文章编号:1000-5404(2011)04-0365-03

论著

# PDIA3在大鼠同种异体移植肾组织中的表达及意义

陈 刚[1],唐 伟[1],唐亚雄[2],何云峰[1],李家兵[1],李 杰[1],吴小侯[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院泌尿外科[1];641000 四川 内江,内江市第一人民医院泌尿外科[2])

**[摘要]** **目的** 探讨蛋白质二硫键异构酶A3(protein disulfide isomerase A3,PDIA3)在大鼠同种异体移植肾组织中的表达及意义。**方法** 实验分2组。实验组(异基因移植组):近交系雄性F344和Lewis大鼠分别作为供体和受体,共8对。对照组(同基因移植组):近交系雄性F344大鼠作为供体和受体,共8对。分别建立原位大鼠肾移植模型。术后7 d获取移植肾组织,分别应用免疫组化、RT-PCR和Western blot等方法检测实验组和对照组移植肾组织中的PDIA3的表达情况。**结果** PDIA3主要表达在细胞质,在实验组移植肾组织中的表达呈阳性或强阳性,而在对照组表达呈弱阳性。实验组移植肾PDIA3的mRNA表达量为(0.821±0.046),对照组移植肾PDIA3的mRNA表达量为(0.187±0.154),2组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。实验组移植肾PDIA3的蛋白表达量为(0.812±0.045),对照组移植肾PDIA3的蛋白表达量为(0.237±0.134),2组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 大鼠同种异基因肾移植急性排斥反应组移植肾组织中的PDIA3的表达明显高于同基因移植对照组。PDIA3可能参与肾移植急性排斥反应的发生、发展过程。

**[关键词]** PDIA3;肾移植;移植物排斥
**[中图法分类号]** R345.5;R617;R692 **[文献标志码]** A

# Expression and significance of protein disulfide isomerase A3 in renal allograft of rats

Chen Gang[1], Tang Wei[1], Tang Yaxiong[2], He Yunfeng[1], Li Jiabing[1], Li Jie[1], Wu Xiaohou[1] ([1]Department of Urology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Urology, First People's Hospital of Neijiang, Neijiang, Sichuan Province, 641000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expressions of protein disulfide isomerase A3 (PDIA3) in renal allograft of rats. **Methods** The rat model of allogene renal transplantation was established in the 2 groups, homogenic transplantation group (F344→F344, 8 pairs) and allogene transplantation group (F344→Lewis, 8 pairs). In 7 d after the transfection, the graft was taken out. The expression of PDIA3 in the kidney was detected by immunohistochemistry, RT-PCR and Western blot analysis. **Results** Immunohistochemistry indicated that the expression of PDIA3 was increased significantly in the allogene transplantation group than in the homogenic transplantation group. Compared with control group, the mRNA expression as well as protein expression of PDIA3 was increased significantly in the allogene transplantation group than in the control ($P<0.01$). **Conclusion** PDIA3 is highly expressed in the allogene transplantation rats than in the homogenic transplantation rats, and may play an important role in acute renal allograft rejection.

**[Key words]** protein disulfide isomerase A3; renal transplantation; acute rejection

Supported by the Science Research Foundation of Chongqing Municipal Health Bureau (2010-2-042) and the Science Research Foundation of Chongqing Medical University (XBYB2008001). Corresponding author: Wu Xiaohou, E-mail: chengang127@163.com

肾移植已成为目前治疗各种终末期肾脏疾病的最有效方法。急性排斥反应是肾移植术后的主要并发症,也是导致慢性排斥反应和移植物失功的最重要的因素[1]。目前肾移植术后免疫排斥反应确切的发病机制尚不完全清楚。PDIA3是蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide isomerase,PDI)家族成员之一,既是一种酶,又是一种多功能分子伴侣。近年的研究[2]发现,PDIA3不只在内质网中发挥作用,也存在于细胞的表面,是一种多功能的蛋白质。既往研究证实PDI与免疫和损伤应激关系较为密切。肾移植急性排斥反应的发生、发展过程是否有PDIA3的参与及其作用如何尚有待研究。本实验通过建立大鼠同种异体肾移植模型,采用免疫组化、半定量RT-PCR和Western blot等方法分析检测大鼠同种异基因肾移植急性排斥反应组移植肾组织中的PDIA3的表达,探讨PDIA3肾移植急性排斥反应的发生、发展过程中可能发挥的作用。

**[基金项目]** 重庆市卫生局科研基金(2010-2-042);重庆医科大学校级课题(XBYB2008001)
**[通信作者]** 吴小侯,E-mail:chengang127@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 大鼠同种异体肾移植模型的建立

