiac diseases in maintenance hemodialysis patients: results of the HEMO study [J]. *Kidney Int*, 2004, 65(6): 2380-9.
- [26] ANDERSON S, RENNKE H G, BRENNER B M. Therapeutic advantage of converting enzyme inhibitors in arresting progressive renal disease associated with systemic hypertension in the rat [J]. *J Clin Invest*, 1986, 77(6): 1993-2000.
- [27] RÜSTER C, WOLF G. Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease [J]. *J Am Nephrol*, 2006, 17(11): 2985-91.
- [28] REMUZZI G, PERICO N, MACIA M, et al. The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease [J]. *Kidney Int*, 2005, 68: S57-65.
- [29] PEDERSEN S F, O'DONNELL M E, ANDERSON S E, et al. Physiology and pathophysiology of $\text{Na}^+\text{/H}^+$ exchange and $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransport in the heart, brain, and blood [J]. *Am J Physiol*, 2006, 291(1): R1-25.
- [30] WALL S M, KNEPPER M A, HASSELL K A, et al. Hypotension in NKCC1 null mice: role of the kidneys [J]. *Am J Physiol*, 2006, 290(2): F409-16.
- [31] DING B, FRISINA R D, ZHU X X, et al. Direct control of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransport protein (NKCC1) expression with aldosterone [J]. *Am J Physiol*, 2014, 306(1): C66-75.
- [32] WYNN T A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis [J]. *J Pathol*, 2008, 214(2): 199-210.
- [33] PIERA-VELAZQUEZ S, LI Z D, JIMENEZ S A. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders [J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(3): 1074-80.
- [34] SUN D, LYTLE C, O'DONNELL M E. Astroglial cell-induced expression of Na-K-Cl cotransporter in brain microvascular endothelial cells [J]. *Am J Physiol*, 1995, 269(6): C1506-12.
- [35] KOUMANGOYE R, OMER S, KABEER M H, et al. Novel human NKCC1 mutations cause defects in goblet cells mucus secretion and chronic inflammation [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2020, 9(2): 239-55.