DOI:10.16016/j.1000-5404.201505014

硫酸吲哚酚促进肾纤维化的机制研究

余彦霖,肖堂利,刘 亮,何 婷,徐新丽,管 旭,杨 可,赵景宏 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院肾内科,全军肾脏病中心)

[摘要] **目的** 探讨尿毒症毒素硫酸吲哚酚(indoxyl sulfate,IS)诱导肾纤维化的作用及可能机制。**方法** 24 只 3 周龄健康雄性 CD-1 小鼠,体质量 14 ~ 15 g,建立 1/2 肾切除模型后,采用完全随机分组法将小鼠分为 IS 处理组($n=12$)和对照组($n=12$),分别给予小鼠腹腔注射 IS 100 mg/(kg·d)和等体积灭菌磷酸缓冲溶液,IS 注射 4 周后留取肾脏标本,Masson 染色观察小鼠肾间质胶原沉积情况,免疫组化染色检测观察小鼠肾脏 α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)和 β-catenin 蛋白表达变化,Western blot 检测 β-catenin 蛋白表达变化;用不同浓度的 IS(0、2、10、50 mg/L)孵育人近端肾小管上皮细胞(HK-2 细胞)72 h 后,Western blot 检测 β-catenin 表达变化。**结果** 与对照组比较,Masson 染色发现腹腔注射 IS 4 周后,小鼠肾脏胶原沉积明显增加[(2.43 ± 0.51) *vs* (6.57 ± 0.51),$P<0.05$],IS 处理组肾小管上皮细胞 β-catenin[(0.87 ± 0.74) *vs* (10.87 ± 1.21),$P<0.05$]以及 α-SMA[(1.30 ± 0.56) *vs* (13.53 ± 0.50),$P<0.05$]的表达均明显增加;与对照组相比,IS 处理组 HK-2 细胞的 β-catenin 表达显著增加,且呈剂量依赖效应[(0.71 ± 0.71) *vs* (0.96 ± 0.70)或(0.71 ± 0.71) *vs* (1.10 ± 0.95),$P<0.01$]。**结论** IS 可能通过激活 Wnt/β-catenin 信号通路发挥促小鼠肾纤维化的作用。

[关键词] 硫酸吲哚酚; Wnt/β-catenin;肾纤维化

[中图法分类号] R-332;R595.9;R692.02 [文献标志码] A

Indoxyl sulfate induces renal fibrosis in mice

Yu Yanlin, Xiao Tangli, Liu Liang, He Ting, Xu Xinli, Guan Xu, Yang Ke, Zhao Jinghong (Department of Nephrology, Kidney Disease Center, Xinqiao Hispital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect of uremic toxin indoxyl sulfate (IS) on inducing renal fibrosis in mice and its underlying mechanism. **Methods** A total of 24 healthy 3-week-old male CD-1 mice (weighting 14 ~ 15 g) were used to establish 1/2 nephrectomy model and then randomly divided into IS treatment group ($n=12$) and blank control group ($n=12$). The IS treatment group received intraperitoneal injection of IS at dose of 100 mg/(kg·d), and the control group received the same volume of phosphate buffer saline for 4 weeks. At the end of 4 weeks, the kidney samples were taken, and the mouse renal interstitial collagen deposition was observed by Masson staining. Expression levels of renal α-smooth muscle actin (α-SMA) and β-catenin were detected by immunohistochemical staining, and the changes of β-catenin protein were also detected by Western blotting. Human renal proximal tubular epithelial cells (HK-2 cells) were incubated with different concentrations of IS (0, 2, 10, and 50 mg/L) for 72 h, and the expression of β-catenin was measured by Western blotting. **Results** Compared with the control group, Masson staining showed that the IS-injected mice had significantly increased collagen deposition (2.43 ± 0.51 *vs* 6.57 ± 0.51,

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81270290)

[通信作者] 赵景宏,E-mail:zhaojh@tmmu.edu.cn

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151127.0853.008.html(2015-11-27)

