

整合素连接激酶在梗阻性肾病合并肾小管酸中毒中的表达

陈琇萌,俞小敏[△],张惠丽

(广州医科大学附属第一医院肾内科 510120)

摘要:目的 观察整合素连接激酶(ILK)在梗阻性肾病合并肾小管酸中毒中的表达,探讨肾小管酸中毒在致肾间质纤维化中的作用。方法 实验大鼠 75 只,其中假手术组大鼠 25 只,单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠 50 只。UUO 大鼠术后第 7 天分为肾小管酸中毒大鼠(UUO1 组, $n=31$)和非肾小管酸中毒大鼠(UUO2 组, $n=19$),同时做肾功能与组织学检测,于术后 7、14、21、28 d 时分批处死大鼠,免疫组织化学与 Western blot 法测定肾组织中 ILK 的表达。结果 与 UUO2 组比较,UUO1 组光镜下炎症细胞浸润和间质纤维化程度更严重;假手术组仅有少量的 ILK 蛋白表达,几乎无纤粘连(FN)蛋白的沉积,UUO2 组 ILK 蛋白表达及 FN 蛋白的沉积增多,而 UUO1 组较 UUO2 组增多。结论 在梗阻性肾病中,肾小管酸中毒可上调 ILK 蛋白的表达与 FN 的沉积,加速肾小管间质纤维化。

关键词:肾病;酸中毒;肾小管性;整合素连接激酶;梗阻性

中图分类号:R692

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)34-4579-02

Expression of integrin linked kinase in obstructive nephropathy with renal tubular acidosis

Chen Xiუმeng, Yu Xiaomin[△], Zhang Huili

(Department of Nephrology Medicine, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract: Objective To observe integrin linked kinase(ILK) expression in obstructive nephropathy with renal tubular acidosis, and investigate the function of renal tubular acidosis on renal interstitial fibrosis. **Methods** 75 rats were divided into control group and unilateral ureteral obstruction(unilateral ureteral obstruction(UUO, $n=25$) group, and other 50 rats in UUO group. UUO group was divided into renal tubular acidosis (UUO1 group, $n=31$) group and non-renal tubular acidosis(UUO2, $n=19$) group, renal function and histology test was carried at the same time. 7, 14, 21, 28 days later after operation, the rats were killed in batches, then measured the expression of ILK in renal tissue by immunohistochemistry and western blot. **Results** Inflammatory cell infiltration and interstitial fibrosis of UUO1 group were more serious under the light microscope than that of UUO2 group; there was only a small amount of ILK protein expression in control group, almost no FN protein deposition, expression of ILK and FN protein precipitation of UUO2 group increased, and UUO1 group was more than UUO2 group. **Conclusion** In obstructive nephropathy, renal tubular acidosis can up-regulate expression of ILK and FN sedimentation, then lead to interstitial fibrosis promotion.

Key words: nephrology; acidosis, renal tubular; integrin linked kinase; obstructive

梗阻性肾病可导致肾小管间质纤维化,慢性肾衰竭的进展与肾小管间质损害和纤维化关系密切。梗阻性肾病常合并肾小管酸中毒,肾小管酸中毒不但加剧肾结石的形成、导致内环境紊乱,而且进一步加重肾小管间质损害和纤维化,加速肾功能衰竭。本研究通过观察单侧输尿管梗阻(UUO)合并肾小管酸中毒的小鼠模型整合素连接激酶(ILK)的表达,了解肾小管间质纤维化的启动机制及加重因素,探讨肾小管酸中毒在梗阻性肾病中诱导肾小管间质纤维化的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 试剂 Western blot 和免疫组织化学法的 MMP-9 抗体和 ILK 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,免疫组织化学二抗(小鼠抗兔)购自美国 Dako 公司,免疫发光二抗(山羊抗兔)购自美国 Cell Signaling 公司。

1.2 方 法

1.2.1 动物模型的建立与分组 实验大鼠由广州医科大学动物中心提供,75 只清洁级成年雄性大鼠,8~10 周龄,体质量 150~220 g,分为假手术组(对照, $n=25$)和 UUO 组大鼠($n=50$)。建立 UUO 组模型^[1](3% 水合氯醛腹腔麻醉 30 mL/kg)。假手术组除不结扎输尿管外,其余步骤与 UUO 组相同。检测小鼠血、尿钾和 pH 值、尿液中可滴定酸和铵离子、

