DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.13.006
第26卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 13
2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

文章编号:1000-5404(2004)13-1141-04

论著

Smad2,3,4,7蛋白在大鼠5/6肾切除肾衰模型中的定位和表达变化

张金海[1],黄云剑[2],蔡文琴[1] (第三军医大学:[1]基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038,[2]新桥医院肾内科,全军肾脏病中心,重庆市肾病研究所,重庆 400037)

提 要:目的 研究Smad2,3,4,7蛋白在5/6肾切除模型中的定位和表达变化。方法 Wistar大鼠行5/6肾切除,分别于模型4、8、12周处死大鼠。用免疫组化检测Smad2、Smad3、Smad4和Smad7蛋白的定位和表达;纤维化程度通过测定肾组织羟脯氨酸含量来判断。结果 Smad2、Smad3和Smad4主要在肾小球和肾小管上皮细胞内有表达,而Smad7主要在肾小球表达。随着肾功能衰竭的加重,肾小球Smad2、Smad3和Smad4蛋白表达逐渐增加,而Smad7蛋白表达却逐渐下降,并伴有肾组织羟脯氨酸含量的明显增高。结论 TGF-β/Smad信号通路参与了肾间质纤维化进程,Smad2,3,4高表达和Smad7负调控不足是本模型TGFβ高表达导致肾小球硬化加重的主要原因之一。

关键词:Smad;转化生长因子β;肾小球硬化;慢性肾衰
中图法分类号:R-332;R394.2;R692.5 文献标识码:A

localization and changes of expressions of Smad2, Smad3, Smad4, and Smad7 proteins in the 5/6 subtotally nephrectomized rat kidney

ZHANG Jin-hai[1], HUANG Yun-jian[2], CAI Wen-qin[1] ([1]Department of Neurobiology, College of Medicine, Institute of Neurobiology Chongqing, Third Military Medical University Chongqing 400038; [2]Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical College, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To investigate the localization of Smad2, Smad3, Smad4, and Smad7 proteins and their expression changes in the 5/6 subtotally nephrectomized rat kidney. **Methods** The rat model of chronic renal failure was established by performing 5/6 subtotally nephrectomy (SNx) and rats in the control group underwent sham-operation. The rats were sacrificed at 4, 8, and 12 week after operation. The sites and levels of expressions of Smad2, Smad3, Smad4, and Smad7 proteins were examined by immunohistochemical staining. Renal fibrosis was assessed by measuring tissue hydroxyproline. **Results** Immunohistochemical staining indicated that Smad2, Smad3, and Smad4 proteins were mainly expressed in glomeruli and renal tubular cells, while Smad protein 7 was expressed in glomeruli, but rarely in proximal renal tubular cells. Expressions of Smad2, Smad3, and Smad4 proteins in glomeruli were significantly increased during 4—12 weeks after 5/6 nephrectomy, but the expression level of Smad protein 7 was significantly decreased, but accompanied increase of hydroxyproline content in the renal tissues. **Conclusion** These results indicate that TGF-β/Smad signaling is involved in the progress of chronic glomerulosclerosis. The high level expressions of Smad2, Smad3, and Smad4 proteins and the down-regulation of Smad7 protein may be the major cause of the glomerulosclerosis in this model.

Key words: Smad; TGF-β; glomerulosclerosis; chronic renal failure

Smads蛋白是TGF-β超家族细胞内信号转导分子[1]。Smads蛋白根据其结构和功能的不同分为3类:第1类是受体激活的R-Smads(receptor-activited smads)包括Smad1~Smad3、Smad5、Smad8;第2类辅助Smad蛋白(Co-Smads)即Smad4;第3类为抗Smads蛋白(anti-Smads)包括Smad6、Smad7。其中Smad2~Smad4、Smad7参与TGF-β的信号转导。既往研究已经证实,TGF-β是5/6肾衰模型肾小球硬化进展的主要细胞因子,但其细胞内信号分子Smads蛋白在该模型中表达变化不

