DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.04.020

论著

文章编号:1000-5404(2004)04-0332-03

肾移植前后骨髓红细胞生成素受体基因表达的临床研究

孙 岩,吴雄飞,赵洪雯,范连慧,余荣杰,刘 宏 (第三军医大学西南医院全军泌尿外科中心肾科,重庆 400038)

提 要:目的 研究尿毒症肾性贫血患者肾移植前后骨髓红细胞生成素受体(erythropoietin receptor, EPOR)mRNA的表达变化及其与肾功能、贫血状态的关系。方法 58例同种异体肾移植患者,按术后肾功能恢复情况分为立即肾功能恢复(immediate graft function, IGF)组49例、缓慢肾功能恢复(slow graft function, SGF)组5例、延迟肾功能恢复(delayed graft function, DGF)组4例,5例发生红细胞增多症受者同时被另外列为肾移植后红细胞增多症(post-transplant erythropoiesis, PTE)组。用RT-PCR方法检测所有患者术前、术后10、30、90 d骨髓EPOR mRNA的表达,并与血清肌酐(serum creatinine, SCr)和血红蛋白(hemoglobin, Hb)水平进行相关性分析。结果 各组EPOR mRNA的表达术前显著下降,术后逐渐升高,PTE组升高最快,DGF组升高最慢,且与SCr呈负相关,与Hb呈正相关。结论 EPOR mRNA表达显著下降在肾性贫血的发病机制中起重要作用,成功的肾移植可增加其表达,从而改善及纠正患者的贫血状态。

关键词:慢性肾功能衰竭;贫血;红细胞生成素受体;肾移植

中图法分类号:R392.2;R617;R699.2 文献标识码:A

Clinical study of mRNA expression of erythropoietin receptor before and after renal transplantation

SUN Yan, WU Xiong-fei, ZHAO Hong-wen, FAN Lian-hui, YU Rong-jie, LIU Hong (Department of Kidney, Urinary Surgery Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the changes of mRNA expression of erythropoietin receptor (EPOR) before and after renal transplantation in bone marrow of patients with renal anemia and its correlation with renal function and state of anemia so as to explore the pathogenesis of renal anemia. **Methods** A total of 58 cases of uremia undergoing renal transplantation were divided into the following groups according to the recovery of renal function: group IGF (immediate graft function, $n=49$), group SGF (slow graft function, $n=5$), group DGF (delayed graft function, $n=4$), and group PTE (post-transplant erythropoiesis, $n=5$). The mRNA expression of EPOR in bone marrow of all the subjects before transplantation and at 10, 30, and 90 days after transplantation was detected by RT-PCR technique, and its correlation with serum creatinine (SCr) and hemoglobin (Hb) was analyzed. **Results** The mRNA expression of EPOR decreased significantly before transplantation and increased gradually after transplantation, and was negatively correlated with SCr, but positively with Hb. **Conclusion** The decreased mRNA expression of EPOR plays a crucial role in the pathogenesis of renal anemia. Successful transplantation can increase the mRNA expression of EPOR and improve the state of anemia.

Key words: chronic renal failure; anemia; erythropoietin receptor; renal transplantation

慢性肾功能衰竭常并发肾性贫血。目前认为,肾脏生产红细胞生成素(erythropoietin, EPO)的细胞减少,患者血清EPO相对不足是肾性贫血的主要原因,即EPO缺乏学说[1]。用人类重组EPO(recombinant human erythropoietin, rHuEPO)治疗可以纠正肾性贫血有力地支持了这一学说。但EPO缺乏并不是肾性贫血的惟一原因。EPO刺激红系细胞增殖、分化的作用是通过位于骨髓红系祖细胞膜上的红细胞生成素受体(erythropoietin receptor, EPOR)介导完成,EPOR的异常同样可以产生贫血。本课题采用RT-PCR方法检测尿毒症肾性贫血患者在肾移植术前和术后10、30、90 d骨髓EPOR mRNA的表达水平,研究它的变化规律及与肾功能、贫血状态之间的关系,旨在从EPOR方面初步探讨肾性贫血的发病机制,为治疗肾性贫血及肾移植后红细胞增多症(post-transplant erythropoiesis, PTE)提供新的理论依据。

