

抑瘤素M在狼疮鼠肾组织中的表达及意义

张 玮¹ 王 辉¹ 李宏博¹ 杜云霞¹ 邢玲玲² 徐 宁¹ 刘青娟^{1*}

(¹河北医科大学病理教研室, 石家庄 050017; ²河北医科大学第二医院肾内科, 石家庄 050000)

摘要 该文探讨了抑瘤素M(oncostatin M, OSM)在狼疮鼠肾组织中的表达及意义。以MRL/MpJ鼠作为正常对照鼠, MRL/lpr鼠随作为狼疮鼠。收集动物血、尿进行生化指标检测; 收集肾组织后免疫组织化学和酶联免疫吸附实验检测OSM的表达情况; qRT-PCR和Western blot分别检测E-钙黏蛋白(E-cadherin)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)及I型胶原(collagen I, Col I)mRNA和蛋白的表达; 实时荧光定量PCR(quantitative Real-time PCR, qRT-PCR)检测纤维黏连蛋白(fibronectin, FN)mRNA的表达。结果发现, 与对照鼠相比, 狼疮鼠肾组织中OSM的表达明显增多, 且其表达与血尿素氮、24 h尿蛋白及 α -SMA、Col I和FN的表达呈正相关, 而与E-cadherin的表达呈负相关。结果表明, OSM在狼疮鼠肾组织中的表达升高, 且其高表达可能与狼疮鼠肾功能减退及肾小管上皮细胞转分化有一定的关系。

关键词 狼疮性肾炎; MRL/lpr小鼠; 抑瘤素M; 肾小管上皮细胞

Expression of Oncostatin M in Kidney of MRL/lpr Mice

Zhang Wei¹, Wang Hui¹, Li Hongbo¹, Du Yunxia¹, Xing Lingling², Xu Ning¹, Liu Qingjuan^{1*}

(¹Department of Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; ²Department of Nephrology, the Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract The aim of this study is to investigate the expression of OSM (oncostatin M) in the renal cortex of MRL/lpr mice. MRL/MpJ mice were designated as the control group and MRL/lpr mice were designated as the lupus group. The expression of OSM was detected by the methods of immunohistochemistry and enzyme linked immunosorbent assay. Western blot and quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) analysis were used to determine the protein and mRNA expression of E-cadherin, α -SMA (α -smooth muscle actin) and Col I (collagen I). qRT-PCR analysis was used to detect the expression of fibronectin (FN) mRNA. The results suggested that the OSM expression increased in lupus mice compared with control mice. And the expression level of OSM is positively correlated with blood urea nitrogen, 24 h urinary protein and the expression level of α -SMA, Col I and FN but is negatively correlated with the expression level of E-cadherin. The results indicated that OSM expression is increased in kidney in lupus mice, which may connected with the renal dysfunction and tubular-epithelial cell transdifferentiation.

Keywords lupus nephritis; MRL/lpr mice; oncostatin M; tubular epithelial cell

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种病因不明的以多器官、多系统损害为特征的自身免疫性疾病, 其中以肾脏损害为主要表现者称为狼疮性肾炎(lupus nephritis, LN), 是SLE致死

收稿日期: 2016-10-19 接受日期: 2017-01-17

教育部高等学校博士学科点专项科研基金(批准号: 20131323120001)和河北省卫生厅重点科技研究计划(批准号: ZD20140034)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0311-86265734, E-mail: liujq246@163.com

Received: October 19, 2016 Accepted: January 17, 2017

This work was supported by the Doctoral Program of the Education Ministry of China (Grant No.2013132320001) and the Department of Health of Hebei Province (Grant No.ZD20140034)

*Corresponding author. Tel: +86-311-86265734, E-mail: liujq246@163.com

网络出版时间: 2017-02-27 15:21:44

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170227.1521.008.html>

致残的主要原因^[1-2]。在SLE肾脏损伤中小管间质损害的发生率高达50%~67%^[3],是LN的独立危险因素且与其预后密切相关^[4]。肾小管上皮细胞转分化为肌成纤维细胞是小管间质损害中的一个重要事件。

