

骨桥蛋白在糖尿病大鼠肾组织中的表达及意义

曹延萍 高峰 郝军 任毓卓 段惠军

【摘要】 目的 观察糖尿病大鼠肾组织中骨桥蛋白(OPN)的表达及其与巨噬细胞(CD68)、细胞增殖核抗原(PCNA)之间的关系,初步探讨其在糖尿病肾损害中的意义。方法 雄性 Wistar 大鼠被随机均分为对照组和糖尿病组,每组 24 只。腹腔单次注射链脲佐菌素(STZ)诱发糖尿病大鼠模型,采用免疫组化和蛋白质免疫印迹法(Western blotting)分别检测 OPN、CD68 及 PCNA 在肾组织的表达,原位杂交检测肾组织中 OPN mRNA 的表达。结果 与对照组比较,糖尿病组大鼠在注射 STZ 后 1、2、4 和 8 周,血糖、尿素氮(BUN)和 24 h 尿蛋白定量显著增高,肌酐清除率(CCr)显著降低;OPN 表达呈进行性增加并明显高于对照组(P 均 <0.05);1 周和 2 周时 PCNA 表达高于对照组,4 周和 8 周时 CD68 表达较对照组略有增高。结论 OPN 在糖尿病肾损害过程的早期可能与肾小管上皮细胞增殖有关,后期可能趋化巨噬细胞浸润。

【关键词】 糖尿病肾病; 骨桥蛋白; 巨噬细胞; 细胞增殖核抗原

Expression and implication of osteopontin in renal cortex of diabetic rats CAO Yan-ping, GAO Feng, HAO Jun, REN Yun-zhuo, DUAN Hui-jun. Department of Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei, China

Corresponding author: DUAN Hui-jun (Email: duanhuijun@hebmu.edu.cn)

【Abstract】 Objective To investigate the expression and implication of osteopontin (OPN) in renal cortex of diabetic rats. Methods Experimental diabetes was reproduced in uninephrectomized rats by giving streptozotocin (STZ). The animals were divided into two groups: control group and diabetic group (each $n=24$). Immunohistochemistry and Western blotting were used to detect the protein expression of OPN, CD68, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). At the same time the mRNA expression of OPN was detected by in situ hybridization. Results Compared with control group, blood glucose, blood urea nitrogen (BUN), 24-hour urine protein quantum and quantification of OPN protein significantly increased while creatinine clearance rate (CCr) was significantly decreased in diabetic rat group 1, 2, 4 and 8 weeks after STZ injection. The protein of PCNA were also higher than that of control group 1 and 2 weeks after STZ injection (all $P<0.05$), and the increase in CD68 was observed at week 4 and week 8. Conclusion Overexpression of OPN may be responsible for the proliferation of tubular cells at early stage of diabetic nephropathy and for the accumulation of macrophage at later stage.

【Key words】 diabetic nephropathy; osteopontin; macrophage; proliferating cell nuclear antigen

骨桥蛋白(OPN)是一种分泌型酸性糖化磷蛋白,其近年来在肾脏疾病发生过程中的重要作用已逐渐被认识。OPN 具有致炎和保护的双重作用,在不同肾疾病模型中表达部位和作用都不尽相同,在糖尿病肾病(DN)的研究中多是检测其表达情况及影响因素,关于其在糖尿病肾损害中发挥的作用目前研究较少。我们采用免疫组化、原位杂交、蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测了糖尿病大鼠肾组织中 OPN、巨噬细胞(CD68)和细胞增殖核抗原(PCNA)的表达,初步探讨 OPN 在糖尿病肾组织病变中的表达、定位及意义,为进一步阐明 OPN 在 DN 发生发展中的作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料:雄性 Wistar 大鼠 48 只,体重 120~150 g,由河北省实验动物中心提供。链脲佐菌素(STZ)购自美国 Sigma 公司,小鼠抗大鼠 OPN 单克隆抗体(单抗)购自美国 Santa Cruz 公司,小鼠抗大鼠 CD68 单抗购自美国 NeoMarker 公司,小鼠抗大鼠 PCNA 单抗和 OPN 原位杂交试剂盒购自武汉博士德生物工程公司。

