

真核起始因子 6 抑制小鼠肾间质纤维化的组织学研究*

刘岱松, 杨思思, 谭江琳, 罗高兴, 吴 军[△](第三军医大学西南医院烧伤研究所/创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室/
疾病蛋白质组学重庆市市级重点实验室, 重庆 400038)

摘要:目的 通过建立小鼠单侧输尿管结扎(UUO)模型,探讨真核起始因子 6(eIF6)在肾间质纤维化中的作用。方法 建立 eIF6^{+/-}和 eIF6^{+/+}小鼠 UUO 模型;用 HE 和 Masson 染色观测小鼠肾间质胶原沉积程度,免疫组化方法观察 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、转化生长因子 β 1(TGF- β 1)的表达与分布变化,并进行图像定量分析。结果 UUO 模型 eIF6^{+/-}小鼠在建模后 10 d 出现比 eIF6^{+/+}小鼠更明显的肾纤维化;在 UUO 模型中,eIF6^{+/-}小鼠的肾小管区比 eIF6^{+/+}小鼠的肾小管区表达更多的 TGF- β 1 和 α -SMA。结论 eIF6 可能通过影响 TGF- β 1 的表达参与调控肾间质纤维化。

关键词:真核起始因子 6;转化生长因子 β 1;肾小管上皮细胞;成纤维细胞;肾间质纤维化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.16.018

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)16-2022-04

EIF6 delays the kidney interstitial tissue fibrosis process by regulating the expression of TGF- β 1*Liu Daisong, Yang Sisi, Tan Jianglin, Luo Gaoxing, Wu Jun[△](Chongqing Key laboratory of Proteomics of Diseases, State Key Laboratory of Trauma/Burns and
Combined Injury, Institute of Burns/South west Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the possible role of eukaryotic initiation factor 6 (eIF6) in the development of kidney interstitial tissue fibrosis in a mouse model of unilateral ureteral obstruction(UUO). **Methods** (1) UUO model was set up in eIF6^{+/-} and eIF6^{+/+} mice. (2) HE and Masson staining were used to histologically assess the interstitial deposition of collagen in mouse kidney. Immunohistochemistry and image analysis were applied to analyze the expression of α -SMA and TGF- β 1 in mouse kidney as well as eIF6 in human kidney samples. **Results** 10 days after unilateral ureteral obstruction, more kidney interstitial fibrosis tissues were found in eIF6^{+/-} mice than that in eIF6^{+/+} mice. TGF- β 1 and α -SMA were expressed more intensive in tubular epithelial cells of eIF6^{+/-} mice than that of eIF6^{+/+} mice in the UUO model. Expression of eIF6 is lower in the region of fibrosis than that in non-fibrotic area. **Conclusion** eIF6 might be involved in the development of kidney interstitial tissue fibrosis by regulating the expression of TGF- β 1.

Key words: eukaryotic initiation factor 6; transforming growth factor- β 1; renal tubular epithelial cell; kidney; fibrosis

肾间质纤维化是一个多细胞、多因子、多因素共同参与的复杂过程,是各种慢性肾病发展到晚期的共同标志性病理性变化,表现为肾间质成纤维细胞增生,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肾脏沉积引起的肾小管损伤,肾功能不全。真核启动因子 6(eukaryotic initiation factor 6, eIF6)作为一种核基质蛋白,参与核糖体的装配,并可转位至细胞核中参与翻译起始调控^[1-2]。谭江琳等^[3]发现 eIF6 能够影响皮肤成纤维细胞分泌转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、Collagen I,那么 eIF6 是否与肾间质纤维化有关呢?因此,本研究通过对对比研究 eIF6^{+/-}基因敲除小鼠和 eIF6 野生型小鼠单侧输尿管结扎(UUO)模型,试图了解 eIF6 在小鼠肾间质纤维化过程中可能的作用。