LN的发生发展和众多因素有关,其中细胞因子是一个关键因素。研究表明,大量细胞因子参与了LN的免疫炎症反应^[5-6]。抑瘤素M(oncostatin M, OSM)属于白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)细胞因子家族成员,主要由活化的T淋巴细胞和单核巨噬细胞分泌。据报道,OSM有可能是SLE的一种标志因子^[7],并且与各种原因导致的肾脏疾病有关^[8-10]。但上述研究中关于OSM在肾脏疾病尤其在肾小管间质损害中作用存在争议。本研究应用狼疮鼠模型,探讨OSM在狼疮性肾炎肾组织中的表达及其与肾小管上皮细胞转分化和肾功能的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

MRL/lpr鼠购自南京大学模式动物研究所。兔抗OSM抗体及OSM酶联免疫吸附试剂盒购自R&D公司。兔抗E-cadherin、 α -SMA(α -smooth muscle actin)和Col I(collagen I)抗体购自Proteintech公司。PCR引物均由生工生物工程股份有限公司合成。二步法免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 MRL/MpJ鼠作为正常对照组(N),MRL/lpr鼠作为狼疮组(LN)。每组动物6只。每周收集尿液检测尿蛋白含量,分别于出现蛋白尿以及蛋白尿后的4周和8周处死动物并收集血、尿及肾组织标本用于以下检测(我们将不同时间点时收集的小鼠标本分别称为LN1、LN2和LN3)。

1.2.2 免疫组织化学染色 4 μ m肾组织切片,常规脱蜡至水,一抗OSM(1:100)稀释,二抗为生物素化羊抗兔IgG,以PBS代替一抗作为阴性对照,DAB显色,光镜观察阳性信号。

1.2.3 酶联免疫吸附实验 组织匀浆后离心,收集上清液进行分析,具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行,反应结束后测 D_{450} 值。以标准品浓度和对应 D 值做标准曲线,计算出各标本 D 值对应的OSM的浓度。

1.2.4 Western blot检测 取肾皮质组织加入蛋白裂解液提取蛋白,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,-70℃

保存。每个样品取50 μ g总蛋白,10% SDS-PAGE凝胶电泳后电转至PVDF膜,5%脱脂奶粉37℃封闭2 h,再加入一抗(1:500),4℃过夜。ECL化学发光法显色。以 β -actin作为内参照。Western blot条带信号强度应用LabWork 45图像分析软件进行定量分析,测定各条带的吸光度值。

1.2.5 qRT-PCR Trizol法提取总RNA,反转录为cDNA,以cDNA为模板进行扩增。*E-cadherin*引物序列:上游5'-CCC AGA GAC TGG TGC CAT TT-3',下游5'-TCT GTG GCG ATG ATG AGA GC-3'; *α -SMA*引物序列:上游5'-AAT GGC TCT GGG CTC TGT AA-3',下游5'-CTC TTG CTC TGG GCT TCA TC-3';*Col I*引物序列:上游5'-CGA CCT CAA GAT GTG CCA CT-3',下游5'-GCA GTA GAC CTT GAT GGC GT-3';*FN*(fibronectin)引物序列:上游5'-CCC CAA CTG GTT ACC CTT CC-3',下游5'-TGT CCG CCT AAA GCC ATG TT-3'。扩增条件:95℃预变性5 min;94℃变性45 s,55℃退火60 s,72℃延伸60 s,36个循环;72℃延伸10 min。以18S rRNA作为内参照,应用 $\Delta\Delta CT$ 法计算目的基因的相对表达量。

1.3 统计学方法

所得数值用 $\bar{x}\pm s$ 表示,SPSS 13.0进行统计分析,多组数据间的两两比较采用方差分析、两组数据间的相关性用Person相关分析进行显著性检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血、尿生化指标结果

血、尿生化结果显示,与对照鼠相比,狼疮鼠血肌酐(serum creatinine, Scr)水平未见改变,而血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和24 h尿蛋白(24 h urinary protein, 24 h upro)明显升高(表1)。

2.2 肾组织中OSM的表达

免疫组织化学显示,OSM阳性着色主要位于肾小管上皮细胞,与对照鼠相比,狼疮鼠肾小管上皮细胞中的阳性信号明显增强(图1A)。ELISA结果显示,狼疮鼠肾皮质中OSM的表达水平显著高于对照鼠(图1B)。

2.3 表型转化相关蛋白及mRNA的表达

Western blot(图2)和qRT-PCR(图3)结果表明,与对照鼠相比,无论是蛋白还是mRNA,狼疮鼠肾组织中E-cadherin的表达明显减少,而 α -SMA、Col I和FN的表达显著上调。

