论著

文章编号:1000-5404(2012)12-1158-04

Trps1在大鼠肾脏缺血再灌注损伤修复过程中的表达及意义

黄 坤,张建国,李开龙,林利容,詹 俊,杨聚荣,何娅妮 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所肾内科)

[摘要] **目的** 观察大鼠缺血再灌注损伤肾组织Trps1的表达变化及其与肾组织病变的关系,探讨Trps1在肾脏修复再生中的作用。**方法** 42只雄性SD大鼠分为假手术组、缺血再灌注组。经腹正中切口分离大鼠双侧肾蒂,用无损动脉夹夹闭60 min后恢复灌注,假手术组仅暴露肾蒂不夹闭。于再灌注后1、3、7、14、21 d取大鼠动脉血及肾组织标本,采用自动生化分析仪检测大鼠血肌酐、尿素氮水平,PAS染色检测肾组织损伤情况,免疫组化和Western blot检测肾组织Tprs1表达变化。**结果** 假手术组大鼠血肌酐和尿素氮分别为(30.12±2.95)μmol/L、(5.89±0.67)mmol/L。与假手术组相比,大鼠肾脏缺血再灌注后1、3、7 d血肌酐[(319.25±25.49)、(338.20±22.70)、(216.07±18.54)μmol/L]及尿素氮[(33.53±8.06)、(78.05±7.13)、(42.61±11.87)mmol/L]显著升高($P<0.05$),14、21 d血肌酐[(33.33±6.46)、(32.06±8.74)μmol/L]及尿素氮[(6.02±1.27)、(6.93±3.28)mmol/L]与假手术组相比无显著差异($P>0.05$)。PAS染色显示肾组织在再灌注1 d时即出现损伤,3 d时损伤最重,7 d时损伤开始修复,至第21天修复完全。免疫组化及Western blot显示,假手术组Trps1主要在皮质肾小管上皮细胞表达,缺血再灌注后1 d肾组织Trps1表达显著下降($P<0.05$),3 d仅见微弱表达($P<0.05$),7、14 d表达开始上升,但仍有显著差异($P<0.05$),21 d与假手术组水平无显著差异($P>0.05$)。相关性分析显示Trps1表达变化与肾小管急性损伤评分呈负相关($r=-0.81$,$P<0.05$)。**结论** Trps1在AKI肾脏损伤修复期表达上调,与肾组织损伤指标呈负相关,提示其可能具有促进肾脏修复再生的作用。

[关键词] 急性肾损伤;缺血再灌注;Trps1;修复

[中图法分类号] R329.26;R364.12;R692 [文献标志码] A

Expression and significance of Trps1 in rat kidney repair after ischemia/reperfusion injury

Huang Kun, Zhang Jianguo, Li Kailong, Lin Lirong, Zhan Jun, Yang Jurong, He Yani (Department of Nephrology Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To study Trps1 expression changes in rat kidney after ischemia/reperfusion (I/R) injury and its relationship with renal pathological changes so as to explore the role of Trps1 in renal repair and regeneration. **Methods** Forty-two male SD rats were divided to a sham operation group and an I/R group. Kidney I/R rat model was established by clipping bilateral renal pedicles by artery clamps for 60 min after isolating them from surrounding tissues. On days 1, 3, 7, 14 and 21 after kidney I/R, SCr and BUN were detected. Renal injury was observed under a light microscope with PAS staining, and Trps1 was tested by immunohistochemistry and Western blotting. **Results** The SCr and BUN levels in the sham operation group were (30.12±2.95) μmol/L and (5.89±0.67) mmol/L. The levels of SCr [(319.25±25.49), (338.20±22.70), and (216.07±18.54) μmol/L] and BUN [(33.53±8.06), (78.05±7.13), and (42.61±11.87) mmol/L] on days 1, 3, and 7 were significantly higher in the I/R group than in the sham operation group ($P<0.05$). No significant difference was observed in SCr [(33.33±6.46) and (32.06±8.74) μmol/L] and BUN [(6.02±1.27) and (6.93±3.28) mmol/L] levels between the two groups on days 14 and 21 ($P<0.05$). PAS staining results showed that kidney injury started on day 1 and was the severest on day 3, while kidney repair started on day 7 and completed on day 21. Immunohistochemistry results showed that Trps1 was mainly expressed in kidney tubules of cortex in the sham operation group. In the I/R group, Trps1 expression in kidney tissue decreased significantly on day 1 after I/R ($P<0.05$), was weak on day 3 ($P<$