1 材料与与方法

1.1 实验动物 SPF 级 eIF6^{+/-}小鼠(引进于 San Raffaele Scientific Institute,意大利)和对照野生型 C57BL/6 背景小鼠,由第三军医大学附属大坪医院动物所饲养。实验动物分笼饲养,自由进食,室温 26℃,湿度 50%,选取同窝,体质量(20±2)g,8~10 周龄,雄性 eIF6^{+/-}小鼠和野生型小鼠,每次实验 4~6 对小鼠,重复 3 次,分为 eIF6^{+/+} UUO 组, eIF6^{+/+} 对照组, eIF6^{+/-} UUO 组, eIF6^{+/-} 对照组。

1.2 仪器与试剂 MASSON 染色试剂盒(福州新迈公司), DAB 显色试剂盒(北京中杉公司), HRP 标记兔抗小鼠 IgG(武汉博士德公司), HRP 标记羊抗兔 IgG(武汉博士德公司),兔抗小鼠 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)单克隆抗体(Abcam,美国),兔抗鼠 TGF- β 1 单克隆抗体(武汉博士德公司),4%多聚甲醛,戊巴比妥,Image-Pro Plus 6.0 软件。

1.3 方法

1.3.1 小鼠肾纤维化模型的建立 (1)UUO 组:1%戊巴比妥(0.01 g/mL)腹腔注射麻醉小鼠,腹部脱毛,乙醇消毒。通过腹部正中切口,暴露左侧输尿管;缝线分别结扎上 1/3 和 2/3 分界处 2 次,两结扎处之间离断输尿管,完全阻断左侧输尿管;复位肾脏及肠管,分层缝合肌肉、皮肤,结扎后 10 d 处死小鼠,取材。(2)对照组:分离出左侧输尿管后不结扎,复位肾脏及肠管,分层缝合肌肉、皮肤,10 d 后处死小鼠,取材。

1.3.2 小鼠肾脏病理样本制作与观察 肾脏标本置于 4%多聚甲醛固定,24 h 后进行石蜡包埋,5 μ m 厚度切片,苏木素伊红和 Masson 染色,光镜下观察肾小管和肾间质病变情况,每张切片在 200 倍视野下随机选取 5 个肾小管的视野获取图像。利用 IPP 软件对图像进行定量测量胶原纤维表达情况,结果用 5 个视野胶原纤维面积/视野面积的均值表示,均无空白视野。

1.3.3 免疫组化观察 TGF- β 1、 α -SMA 和 eIF6 4%多聚甲醛固定标本,24 h后常规脱水、石蜡包埋,5 μ m切片。脱蜡至失水。分别进行免疫组化染色(ABC法),PBS液代替一抗作为空白对照。具体步骤:PBS液冲洗 5 min \times 3次,加入抗原修复液 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,PBS液冲洗 5 min \times 3次,3% H_2O_2 常温下孵育 30 min 消除内源性过氧化物酶活性,PBS液冲洗 5 min \times 3次。山羊血清封闭室温孵育 30 min后倾去,PBS液冲洗 5 min \times 3次,分别滴加兔抗小鼠 TGF- β 1 单克隆抗体、兔抗小鼠 α -SMA 单克隆抗体置于 4 $^{\circ}$ C 过夜,PBS液冲洗 5 min \times 3次,滴加生物素化二抗工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,PBS液冲洗 5 min \times 3次,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,PBS液冲洗 5 min \times 3次。DAB 显色剂显色,自来水冲洗,苏木素复染,梯度乙醇脱水、二甲苯透明、封片。PBS代一抗作为空白对照。小鼠肾脏组织的每张切片在 400 倍视野下随机选取 5 个肾小管的视野获取图像,IPP 分别分析 TGF- β 1 和 α -SMA 的表达强度,以积分光密度(IOD)表示阳性物质水平。

