DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.025
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002


文章编号:1000-5404(2002)02-0173-03

论著

# 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

黄云剑,杨惠标,杨唐俊 (第三军医大学附属新桥医院肾病中心,重庆 400037)

提 要:目的 研究Smad6、7蛋白表达与梗阻性肾病小管间质损伤的关系。方法 32只Wistar大鼠随机分为单侧输尿管梗阻组和假手术组(对照组),于术后3、7、14、21 d处死大鼠。采用逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)检测TGF-$\beta_1$ mRNA表达水平;用免疫组化和Western杂交分别检测Smad6,Smad7蛋白的定位和表达;DNA片断末端标记原位检测肾小管细胞凋亡数;图像分析小管细胞和肾小球毛细血管球囊平均卡规直径的变化。判断纤维化程度通过测定肾组织羟脯氨酸含量。结果 与对照组相比,梗阻肾组织TGF-$\beta_1$ mRNA表达显著增高,并伴有明显的肾小管和肾小球毛细血管球囊萎缩、小管细胞的凋亡,以及肾组织羟脯氨酸含量增高。Smad6、7蛋白主要在肾小球和皮质肾小管上皮细胞内表达。输尿管梗阻后,Smad6、7蛋白表达明显下降,该Anti-Smad蛋白下调与小管间质损伤呈明显相关。结论 TGF-$\beta_1$信号通路参与了梗阻性肾病小管间质损伤的进程,Anti-Smad蛋白表达下降可能是该模型TGF-$\beta_1$致伤作用加重的主要原因。

关键词:Smad6;Smad7;梗阻性肾病;肾小管间质损伤
中图法分类号:R394.3;R692.202 文献标识码:A

# Relationship between expression of Smad6 and Smad7 and renal tubulointerstitial injury following unilateral ureteral obstruction in rats

HUANG Yun-jian, YANG Hui-biao, YANG Tang-jun (Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**Abstract:** Objective To investigate the relationship between the expressions of Smad6 and Smad7 and renal tubulointerstitial injury in rats with unilateral ureteral obstruction. Methods Thirty-two rats were subjected to unilateral ureteral obstruction (UUO) or sham operation and then sacrificed on day 3, 7, 14 and 21 postoperatively. The levels of TGF-$\beta_1$ mRNA were measured with RT-PCR. The expression sites and levels of Smad6 and Smad7 were examined with immunohistochemical staining and western blot respectively. The apoptosis of renal tubular cell (RTC) was measured with in situ detection of nuclear DNA fragmentation. The diameters of tubular cell and glomerular capillary capsule (GCC) were quantitated with histomorphometry. Renal fibrosis was assessed by the determination of tissue hydroxyproline content. Results Compared with controls, the expression of TGF-$\beta_1$ mRNA was significantly increased in UUO rats, and progressive tubular cell apoptosis, tubular and glomerular atrophy, and increased hydroxyproline content were observed at the same time. Immunohistochemistry indicated that Smad6 and Smad7 were expressed in both the glomeruli and proximal renal tubular cells. The expressions of Smad6 and Smad7 were significantly reduced from day 3 to 21 after UUO, which was significantly correlated to the down-regulation of Anti—Smad and renal tubulointerstitial injury. Conclusion These results indicate that TGF-$\beta_1$ signaling is involved in the process of renal tubulointerstitial injury after obstruction, the down-regulation of these anti-Smads may be the major cause of the exacerbation of renal injury in this model

**Key words:** Smad6; Smad7; obstructive nephropathy; renal tubulointerstitial injury

近年发现Smad6和Smad7蛋白是TGF-β细胞内信号转导的负调控蛋白(Anti-Smads)[1,2],二者均是细胞内Ⅰ型受体丝氨酸/苏氨酸激酶的拮抗蛋白,能与活化TGF-β Ⅰ型受体牢固结合,阻止R-Smads(Receptor-activited Smads)的磷酸化,从而自动反馈调节TGF-β对靶基因的转录。既往研究已经证实梗阻性肾病小管间质存在有TGF-$\beta_1$的高表达,但其细胞内负调控Smad6、7蛋白的表达调节尚未见文献报道。我们建立单侧输尿管梗阻性肾病模型,观测Smad6、7在该模型的定位和表达调节,以及与小管间质损伤关系,旨在了解Anti-Smads蛋白在该模型小管间质损伤中的作用。