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2011CB944000)

[通信作者] 何娅妮,电话:(023)68757871,E-mail: heynmail@yahoo.com

0.05), started to increase on days 7 and 14 but still had significant difference ($P<0.05$), and returned to the same level as the sham operation group on day 21 ($P>0.05$). The expression of Trps1 was negatively correlated with kidney tubule injury ($P<0.05$). **Conclusion** Trps1 shows upregulated expression during kidney repair after acute kidney injury, and is negatively correlated with injury degree. Trps1 may play a positive role in kidney repair.

[**Key words**] acute kidney injury; ischemia/reperfusion; Trps1; repair

Supported by the National Basic Research Program of China (973 Program, 2011CB944000). Corresponding author: He Yani, Tel: 86-23-68757871, E-mail: heynmail@yahoo.com

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是严重创伤、挤压综合症以及临床上各种疾病所导致的急危重症,目前尚无针对AKI特异性的治疗措施。在存活的患者中,每年仍有12.7%的患者由于肾组织结构和功能不能完全修复,最终发展为慢性肾脏疾病(chronic kidney disease, CKD),甚至终身依赖肾脏替代治疗[1]。因此,研究肾脏损伤后修复的分子机制,对于改善AKI患者预后,提高患者的存活率具有重要意义。

目前研究认为AKI后肾小管上皮细胞的修复过程是胚胎后肾发育过程的再现[2]。Trps1是胚胎后肾间充质细胞向上皮细胞分化的重要调控因子,但其在急性肾损伤修复中的作用目前尚不清楚。本研究通过观察大鼠肾脏缺血再灌注损伤Trps1的表达变化与肾脏损伤修复指标的关系,探讨Trps1在AKI损伤修复中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 试剂

Trps1抗体(Santa Cruz, sc-124310);GAPDH抗体(碧云天, AG019);山羊超敏二步法免疫组化检测试剂盒(碧云天, PV-9003);0.01 mol/L枸橼酸钠、0.01 mol/L PBS缓冲液(中杉金桥);辣根过氧化物酶标记驴抗羊IgG抗体(碧云天, A0181);辣根过氧化物酶标记驴抗小鼠IgG抗体(Santa Cruz, sc-2318);戊巴比妥钠(重庆试剂总厂)。

1.2 动物模型制备

清洁级雄性SD大鼠42只,鼠龄28 d,体质量180~200 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。实验动物饲养于温室(20~28 ℃)、自然光照周期环境中,术前自由饮水和进食。动物按随机数字表法分为假手术组($n=7$)、缺血再灌注(I/R)组($n=35$,分为1、3、7、14、21 d 5个时相点,每个时相点7只)。根据文献[3]制作肾缺血再灌注模型。根据分组情况,假手术组打开腹腔找到肾蒂但不夹闭;I/R组夹闭肾蒂60 min后,去除动脉夹恢复血流灌注。分层缝合关闭腹腔后将大鼠置于常规环境饲养,自由饮食,并密切观察大鼠生命体征。

1.3 肾功能检测

经大鼠腹主动脉采血2 ml,3 000 r/min离心5min,留取血清,德国Beckman公司全自动生化分析仪检测大鼠血清肌酐、尿素氮水平。

1.4 肾脏病理学观察

肾组织经10%福尔马林固定12 h后,常规石蜡包埋,PAS染色观察肾脏病理变化。根据文献[4]以坏死上皮细胞或坏死碎片与小管的百分比代表肾小管损伤情况,评分标准为:0分,无损伤;1分,<10%;2分,10%~25%;3分,26%~75%;4分,>75%。每张切片至少观察10个连续视野,双盲条件下由实验者和病理医师观察病理变化。取其平均值作为衡量肾小管损伤的指标。