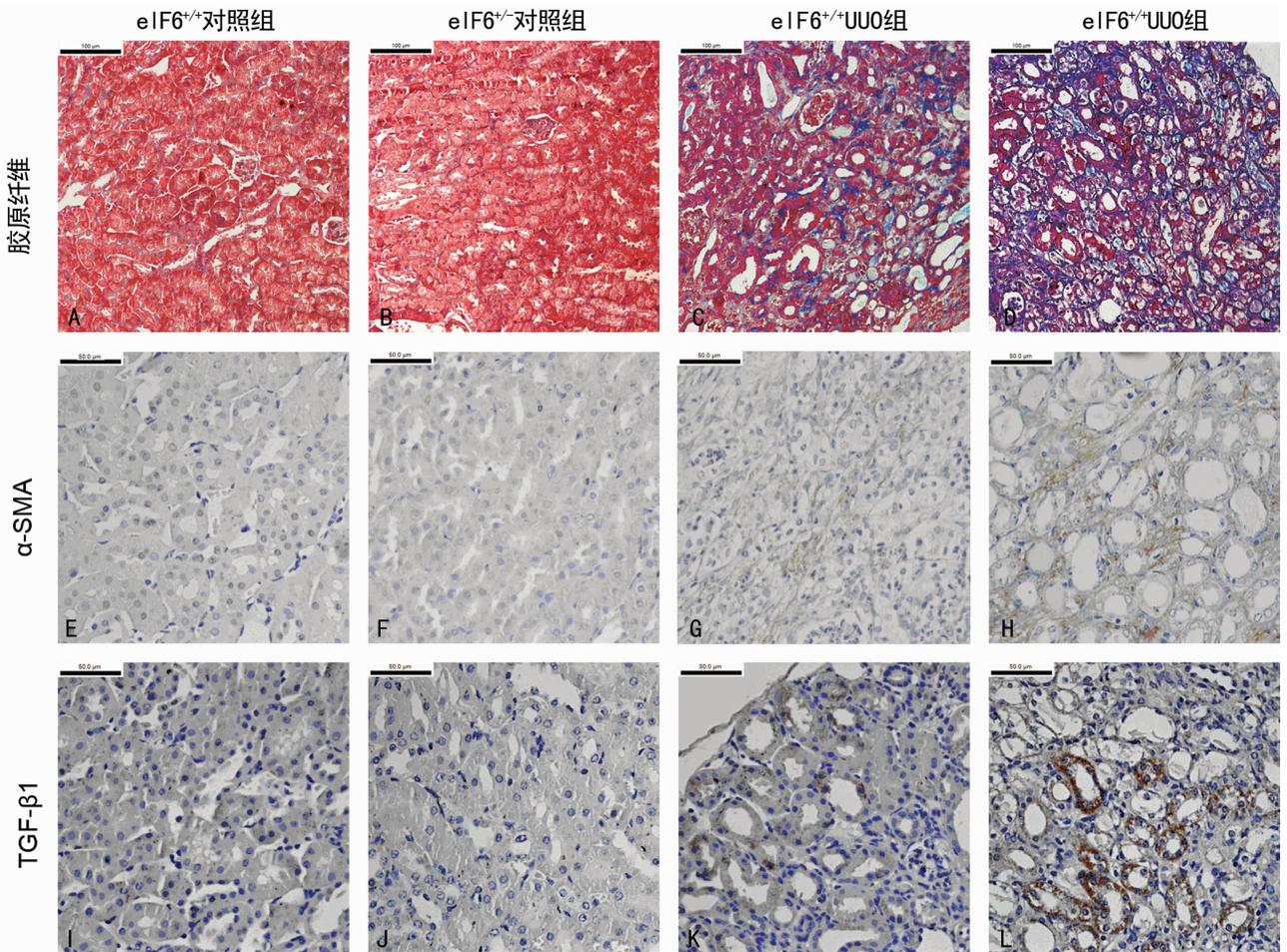
1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组小鼠肾间质胶原纤维沉积、 α -SMA 和 TGF- β 1 表达比较 成功建立 UUO 模型,eIF6 $^{+/-}$ 小鼠肾间质胶原沉积比