基金项目:全军"十五"医药卫生青年科研基金资助项目(01Q103)
作者简介:黄云剑(1965—),男,四川省大邑县人,博士,主治医师,讲师,主要从事肾脏小管间质损伤机制方面的研究,发表论文11篇。电话:(023)68755769
收稿日期:2001-07-17;修回日期:2001-11-15

## 1 材料和方法

### 1.1 动物模型的建立和分组

采用Wistar雌性大鼠(本校实验动物中心提供)32只,体重180~250 g,普食喂养,随机分为2组:①单侧输尿管梗阻组(UUO):从大鼠背部肾区入路,双线结扎左侧输尿管近肾盂处。分别于3、7、14、21 d乙醚麻醉后处死动物,左侧肾脏行原位灌流去除血细胞后,肾组织一部分行10%福尔马林固定,一部分液氮中保存以备提取mRNA和蛋白质。②对照组(Control):除不结扎左侧输尿管外,手术方式同梗阻组。

### 1.2 观察指标及方法

1.2.1 TGF-$\beta_1$的RT-PCR分析 按逆转录试剂盒(Promega)方法进行RT-PCR。大鼠TGF-$\beta_1$引物序列(由日本筑波大学健康和运动科学系Yutaka Miyanaga博士馈赠)为:正义序列:5′-CGA GGT GAC CTG GGC ACC ATC CAT GAC-3′;反义序列:5′-CTG CTC CAC CTT GGG CTT GCG ACC CAC-3′,PCR产物为405 bp。以GAPDH为内参照,正义序列:5′-TCC CTC AAG ATT GTC

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

AGC AA-3′；反义序列：5′-AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT-3′；PCR 产物为 405 bp。PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳，采用 Imagetool 凝胶分析系统对 PCR 产物进行定量分析以对 GAPDH 相对值记录结果。

1.2.2 Western 杂交分析 蛋白质提取及 SDS-PAGE 凝胶电泳基本参照《分子克隆》方法进行。蛋白质经 10% 或 8% SDS-PAGE 垂直凝胶电泳后，电转移至 PVDF 膜上，用丽春红 S 染色观察转移效果并标出分子量标准，一抗采用兔抗大鼠 Smad6，7 多克隆抗体（Santa Cruza 公司），依次再用 HRP 标记的羊抗兔 IgG 杂交和辣根酶标记的链霉卵白素液（北京中山公司）杂交，最后加 ECL 发光试剂（Boehringer Mannhiem 公司），在暗室中将膜贴在 X 光胶片下曝光，常规方法显影、定影，直至显影出电泳带。杂交信号在 Imagetool 图像分析系统中进行光密度分析。

1.2.3 免疫组化法检测 Smads 蛋白的表达 采用 S-P 组化法。PBS 缓冲液替代一抗作阴性对照。

1.2.4 DNA 片断末端标记法（TUNEL） 按 Boehringer Mannhiem 公司试剂盒说明书进行。以 PBS 代替 TUNEL 反应液作为阴性对照。

1.2.5 肾小球毛细血管球囊和小管细胞平均卡规直径的分析 采用 HE 染色的肾组织切片，在 Imagetool 图像分析系统下测定，每组 8 只大鼠，每只大鼠观察 5 张切片，每张切片观察 10 个视野，约 50 个肾小球，200 个肾小管。肾小球直径为冠状径，肾小管为基底缘到刷状缘距离。

1.2.6 肾组织羟脯氨酸（Hydroxyproline）含量测定 参照 Shimzu[3] 方法进行。

1.2.7 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）进行组间差异显著性 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 各组 TGF-$\beta_1$ mRNA 表达的变化