作者简介:孙 岩(1976-),女,吉林省长春市人,硕士,医师,主要从事肾移植和血液透析方面的研究。电话:(023)68754188

收稿日期:2002-08-25;修回日期:2003-11-10

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

1　资料与方法

1.1　对象

同种异体肾移植患者 73 例(为我科 2000 年 9 月至 2001 年 12 月间收治的尿毒症首次接受同种异体肾移植术病例), 入选条件为:①慢性肾功能衰竭尿毒症期伴有严重贫血状态(Hb< 70 g/L);②经肾活检病理证实原发病均为慢性肾小球肾炎;③血液透析 2 次/周至少 3 个月;④rHuEPO 治疗 2 次/周, 至少 3 个月。15 例因各种原因中途死亡、移植肾切除、拒绝检查或失访而未纳入统计。实验结束时共有 58 例完成全部时间点的观察, 其中男性 39 例, 女性 19 例, 年龄 17~69 岁, 平均(32.9±19.8)岁。所有患者的群体反应性抗体均为阴性;淋巴细胞毒试验均小于 10%;供受者血型匹配同输血原则。供者肾功能和血常规正常(血清肌酐 SCr: 53~115 μmol/L, 血红蛋白 Hb: 110~170 g/L);肝炎标志物、梅毒螺旋体抗体、艾滋病抗体初筛试验均为阴性。供肾组织学检查正常;热缺血时间 5~9(7.2±2.7) min, 冷缺血时间 7~15(10.5±2.9) h。

受者术前输红细胞混悬液至 Hb 达 60 g/L 以上, 术前 1 d 给予硫唑嘌呤 200 mg 顿服。术中输红细胞混悬液 800~1 200 ml、甲基强的松龙 1 000~1 500 mg, 出血 200~400 ml。供肾肾动脉与受者髂内动脉端端吻合, 供肾肾静脉与受者髂外静脉端侧吻合, 输尿管与膀胱隧道式吻合。术后前 3 d 给予甲基强的松龙 500 mg 静滴, 1 次/d, 术后第 4 天开始至实验结束的 3 个月给予强的松+骁悉+环孢素 A 三联免疫抑制治疗。出现急性排斥反应时给予甲基强的松龙 3~5 d 或抗胸腺细胞球蛋白 3 d 连续冲击治疗。

术后肾功能恢复分 3 种情况:①立即肾功能恢复(immediate graft function, IGF)49 例, 即术后 5 d 内 SCr< 265.8 μmol/L;②缓慢肾功能恢复(slow graft function, SGF)5 例, 即术后 5 d 后 SCr> 265.8 μmol/L, 但无需血液透析;③延迟肾功能恢复(delayed graft function, DGF)4 例, 即术后 7 d 内需要血液透析, 经病理学诊断, 其中 3 例为急性排斥反应, 1 例为急性肾小管坏死[2]。术后 3 月 IGF 患者中有 5 例出现 PTE, 红细胞压积男性> 55%, 女性> 50%[3]。

1.2　方法

1.2.1　分组　　肾移植术后根据肾功能恢复情况分为 IGF 组 49 例、SGF 组 5 例、DGF 组 4 例, 其中 IGF 组中发生 PTE 的 5 例又同时被另外列为 PTE 组。

1.2.2　检测指标　　所有患者分别于肾移植术前(手术当日)、肾移植术后 10、30、90 d, 于髂前或髂后上棘抽取骨髓 1.5 ml, 应用 RT-PCR 法检测骨髓中 EPOR mRNA 的表达水平, 并记录患者当时的 SCr 和 Hb。RT-PCR 两步法试剂盒购于大连宝生物公司。

1.2.3　EPOR mRNA 表达测定　　按 Trizol 说明书抽提骨髓中总 RNA, RT-PCR 法测定 EPOR mRNA 表达, β-肌动蛋白为内对照, 人 EPOR 上游引物序列为 5′-GACGATGCAGGCAGTGGA-3′, 下游引物序列为 5′-AAGGCTGTTCTCATAAGGGTTG-3′, 产物长度为 460 bp;β-肌动蛋白上游引物序列为 5′-CGTGGACATCCGCAAAGAC-3′, 下游引物序列为 5′-CAAGAAAGGGTGTAACGCAACTA-3′, 产物长度为 307 bp。扩增条件为 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 40 s→57 ℃ 40 s→72 ℃ 1.5 min, 循环 35 次; 72 ℃ 10 min。1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶成像分析系统进行凝胶扫描及分析, 以 EPOR mRNA 扩增带与 β-肌动蛋白扩增带的灰度比值作为 EPOR mRNA 表达相对值。

1.3　统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 应用 SPSS 10.0 进行独立样本 t 检验和相关性分析。

2　结果

2.1　肾移植前后 SCr 和 Hb 的变化

所有患者术前 SCr 均显著高于正常, Hb 显著低于正常。术后 PTE 组肾功能和 Hb 均恢复最快, DGF 组最慢, IGF 组和 SGF 组位于两者之间(表 1, 2)。

表 1　肾移植前后各组 SCr 的变化 (μmol/L, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of SCr in each group before and after transplantation (μmol/L, $\bar{x}\pm s$)