eIF6 $^{+/+}$ 小鼠的肾脏显著增多。对照组小鼠肾脏组织结构正常,均未见明显病变。eIF6 $^{+/+}$ 小鼠和 eIF6 $^{+/-}$ 小鼠的肾间质均有少量炎症细胞浸润,见大量嗜伊红蛋白沉积于扩张积水的肾脏组织周边,并形成纤维膜。UUO 组肾脏少量炎症细胞浸润,肾小管肿胀明显,可见部分空泡样变性,远端肾小管扩张,上皮细胞脱落,肾实质萎缩。Masson 染色见 UUO 模型小鼠肾小管间质胶原沉积,纤维增生(图 1),提示成功建立小鼠 UUO 模型。在 UUO 模型中,eIF6 $^{+/-}$ 小鼠肾脏组织比 eIF6 $^{+/+}$ 小鼠表达更多的 α -SMA 和 TGF- β 1。免疫组化染色发现, α -SMA 在对照组小鼠内仅在肾血管内皮细胞表达,而输尿管结扎 10 d 后, α -SMA 则可在肾小管间质成纤维样细胞和肾血管内皮细胞表达明显(图 1)。对照组的肾脏组织无明显 TGF- β 1 表达,而 UUO 组可见 TGF- β 1 表达于肾间质、纤维化增生区域、肾血管内皮细胞及炎症细胞中,见图 1。

2.2 各组小鼠肾脏组织中胶原纤维、 α -SMA 和 TGF- β 1 表达定量比较 在 UUO 模型中,HE 染色与 Masson 染色显示 eIF6 $^{+/-}$ 小鼠肾脏组织比 eIF6 $^{+/+}$ 小鼠产生了更多的纤维化组织,形态计量证明二者之间差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 1。免疫组化 IPP 定量分析 α -SMA 表达的结果显示,eIF6 $^{+/-}$ UUO 组 α -SMA 较 eIF6 $^{+/+}$ UUO 组显著增多($P < 0.01$)。在肾小管上皮细胞中,eIF6 $^{+/-}$ UUO 组表达 TGF- β 1 水平较 eIF6 $^{+/+}$ UUO 组显著增高($P < 0.01$),见图 2。



A~D: Masson 染色下的胶原纤维($\times 200$);E~H: α -SMA($\times 400$);I~L:TGF- β 1($\times 400$)。