表1 血肌酐、血尿素氮和24 h尿蛋白水平

Table 1 The levels of serum creatinine, blood urea nitrogen and 24 h urinary protein

分组 Group	血肌酐 Scr	尿素氮 BUN	24 h尿蛋白 24 h Upro
N	48.33±5.49	4.92±1.79	126.17±49.13
LN1	52.17±12.61	11.75±1.39*	3 895.35±719.33*
LN2	52.50±8.78	21.05±2.05*	4 709.77±657.55*
LN3	52.67±8.14	30.32±3.29*	6 101.98±918.31*

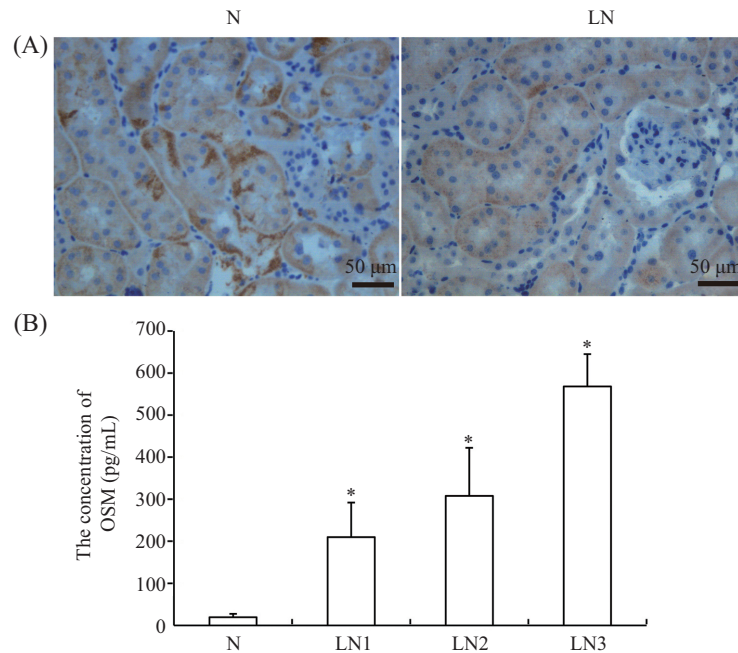
* $P<0.05$, 与对照组比较。* $P<0.05$ vs N group.* $P<0.05$, 与对照组比较。* $P<0.05$ compared with N group.

图1 免疫组织化学(A)和ELISA检测(B)肾组织中OSM的表达

Fig.1 The expression of OSM in renal tissue detected by immunohistochemistry (A) and ELISA (B)

2.4 Western blot和mRNA结果分析

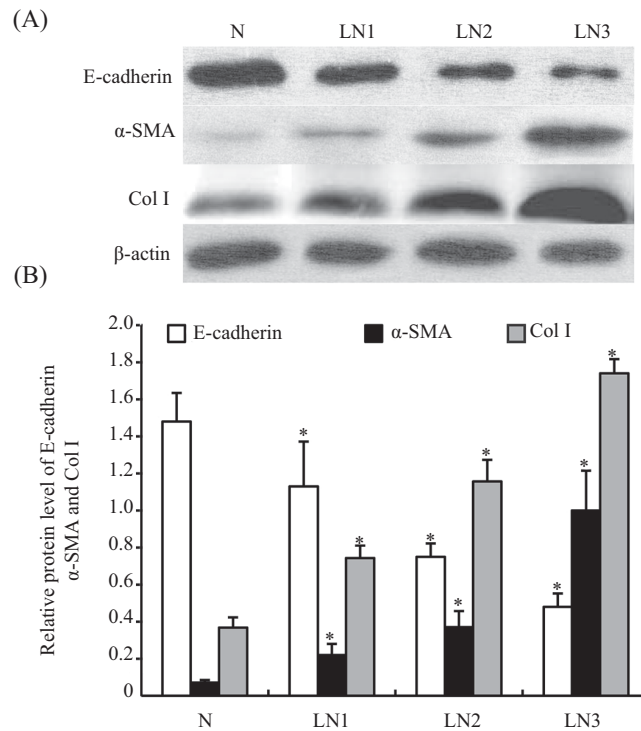
肾组织中OSM蛋白的表达与BUN($r=0.892$)、24 h Upro($r=0.828$)、 α -SMA蛋白($r=0.882$)、Col I蛋白($r=0.898$)、 α -SMA mRNA($r=0.825$)、Col I mRNA($r=0.920$)和FN mRNA($r=0.858$)的表达呈正相关, 而与E-cadherin蛋白($r=-0.852$)和E-cadherin mRNA($r=-0.899$)的表达呈负相关。