实验分2组。所用大鼠为近交系雄性Lewis和F344大鼠，8～10周龄，体质量约180～200 g。购于北京维通利华实验动物技术有限公司。清洁饲养，术前禁食12 h。实验组（异基因移植组）：近交系雄性F344和Lewis大鼠分别作为供体和受体，共8对。对照组（同基因移植组）：近交系雄性F344大鼠作为供体和受体，共8对。手术采用腹腔注射氯胺酮（150mg/kg）麻醉，行供体的下腔静脉与受体的肾静脉行端端吻合，再分别将吻合线打结，供体腹主动脉与受体腹主动脉行端侧吻合，进行左肾原位异体肾移植。静脉吻合参照李家兵等[3]的方法并有所改进，取肾时供体下腔静脉内留置F3或F4支架管（用硬膜外麻醉导管自制），吻合前将支架管另一端插入受体左肾静脉，间断缝合6～8针，暂不打结，拔去支架管后打结。手术均在无菌条件下进行。受体从手术当天开始，腹腔每天注射青霉素20万U连续3 d。分组喂养，观察肾移植大鼠的食欲、活动、毛发光洁度及有无不良反应等情况。

### 1.2 样本获取及组织切片分析

术后1周获取移植肾标本。部分标本10%福尔马林、4 ℃固定过夜，石蜡包埋，切片，HE染色，行组织形态学观察，病理诊断标准采用Banff97分级诊断标准。部分标本－80 ℃保存备用。同时每只受体鼠心脏采血约6～10 ml，血液标本4 000 r/min离心5 min后取血清，0.5 ml送检肌酐，余－20 ℃冻存。另术前抽取未手术受体鼠心脏采血约6～10 ml，血液标本4 000 r/min离心5 min后取血清，0.5 ml送检肌酐，做对照。

### 1.3 免疫组化染色

以抗PDIA3单抗为一抗，以SABC法对切片染色，DAB显色（具体按试剂盒说明书进行）。由2位有经验的病理科医生对免疫组化染色的结果进行评价，阳性显色者细胞质内有棕黄色颗粒。根据是否染色及染色的强度可半定量分为阴性、弱阳性、阳性、强阳性。

### 1.4 移植肾PDIA3的mRNA检测

参照GenBank中大鼠PDIA3基因序列，应用Primer 5.0软件设计引物。PDIA3上游引物为5′-CTCCTCGCCTCCGCCTCAGA-3′，下游引物为5′-AGCCCACCACCGAGGCATCT-3′，扩增片段为418 bp，以β-actin作为内参照，β-actin上游引物5′-GTGGACATCCGCAAAGAC-3′，下游引物5′-AA-AGGGTGTAACGCAATCAA-3′，扩增片段为302 bp。获取实验组和对照组移植肾组织各一块，分别用RNA提取试剂盒提取总RNA（按说明书进行）。RT-PCR采用两步法，37 ℃逆转录30 min；94 ℃ 10 min，94 ℃变性1 min、57 ℃退火40 s、72 ℃延伸50 s，进行35个循环后，72 ℃进行10 min延伸反应。取PCR产物5 μl加2 μl溴酚蓝上样到15 g/L琼脂糖凝胶电泳。成像分析系统测定光密度。以各实验组电泳条带光密度值与对应内参光密度值之比表示PDIA3相对表达量。

### 1.5 移植肾PDIA3的Western blot分析

取同组移植肾组织各1块，裂解、离心，定量。提取含30 μg蛋白的样品进行SDS-PAGE凝胶电泳。然后转印至硝酸纤维膜，浸入封闭液中（37 ℃，2 h）。加入一抗，摇床上37 ℃孵育1 h；以PBST洗膜3次，每次10～15 min；加入辣根过氧化物酶标记兔抗鼠IgG（二抗），摇床上37 ℃孵育30 min；室温杂交2 h，以PBST洗膜3次，加入新鲜配制的底物反应液，轻摇至显色后，去离子水漂洗终止显色。成像后由软件系统计算PDIA3和β-actin的光密度值，二者比值作为该样品PDIA3蛋白的表达量。

### 1.6 统计学分析

数据以$\bar{x} \pm s$表示，采用SPSS 10.0统计学软件，组间比较采用样本均数$t$检验。

## 2 结果

### 2.1 肾移植术后血清肌酐的变化

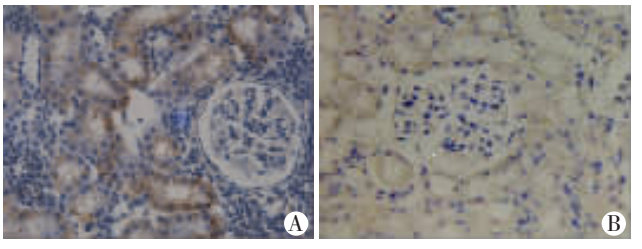
术前血清肌酐水平实验组和对照组比较差异无统计学意义[（47.12±4.33）μmol/L *vs*（48.23±4.14）μmol/L，$P>0.05$]。实验组术后第7天血清肌酐水平高于对照组，2组比较差异有统计学意义[（541.4±47.19）μmol/L *vs*（42.67±3.95）μmol/L，$P<0.01$]。