图 1 eIF6 对小鼠 UUO 模型中胶原纤维、 α -SMA、TGF- β 1 表达的影响

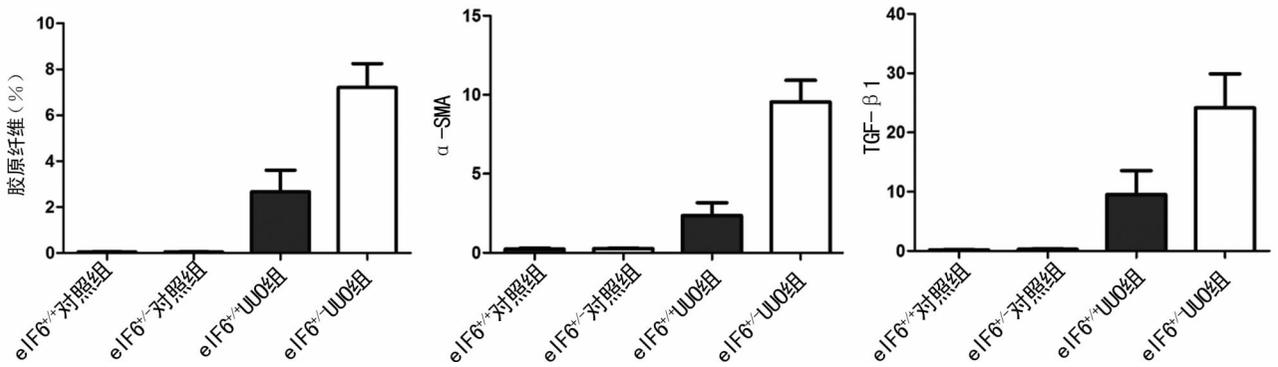


图 2 eIF6 对小鼠肾脏组织中胶原纤维、 α -SMA、TGF- β 1 表达的定量分析

3 讨论

肾小动脉硬化、肾间质纤维化、肾脏慢性炎症等,可造成肾脏的进行性损伤,最终发展成纤维化肾病^[4-6]。纤维化肾病的发展可以简单地分为 4 期。第 1 期为损伤期,成纤维细胞、内皮细胞、肾小管上皮细胞、炎症细胞等被激活,并开始分泌各种因子;第 2 期为纤维化因子分泌期,包括 TGF- β 1、血管紧张素 II、血小板源性生长因子等分泌增加;第 3 期为纤维化增生期,表现 ECM 的分泌增多和降解减少导致的 ECM 沉积;第 4 期是肾功能损害期,由于 ECM 的过度增加,最终导致不可逆转的肾单位持续性减少,肾功能损害^[7]。

ECM 大量沉积是肾间质纤维化的标志性病理变化。成纤维细胞和肌成纤维细胞的增生是促进肾间质纤维化的关键因素,成纤维细胞能够合成并分泌 I、III、IV 型胶原及纤连蛋白等多种 ECM^[8-10]。肌成纤维细胞则被认为是活化状态的成纤维细胞,能够分泌 ECM,是引起细胞外基质在肾小管间质沉积的主要原因^[11]。EMT 也是肾间质纤维化的重要机制之一,肾小管上皮细胞转化为成纤维细胞或肌成纤维细胞从而引起肾纤维化。发生 EMT 的肾小管上皮细胞其 I/III 型胶原蛋白和纤维连接蛋白的表达增高,并开始表达 α -SMA,肾小管上皮细胞中 α -SMA 的表达也作为 EMT 发生的标志之一^[12-13]。Valerie 等^[14]的研究发现,肾纤维化过程中生成的肌成纤维细胞 5% 来自 EMT。Biffo 等^[15]研究了 eIF6 基因半量敲降小鼠(eIF6^{+/-}小鼠),发现该小鼠的 eIF6 在皮肤及各器官的表达显著下降。本实验研究了小鼠 UUO 模型中胶原纤维的表达和肌成纤维细胞标志物 α -SMA 的表达,发现 eIF6^{+/-} UUO 组肾小管间质 α -SMA 的表达较 eIF6^{+/+} UUO 组显著增高,胶原纤维沉积严重,eIF6 敲降后肾纤维化的程度显著增高,提示 eIF6 参与了调控小鼠肾间质纤维化的发生、发展。

eIF6 普遍存在于上皮细胞、成纤维细胞等多种细胞内^[15-16]。作为核基质蛋白,参与核糖体 60S 亚基的装配^[1],是翻译的起始的限速因子^[2]。有研究等利用免疫共沉淀和荧光共振能量转移技术(fluorescence resonance energy transfer, FRET)证明了 eIF6 与纤维化相关因子 P311 存在相互作用^[17-19]。谭江琳等^[3]报道了 eIF6 能够抑制皮肤成纤维细胞 TGF- β 1、Collagen I 的分泌^[3]。而 TGF- β 1 是肾纤维化过程中起着核心作用的生长因子,多种肾小球疾病及肾间质纤维化疾病都有报道 TGF- β 1 过度表达^[20],或者和 TGF- β 1 有关基因表达相关^[21-22]。受损伤的肾小球细胞及肾小管上皮细胞都能表达 TGF- β ^[23-24]。TGF- β 1 能够促进成纤维细胞向肌成纤维细胞分化,诱导 α -SMA 的表达^[25],促进 ECM 的生成,抑制 ECM 的分解,促进肾小管上皮细胞向肌成纤维细胞转化。Hwang 等^[26]通过 SiRNA 抑制 TGF- β 1 的表达,延迟了肾小管纤维化