1.2 糖尿病大鼠模型制备和分组:48 只大鼠用戊巴比妥(40 mg/kg)腹腔注射麻醉后行右肾切除术,2 周后切口完全愈合。按随机数字表法分为右肾切除对照组(24 只)和糖尿病组(24 只)。糖尿病组大鼠腹腔单次注射 STZ 65 mg/kg(用 pH 4.5 的枸橼酸钠缓冲液 0.1 mol/L 配制),对照组只注射等量枸橼酸钠缓冲液,48~72 h 后,血糖 ≥ 16.7 mmol/L、尿糖(+++)~(++++)的大鼠确定为糖尿病模型制备成功。实验期间动物自由进食、饮水,不使用胰岛素

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(C2006000825)

作者单位:050017 石家庄,河北医科大学病理教研室

通讯作者:段惠军,教授,博士生导师,Email:duanhj@hebmu.

edu.cn

作者简介:曹延萍(1978-),女(汉族),河北省人,医学硕士,医师。

及其他降糖药物。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 标本收集:分别于注射 STZ 后 1、2、4 和 8 周每组取 6 只大鼠,称重后用代谢笼收集 24 h 尿。股动脉取血,分离血清,用于生化指标测定。切取左侧肾脏,去掉被膜,滤纸吸干血迹后称重;取部分肾皮质保存于 -70 °C 冰箱中,用于 Western blotting 检测,部分肾组织置于体积分数为 4% 的多聚甲醛水溶液[用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)、焦碳酸二乙酯(DEPC)水配制]中固定用于原位杂交,部分用体积分数为 10% 的甲醛水溶液固定用于常规病理学观察及免疫组化观察。

1.3.2 血、尿生化指标的测定:用日立 7170A 全自动生化分析仪测定血糖、血尿素氮(BUN)、血肌酐(SCr)、尿肌酐(UCr)和 24 h 尿蛋白定量,并计算肌酐清除率(CCr)。

1.3.3 病理学观察:常规病理切片,片厚 4 μm,脱蜡至水,行苏木素-伊红(HE)和高碘酸-希夫(PAS)染色,光学显微镜观察。

1.3.4 免疫组化检测 OPN、CD68 和 PCNA 的表达:采用过氧化物酶标记的链霉卵白素法(SP 法)。切片厚 4 μm,常规脱蜡至水,一抗为 OPN、CD68 和 PCNA 单抗(1 : 200 稀释),二抗为生物素化兔抗大鼠 IgG,以 PBS 代替一抗作阴性对照,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色。

1.3.5 Western blotting 检测肾皮质 OPN 的表达:取肾皮质加入预冷的蛋白裂解液[由 2.5 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)、体积分数为 10% 的甘油和 1% 的 TritonX-100、质量分数为 1% 的脱氧胆酸钠和 0.1% 十二烷基硫酸钠(SDS)、10 mmol/L 焦磷酸钠、50 mmol/L 硫酸钠、1 mmol/L 苯甲基磺酰氟组成]裂解,蛋白质定量采用 Bradford 法,10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转膜至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,用含质量分数为 5% 脱脂奶粉

的蒸馏水 37 °C 封闭 2 h,加适量一抗(1 : 200 的 OPN 抗体)4 °C 过夜,洗膜后加适量辣根过氧化物酶标记的兔抗大鼠 IgG 二抗,于 37 °C 孵育 2 h, DAB 显色,每组重复 3 次,凝胶分析软件分析结果。

1.3.6 原位杂交检测 OPN mRNA 的表达:切片厚 6 μm,常规脱蜡至水,体积分数为 3% 的过氧化氢(H₂O₂)处理,胃蛋白酶消化,40 °C 杂交过夜,洗涤后依次滴加生物素化鼠抗地高辛和生物素化过氧化物酶,DAB 显色。