1.5 免疫组化检测

使用山羊超敏二步法免疫组化检测试剂盒进行Trps1染色。脱蜡、水化组织切片;二步法免疫组化染色按照试剂盒说明书进行,应用DAB溶液显色。自来水充分冲洗、复染、脱水、透明、封片。对肾小管皮髓区域Trps1的免疫组化染色情况进行评分,评分方法为阳性着色细胞计数法。在光镜下,计数阳性着色细胞,然后进行组间比较。每张切片至少观察10个连续视野,双盲条件下由实验者和病理医师计数。取其平均值作为衡量肾小管Trps1表达情况的指标。

1.6 统计学方法

应用SPSS 13.0统计软件,计量资料数据以$\bar{x}\pm s$表示,组间比较行独立样本t检验,相关性分析行Pearson法。

2 结果

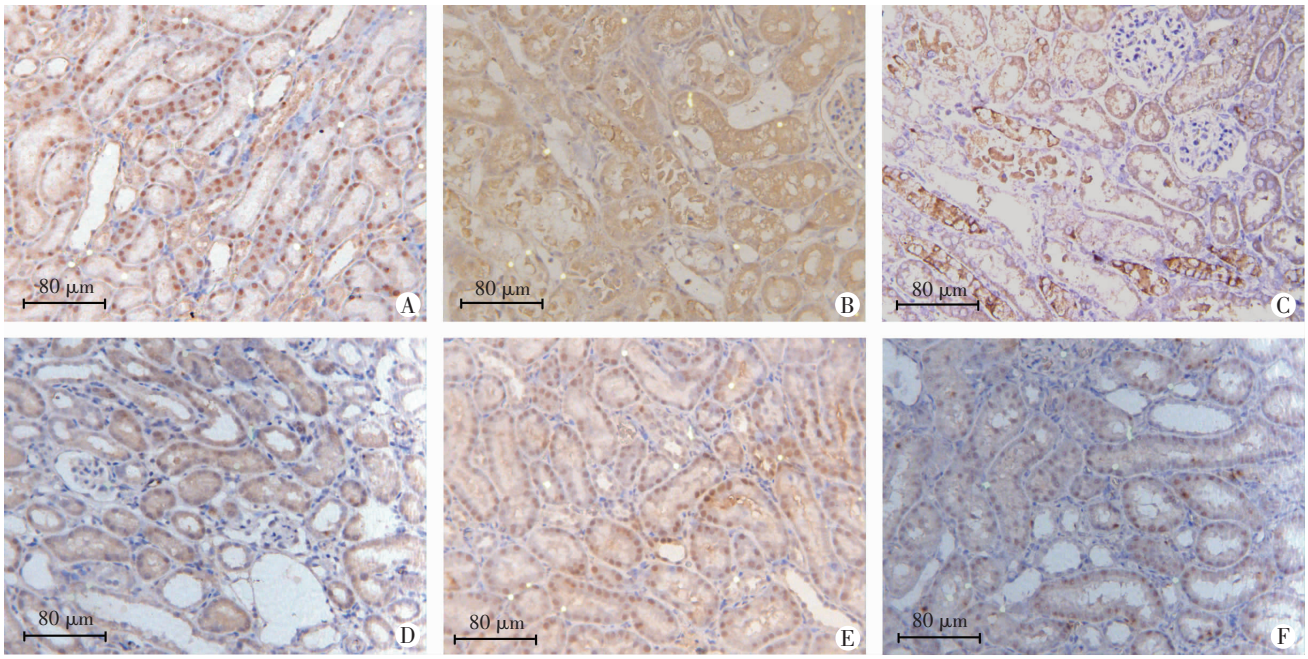
2.1 肾功能变化

与假手术组比较,肾脏缺血再灌注1 d后大鼠血肌酐(SCr)水平升高10.60倍($P<0.05$),尿素氮(BUN)水平升高5.69倍($P<0.05$),第3天达峰值($P<0.05$),第7天时肾功能开始恢复,至14 d后逐渐降至正常水平(表1)。