$P<0.05$), and the expression levels of β-catenin (0.87 ± 0.74 *vs* 10.87 ± 1.21, $P<0.05$) and α-SMA (1.30 ± 0.56 *vs* 13.53 ± 0.50, $P<0.05$) in the proximal and distal tubule epithelial cells of the IS-injected mice were obviously increased. In the HK-2 cells incubated with IS, the protein levels of β-catenin increased significantly (0.71 ± 0.71 *vs* 0.96 ± 0.70, 0.71 ± 0.71 *vs* 1.10 ± 0.95, $P<0.01$) in a dose-dependent manner. **Conclusion** IS can promote the progress of renal fibrosis in the mice, which may be through activating Wnt/β-catenin signaling pathway.

[**Key words**] indoxyl sulfate; Wnt/β-catenin; renal fibrosis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81270290). Corresponding author: Zhao Jinghong, E-mail: zhaojh@tmmu.edu.cn

慢性肾脏疾病(chronic kidney disease,CKD)的发病率和病死率逐年增高,已成为全球公共卫生关注的焦点[1]。肾纤维化是 CKD 进行性发展至终末期肾功能衰竭的共同病理标志。然而,至今 CKD 肾纤维化的机制尚未完全明确。研究报道尿毒症毒素在促进肾纤维化持续进展过程中起着重要作用。其中,硫酸吲哚酚(indoxyl sulfate,IS)作为难以被透析所清除的尿毒症毒素之一,引起了人们的广泛关注。它是一种内源性的蛋白结合型小分子尿毒症毒素,并且随着 CKD 进展,IS 在血清中的浓度逐渐增加。近年研究发现,IS 是导致 CKD 小鼠肾纤维化的关键毒素[2],肾纤维化加重可以使肾功能进一步减退,又促进了 IS 在体内的蓄积。因此,两者之间的相互促进可能是肾纤维化和 CKD 持续进展的重要因素。但 IS 诱导肾纤维化的机制并不明确。本研究以 1/2 肾切除模型小鼠和人近端肾小管上皮细胞株(HK-2)为研究对象,探讨 IS 促进肾纤维化的内在机制,为 CKD 的防治提供新思路和新方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

主要试剂:HK-2 细胞株购自美国 ATCC 细胞库,DMEM 高糖培养基、胰酶购自 HyClone 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,硫酸吲哚酚购自美国 Sigma-Aldrich 公司,α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)抗体购自美国 Millipore 公司,β-catenin 抗体购自碧云天生物技术研究所,Masson 染色试剂盒购自福州迈新公司。

实验动物:24 只 3 周龄 CD-1 小鼠[SCXK(京)2012-0001],雄性,体质量 14 ~ 15 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 HK-2 细胞株培养与处理

冻存的 HK-2 细胞株复苏后,采用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 放于 5% CO_2,37 ℃恒温培养箱中进行培养,当细胞生长达到 80% ~90% 时,用 0.25% 的胰酶消化,传代。采用不同浓度 IS(0、2、10、50 mg/L)孵育 72 h 提取细胞总蛋白进行后续实验。

1.3 动物分组与模型制备

CD-1 小鼠行 1/2 肾切除手术后,采用完全随机法分为对照组($n=12$)和 IS 处理组(IS 组,$n=12$),手术结束 1 h 后开始给予小鼠腹腔注射 100 mg/(kg·d)的 IS(由磷酸盐缓冲液配制),对照组小鼠每 24 h 腹腔注射等体积磷酸盐缓冲液,连续注射 4 周。

1.4 标本的采取与处理

上述 2 组小鼠在给予 IS 腹腔注射 4 周后,用 1% 戊巴比妥钠麻醉小鼠后,颈椎离断处死小鼠;肾脏去除包膜后沿正中纵向剖开,取 1/4 肾脏于 10% 中性福尔马林中固定,然后脱水、石蜡包埋、切片,用于 Masson 染色和免疫组化染色,另外 3/4 肾脏分为 5 份分别装入冻存管内,冻存于 -80 ℃冰箱中,用于 Western blot 检测。