3 讨论

应用MRL/lpr狼疮鼠模型发现, OSM在狼疮鼠肾组织中高表达, 且其高表达与血尿素氮和24 h尿蛋白密切相关。此外, 狼疮鼠肾组织中E-cadherin的表达降低而 α -SMA的表达升高, 同时细胞外基质蛋白Col I和FN的表达增高。通过相关分析发现, OSM与E-cadherin的表达呈负相关而与 α -SMA、Col I和

FN的表达呈正相关。上述结果提示, 狼疮鼠肾组织中OSM表达增高, 其高表达或许与肾功能损害及肾小管上皮细胞转分化有关。

LN的肾损害累及肾脏各个部分, 包括肾小球、肾小管、肾间质及肾小血管。其中, 肾小管间质病变不仅是继发于肾小球病变的伴随表现, 也是LN重要的独立参与者, 是影响肾脏病理进程和肾功能损害程度的重要因素。肾小管间质纤维化(tubulointerstitial fibrosis, TIF)是预测LN进展至终末期肾功能衰竭的一个重要形态学特点。TIF主要表现为细胞外基质的异常积聚, 而肌成纤维细胞是产生细胞外基质的主要细胞。正常肾组织中几乎无肌成纤维细胞, 但在病理状态下其数量明显增多。肾小管上皮细胞是疾病状态下肌成纤维细胞的重要来源之一, 即肾小管上皮细胞-肌成纤维细胞转分化(epithelial-

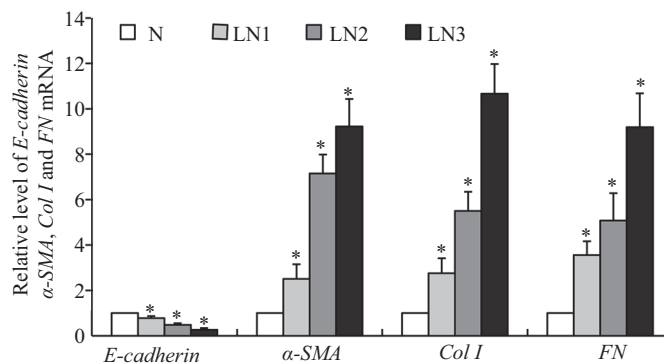


A: E-cadherin、 α -SMA和Col I蛋白表达; B: Western blot结果分析。* $P < 0.05$, 与对照组比较。

A: the expression of E-cadherin, α -SMA and Col I detected by Western blot; B: the Western blot results represented as a bar graph. * $P < 0.05$ compared with N group.

图2 Western blot检测肾组织中E-cadherin、 α -SMA和Col I的表达

Fig.2 The expression of E-cadherin, α -SMA and Col I in renal tissue detected by Western blot



* $P < 0.05$, 与对照组比较。

* $P < 0.05$ compared with N group.

图3 肾组织中E-cadherin、 α -SMA、Col I和FN mRNA的表达

Fig.3 The expression of E-cadherin, α -SMA, Col I and FN mRNA in renal tissue detected by qRT-PCR

myofibroblast transdifferentiation, EMT)^[11-12]。EMT的发生起始于肾小管上皮细胞特性的消失(如E-cadherin表达的下降), 获得间充质细胞特性(如表达 α -SMA), 之后分泌过多的细胞外基质参与TIF。实验结果表明, 不论从mRNA还是蛋白水平, MRL/lpr鼠肾皮质组织中E-cadherin的水平明显降低而 α -SMA的表达水平明显上升, 同时细胞外基质蛋白Col I和FN的表达增多, 提示狼疮鼠肾组织中存在肾小管上皮细胞表型转化现象。

众多因素参与了LN的发生发展, 其中细胞因子是一个关键因素。OSM是1986年发现的一种新的生长调节因子, 属于IL-6细胞因子家族。OSM已被证明具有多种生物学活性, 其中包括参与调节炎症反应。研究发现, OSM既与SLE的活动密切相关, 又参与肾脏疾病的发生发展。但关于其在肾脏疾病中的作用目前尚存在争议。有学者认为, OSM可诱导肾小管上皮细胞转变为肌成纤维细胞, 从而参与肾小管间质纤维化^[9-10]。Elbjeirami等^[8]利用单侧输尿管