Group	Before transplantation	Time after transplantation (d)		
		10	30	90
IGF(n=49)	985.7±191.3	144.7±45.5*	123.1±18.7	104.7±20.2
SGF(n=5)	965.6±204.7	661.5±15.7	129.8±9.9	108.7±30.1
DGF(n=4)	994.1±199.8	865.5±80.6	430.7±59.9★	149.1±12.8
PTE(n=5)	973.9±195.5	93.3±10.1*	85.7±9.7△	78.3±9.9▲

*: $P<0.01$, *vs* SGF and DGF; ★: $P<0.01$, *vs* IGF, SGF and PTE; △: $P<0.01$, *vs* IGF and SGF; ▲: $P<0.05$, *vs* IGF, SGF and DGF

表 2　肾移植前后各组 Hb 的变化 (g/L, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of Hb in each group before and after transplantation (g/L, $\bar{x}\pm s$)

Group	Before transplantation	Time after transplantation (d)		
		10	30	90
IGF(n=49)	58.6±8.6	65.3±12.5▲	86.8±10.3◇	127.6±20.1◆
SGF(n=5)	55.7±7.1	60.1±2.2	76.2±8.9	118.6±18.1
DGF(n=4)	60.4±8.9	59.5±1.4	63.3±6.7	92.8±3.3
PTE(n=5)	57.3±7.8	70.3±3.1*	92.5±2.5△	188.9±9.6☆

*: $P<0.05$, *vs* IGF, SGF and DGF; ▲: $P<0.05$, *vs* DGF; △: $P<0.05$, *vs* SGF and DGF; ◇: $P<0.05$, *vs* DGF; ☆: $P<0.05$, *vs* IGF, SGF and DGF; ◆: $P<0.05$ *vs* DGF

2.2　肾移植前后骨髓 EPOR mRNA 表达的变化

EPOR mRNA 的表达术前明显低于正常, 术后逐渐升高, PTE 组升高最快, IGF 组和 SGF 组次之, DGF 组升高最慢(表 3)。

表 3　肾移植前后各组 EPOR mRNA 表达 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　EPOR mRNA expression in each group before and after renal transplantation ($\bar{x}\pm s$)

Group	Before transplantation	Time after transplantation (d)		
		10	30	90
IGF(n=49)	0.080±0.007	0.322±0.017	0.435±0.034	0.499±0.010
SGF(n=5)	0.078±0.008	0.163±0.009▲	0.415±0.026	0.479±0.059
DGF(n=4)	0.082±0.009	0.110±0.007▲	0.298±0.014◇	0.446±0.032◆
PTE(n=5)	0.084±0.005	0.399±0.015*	0.486±0.027△	0.937±0.058☆

*: $P<0.05$, *vs* DGF and SGF; ▲: $P<0.05$, *vs* IGF; △: $P<0.05$, *vs* DGF and SGF; ◇: $P<0.05$, *vs* IGF and SGF; ☆: $P<0.05$, *vs* DGF and SGF; ◆: $P<0.05$, *vs* IGF

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

2.3 EPOR mRNA 表达与 SCr、Hb 的相关性分析

EPOR mRNA 的表达与 SCr 呈显著负相关($r=-0.78$, $P<0.05$), 与 Hb 呈显著正相关($r=0.91$, $P<0.01$)。

3 讨论

EPOR 是体内最重要的造血因子受体, 属于 I 型细胞因子受体超家族, 对维持红系祖细胞的生存、增殖、分化、成熟有重要作用[4]。EPOR 缺乏的大鼠, 在胚胎期就因红细胞生成障碍而死亡。Erslev 等[5]发现: 尿毒症肾性贫血时骨髓对内源性 EPO 的反应性降低, 因此不排除在肾性贫血时存在 EPOR 的异常。目前关于 EPOR 与肾性贫血的关系, 国外尚无报道, 国内仅见零星报道[6]。本实验结合肾移植前后肾功能及贫血状态的不同变化对肾性贫血患者 EPOR mRNA 表达的变化进行了初步探讨, 发现肾性贫血时 EPOR mRNA 表达显著下降, 肾移植后升高, 且 EPOR mRNA 的表达和 Hb 存在非常显著的正相关, 与 SCr 存在明显的负相关。由此我们认为: EPOR mRNA 表达的降低与肾性贫血密切相关, 可能是发生肾性贫血的重要机制之一。EPOR mRNA 表达下降可能是由于肾功能衰竭导致体内各种毒素堆积, 从而抑制 EPOR mRNA 表达。具体来说, 肾功能损害导致各种尿毒素在患者体内堆积, 抑制骨髓红系祖细胞 EPOR mRNA 的表达, 从而使骨髓红系祖细胞表面 EPOR 的数量减少, 同时 EPO 水平降低, EPO-EPOR 生物学效应降低, 导致红细胞生成障碍, 参与并加重肾性贫血的发生。肾移植后患者体内尿毒素得到清除, 解除了对 EPOR mRNA 表达的抑制, 表达逐步回升, 骨髓对 EPO 的正常敏感性得到恢复, 同时 EPO 升高, Hb 逐步恢复。而术后 EPOR mRNA 的异常高表达, 则可导致骨髓细胞对 EPO 的敏感性增加, 使血红蛋白合成过度, 可能与不依赖 EPO 分泌的 PTE 有关。对于尿毒症毒素与肾性贫血的关系, 以往的研究仅限于毒素对 EPO 分泌量和红细胞生成的直接抑制作用, 但结论不一[7], 本实验说明尿毒素也可能通过抑制 EPOR 表达参与抑制骨髓造血。