表1 各组大鼠血肌酐、尿素氮水平比较 ($n=7, \bar{x}\pm s$)

组别	血肌酐(μmol/L)	尿素氮(mmol/L)
假手术组	30.12±2.95	5.89±0.67
I/R组		
1 d	319.25±25.49[a]	33.53±8.06[a]
3 d	338.20±22.70[a]	78.05±7.13[a]
7 d	216.07±18.54[a]	42.61±11.87[a]
14 d	33.33±6.46	6.02±1.27
21 d	32.06±8.74	6.93±3.28

a: $P<0.05$, 与假手术组比较



A:假手术组;B:I/R 组 1 d;C:I/R 组 3 d;D:I/R 组 7 d;E:I/R 组 14 d;F:I/R 组 21 d

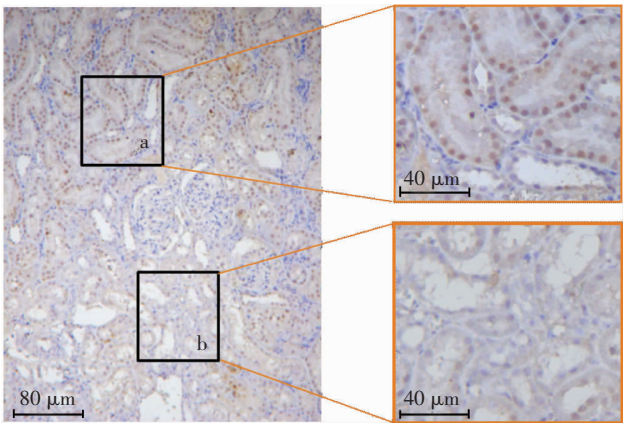
图 1　免疫组化检测各组大鼠肾组织 Trps1 表达（二步法）

2.2　肾脏病理学改变

PAS 染色见假手术组肾小管上皮细胞形态规则,细胞连接紧密,刷状缘完整。I/R 组大鼠再灌注后第 1 天肾小管上皮细胞排列紊乱,可见肾小管上皮细胞脱落、部分基底膜裸露,管腔内可见脱落细胞和细胞碎片。病变以小管细胞脱落和管型为主,以皮髓交界处最重。第 3 天时可见明显的肾小管上皮细胞脱落、崩解,肾间质水肿、小管扩张及基底膜裸露、断裂,出现大量管型。第 7 天时开始出现新生肾小管细胞。第 14 天时,新生肾小管细胞明显增多,仅有少部分肾小管基底膜仍裸露。第 21 天时,大部分肾小管已修复完全,但部分小管出现细胞呈扁平状,管腔扩张等慢性化倾向。以坏死上皮细胞或坏死碎片与小管的百分比对肾小管损伤情况进行评分,结果显示,与假手术组(0 分)相比, I/R 组大鼠肾小管损伤评分明显升高[1 d(3.5 ± 0.3)、3 d(4.0 ± 0.2)、7 d(3.0 ± 0.2)、14 d(2.0 ± 0.3)、21 d(1.0 ± 0.3),$P<0.05$]。