梗阻模型鼠的研究发现, OSM的表达随梗阻时间的延长而增多, 且OSM抗体处理可缓解病变。上述结果均说明, OSM促使肾脏病变进展。但Sarközi等^[13-14]的研究发现, OSM可抑制TGF- β 诱导的细胞外基质蛋白的合成, 提示OSM可能是一种肾小管间质纤维化的保护因子, 并由此提出由于局部微环境的不同, OSM具有促纤维化和抗纤维化的双重特性。为进一步探讨OSM在肾脏疾病中的作用, 该实验应用MRL/lpr狼疮鼠模型探讨OSM的表达及意义。结果发现, 狼疮鼠肾组织中OSM的表达增高, 尤其是在肾近端小管上皮细胞, 并且OSM的高表达与肾功能减退及肾小管上皮细胞表型转化均有相关性。结果提示, 在狼疮性鼠肾损害中, OSM是一种致病因子, 其表达促进了肾脏病变的进展和肾功能的下降。

参考文献 (References)

- 1 D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic lupus erythematosus. *Lancet* 2007; 369(9561): 587-96.
- 2 Seshan SV, Jennette JC. Renal disease in systemic lupus erythematosus with emphasis on classification of lupus glomerulonephritis: Advances and implications. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133(2): 233-48.
- 3 Hayakawa S, Nakabayashi K, Karube M, Arimura Y, Soejima A, Yamada A, *et al.* Tubulointerstitial immune complex nephritis in a patient with systemic lupus erythematosus: Role of peritubular capillaritis with immune complex deposits in the pathogenesis of the tubulointerstitial nephritis. *Clin Exp Nephrol* 2006; 10(2): 146-51.
- 4 Yu F, Wu LH, Tan Y, Li LH, Wang CL, Wang WK, *et al.* Tubulointerstitial lesions of patients with lupus nephritis classified by the 2003 International Society of Nephrology and Renal Pathology Society system. *Kid Int* 2010; 77(9): 820-9.
- 5 Aringer M, Smolen JS. Cytokine expression in lupus kidneys. *Lupus* 2005; 14(1): 13-8.
- 6 Gigante A, Gasperini ML, Afeltra A, Barbano B, Margiotta D, Cianci R, *et al.* Cytokines expression in SLE nephritis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011; 15(1): 15-24.
- 7 Robak E, Sysa-Jedrzejowska A, Stepień H, Robak T. Circulating interleukin-6 type cytokines in patients with systemic lupus erythematosus. *Eur Cytokine Netw* 1997; 8(3): 281-6.
- 8 Elbjerrami WM, Truong LD, Tawil A, Wang W, Dawson S, Lan HY, *et al.* Early differential expression of oncostatin M in obstructive nephropathy. *J Interferon Cytokine Res* 2010; 30(7): 513-23.
- 9 Nightingale J, Patel S, Suzuki N, Buxton R, Takagi KI, Suzuki J, *et al.* Oncostatin M, a cytokine released by activated mononuclear cells, induces epithelial cell-myofibroblast transdifferentiation via Jak/Stat pathway activation. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(1): 21-32.
- 10 Pollack V, Sarkozi R, Banki Z, Feifel E, Wehn S, Gstraunthaler G, *et al.* Oncostatin M-induced effects on EMT in human proximal tubular cells: Differential role of ERK signaling. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 293(5): F1714-26.
- 11 Hay ED, Zuk A. Transformations between epithelium and mesenchyme: Normal, pathological, and experimentally induced. *Am J Kidney Dis* 1995; 26(4): 678-90.
- 12 Ng YY, Huang TP, Yang WC, Chen ZP, Yang AH, Mu W, *et al.* Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int* 1998; 54(3): 864-76.
- 13 Sarkozi R, Flucher K, Haller VM, Pirklbauer M, Mayer G, Schramek H. Oncostatin M inhibits TGF-beta1-induced CTGF expression via STAT3 in human proximal tubular cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 424(4): 801-6.
- 14 Sarkozi R, Hauser C, Noppert SJ, Kronbichler A, Pirklbauer M, Haller VM, *et al.* Oncostatin M is a novel inhibitor of TGF-beta1-induced matricellular protein expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 301(5): F1014-25.