1.5 肾脏组织 Masson 染色

肾组织切片脱蜡水化后,Masson 复合染液染色 10 min,蒸馏水冲掉染液,用磷钼酸染色 8 min 并甩干,然后直接滴加苯胺蓝染色 3 min 后,蒸馏水稍冲洗,再滴分化液分化 40 s,脱水、透明、封片后拍照,步骤均在室温下完成。Masson 染色后在光镜下可见纤维化肾组织呈蓝色。在 400 倍光镜下,随机挑选 10 个视野,根据病变面积占视野面积的比值进行半定量分析,以此评价各组小鼠肾纤维化程度。

1.6 免疫组化染色

取 2 组小鼠石蜡包埋的肾组织标本切片(厚 2.5 μm)并行免疫组织化学染色。切片经烤片、脱蜡和水化后用 PBS 润洗 2 次,然后将切片浸泡在柠檬酸盐缓冲液(0.01 mol/L,pH 6.0)中高压修复 8 min,待自然冷却后 PBS 洗涤 5 min × 3 次,经过氧化氢作用 15 min,再用 10% 羊血清室温封闭 30 min 后分别加入

β-catenin(1∶200)、α-SMA(1∶1 000)一抗并放入湿盒,用 PBS 代替一抗作为阴性对照,在 4 ℃条件下孵育过夜。一抗孵育后 PBST 洗涤 5 min×3 次,加入山羊抗兔二抗、37℃孵育 30min、PBST 洗涤 5 min×3 次、DAB 显色,苏木精复染后脱水、透明、封片并拍照。于 400 倍光镜下观察肾小管细胞着色情况,β-catenin 在细胞质和细胞核内出现棕色及浅棕色染色为阳性,而 α-SMA 在细胞膜上出现棕色及浅棕色染色为阳性。每张切片随机取 5 个视野,使用 Image Pro Plus 6.0 分析软件检测 β-catenin、α-SMA 蛋白的表达,以平均光密度值(IOD/面积)作为判定蛋白表达强弱的标准。

1.7　Western blot 分析

收集不同浓度(0、2、10、50 mg/L)IS 处理 72 h 后的 HK-2 细胞,剪碎小鼠肾组织并在液氮研磨后,分别加入裂解液,混匀后冰上放置 15 min。在 4 ℃、12 000×g 条件下离心 10 min 后收集上清,BCA 法进行蛋白定量后加入 5×SDS 上样缓冲 Buffer,99 ℃变性 10 min。8% 聚丙烯酰胺凝胶每孔等量上样 60 μg,压缩胶 80 V、分离胶 100 V 恒压电泳,湿转仪 275 mA 转膜 45 min。5% 脱脂奶粉封闭转印好的 PVDF 膜 1 h 后加入 β-catenin(1∶1 000)和 β-actin(1∶1 000)一抗 4 ℃孵育过夜。洗涤后用 1∶1 000 相应的二抗 37 ℃孵育 1 h,再次洗涤后用 ECL 显影成像。采用 Image J 软件扫描特异性条带净灰度值,将 β-catenin 条带的灰度值除以 β-actin 条带灰度值作为最终结果进行统计分析。