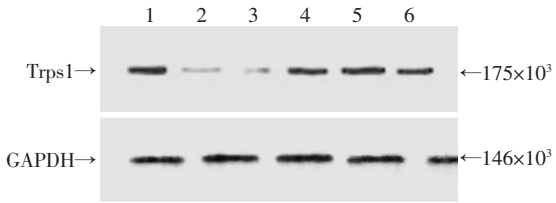
2.3　肾脏 Trps1 表达

假手术组 Trps1 主要在皮质肾小管上皮细胞表达,阳性细胞计数为(339 ± 25),富集在细胞核中。再灌注第 1 天肾小管上皮细胞 Trps1 的表达明显下降($P<0.05$),阳性细胞计数为(83 ± 13);第 3 天 Trps1 的表达进一步减少,阳性细胞计数为(20 ± 4),且弥散在细胞质表达;第 7 天 Trps1 的表达开始增多,阳性细胞计数为(98 ± 9),在核内富集;第 14 天 Trps1 的表达进一步增多($P<0.05$),阳性细胞计数为(246 ± 20),至第 21 天 Trps1 的表达与假手术组相比无明显差异($P>0.05$),阳性细胞计数为(326 ± 34)(图 1、2)。在缺血再灌注组肾组织病理切片中可见,Trps1 表达量较高的部位,肾组织修复良好;在 Trps1 表达受抑制的部位,肾组织的修复亦不佳(图 3)。



a:Trps1 表达较高的部位;b:Trps1 表达较低的部位　右图为左图的放大

图 2　免疫组化检测缺血再灌注后第 14 天肾组织 Trps1 表达（二步法）



1:假手术组;2:I/R 组 1 d;3:I/R 组 3 d;4: I/R 组 7 d;5: I/R 组 14 d;6: I/R 组 21 d

图 3　Western blot 检测各组大鼠肾组织 Trps1 表达

2.4　Trps1 表达与肾小管急性损伤评分的相关分析

Pearson 相关分析显示,缺血再灌注损伤肾组织 Trps1 表达与肾小管急性评分呈显著负相关($r=-0.81$, $P<0.05$)。

3 讨论

肾小管上皮细胞对缺血缺氧、中毒、脓毒血症等损伤因素非常敏感,是AKI时最容易受到损害因素攻击的靶细胞[5]。在损伤情况下,肾小管上皮细胞首先受累发生去分化,细胞骨架的完整性和极性破坏,肾小管上皮细胞标志消失,出现间充质细胞的表型;损伤因素去除后,在各种修复机制的作用下肾小管上皮细胞再生修复,肾小管结构重建,肾脏功能恢复[6]。

目前对于修复机制尚未完全阐明。有学者认为[7],干细胞(肾外干细胞及肾固有干细胞等)在修复过程中发挥了重要作用。但是随后有研究表明[8],肾脏修复时新生的肾小管上皮细胞(RTEC)仅有11%由干细胞分化而来,其余则由自身的RTEC增殖而来。同时文献[9]报道,肾脏自身RTEC在受损后会丢失上皮细胞标志E-cadherin、α-Catenin等,出现间充质细胞标志Vimentin、α-SMA等,发生去分化,这些去分化的细胞开始大量增殖、迁移并再分化为新生的RTEC,在再分化的过程中,间充质细胞标志丢失,而上皮细胞表示则再次出现。该修复过程类似于胚肾间充质细胞向肾小管上皮细胞分化的发育过程,同时,一些在胚胎后肾发育中起重要调控作用的因子(如NCAM1、Lim-1、Pax2、Wnts、FoxC2)[2,10-12]也表达升高。在体外实验[12]中胚肾发育因子(wnt7b、FoxC2)也能部分促进RTEC损伤的修复。因此目前新的研究观点认为AKI修复过程是胚胎肾脏发育的重现。本研究即从胚胎肾脏发育的角度出发,观察在胚肾发育过程中起关键作用的因子Trps1来研究其对AKI修复过程中的影响,为阐明AKI的修复机制寻找新的靶点。