### 2.2 移植肾组织学检查

实验组在肾移植术后第7天表现出明显细胞免疫性损伤改变，光镜下主要表现为肾小管炎和肾小管间质肾炎和血管内、外膜炎，即肾小管间质弥漫状单核细胞和淋巴细胞浸润，淋巴细胞侵入肾小管上皮细胞，同时可见肾小球内炎症细胞浸润，并有较多单核细胞浸润小动脉的内膜、外膜，伴局部出血及血管壁纤维素样坏死。肾小球肾小管结构有不同程度破坏。对照组肾间质轻度水肿，肾小球肾小管结构完整，未见明显炎性细胞浸润，未见出血或坏死。

### 2.3 移植肾PDIA3组织定位

PDIA3主要表达在细胞质，呈黄色颗粒状，其在实验组移植肾组织中的表达呈阳性或强阳性（图1A），而在对照组表达呈弱阳性（图1B）。

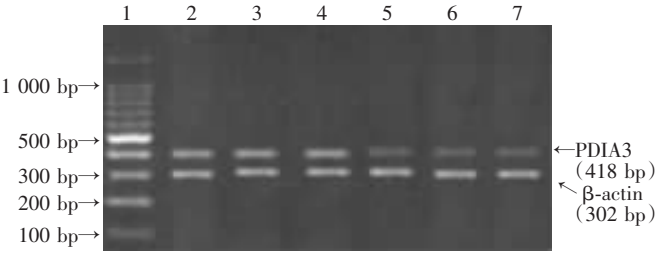



A：实验组；B：对照组

**图1 PDIA3在2组术后第7天移植肾组织中的表达**（SABC×400）

### 2.4 移植肾PDIA3的mRNA检测

实验组移植肾PDIA3的mRNA表达水平明显高于对照组[（0.821±0.046）*vs*（0.187±0.154），$P<0.01$]。见图2。

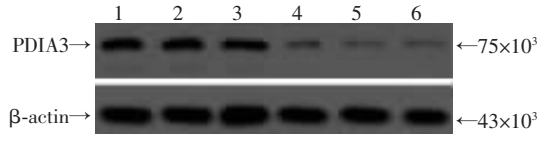



1：DNA标准；2～4：实验组；5～7：对照组

**图2 RT-PCR检测PDIA3 mRNA在2组移植肾组织中的表达**

### 2.5 移植肾 PDIA3 的 Western blot 分析

实验组移植肾 PDIA3 的蛋白表达水平明显高于对照组[(0.812 ± 0.045) *vs* (0.237 ± 0.134), $P < 0.05$]。见图 3。




1～3：实验组；4～6：对照组

**图 3 Western blot 检测 2 组移植肾组织中 PDIA3 蛋白的表达**

## 3 讨论

肾移植已成为治疗各种终末期肾脏疾病最有效方法。但是排斥反应仍然是临床面临的一个主要问题，严重影响着移植肾长期的存活。目前肾移植排斥反应机制尚不完全清楚。PDIA3 又名 ER60、ERp57、GRp58，是 PDI 家族成员之一，也是一种多功能分子伴侣。PDI 是目前发现蛋白质折叠活性最高的蛋白质[4]。在蛋白质折叠早期，PDI 以分子伴侣形式出现，防止已部分折叠的肽链由于错误相互作用导致聚合；当多肽链已折叠到较高的程度，PDI 则表现异构酶的功能，促二硫键的异构[2,5]。PDI 又是热休克蛋白(heat shock protein, HSP)之一。