尿二氧化碳分压(PCO₂)/血 PCO₂ 值,于术后第 7 天筛选出肾小管酸中毒组(UUO1 组, $n=31$)和非肾小管酸中毒组(UUO2 组, $n=19$),分 4 个时期(7、14、21、28 d)处死各组大鼠,取左侧部分肾组织置于 10% 甲醛中,并予石蜡包埋;其余肾组织液氮冰冻,置于-80℃ 保存。

1.2.2 血、尿生化检测 采用生化法检测血、尿钾和 pH 值、尿液中可滴定酸和铵离子、尿 PCO₂/血 PCO₂ 值。

1.2.3 肾组织病理学检查 石蜡组织切片作 HE、PAS 和 Masson 染色。采用百分比评分法评估肾小管损伤程度,计算 30 个高倍视野($\times 400$)肾皮质中出现损害(肾小管扩张、管型、坏死或小管炎、萎缩)的肾小管数目及总肾小管数,以损害的肾小管数占总肾小管数的百分比表示。

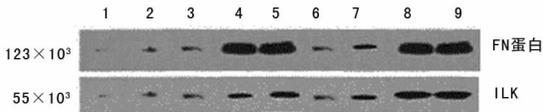
1.2.4 Western blot 法检测肾组织 ILK、纤粘连(FN)蛋白的表达水平 (1)蛋白质抽提、聚丙烯酰胺凝胶电泳及转膜。(2)硝酸纤维素(NC)膜置于 50 g/L 牛奶-TBS 溶液中室温封闭 1 h,加入 1:2 000 抗大鼠一抗,室温孵育 1 h,1 g/L TBS-Tween 溶液洗涤 3 次,再加入 1:2 000 HRP-conjugated 二抗,室温孵育 1 h,1 g/L TBS-Tween 溶液洗涤 3 次,TBS 溶液洗涤 5 min, Lumi-GLO 室温孵育 1 min,暗房中冲洗胶片。(3)半定量方法分析肾组织中 ILK、FN 蛋白表达水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用 *t* 检验或方差分析, 相关性分析采用 Spearman 等级相关分析法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 光镜下肾脏病理改变 与假手术组相比, UUO2 组术后 7 d 肾间质炎症加重, 集合管、肾小管水肿、扩张; 14、21 d 肾小管基底膜开始增厚、上皮细胞肿胀、变性, 后期肾间质出现纤维化改变; 28 d 时质内有大量肌成纤维增生和纤维结缔组织形成, 肾小管全程扩张, 上皮细胞萎缩。UUO1 组在各期病较 UUO2 组炎症细胞浸润和间质纤维化加重, 28 d 时基本无正常结构的肾小球。

2.2 大鼠肾组织 ILK 与 FN 蛋白的表达 UUO2 组大鼠肾组织中可检测到 FN 蛋白的沉积和 ILK 的表达, UUO1 大鼠肾组织 FN 蛋白的沉积和 ILK 的表达高于 UUO2 组。假手术组仅有少量的 ILK 蛋白表达, 几乎无 FN 蛋白的沉积, UUO2 组 ILK 蛋白表达及 FN 蛋白的沉积增多, 而 UUO1 组较 UUO2 组增多。UUO1、UUO2 两组差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 1。相关性分析结果表明, 肾组织中 ILK 的表达水平与 FN 蛋白沉积的程度呈正相关。



1: 28 d 对照组; 2~5: 7、14、21、28 d UUO1 组; 6~9: 7、14、21、28 d UUO2 组。

图 1 大鼠肾组织 ILK 和 FN 蛋白的表达情况

3 讨论

梗阻性肾病可致肾小管尤其是其远端的管腔负电位无法维持(电压依赖型), 使泌氢入管腔的速率减慢, 导致非分泌缺陷性酸化功能障碍, 即远端肾小管酸中毒。临床表现为尿中可滴定酸和铵离子减少、尿 pH 上升 (> 6.0)、血 pH 下降(正常阴离子间隙的高氯性代谢性酸中毒)、低钾血症及钙磷代谢障碍等。肾小管酸中毒不仅造成内环境的紊乱、泌尿系结石形成, 更可能造成肾小管受损, 最终导致肾间质-小管纤维化。肾小管间质纤维化是梗阻性肾病进展为终末期肾衰竭的最终路径之一。