Trps1属于非典型的GATA转录因子家族成员,在胚胎后肾间充质细胞向肾小囊体分化中发挥着关键的调控作用。Trps1$^{-/-}$新生鼠肾脏大小发育正常,但后肾间充质细胞分化停滞,分化标志物Pax2和Wt1表达缺陷,特征性的表现为肾小管数量显著减少,肾皮质间质明显增宽[13]。Gai等[14]研究发现,Trps1能够通过下调Arkadia对Smad7的降解作用,抑制单侧输尿管梗阻(UUO)模型肾小管上皮细胞向间充质细胞的转分化(EMT)。在肺脏也发现,Trps1缺陷能够导致远端呼吸上皮细胞分化受损[15]。新近在肿瘤细胞转分化的研究中已证实,Trps1能够通过在转录水平抑制ZEB2基因的表达,抑制上皮细胞向间充质细胞转分化(EMT)[16]。目前对于Trps1在AKI损伤修复过程中的作用尚少见报道。本研究发现,在缺血再灌注肾组织损伤期Trps1表达显著下调,而在病变修复期Trps1表达上调,其表达变化与肾小管损伤程度呈负相关。在同病变肾组织也表现为Trps1高表达的部位肾组织修复良好。这些都提示Trps1可能在促进肾脏修复中起到了重要的调控作用,为下一步阐明Trps1在AKI修复过程中的作用研究奠定了基础。

参考文献:

[1] Coca S G, Yusuf B, Shlipak M G, *et al*. Long-term risk of mortality and other adverse outcomes after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis[J]. Am J Kidney Dis, 2009, 53(6): 961-973.

[2] Villanueva S, Cespedes C, Vio C P. Ischemic acute renal failure induces the expression of a wide range of nephrogenic proteins[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006, 290(4): R861-R870.

[3] Li M, Khan A M, Maderdrut J L, *et al*. The effect of PACAP38 on MyD88-mediated signal transduction in ischemia-/hypoxia-induced acute kidney injury[J]. Am J Nephrol, 2010, 32(6): 522-532.

[4] Sharfuddin A A, Sandoval R M, Berg D T, *et al*. Soluble thrombomodulin protects ischemic kidneys[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(3): 524-534.

[5] Guo J K, Cantley L G. Cellular maintenance and repair of the kidney[J]. Annu Rev Physiol, 2010, 72: 357-376.

[6] Bonventre J V. Pathophysiology of AKI: injury and normal and abnormal repair[J]. Contrib Nephrol, 2010, 165: 9-17.

[7] Kitamura S, Yamasaki Y, Kinomura M, *et al*. Establishment and characterization of renal progenitor like cells from S3 segment of nephron in rat adult kidney[J]. FASEB J, 2005, 19(13): 1789-1797.

[8] Lin F, Moran A, Igarashi P. Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney[J]. J Clin Invest, 2005, 115(7): 1756-1764.

[9] Benigni A, Morigi M, Remuzzi G. Kidney regeneration[J]. Lancet, 2010, 375(9722): 1310-1317.

[10] Lin S L, Li B, Rao S, *et al*. Macrophage Wnt7b is critical for kidney repair and regeneration[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(9): 4194-4199.

[11] Lindoso R S, Verdoorn K S, Einicker-Lamas M. Renal recovery after injury: the role of Pax-2[J]. Nephrol Dial Transplant, 2009, 24(9): 2628-2633.

[12] Hader C, Marlier A, Cantley L. Mesenchymal-epithelial transition in epithelial response to injury: the role of Foxc2[J]. Oncogene, 2010, 29(7): 1031-1040.

[13] Gai Z, Zhou G, Gui T, *et al*. Trps1 haploinsufficiency promotes renal fibrosis by increasing Arkadia expression[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(9): 1468-1476.

[14] Gai Z, Zhou G, Itoh S, *et al*. Trps1 functions downstream of Bmp7 in kidney development[J]. J Am Soc Nephrol 2009, 20(11): 2403-2411.

[15] Suemoto H, Muragaki Y, Nishioka K, *et al*. Trps1 regulates proliferation and apoptosis of chondrocytes through Stat3 signaling[J]. Dev Biol, 2007, 312(2): 572-581.

[16] Stinson S, Lackner M R, Adai A T, *et al*. miR-221/222 targeting of trichorhinophalangeal 1 (TRPS1) promotes epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer[J]. Sci Signal, 2011, 4(186): pt5.

(**收稿**:2012-02-17;**修回**:2012-03-05)

(编辑 王 红)