与对照组相比，梗阻肾第 3 天 TGF-$\beta_1$ mRNA 的表达就开始增加，随着梗阻时间的延长，mRNA 的表达逐渐增加，于第 7 天表达最高，第 21 天出现回落，但仍然高于对照组（$P<0.05$）。见图 1 和表 1。

### 2.2 Smads 蛋白的定位

正常肾组织均有丰富 6，7 蛋白表达。Smad6、7 蛋白主要在肾小球和皮质肾小管上皮细胞内表达，在髓质的肾小管仅有少许分布。随着输尿管梗阻时间的延长，Smad6、7 染色却逐渐减轻，与 Western 结果相一致。




M：Marker；1，3，5，7：Day 3，7，14，21 in control kidneys；2，4，6，8：Day 3，7，14，21 in obstructed kidneys

图 1 各组 TGF-$\beta_1$ mRNA 表达变化

**Fig 1 RT-PCR products of TGF-$\beta_1$ mRNA**

表 1 各组 TGF-$\beta_1$ mRNA，Smad6，7 蛋白表达和组织羟脯氨酸含量的变化（$\bar{x}\pm s$）

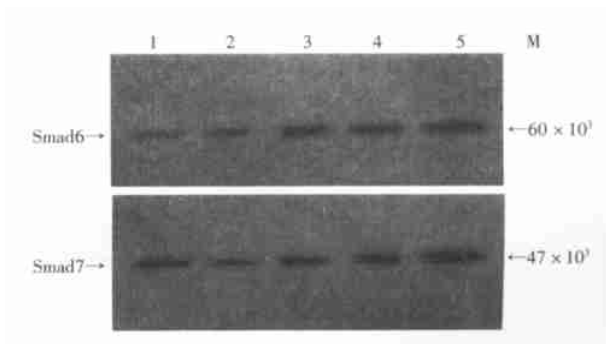
**Tab 1 Changes of TGF-$\beta_1$ mRNA，Smad6 and Smad7 expressionsand hydroxyproline content in every group（$\bar{x}\pm s$）**

| | Control（$n=6$） | Time after UUO | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 3 d（$n=7$） | 7 d（$n=7$） | 14 d（$n=6$） | 21 d（$n=6$） |
| TGF-$\beta_1$ | 0.95±0.04 | 1.02±0.08 * | 1.97±0.17 * | 1.71±0.13 * | 1.31±0.1 * |
| Smad6 | 11976±1448 | 10234±826 * | 8816±669 * | 6829±396 * | 7613±476 * |
| Smad7 | 11142±1248 | 8716±635 * | 6591±478 * | 3644±337 * | 5176±388 * |
| Hydroxyproline（μg/mg） | 11.9±2.7 | 16.9±4.4 * | 20.47±5 * | 29.3±8.7 * | 35.2±9.3 * |

*：$P<0.05$ *vs* control

### 2.3 Smad6，7 的 Western 杂交

梗阻后第 3 天 Smad6，7 表达就开始降低，随着梗阻时间的延长，表达量逐渐减少，于第 14 天降至最低，第 21 天稍有回升，但仍然低于对照组。从表 1 可了解到肾组织羟脯氨酸含量与 TGF-$\beta_1$ mRNA 表达变化一致，而与 Anti-Smads 表达变化趋势相反。见表 1，图 2。




M：Marker；1，2，3，4：Day 21，14，7，3 in obstructive group；5：Day 7 in control group

图 2 各组 Smad6，7 蛋白 Western 分析

**Fig 2 Western analysis of Smad6 and Smad7 expressions in control and obstructed kidneys**

### 2.4 小管细胞的凋亡数、小管细胞和肾小球毛细血管球囊平均卡规直径、肾组织羟脯氨酸含量的变化

与对照组相比，输尿管梗阻后小管细胞凋亡细胞数和肾组织羟脯氨酸含量均逐渐增多，21 d 达最高值（$P<0.05$）。而肾小管细胞和肾小球毛细血管球囊平均直径却逐渐减少，21 d 达最低值（$P<0.05$）。见表 2，图 3。