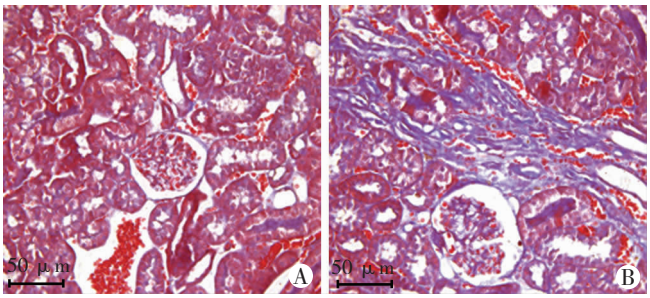
1.8　统计学分析

实验重复 3 次,采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验。

2　结果

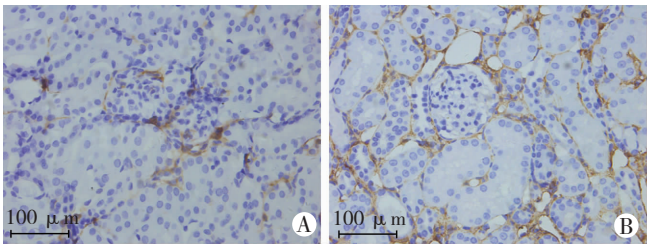
2.1　IS 对肾间质纤维化的影响

Masson 染色结果显示,与对照组相比,腹腔注射 IS 4 周的小鼠胶原纤维沉积明显增多[(2.43±0.51) *vs* (6.57±0.51),$P<0.05$,图 1]。提示 IS 可增加小鼠肾脏胶原沉积,促进小鼠肾纤维化的进展。免疫组化染色结果显示,与对照组相比,腹腔注射 IS 4 周的小鼠 α-SMA 表达显著增加[(1.30±0.56) *vs* (13.53±0.50),$P<0.05$,图 2],提示 IS 可以促进小鼠肾脏纤维化的进展。



A:对照组;B:IS 处理组

图 1　IS 处理后小鼠肾脏胶原纤维沉积情况　(Masson)

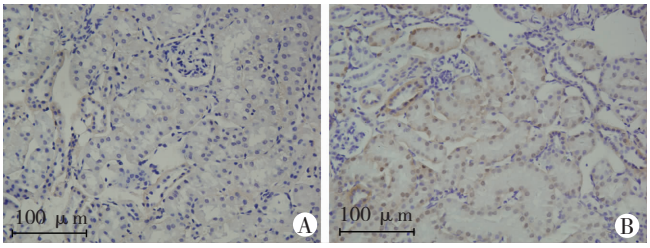


A:对照组;B:IS 处理组

图 2　免疫组化观察 IS 处理后小鼠肾脏 α-SMA 的表达(二步法)

2.2　IS 对小鼠肾脏 Wnt/β-catenin 信号通路活性的影响

在光镜下观察两组小鼠肾脏 β-catenin 蛋白免疫组化染色,可见 β-catenin 表达于小鼠近、远端肾小管上皮细胞细胞质和细胞核;与对照组相比,腹腔注射 IS 4 周的小鼠肾小管上皮细胞 β-catenin 表达明显增多[(0.87±0.74) *vs* (10.87±1.21),$P<0.05$,图 3];两组小鼠肾脏 β-catenin 蛋白 Western blot 检测结果显示,与对照组小鼠比较,腹腔注射 IS 4 周的小鼠 β-catenin 表达明显增加[(0.72±0.06) *vs* (1.13±0.09),$P<0.05$,图 4],提示腹腔注射 IS 可以明显上调 β-catenin 蛋白的表达。因此,IS 可以激活小鼠肾脏 Wnt/β-catenin 信号通路,从而诱导肾纤维化的发生和发展。



A:对照组;B:IS 处理组

图 3　免疫组化观察 IS 处理后小鼠肾脏 β-catenin 的表达(二步法)

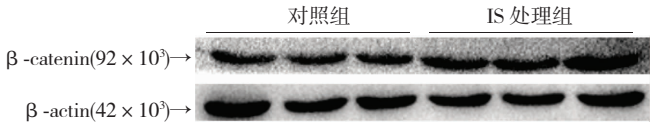
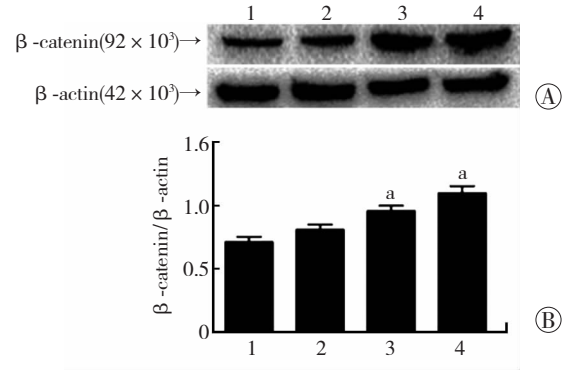