1.4 统计学处理:应用 SPSS 11.0 统计软件完成,所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用配对 *t* 检验和方差分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生化指标结果(表 1):与对照组比较,糖尿病组制模后不同时间点血糖、BUN 和 24 h 尿蛋白定量均显著增高,CCr 均显著降低,差异有统计学意义(*P* 均 < 0.05)。

2.2 OPN 的表达(彩色插页图 1):对照组肾皮质部分远端肾小管上皮细胞中有 OPN 表达,主要以上皮细胞管腔侧为主。糖尿病组于 1 周时皮质肾小管上皮细胞出现轻度表达,表达不仅局限于管腔侧,部分肾小管上皮细胞胞质中也有表达,肾小球可见弱阳性表达;2 周时皮质肾小管上皮细胞及肾小球 OPN 表达呈进行性增加,肾小管表达增加更明显;8 周时表达达到高峰,此时肾小管 OPN 的表达趋向弥漫性分布,肾小球呈阳性表达。

2.3 CD68 的表达:对照组仅有少量 CD68 阳性巨噬细胞散在分布于肾皮质。糖尿病组 1 周和 2 周未见巨噬细胞增多,4 周和 8 周巨噬细胞在局部肾间质有轻度增多趋势。

2.4 PCNA 的表达(彩色插页图 2):PCNA 蛋白在细胞核表达,细胞核呈棕色为阳性细胞。对照组仅在肾小管有极少量阳性细胞。糖尿病组 1 周肾小球、肾小管均出现阳性细胞,表达高于对照组;2 周时肾小

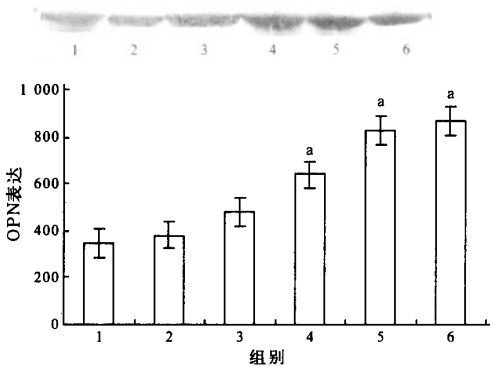
表 1 对照组及糖尿病组大鼠血糖、BUN、CCr 及 24 h 尿蛋白定量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	动物数	血糖 (mmol/L)	BUN (mmol/L)	CCr (ml/min)	24 h 尿蛋白定量 (mg)
对照组	1 周	24	7.89 ± 1.25	5.24 ± 0.11	0.69 ± 0.37	5.45 ± 1.12
	2 周	24	8.75 ± 0.63	5.34 ± 0.23	0.67 ± 0.18	5.78 ± 1.33
	4 周	24	7.95 ± 0.46	5.47 ± 0.15	0.67 ± 0.17	6.35 ± 1.24
	8 周	24	8.68 ± 0.66	5.81 ± 0.13	0.64 ± 0.21	6.57 ± 1.03
糖尿病组	1 周	24	19.99 ± 1.76*	10.18 ± 1.54*	0.24 ± 0.27*	9.87 ± 1.07*
	2 周	24	23.72 ± 1.48*	10.22 ± 2.15*	0.23 ± 0.24*	13.51 ± 1.25*
	4 周	24	21.87 ± 1.93*	12.21 ± 0.24*	0.21 ± 0.14*	15.63 ± 1.72*
	8 周	24	20.15 ± 1.56*	12.98 ± 2.04*	0.20 ± 0.16*	17.42 ± 1.22*