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100083);全军医学科研"十五"计划青年基金资助项目(01Q103);中国博士后基金资助项目(2003033364)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30100083), the Scientific Research Funds for the Young Scholars of the "Tenth Five-year Plan" of Medicine and Public Health of PLA (01Q103), and Funds for Postdoctoral Researchers of China (2003033364)
作者简介:张金海(1967—),男,江苏省盐城市人,实验师,主要从事肾脏发育和病理方面的研究。电话:(023)68752232
收稿日期:2003-11-27;修回日期:2004-02-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

清楚。我们建立5/6肾衰模型，观测Smad2，3，4，7蛋白在该模型的定位和表达，旨在了解Smads蛋白在肾小球硬化进展中的作用。

1 材料和方法

1.1 动物模型的建立和分组

成年雄性Wistar大鼠20只，体质量180～220 g（第三军医大学实验动物中心提供），分为2组，每组10只，A组为5/6肾切除组，B组为假手术对照组。A组先在严格无菌条件下，大鼠左背部中1/3脊柱旁开1.5 cm纵切口，剥离肾包膜，用无损伤血管钳钳夹肾蒂，切除占左肾2/3的上、下极，明胶海绵止血，去除肾蒂夹，还纳残余的肾脏，观察无出血后，再切除右肾；B组接受模拟手术，轻翻肠拌，游离肾包膜后，不切除肾脏，以求达到A组条件的相对一致。所有动物均采用标准颗粒饲料喂养，自由进食、饮水。分别于术后4、8、12周，断颈后处死动物。所有大鼠于处死前1 d采血，留24 h尿标本。处死时用生理盐水灌洗肾脏，并留取标本。

1.2 观察指标及方法

1.2.1 常规及生化检测 ①24 h尿蛋白定量采用考马斯亮蓝比色法；②血肌苷、尿素氮由新桥医院生化科采用全自动生化分析仪检测。

1.2.2 免疫组化法检测 肾组织标本经4%多聚甲醛固定、30%蔗糖脱水后行30 μm厚的冰冻切片。3%过氧化氢室温孵育10 min灭活内源性过氧化物酶，山羊血清37 ℃封闭25 min，3% TritonX-100（PBS配制）37 ℃孵育25 min。分别滴加兔抗Smad2/3、Smad4和Smad7抗体，37 ℃，2 h，再依次加入生物素化标记的羊抗兔IgG和辣根酶标记的SABC工作液，37 ℃，30 min。每步后均PBS冲洗，5 min×3，DAB显色，常规乙醇脱水、二甲苯透明、封片镜检。PBS缓冲液替代一抗作阴性对照。

1.2.3 肾脏组织病理学检查 肾组织分成两部分：一部分行4%多聚甲醛固定后，行冰冻切片，组化染色和石蜡切片，PAS染色；另一部分－70 ℃保存，以备检测羟脯氨酸含量。

1.2.4 肾脏组织光镜切片的计算机图像分析 采用TigerT-MV3.3医用细胞图像分析系统进行图像扫描后分析。每张组织切片分析10个正切肾小球，测定肾小球阳性组化染色的积分光密度值。同时计算平均肾小球面积(G)、PAS阳性的肾小球系膜基质面积(M)，以及系膜基质占肾小球面积的百分比(M/G)。

1.2.5 肾组织羟脯氨酸含量测定 取肾组织100～150 mg，匀浆后置入20 ml瓶中，经6 mol/L HCl消化，120 ℃水解蛋白6 h，冷却后用6 mol/L NaOH滴定至pH 6.0，经双蒸水稀释至20 ml过滤备用。再取该备用液各1 ml，分别加入0.1 mol/L柠檬酸缓冲液0.5 ml和0.05 mol/L氯胺T溶液1 ml，37 ℃水浴25 min，3.15 mol/L高氯酸及二甲氨基苯甲醛各1 ml，在100 ℃煮沸3 min，冷却后用BECKMAN DU-60紫外可见分光光度计，在波长为560 nm光波下比色，测定前制备羟脯氨酸标准液及空白对照。