表 2 各组小管和肾小球毛细血管囊直径、小管细胞凋亡数的变化（$\bar{x}\pm s$）

**Tab 2 Changes of renal tubular cell（RTC）and glomerular capillary capsule（GCC）diameters，and tubular cell apoptosis in every group（$\bar{x}\pm s$）**

| | Control（$n=6$） | Time after UUO | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 3 d（$n=7$） | 7 d（$n=7$） | 14 d（$n=6$） | 21 d（$n=6$） |
| RTC diameter（μm） | 45.8±3.6 | 46.9±3.9 | 33.8±3.5 * | 27.8±3.1 * | 24.4±2.8 * |
| GCC diameter（μm） | 325.4±47.3 | 297.2±32.1 * | 266.5±28.3 * | 236.4±25.3 * | 199.28±14.1 * |
| Apoptotic tubular cells/HPF | 4.5±1.7 | 7.5±1.8 * | 10.5±2.6 * | 16.9±3.1 * | 21.4±4.6 * |

*：$P<0.05$ *vs* control

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

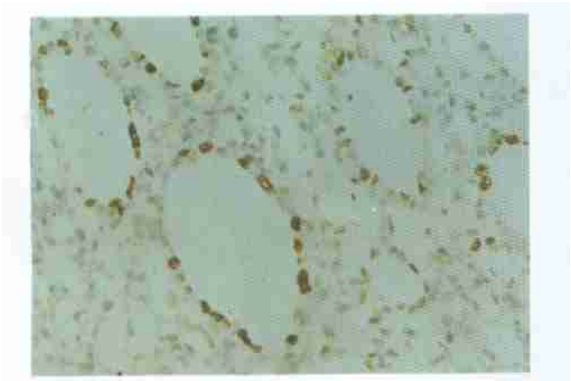


图 3　21 d 梗阻肾小管细胞可见明显的 TUNEL 染色阳性　(TUNEL× 200)
**Fig 3　Apoptosis of renal tubular cells 21d after obstruction**　(TUNEL× 200)

## 3　讨论

梗阻性肾病是由于泌尿道结构和/或功能改变, 阻碍了尿液的排出, 最终导致肾功能衰竭的一种疾病, 该病多见于儿童和老年人, 先天性输尿管梗阻是儿童肾功能衰竭的主要原因之一。持续的输尿管梗阻对肾脏影响以肾小管间质损害最为严重, 主要表现为肾小管细胞萎缩、凋亡和间质纤维化, 最终导致有效肾单位的完全丧失。既往研究已证实肾缺血、低氧、血管紧张素Ⅱ、TGF-β、活性氧产物均与上述损伤有关, 其中 TGF-β 是肾缺血、低氧、AgⅡ、PDGF、CTGF 致伤作用的主要介导因素, 作用尤为突出[4], 但 TGF-β 细胞内信号转导蛋白 Smads 与该模型小管间质损伤的关系仍然不清楚, 我们研究特别观测 Anti-Smads 蛋白在该模型的表达, 可能对了解该病的发病机制会有帮助。

本研究发现梗阻性肾病存在有 TGF-$\beta_1$ mRNA 高表达, 梗阻第 3 天即见增高, 于第 7 天达最高值, 第 14 天出现回落, 但均高于假手术组, 这与文献的结果相一致。同时我们也发现梗阻肾出现进行性肾小管和肾小球毛细血管囊直径缩小, 肾小管细胞凋亡和肾组织羟脯氨酸含量增多, 这些变化与 TGF-$\beta_1$ mRNA 表达变化趋势相一致。TGF-β 诱导小管细胞生长阻抑和间质纤维化与其下列生理作用因素有关: TGF-β 可抑制小管上皮细胞 DNA 的合成, 使细胞停止在 $G_1$ 后期, 并诱导细胞调亡; 还抑制肾小管分枝的形成; TGF-β 可直接促进肾小管细胞、间质纤维细胞合成胶原, 同时也抑制 MMPs 活性和促进 TIMPs 与 PAI-1 基因的表达, 进而抑制 ECM 的降解。