这一机制可以解释临床上用 EPO 缺乏理论无法解释的难治性肾性贫血。临床上常见尿毒症血透患者贫血纠正效果优于非血透者, 而透析前后 EPO 水平并无明显变化, 说明透析对贫血的改善与 EPO 水平无关, 这可能与其清除体内毒素, 增强 EPOR mRNA 表达有关。但即使在充分透析和维持 EPO 水平正常或较高的情况下, 透析患者 Hb 也难以恢复正常, 是因为常规血液透析只能清除部分小分子毒素, 大量的大、中分子毒素仍然滞留血循环中, 持续抑制 EPOR mRNA 表达。对 EPO 抵抗的尿毒症血透患者, 在加用了血液滤过后, 由于清除了对 EPOR mRNA 表达抑制作用强的中分子物质, 使骨髓细胞 EPOR 数量增加, 红细胞增殖提高[8]。只有肾移植完全肾替代才可以清除体内全部大、中、小分子毒素, 对 EPOR mRNA 表达的抑制作用才能完全解除, 贫血完全纠正。

本结论作为对 EPO 缺乏学说的补充, 在治疗顽固性肾性贫血和 PTE 方面可能具有一定的理论指导意义。首先, 对存在 EPO 抵抗的肾性贫血患者, 可能存在 EPOR mRNA 的表达下降, 应采用血液滤过的方法清除普通血液透析不易清除的大、中分子毒素, 减轻对 EPOR mRNA 表达的抑制。同时还需要进一步研究对中分子毒素有更高清除率的生物膜材料。其次, 理论上如果能够找到 EPOR 的激动剂和拮抗剂, 则可以更为直接地调控其表达, 从而促进和抑制骨髓造血, 提高肾性贫血和 PTE 的治疗水平。目前如何干预 EPOR 表达尚无研究, 有人通过 EPO 模拟肽(EPO-mimetic peptides, EMP)来研究 EPOR 与 EPO 结合后的激活方式[9], 相信可以用于 EPOR 激动剂和拮抗剂的研究。

另外, 肾性贫血时 EPOR 蛋白质结构、功能和 EPO—EPOR 信号转导途径也可能出现改变, 同时 EPOR 完整型、截断型、可溶型 3 种类型间转换或比例也可能发生变化, 因此肾性贫血 EPOR 异常的机制可能较为复杂, 有待进一步的研究。

参考文献:

[1] Stopka T, Zivny J H, Stopkova P, *et al*. Human hematopoietic progenitors express erythropoietin[J]. Blood, 1998, 91(10): 3766—3772.

[2] Humar A, Johnson E M, Payne W D, *et al*. Effect of initial slow graft function on renal allograft rejection and survival[J]. Clin Transplant, 1997, 11(6): 623—627.

[3] Gaciong Z, Koziak K, Jarzy O I, *et al*. Erythropoietin production after kidney transplantation[J]. Ann Transplant, 1996, 1(1): 29—33.

[4] Mulcahy L. The erythropoietin receptor[J]. Semin Oncol, 2001, 28(2 Suppl 8): 19—23.

[5] Erslev A J, Besarab A. The rate and control of baseline red cell production in hematologically stable patients with uremia[J]. J Lab Clin Med, 1995, 126(3): 283—286.

[6] 吕秋军, 叶棋浓, 温利清, 等. 慢性肾功能衰竭对大鼠红细胞生成素受体基因表达的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 1999, 15(1): 21—23.

[7] Chikao Y, Kenzo M, Taihei Y, *et al*. Early effects of parathyroidectomy on erythropoietin production in secondary hyperparathyroidism[J]. Am J Surg, 2002, 183(2): 199—204.

[8] Carozzi S, Nasini M G, Santoni O, *et al*. Recombinant human erythropoietin resistance in hemodialysis. Effects of paired filtration dialysis[J]. ASAIO J, 1997, 43(5): 535—538.

[9] Livnah O, Stura E A, Johnson D L, *et al*. Functional mimicry of a protein hormone by a peptide agonist: the EPO receptor complex at 2.8Å[J]. Science, 1996, 273(26): 464—470.

(编辑 张大春)

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