在慢性肾衰竭肾间质纤维化过程中, 会产生多种细胞因子、生长因子及血管活性物质。上皮细胞向肌成纤维细胞的转分化是参与肾小管间质纤维化的重要机制之一^[2]。转分化受多种细胞因子、生长因子和激素的调节, 值得强调的是, TGF- β 1 诱导转分化的过程是在病理状态下导致肾间质纤维化的主要途径。而目前研究认为, 梗阻性肾病时局部和系统产生的细胞因子和血管活性物质激活细胞, 使浸润的单核巨噬细胞及转分化的细胞分泌细胞外基质显著增多。其中构成细胞外基质的重要组成部分 FN 蛋白在间质中大量聚积是导致肾小管间质纤维化的病理基础^[3]。TGF- β 1 具有多种生物学功能, 其中以在组织器官免疫以及非免疫损伤后瘢痕和纤维化形成过程中的作用最令人关注, 是迄今为止发现的在纤维和结缔组织基质发生过程中最为主要的细胞因子。TGF- β 1 的高表达在肾脏纤维化的形成中的作用已明确, TGF- β 1 族细胞因子通过不同信号传导途径产生多种生物效应, 其中 Smads 家族蛋白是其细胞内信号传导通路中的重要因子^[4]。参与 TGF2/Smad 这一信号传导途径的 Smads 家族蛋白主要有 Smad2、3、4、7。Snail 抑

制 E-钙黏蛋白破坏上皮细胞极性, 将上皮细胞转换成间充质细胞; Snail 上调基质金属蛋白酶的表达破坏小管基底膜; 国外学者认为 Snail 和 LEF-1 转录抑制的相互作用是 TGF2- β 1 诱导的上皮细胞间质转化的必须因素。而 ILK 是其信号传导途径的效应分子, 介导了 TGF2- β 1 诱导肾小管转分化的各个关键步骤。

Li 等^[5]提出 TGF- β 1-Smad-ILK-EMT 轴的存在, ILK 在 TGF- β 诱导的 EMT 可能起关键作用。ILK 能够调节 FN 蛋白的组装与沉积, 即使使细胞产生的分泌型 FN 转分化组装成不溶的 FN 而直接沉积于细胞间隙, 以此参与细胞外基质的聚积^[6]。ILK 是 1996 年 Hannigan 以 β 1 整合素胞质域为诱饵, 应用酵母双杂交系统发现的一种具有多种功能的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶, ILK 能通过与整合素 β 1 亚单位胞内域相互作用, 介导细胞与细胞外基质(如 FN 蛋白)的连接^[7-8]。Li 等^[9]发现细胞与基质积聚的相互作用是由 ILK 介导完成, 与肾脏病变程度相关。ILK 能够直接参与细胞形态学的改变以及细胞的生长、分化和基因表达。在肾间质纤维化过程中, ILK 是诱导转分化的关键调节因子, 可能参与肾小管上皮细胞-肌成纤维细胞转分化的关键步骤。有研究表明, 在正常肾间质中无或仅有极少量 ILK 表达, 随肾间质病变程度的加重, ILK 表达量明显增加, 肾小管上皮细胞病变越重表达越强, 萎缩变性的肾小管表达最为强烈^[10]。

本研究通过动物实验发现, 合并肾小管酸中毒的 UUO 大鼠较未合并肾小管酸中毒的 UUO 大鼠肾组织 ILK 蛋白的表达与 FN 蛋白的沉积上升。因此认为梗阻性肾病合并肾小管酸中毒, 加速了肾小管间质纤维化, 与 ILK 的高表达及 FN 蛋白的沉积相关。本研究探讨的肾小管酸中毒通过上调 ILK 介导梗阻性肾病 FN 蛋白沉积的成因, 不仅有利于认识梗阻性肾病合并肾小管酸中毒导致肾小管间质纤维化的启动机制及加重因素, 而且有助于在此基础上发展防治梗阻性肾病的新措施。