近年发现 Smads 蛋白是 TGF-β 家族信号从受体到核的细胞内转导分子, Smads 蛋白根据其结构和功能的不同分为三类[5]: 第一类是受体激活的 R-Smads (Receptor-activited Smads) 包括 Smad1 ~Smad3, Smad5, Smad8; 第二类辅助 Smad 蛋白 (Co-Smads) 即 Smad4; 第三类为抗 Smads 蛋白 (anti-Smads) 包括 Smad6, Smad7。其中 Smad2 ~Smad4, Smad6、Smad7 参与 TGF-β 的信号转导。目前 Smads 蛋白在肾脏的表达和分布情况研究报告不多。利用免疫组化, 我们发现正常肾脏存在有丰富 Smad6, 7 表达, 二者在皮质肾小管和肾小球均有表达。Western 分析发现R-Smad蛋白随着输尿管梗阻进程的延长, Smad6, 7 表达未见反应性增高, 第 3 天即见下降, 第 14 天降至最低值, Smad7 下降 67%, Smad6 下降 42%, 上述结果表明负调控 anti-Smads 表达下降可能是该模型 TGF-$\beta_1$ 致伤作用加重的主要原因之一, 但 anti-Smads 蛋白表达下调的原因有待进一步研究。

Smad6 和 Smad7 与其他 Smad 蛋白相比, 结构上两者均无 MH1 区, C 端没有 SSXS 基序, 所以不能被受体磷酸化, 但可与活化 TGF-β、BMP Ⅰ型受体牢固结合, 阻止R-Smads的磷酸化, 从而对该超家族信号传递起负调控作用[5]。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 Smad6, 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 (Smad6, 7) 蛋白。Smad6 和 Smad7 负调控 TGF-β 超家族信号信号转导有些不同, Smad7[2] 可抑制 Smad2, 3 的磷酸化, 而 Smad6[1] 只能抑制 Smad2 磷酸化, 但 Smad6 能与 Smad4 竞争同 Smad1 的结合, Smad6 ~Smad1 聚合体是无活性的, 从而负调控 BMP 信号传递。已经发现 Smad2, 3, 4 参与了 TGF-β 诱导 Smad7 mRNA 转录过程, Smad3, Smad4 复合体与 Smad7 基因增强子 SBE (GTCTAGAC) 元件结合, 从而促进Smad7 mRNA 转录[6]。由于在本实验模型中未见 Anti-Smad 反馈性增高, 负调控机制丧失, 这就加重了 TGF-$\beta_1$ 的致伤作用。同样的情况也出现在慢性心肌纤维化病变[7], 因此我们下一步可以考虑将 Smad6 和 Smad7 全长序列基因转移到该模型, 加强 Anti-Smad 负调控作用, 从而缓解小管间质损伤进程。

参考文献:


[1] Hata A, Lagna G, Massague J, *et al*. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor[J]. Genes Dev, 1998, 12(2): 186－197.

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

[3] Shimizu T, Kuroda T, Hata S, *et al*. Pirfenidone improves renal function and fibrosis in the post-obstructed kidney[J]. Kidney Int, 1998, 54(1): 99－109.

[4] Chevalier R L. Molecular and cellular pathophysiology of obstructive nephropathy[J]. Pediatr Nephrol, 1999, 13(7): 612－619.

[5] Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-β/Smad signaling system[J]. EMBO J, 2000, 19(8): 1 745－1 754.

[6] 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): 33 412－33 418.

[7] Hao J M, Ju H S. Elevation of expression of smad2, 3 and4, Decorin and TGF-βin the chronic phase of myocardial infarct scar healing[J]. J Mol Cell Cardiol, 1999, 31(3): 667－678.


(编辑　谢义霞)

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