的进程。本研究证明当敲降小鼠的 eIF6 后,肾小管上皮细胞和肾间质细胞表达 TGF- β 1 水平显著增加,提示 eIF6 对肾间质纤维化的抑制作用可能是通过抑制 TGF- β 1 的表达而实现。

综上所述,本研究初步证明 eIF6 参与了肾积水组织纤维化病理过程,提示 eIF6 可能成为防治肾纤维化新的药物靶点。

参考文献:

- [1] Sanvito F, Piatti S, Villa A, et al. The beta4 integrin interactor p27(BBP/eIF6) is an essential nuclear matrix protein involved in 60S ribosomal subunit assembly[J]. *J Cell Biol*, 1999, 144(5): 823-837.
- [2] Valentina G, Annarita M, Barbieri AM, et al. Eukaryotic initiation factor 6 is rate-limiting in translation, growth and transformation[J]. *Nature*, 2008, 455(7213): 684-688.
- [3] 谭江琳, 彭旭, 袁顺宗, 等. β 4 整合素结合蛋白调控成纤维细胞胞外基质生成的实验研究[J]. *创伤外科杂志*, 2009, 11(5): 397-401.
- [4] Hills CE, Squires PE. The role of TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transition in diabetic nephropathy[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011, 22(3): 131-139.
- [5] Soma M, Robert S. Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis[J]. *Int J Exp Path*, 2011, 92(3): 158-167.
- [6] Agnieszka AP, Isabelle JS, Cecile PH, et al. Patterns of interstitial inflammation during the evolution of renal injury in experimental aristolochic acid nephropathy[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(8): 2480-2491.
- [7] Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis[J]. *Pediatr Nephrol*, 2000, 15(3/4): 290-301.
- [8] Rodemann HP, Muller GA. Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: II. in vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis[J]. *Am J Kidney Dis*, 1991, 17(6): 684-686.
- [9] Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, et al. Myofibroblasts and mechano regulation of connective tissue remodelling[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(5): 349-363.
- [10] Jiang L, Xu LL, Mao JH, et al. Rheb/mTORC1 signaling promotes kidney fibroblast activation and fibrosis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(7): 1114-1126.
- [11] Qi W, Chen X, Poronnik P, et al. The renal cortical fibroblast in renal tubulointerstitial fibrosis[J]. *Int J Biochem*

- Cell Biol, 2006, 38(1): 1-5.
- [12] Guarino M, Tosoni A, Nebuloni M. Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition[J]. Hum Pathol, 2009, 40(10): 1365-1376.
- [13] Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions[J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1429-1437.
- [14] Valerie SL, Gangadhar T. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis[J]. Nature Med, 2013, 19(8): 1047-1053.
- [15] Biffo S, Sanvito F, Costa S, et al. Isolation of a novel beta4 integrin binding protein(p27(BBP)) highly expressed in epithelial cells[J]. J Biol Chem, 1997, 272(48): 30314-30321.
- [16] Sanvito F, Vivoli F, Gambini S, et al. Expression of a highly conserved protein, p27BBP, during the progression of human colorectal cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60(3): 510-516.
- [17] 袁顺宗, 吴军, 易绍萱, 等. 以酵母双杂交系统从成人肝 cDNA 文库中筛选与研究 P311 相互作用蛋白的基因序列[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(14): 1428-1431.
- [18] 袁顺宗, 谭江琳, 彭旭, 等. 荧光共振能量转移技术检测 ITGB4BP 与 P311 间的相互作用[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(16): 1555-1558.
- [19] Pan D, Zhe X, Jakkaraju S, et al. P311 induces a TGF-beta 1 independent, nonfibrogenic myofibroblast phenotype [J]. Clin Invest, 2002, 110(9): 1349-1358.
- [20] Niemer Z, Stein H, Noronha I. PDGF and TGF-beta contribute to the natural course of human IgA glomerulonephritis[J]. Kidney Int, 1995, 48(5): 1530-1541.
- [21] Brezzi B, Del Prete D, Lupo A, et al. Primary IgA nephropathy is more severe in TGF-beta1 high secretor patients[J]. Nephrol, 2009, 22(6): 747-759.
- [22] Vuong MT, Lundberg S, Gunnarsson I, et al. Genetic variation in the transforming growth factor-beta1 gene is associated with susceptibility to IgA nephropathy [J]. Nephrol Dial Transplant, 2009, 24(10): 3061-3067.
- [23] Yamamoto T, Noble NA, Cohen A, et al. Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular diseases[J]. Kidney Int, 1996, 49(2): 461-469.
- [24] Wu FC, Chiang WC, Lai CF, et al. Transforming growth factor beta-1 stimulates profibrotic epithelial signaling to activate pericyte-myofibroblast transition in obstructive kidney fibrosis[J]. Am J Pathol, 2013, 182(1): 118-131.
- [25] Arora PD, Narani N, McCulloch CA. The compliance of collagen gels regulates transforming growth factor-beta induction of alpha-smooth muscle actin in fibroblasts[J]. Am J Pathol, 1999, 154(3): 871-882.
- [26] Hwang M, Kim HJ, Noh HJ, et al. TGF-beta1 siRNA suppresses the tubulointerstitial fibrosis in the kidney of ureteral obstruction[J]. Exp Mol Pathol, 2006, 81(1): 48-54.