图 4 Western blot 检测小鼠肾脏 β-catenin 的表达

2.3 IS 对 HK-2 细胞株 Wnt/β-catenin 信号通路活性的影响

采用不同浓度 IS(0、2、10、50 mg/L)孵育 HK-2 细胞株 72 h 后行 β-catenin 蛋白 Western blot 检测,结果显示,与对照组比较,10、50 mg/L 浓度的 IS 均可使 β-catenin 蛋白的表达显著增加[(0.71±0.71) *vs* (0.96±0.70)或(0.71±0.71) *vs* (1.10±0.95),$P<0.01$],并且呈剂量依赖性(图 5)。这提示 IS 可以激活 HK-2 细胞 Wnt/β-catenin 信号通路,且随着 IS 浓度的增高,其激活作用越大。



A: Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 a: $P<0.01$,与对照组比较;1:对照组; 2: 2 mg/L;3: 10 mg/L; 4: 50 mg/L

图 5 Western blot 检测不同浓度的 IS 孵育 HK-2 细胞 β-catenin 的表达变化

3 讨论

CKD 的发病率和病死率逐年增高,CKD 已成为目前全球亟待解决的健康问题[3]。而肾纤维化是各类肾脏疾病进行性发展的共同病理改变和导致终末期肾病的主要病理基础。因此,深入研究肾纤维化的发生、发展机制并探索有效的干预措施有着极为重要的临床意义。

CKD 患者病程进展与尿毒症毒素的大量蓄积密切相关,尤其是不能经过透析清除的蛋白结合型毒素,如吲哚酚硫酸盐(IS)、对甲酚硫酸盐(PCS),它们在体内长时间滞留对机体造成进行性损伤。研究表明 IS 可以通过激活 CKD 小鼠 RASS 系统促进肾纤维化[2]。故本实验选取 IS 作为刺激因子,本研究通过给予 1/2 肾切模型小鼠腹腔注射 IS 4 周,同样发现 IS 可以促进肾纤维化。但截至目前,IS 促肾纤维化的具体机制尚未完全阐明,对此问题的深入探讨将为延缓肾纤维化和 CKD 进展提供新思路和新方法。

既往研究认为,TGF-β、内皮素-1 表达增高、RASS 系统激活等都具有促进肾纤维化的作用[4],然而肾纤维化的发生机制仍未阐明。近年的研究发现,Wnt/β-catenin 信号通路的激活与肺、肝脏、皮肤等的纤维化密切相关,而且 Wnt/β-catenin 信号通路在缺血性肾损伤、各类肾小球疾病、糖尿病肾病、多囊肾模型中都发挥了重要作用,因而 Wnt/β-catenin 信号通路与肾间质纤维化的发生和进展过程中的作用机制同样受到人们广泛的关注[5]。研究发现,UUO 模型小鼠肾脏 Wnt/β-catenin 信号活性明显增强,Wnt/β-catenin 信号通路的激活可促进肾纤维化[6];在对阿霉素肾病小鼠的研究中发现,抑制 Wnt/β-catenin 信号通路可以减少蛋白尿,抑制肾损伤和肾纤维化[7],这进一步证实了 Wnt 信号通路在肾损伤和肾间质纤维化中发挥了重要作用。