本实验通过 Western blot 分析发现，与同基因移植组相比，PDIA3 在大鼠异基因移植组中蛋白表达水平明显增强，RT-PCR 分析也从 mRNA 水平证实了这一点，而且移植肾组织分布定位分析也得到了一致的结果。本实验结果提示 PDIA3 的高表达与肾移植急性排斥反应发生、发展可能有关，PDIA3 蛋白的高表达可能提示移植肾急性排斥反应的发生，即 PDIA3 可能是一种肾移植急性排斥反应的生物标记物。为何在肾移植急性排斥反应发生时 PDIA3 表达会明显增加？是否 PDIA3 参与了肾移植急性排斥反应的发生、发展？目前少见相关报道。结合本实验结果和 PDIA3 的功能，我们分析肾移植急性排斥反应发生时 PDIA3 高表达的机制可能是：①本实验发现 PDIA3 在异基因移植组蛋白表达水平明显增强，这可能与 PDIA3 直接作用于 MHC-Ⅰ分子，参与抗原提呈有关。ERp57 在抗原提呈过程中与 MHC-Ⅰ和 tapasin 形成复合物，对于正确调节 MHC-Ⅰ的氧化还原状态有重要作用[6-7]。PDIA3 在保持 MHC-I 分子稳定性方面起重要作用[8]。HSP 是引起移植排斥反应的一种潜在抗原决定簇[9]。②ERp57 具有免疫原性，是一种通过调控肌钙网蛋白表达来调控肿瘤细胞免疫原性的关键蛋白[10-11]。本研究发现，PDIA3 在肾移植急性排斥反应发生时蛋白表达水平明显升高，我们推测 PDIA3 因为具有免疫原性，在异基因肾移植时参与了排斥反应发生。③急性排斥反应发生时，各种炎性细胞浸润，释放多种致炎因子，加之缺血、缺氧等多种损害因素的作用导致热休克反应发生，启动热休克基因，进而合成包括 PDIA3 在内的多种热休克蛋白。反过来说，肾移植术后 PDIA3 的高表达可能提示急性排斥反应的发生。④排斥反应发生时会导致分泌蛋白过量或未折叠和错误折叠蛋白的累积，而 PDI 会因此而被诱导表达[12]，以维持细胞必需的蛋白质构象，保护其生命活动。因此，本实验发现在异基因移植组 PDIA3 蛋白表达明显增加，这可能提示蛋白质构象发生了异常，即急性排斥反应的发生。

综上，结合 PDIA3 的已知功能，我们认为急性排斥反应发生后移植肾组织细胞信号传导机制发生变化，PDIA3 表达水平随之发生改变，PDIA3 可能通过多种途径参与肾移植急性排斥反应的发生、发展，是一种可能的生物标记物。但 PDIA3 如何参与肾移植急性排斥反应的发生、发展，还值得进一步研究。

## 参考文献：

[1] Sijpkens Y W, Doxiadis I I, Mallat M J, *et al*. Early versus late acute rejection episodes in renal transplantation[J]. Transplantation, 2003, 75(2): 204-208.

[2] Di-Jeso B, Park Y N, Ulianich L, *et al*. Mixed-disulfide folding intermediates between thyroglobulin and endoplasmic reticulum resident oxidoreductases ERp57 and protein disulfide isomerase[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(22): 9793-9805.

[3] 李家兵，何云锋，夏康，等. 外周血 CXCL9 和 CXCR3 在大鼠肾移植急性排斥反应的表达及意义[J]. 第三军医大学学报，2009，31(9)：828-830.

[4] Frickel E M, Frei P, Bouvier M, *et al*. ERp57 is a multifunctional thiol-disulfide oxidoreductase [J]. J Biol Chem, 2004, 279(18): 18277-18287.

[5] 王孟春，郭静波，刘明华，等. 蛋白质二硫键异构酶在幽门螺杆菌感染者胃黏膜中的表达及意义[J]. 世界华人消化杂志，2006，14(29)：2880-2882.

[6] Santos S G, Campbell E C, Lynch S, *et al*. Major histocompatibility complex class I-ERp57-tapasin interactions within the peptide-loading complex[J]. J Biol Chem, 2007, 282(24): 17587-17593.

[7] Farmery M R, Allen S, Allen A J, *et al*. The role of ERp57 in disulfide bond formation during the assembly of major histocompatibility complex class I in a synchronized semipermeabilized cell translation system[J]. J Biol Chem, 2000, 275(20): 14933-14938.

[8] Stepensky D, Bangia N, Cresswell P. Aggregate formation by ERp57-deficient MHC class I peptide-loading complexes[J]. Traffic, 2007, 8(11): 1530-1542.

[9] 贾雄飞，贺伟峰，罗高兴，等. 肾移植急性排斥反应早期诊断尿液蛋白质组学研究[J]. 第三军医大学学报，2008，30(24)：2267-2271.

[10] Obeid M. ERP57 membrane translocation dictates the immunogenicity of tumor cell death by controlling the membrane translocation of calreticulin[J]. J Immunol, 2008, 181(4): 2533-2543.

[11] Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, *et al*. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death[J]. Nat Med, 2007, 13(1): 54-61.

[12] Lodish H F, Kong N, Wikstrom L. Calcium is required for folding of newly made subunits of the asialoglycoprotein receptor within the endoplasmic reticulum[J]. J Biol Chem, 1992, 267(18): 12753-12760.

（收稿 2010-09-28 修回 2010-11-08）

（编辑　王　红）