(收稿日期: 2013-11-08 修回日期: 2014-01-22)

(上接第 2021 页)

- milk fat globule glycoprotein MFG-E8[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 254(3): 522-528.
- [11] Burgess BL, Abrams TA, Nagata S, et al. MFG-E8 in the retina and retinal pigment epithelium of rat and mouse [J]. Mol Vis, 2006(12): 1437-1447.
- [12] Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, et al. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes[J]. Nature, 2002, 417(6885): 182-187.
- [13] Silvestre JS, Thery C, Hamard G, et al. Lactadherin promotes VEGF-dependent neovascularization[J]. Nat Med, 2005, 11(5): 499-506.
- [14] Watanabe T, Totsuka R, Miyatani S, et al. Production of the long and short forms of MFG-E8 by epidermal keratinocytes[J]. Cell Tissue Res, 2005, 321(2): 185-193.
- [15] Franchi A, Bocca S, Anderson S, et al. Expression of milk fat globule EGF-factor 8(MFG-E8) mRNA and protein in the human endometrium and its regulation by prolactin [J]. Mol Hum Reprod, 2011, 17(6): 360-371.
- [16] Cui T, Miksa M, Wu R, et al. Milk fat globule epidermal growth factor 8 attenuates acute lung injury in mice after intestinal ischemia and reperfusion[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 181(3): 238-246.
- [17] Treglia-Dal Lago M, Jukemura J, Machado MC, et al. Phagocytosis and production of H₂O₂ by human peripheral blood mononuclear cells from patients with obstructive jaundice[J]. Pancreatology, 2006, 6(4): 273-278.
- [18] Aziz M, Jacob A, Matsuda A, et al. Review: milk fat globule-EGF factor 8 expression, function and plausible signal transduction in resolving inflammation [J]. Apoptosis, 2011, 16(11): 1077-1086.
- [19] White MF, Kahn CR. The insulin signaling system[J]. J Biol Chem, 1994, 269(1): 1-4.
- [20] Gross KL, Cidlowski JA. Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair [J]. Trends Endocrinol Metab, 2008, 19(9): 331-339.
- [21] Noda M, Suzumura A. Sweepers in the CNS: microglial migration and phagocytosis in the alzheimer disease pathogenesis[J]. Int J Alzheimers Dis, 2012: 891087.
- [22] Chen JS, Ker CG, Lee KT, et al. Changes of insulin and somatostatin and their relationship to liver regeneration in experimental obstructive jaundice[J]. Kaohsiung J Med Sci, 1997, 13(11): 653-660.

(收稿日期: 2013-12-08 修回日期: 2014-02-22)