1.3 统计学处理

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，用SPSS统计软件（10.0版）进行组间方差分析。

2 结果

2.1 尿蛋白和肾功能的变化

与假手术组相比，大鼠5/6肾切除术后4周出现蛋白尿、血肌苷、尿素氮升高，随着肾衰时间的延长，24 h蛋白尿含量和血肌苷、尿素氮浓度增高于第12周达最高值（表1）。

表1 尿蛋白和肾功能的变化（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

Tab 1 Changes of urine protein and renal function in 5/6 SNx rats ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Group	Time after operation (wk)			
	Sham	4	8	12
Proteinuria(mg/24 h)	5.6±2.7	16.7±5.1**	61.2±7.5**	82.4±8.1**
BUN(mmol/L)	7.0±1.1	19.2±3.2**	28.3±3.4**	38.3±4.2**
Scr(μmol/L)	47.1±5.2	70.8±5.7**	112.0±6.1**	167.0±7.4**

**：$P<0.01$，*vs* sham-operation

2.2 肾小球病理改变

4周肾小球增大不明显，有轻度的系膜细胞增殖和基质增宽，偶见球囊粘连和间质炎细胞浸润，肾小管有轻度变性，偶见蛋白管型，MS/GLO比值增高。8周肾小球明显扩大，包曼氏囊明显扩张，肾小球系膜细胞中、重度增生伴轻、中度系膜硬化，可见轻度纤维素样渗出，MS/GLO比值较4周进一步增高，肾小管呈轻、中度扩张、细胞空泡样变性和间质不同程度的炎细胞浸润和轻度间质纤维化。12周肾小球增大、球囊扩张进一步加重，系膜重度增生伴中、重度系膜硬化，普遍存在纤维素样渗出和球囊粘连，常见到新月体形成，MS/GLO比值达最高，肾小管中、重度扩张、细胞空泡样变性，间质轻、中度炎细胞浸润伴中度间质纤维化，见表2，图1。

表2 肾小球病理改变的图像分析（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

Tab 2 Image analysis of pathological changes of glomeruli ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Group	Time after operation (wk)			
	Sham	4	8	12
Glomerular area (μm^2)	7 682±173	11 876±389*	12 760±578**	13 426±781**
Mesangial areas (μm^2)	2 742±187	4 565±225*	5 170±346**	6 428±478**
G/M(%)	35.6±1.4	38.4±2.4*	40.5±6.2**	47.8±7.8**

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* sham-operation

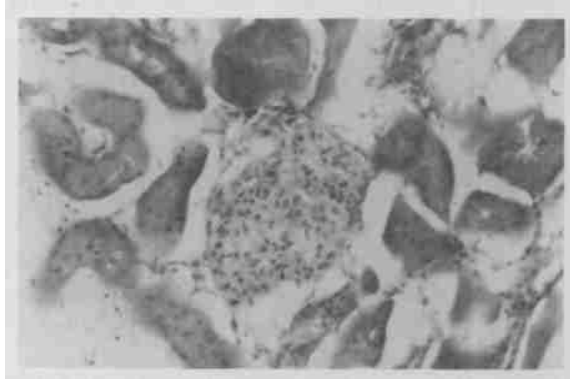


图1 5/6肾切除12周残肾肾小球 （HE×200）

Fig 1 Light micrographs of the glomerulus from the rat remnant kidney at 12 week after 5/6 subtotal nephrectomy （HE×200）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3 Smads 蛋白的定位和表达

正常肾组织均有 Smad2, 3, 4, 7 蛋白表达。Smad2、Smad3 和 Smad4 主要在肾小球和肾小管上皮细胞内有表达。Smad7 蛋白主要在肾小球内表达, 肾小管表达非常少。随着肾功能衰竭进程的延长, 肾小球和肾小管细胞内 Smad2, 3, 4 蛋白表达逐渐增加, 12 周达高峰, 而肾小球内 Smad7 蛋白表达却逐渐下降。见图 2, 表 3。

2.4 肾组织羟脯氨酸含量的变化

与假手术组相比, 大鼠 5/6 肾切除术后第 4 周, 羟脯氨酸含量就开始增加, 随着肾衰时间的延长, 羟脯氨酸含量逐渐增加, 于第 12 周达最高值。见表 3。