Wnt/β-catenin 信号通路活化促进肾纤维化的机制十分复杂。既往研究认为 Wnt/β-catenin 信号通路的激活可以增加其靶基因(如 TCF 和 LEF)的表达[8],激活 RASS 系统[9],促进小管上皮细胞发生 EMT[10],促进炎症因子 IL-1β、IL-6 的表达[11],从而发挥促纤维化的作用。因此 Wnt 信号通路在肾纤维化中的关键作用引起了我们的关注,但 IS 诱导肾纤维化的机制是否与 Wnt 通路的激活有关尚未明确。为此,我们进一步观察了 1/2 肾切除模型小鼠 β-catenin 蛋白的表达情况,Western blot 检测和免疫组化染色均发现腹腔注射 IS 4 周的小鼠其 β-catenin 蛋白表达明显增加,这提示 IS 能够激活小鼠肾小管上皮细胞 Wnt/β-catenin 信号通路,我们进一步通过 Masson 染色和免疫组化检测 α-SMA 的表达发现胶原沉积、肾纤维化程度加重。这提示着 IS 可以通过激活 Wnt/β-catenin 信号通路从而诱导肾纤维化的发生和进展。为此,我们采用不同浓度的 IS 孵育 HK-2 细胞后,Western blot 检测 β-catenin 蛋白的表达变化,发现 IS 明显促进了 HK-2 细胞 β-catenin 的表达,且随着 IS 浓度增加,其激活作用越明显,这提示 IS 可能通过激活 Wnt/β-catenin 信号通路发挥了促肾纤维化的作用。

综上所述,我们在前期工作中发现 IS 能够促进肾纤维化的发生、发展,在此基础上对既往文献报道的可能促进肾纤维化的机制进行了研究,发现 IS 通过激活 Wnt/β-catenin 信号通路促进肾纤维化进展。这为

CKD 的防治提供了新视角和新思路,但 IS 激活 Wnt/β-catenin 信号通路发挥促进肾纤维化的发生、发展的可能机制尚不清楚。这将是我们今后研究的重要关注点。

参考文献:

[1] Erickson K F, Lea J, McClellan W M. Interaction between GFR and risk factors for morbidity and mortality in African Americans with CKD[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2013, 8(1): 75-81.

[2] Sun C Y, Chang S C, Wu M S. Uremic toxins induce kidney fibrosis by activating intrarenal renin-angiotensin-aldosterone system associated epithelial-to-mesenchymal transition[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e34026. DOI:10.1371/journal.pone.0034026

[3] Hoerger T J, Simpson S A, Yarnoff B O, *et al*. The future burden of CKD in the United States: a simulation model for the CDC CKD Initiative[J]. Am J Kidney Dis, 2015, 65(3): 403-411. DOI:10.1053/j.ajkd.2014.09.023

[4] Lawson J, Elliott J, Wheeler-Jones C, *et al*. Renal fibrosis in feline chronic kidney disease: known mediators and mechanisms of injury[J]. Vet J, 2015, 203(1): 18-26. DOI:10.1016/j.tvjl.2014.10.009

[5] Kawakami T, Ren S, Duffield J S. Wnt signalling in kidney diseases: dual roles in renal injury and repair[J]. J Pathol, 2013, 229(2): 221-231. DOI:10.1002/path.4121

[6] He W, Dai C, Li Y, *et al*. Wnt/beta-catenin signaling promotes renal interstitial fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(4): 765-776. DOI:10.1681/ASN.2008060566

[7] He W, Kang Y S, Dai C, *et al*. Blockade of Wnt/beta-catenin signaling by paricalcitol ameliorates proteinuria and kidney injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(1): 90-103. DOI:10.1681/ASN.2009121236

[8] Qin W, Chung A C, Huang X R, *et al*. TGF-β/Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(8): 1462-1474. DOI:10.1681/ASN.2010121308

[9] Zhou L, Li Y, Hao S, *et al*. Multiple genes of the renin-angiotensin system are novel targets of Wnt/β-catenin signaling[J]. J Am Soc Nephrol, 2015, 26(1): 107-120. DOI:10.1681/ASN.2014010085

[10] Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(2): 212-222. DOI:10.1681/ASN.2008121226

[11] Aumiller V, Balsara N, Wilhelm J, *et al*. WNT/β-catenin signaling induces IL-1β expression by alveolar epithelial cells in pulmonary fibrosis[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 49(1): 96-104. DOI: 10.1165/rcmb.2012-0524OC

(**收稿**:2015-05-05;**修回**:2015-06-13)

(编辑 龙 亮)