参考文献:

- [1] Morrissey J, Hruska K, Guo G, et al. Bone morphogenetic protein-7 improves renal fibrosis and accelerates the return of renal function[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13 (Suppl 1): S14-21.
- [2] Bums WC, Kantharidis P, Thomas MC. The role of tubular epithelial-mesenchymal transition in progressive kidney disease[J]. Cells Tissues Organs, 2007, 185 (1/3): 222-231.
- [3] Fioretto P, Mauer M. Histopathology of diabetic nephropathy[J]. Semin Nephrol, 2007, 27(2): 195-207.
- [4] Li Y, Yang J, Dai C, et al. Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis[J]. J Clin Invest, 2003, 112(4): 503-516.
- [5] Li Y, Tan X, Dai C, et al. Inhibition of integrin-linked kinase activity reduces renal interstitial fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(9): 1907-1908.
- [6] He F, Yu L, Tong JR, et al. Role of integrin-linked kinase in renal tubular epithelial-mesenchymal transition and the regulatory effect of urokinase on its expression in mice with obstructive nephropathy[J]. Nan (下转第 4583 页)

则表明细胞水分越多,而细胞成分越多则胞质越多,因此,超声容易直接穿透过去而能量不易沉积。此外,水的比热较高,吸收相同的热量,温度上升比较缓慢,且血供丰富的肌瘤由于丰富的血流流动,很容易带走积聚的热能,使得能量难以长时间聚集,达到目的温度需要更长的时间,其疗效相对也会较差。本研究发现 MRI T₂WI 等信号和低信号的子宫肌瘤,尤其是 MRI T₂WI 等信号的子宫肌瘤,HIFU 治疗前先行无水乙醇的硬化治疗较单纯的 HIFU 治疗能够显著缩短治疗时间和降低治疗能量;而且,对于 MRI T₂WI 高信号的子宫肌瘤,采用 HIFU+PEI 治疗对肿瘤的消融率明显优于单纯 HIFU 治疗。总之,HIFU+PEI 治疗可以缩短麻醉时间,降低手术风险和并发症发生,减轻患者的痛苦,提高 HIFU 治疗的效率。其优点为:(1)可以减轻患者的痛苦,缓解患者的焦虑,利于患者情绪与心情的安宁;(2)可缩短麻醉时间,降低手术风险,并减少并发症发生的可能;(3)可提高 HIFU 治疗的效率。本研究中发现对于 T₂WI 高信号的子宫肌瘤,采用 HIFU+PEI 治疗与单纯 HIFU 治疗比较,在治疗时间与治疗能量上虽然差异无统计学意义($P>0.05$),但是却在肿瘤的消融率方面差异有统计学意义($P<0.05$),而这带给患者的益处不言而喻。

本研究中,先行 PEI 治疗能够帮助提高 HIFU 治疗的效果,与无水乙醇本身的作用是相关的。无水乙醇是目前超声介入治疗中最常用的一种硬化剂,其机制是无水乙醇进入瘤体后对组织蛋白的脱水凝固作用导致肌瘤细胞蛋白质变性使肌瘤缩小,同时使肌瘤内的小血管凝固变性,内皮细胞破坏,血管栓塞,从而破坏肌瘤组织内丰富的血管分布^[14-15]。对于 HIFU 治疗大多数富血供及 T₂WI 高信号的子宫肌瘤中所面对的障碍与困难,PEI 治疗可以先行帮助阻断肌瘤血供,部分硬化瘤细胞,帮助提高 HIFU 治疗效果。因此,应用 HIFU+PEI 治疗子宫肌瘤较单纯的 HIFU 治疗具有很大的优势。同时,在实际应用过程中也发现存在一些不足:(1)PEI 治疗虽然是微创技术,但相比 HIFU 治疗来说已是具有创性;(2)某些患者治疗过程中存在醉酒反应或者对乙醇过敏;(3)HIFU+PEI 治疗,其消融的范围会略大于肌瘤的实际大小。而这些就需要在今后的工作中进一步研究与解决。

参考文献:

- [1] 卫春芳,胡兵,姜立新. 超声造影评价高强度聚焦超声治疗子宫腺肌瘤的疗效[J/CD]. 中华医学超声杂志:电子版,2010,7(1):54-59.
- [2] 黄颖芬,欧阳旺,邹婷,等. 高强度聚焦超声治疗子宫肌瘤 60 例近期疗效观察[J]. 中国医药导报,2011,8(20):245-

246.