表 3　**Smads** 蛋白组化染色以及肾组织羟脯氨酸含量的变化($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tab 3　Changes of expressions of Smad2, Smad3 Smad4 and Smad7 proteins and hydroxyproline content ($\mu g/mg$) in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Group	Time after operation (w)			
	Sham	4	8	12
Smad2/3	13.5±2.12	22.7±2.86 *	28.4±3.35 **	34.7±4.42 **
Smad4	14.9±2.33	24.8±3.11 *	30.1±3.88 **	35.4±4.71 **
Smad7	38.7±4.98	30.8±3.87 *	22.6±2.97 **	18.4±2.52 **
Hydroxyproline	10.5±2.17	13.3±2.43 *	17.7±5.52 **	20.6±6.11 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* sham-operation

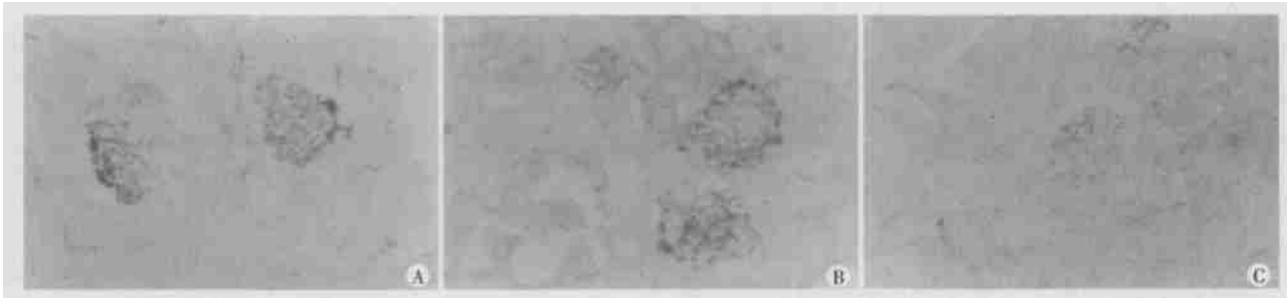


图 2　**Smad2/3**(A)、**Smad4**(B)和 **Smad7**(C)蛋白在 **12** 周 **5/6** 肾切除模型中的表达　(SABC× 200)

Fig 2　Immunohistochemical localizations and expressions of Smad2/3 (A), Smad4 (B) and Smad7 (C) in the rat remnant kidney at 12 week after 5/6 subtotal nephrectomy　(SABC× 200)

3　讨论

本研究表明, 大鼠 5/6 肾切除术后 4 周出现少量蛋白尿、血肌苷、尿素氮升高, 但肾脏病理改变轻微, 轻度肾小球代偿性肥大, 此期可视为肾衰的氮质血症期。肾切除 8～12 周病理改变明显加重, 表现为典型的局灶节段性肾小球硬化, 球囊粘连、新月体形成、纤维素样渗出以及肾小管扩张、变性、间质纤维化的进行性加重, 此期血肌苷、尿素氮持续升高, 尿蛋白持续大量排出, 可视为肾衰的失代偿期。本研究成功建立 5/6 肾切除动物模型, 该模型稳定, 成功率也较高。当肾单位减少至一定数量, 残余的肾单位排泄代谢废物的负荷就显著增加, 因而代偿性发生肾小球毛细血管的高灌注、高压力和高滤过, 而肾小球内三高可引起: ①系膜细胞和基质显著增生, 肾小球肥大进而发生硬化; ②肾小球内皮细胞损伤, 诱发血小板聚集, 导致微血栓形成, 损害肾小球而促进硬化; ③肾小球通透性增加, 使蛋白尿增加而损伤肾小管间质, 上述过程不断进行形成恶性循环, 使肾功能不断恶化, 这种恶性循环是一切慢性肾脏疾病进展到尿毒症的共同途径。

肾小球硬化的发展不可避免地造成进行性肾功能不全和有效肾单位的丧失。对于这一共同途径, 研究其发展因素, 阻抑或延缓这一过程, 是目前肾脏病研究的重点。近年来研究显示[2] TGF-β 是肾小球硬化和肾间质纤维化共同通路的主要介导因素, TGF-β 可直接促进系膜细胞、肾小管细胞、间质纤维细胞合成胶原、纤维连接蛋白和层粘连蛋白, 抑制肾小管细胞增殖并诱导其凋亡, 同时也抑制基质金属蛋白酶(matrix metalloproteins, MMPs)活性和促进金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)与纤溶酶原激活物抑制因子-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)基因的表达, 进而抑制 ECM 的降解, 还介导 Ang Ⅱ、PDGF、CTGF 的致纤维化作用。已经证实急慢性肾小球肾炎、糖尿病肾病、肾移植排斥反应、多囊肾、间质性肾炎等纤维化进程均与 TGF-β 高表达有关。因此深入了解 TGF-β 的细胞内信号转导蛋白 Smads 与肾小球硬化的关系, 对揭示其发病机制有帮助。研究表明, Smad2, 3, 4 参与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成和降解相关基因的表达调控。TGF-β 与其受体 TβR Ⅰ结合后, 激活 TβR Ⅱ受体的丝氨酸/苏氨酸激酶, Smad2、Smad3 蛋白被磷酸化, 活化的 Smad2、Smad3 和 Smad4 形成活性的转录复合物进入核内, 促进 PAI-1 和Ⅵ胶原基因的表达, 进而使 ECM 合成增加而降解减少[3,4]。Ellis 等[5] 发现 Smad1, 2, 3, 4 和 Smad7 均可作为转录调节因子调控Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ胶原基因的转录, Kanamaru 等[6] 进一步发现 Smad2, 3 诱导系膜细胞 α2Ⅰ胶原

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

的表达与 P300 转录辅助因子有关，而这一进程可被 Smad7 基因转染所抑制。同样，Isono 等[7] 也发现在糖尿病肾病，肾小球硬化存在 Smad 信号分子的活化，其中 Smad3 介导 TGF-β 对系膜细胞 Fibronectin 基因的表达。

我们在梗阻性肾病肾小管间质纤维化（TIF）模型中检测了 Smad2，3，6，7 的表达[8,9]，但未了解到 Smad4 的变化，以前的结果初步了解到 Smads 蛋白活化与小管间质的纤维化有关，但在肾小球硬化模型中 Smads 蛋白表达变化是否存在 TIF 相似的变化是本次研究的主要目的。我们采用 Smad2/3 抗体（同时识别 Smad2 和 Smad3 抗原）、Smad4 和 Smad7 抗体进行免疫组化，发现正常肾脏均存在有丰富 Smad2，3，4，7 的表达，Smad2、Smad3 和 Smad4 主要在肾小球和肾小管上皮细胞内有表达。Smad7 蛋白主要在肾小球内表达，肾小管表达非常少。图像分析表明随着肾功能衰竭进程的延长，肾小球和肾小管细胞内 Smad2、3 和 Smad4 蛋白表达逐渐增加，12 周达高峰，而肾小球内 Smad7 蛋白表达却逐渐下降，同时模型肾组织的羟脯氨酸含量随病程的延长含量增高，上述结果表明 Smad2，3，4 的高表达和负调控 Smad7 表达下降可能是该模型 TGF-β 致肾小球硬化加重的主要原因之一。

Smad7 基因的表达和调控在肾纤维化出现异常，启发我们想出了新的治疗途径。Smad7 是细胞内 TGF-βⅠ型受体的拮抗蛋白，能与活化Ⅰ型受体牢固结合，阻止 R-Smads 的磷酸化，从而自动反馈调节 TGF-β 对靶基因的转录[10]。在体外研究条件下，TGF-β 能引起 R-Smad 磷酸化并同时可迅速诱导 Smad7 基因 mRNA 表达，这些观察说明细胞内的确存在有正调控（Smad2，3）和负调控 Smad（Smad7）蛋白的平衡。Smad3-Smad4 复合体可与 Smad7 基因增强子 SBE（GTCTAGAC）元件结合，从而促进 Smad7 mRNA 转录[10]。由于在本实验模型中未见 Smad7 蛋白反馈性增高，负调控机制丧失，这就加重了 TGF-β 的致纤维化作用。因此，通过体内基因转移，将 Smad7 全长序列基因转移到有纤维化病变部位，加强负调控作用，恢复细胞内正调控和负调控 Smads 蛋白的平衡，有可能缓解肾小球硬化。

参考文献：

[1] Derynck R, Zhang Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling[J]. Nature, 2003, 425(6958): 577－584.