- [3] 陈景云,陈文直,朱丽,等. 子宫肌瘤血液供应特征对超声治疗剂量的影像[J]. 中华妇产科杂志,2011,46(6):403-406.
- [4] 陈文直,唐良苔,杨武威,等. 超声消融治疗子宫肌瘤的安全性及有效性[J]. 中华妇产科杂志,2010,45(12):909-912.
- [5] 杨武威,祝宝让,李静,等. 超声消融治疗子宫肌瘤的近期并发症及其影响因素分析[J]. 中华妇产科杂志,2010,45(12):913-916.
- [6] 吴蓉,胡兵. 影像学检查在高强度聚焦超声治疗骨肿瘤疗效评估中的价值[J]. 中国介入影像与治疗学,2008,5(1):79-82.
- [7] 祝宝让,杨武威,李静,等. 高强度聚焦超声消融子宫肌瘤疗效相关因素分析[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2012,6(2):374-377.
- [8] 郑建华,蔡丽瑛. 全子宫、次全子宫、筋膜内子宫切除术的特点及适应证[J]. 实用妇产科杂志,2007,23(12):716-717.
- [9] 蔡丽萍,王捍平,冯萍娟,等. 高强度聚焦超声治疗子宫肌瘤的疗效观察[J/CD]. 中华医学超声杂志:电子版,2008,5(5):819-823.
- [10] 彭晶晶,谭艳,魏东,等. 高强度聚焦超声刀治疗子宫肌瘤临床研究[J]. 介入放射学杂志,2010,19(11):875-877.
- [11] 陈建科,刘学明,张闻,等. 子宫肌瘤超声造影增强类型与高强度聚焦超声治疗疗效的关系[J]. 中国介入影像与治疗学,2010,7(4):428-431.
- [12] 申俊玲,邹建中,沈洁,等. MRI 在评价高强度聚焦超声治疗子宫肌瘤疗效中的应用[J]. 重庆医科大学学报,2008,33(12):1434-1437.
- [13] 朱丽,陈文直,陈锦云,等. 子宫肌瘤超声消融与 MRI 信号特征关系的研究[J]. 第三军医大学学报,2009,31(14):1370-1373.
- [14] 王锡斌. 超声引导穿刺注射无水乙醇治疗子宫肌瘤[J]. 中国介入影像与治疗学,2009,6(4):356-358.
- [15] Ho CS, Kachura JR, Gallinger S, et al. Percutaneous ethanol injection of unresectable medium-to-large-sized hepatomas using a multipronged needle: efficacy and safety [J]. Cardiovasc Intervent Radiol,2007,30(2):241-247.

(收稿日期:2014-06-03 修回日期:2014-08-07)

(上接第 4580 页)

Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao,2009,29(5):909-913.

- [7] Kanasaki K, Kanda Y, Palmsten K, et al. Integrin beta1-mediated matrix assembly and signaling are critical for the normal development and function of the kidney glomerulus[J]. Dev Biol,2008,313(2):584-593.
- [8] Liu BC, Li MX, Zhang JD, et al. Inhibition of integrin-linked kinase via a siRNA expression plasmid attenuates connective tissue growth factor-induced human proximal tubular epithelial cells to mesenchymal transition[J]. Am J Nephrol,2008,28

(1):143-151.

- [9] Li Y, Tan X, Dai C, et al. Inhibition of integrin-linked kinase attenuates renal interstitial fibrosis [J]. J Am Soc Nephrol,2009,20(9):1907-1918.
- [10] Friedrich EB, Liu E, Sinha S, et al. Integrin-linked kinase regulates endothelial cell survival and vascular development[J]. Mol Cell Biol,2004,24(18):8134-8144.

(收稿日期:2014-06-18 修回日期:2014-09-19)