[2] Yu H T. Progression of chronic renal failure[J]. Arch Intern Med, 2003, 163(12): 1417－29.

[3] Vindevoghel L, Lechleider R J, Kon a, *et al*. SMAD3/4-dependent transcriptional activation of the human type Ⅶ collagen gene (COL7A1) promoter by transforming growth factor beta[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(25): 14769－14774.

[4] Dennler S, Itoh S, Vinien D, *et al*. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGFβ-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type1 gene[J]. EMBO J, 1998, 17(11): 3091－3100.

[5] Ellis L R, Warner D R, Greene R M, *et al*. Interaction of Smads with collagen types Ⅰ, Ⅲ, and Ⅴ[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 310(4): 1117－1123.

[6] Kanamaru Y, Nakao A, Tanaka Y, *et al*. Involvement of p300 in TGF-beta/Smad-pathway-mediated alpha2(Ⅰ) collagen expression in mouse mesangial cells[J]. Nephron Exp Nephrol, 2003, 95(1): e36－42.

[7] Isono M, Chen S, Hong S W, *et al*. Smad pathway is activated in the diabetic mouse kidney and Smad3 mediates TGF-beta-induced fibronectin in mesangial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 296(5): 1356－1365.

[8] 黄云剑，梁 莉，杨唐俊. Smad2，3，6，7 蛋白在实验性肾间质纤维化模型中的定位和表达变化[J]. 中华肾脏病杂志，2002，18(5)：356－360.

[9] 黄云剑，杨惠标，杨唐俊. Smad6，7 蛋白表达与梗阻性肾病小管间质损伤关系的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2002，24(2)：173－175.

[10] Nakao A, Afrakhte M, Moren A, *et al*. Identification of Smad7, a TGFβ-inducible antagonist of TGF-β signaling[J]. Nature, 1997, 389(6651): 631－635.

[11] Nagarajan R P, Zhang J, Li W, *et al*. Regulation of Smad7 promoter by direct association with Smad3 and Smad4[J]. J Biol Chem, 1999, 274(47): 33412－33418.

（编辑 陈聪连）

（上接 1140 页）

转移性神经鞘瘤直径为 2 cm，按常规计算需植入放射性 ^{125}I 粒子 10 mCi，实际植入 10.8 mCi。术后第 38 天病灶由直径 2 cm 缩小 0.5 cm，术后 3 个月病灶完全消失，术后 7 个月仍未见复发，无明显不良反应。结果提示瘤体内植入放射性 ^{125}I 粒子有可能成为神经鞘瘤的有效治疗手段，值得临床进一步观察。

关键词：神经鞘瘤；经皮肺穿刺；^{125}I

中图法分类号：R730.55 文献标识码：B

参考文献：

[1] Pollock B E, Foote R L, Stafford S L. Stereotactic radiosurgery: the preferred management for patients with nonvestibular schwannomas[J]? Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2002, 52(4): 1002－1007.

[2] 王恩敏，王滨江，张 南，等. 三叉神经鞘瘤的伽玛刀治疗[J]. 中华医学杂志，2003，83(18)：1576－1579.

[3] 戴晓天，胡建林，杨和平. 经皮穿刺瘤体内 ^{125}I 籽植入近距离内照射并化疗治疗小细胞肺癌 1 例[J]. 第三军医大学学报，2001，23(12)：1459.

[4] Larson D A, Suplica J M, Chang S M, *et al*. Permanent iodine 125 brachytherapy in patients with progressive or recurrent glioblastoma multiforme[J]. Neuro Oncol, 2004, 6(2): 119－126.

（编辑 薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net