注:与对照组同期比较,**P* < 0.05

球无阳性表达,肾小管阳性细胞数较 1 周时有所减少,但仍高于对照组;4 周时肾组织阳性细胞数已接近对照组。

2.5 Western blotting 检测肾皮质 OPN 的表达(图 3):应用凝胶成像分析系统对 OPN 表达进行定量分析,结果显示:对照组 OPN 表达较弱,表达量为 345.29、381.97、480.95。糖尿病组表达较对照组明显增高,在 2、4 和 8 周时表达量分别为 638.95、828.56、868.60,随时间呈现逐渐上升的趋势。



注:1~3 依次为对照组 2、4 和 8 周;4~6 依次为糖尿病组 2、4 和 8 周;与对照组同期比较,* $P < 0.05$

图 3 Western blotting 检测大鼠肾皮质 OPN 的表达

2.6 原位杂交检测 OPN mRNA 的表达(彩色插图 4): OPN mRNA 主要在皮质肾小管胞质表达。对照组肾小管呈弱阳性表达。糖尿病组 1 周时 OPN mRNA 表达较对照组明显增高,近曲小管强于远曲小管,且呈现逐渐上升的趋势。

3 讨论

DN 是糖尿病微血管病变严重的并发症,糖尿病早期即存在的高滤过、高灌注和毛细血管高压,使肾小球、肾小管、间质和血管均可发生病变,高血糖及其引起的代谢紊乱是其发病的始动因素,并使 DN 有着自己特殊的微环境及特点。近年研究显示,OPN 在多种肾脏疾病的进展中过度表达并发挥着重要作用,尤其是其介导的巨噬细胞浸润与肾小管间质的损伤关系密切,并能更好地反映肾脏疾病的进展程度^[1-2]。本研究结果显示:糖尿病大鼠肾组织 OPN 过度表达,并呈逐渐上升趋势,肾小管、肾小球、间质均可见阳性表达。由于曾有文献报道,OPN 存在于血液循环中^[3],并可在单核细胞系表达^[4],我们应用原位杂交方法观察高表达 OPN 的来源,结果证明肾组织中 OPN 表达显著增高主要是肾小管上皮细胞自身分泌的结果。还有文献报道,低氧和高糖环境可促进 OPN mRNA 表达^[5-6],在糖尿病模型

中,肾组织长期暴露于高血糖的超滤液中,而高血糖又加重组织缺血、缺氧,因此,在最初糖尿病引起的肾损害中,OPN 表达增高可能由高糖直接触发。

OPN 在糖尿病肾损害进展中的作用尚不完全清楚。在急性缺血性肾功能衰竭模型及急性肾小管坏死模型中,OPN 对于近端肾小管的完整性是必须的,它可通过促进细胞增殖帮助肾小管的再生和重建^[7-8]。我们分析了 OPN 与 PCNA 阳性细胞之间的关系,结果显示,1 周和 2 周糖尿病组大鼠肾组织 OPN 过度表达的同时伴有小管 PCNA 阳性细胞数增高,而 4 周和 8 周时 PCNA 阳性细胞数则明显下降。我们推测可能是由于糖尿病时伴有肾脏微血管和大血管的病变,肾组织处于一种慢性缺血的微环境状态,而早期即存在的肾小球高滤过、高灌注的血流动力学改变,使肾组织发生灌注性损伤。因此,在糖尿病肾损害早期,OPN 也可通过促进细胞增殖,提高肾脏在这种相对缺血的微环境中肾小管的生存力,但 OPN 的这种保护作用可能仅是机体的一种短暂代偿行为,在肾小管最初受损时促进其再生和重建,帮助功能恢复,随着病情发展,病变逐渐严重,这种作用则失代偿。

另外,近年研究认为,OPN 是一种强大的巨噬细胞趋化因子和黏附分子^[9-10],巨噬细胞上存在大量与 OPN 有高度亲和力的受体,通过这些受体,OPN 可促使巨噬细胞到达肾间质,加重肾间质损伤。同时,OPN 还可促使巨噬细胞定位和释放生长因子,如转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$),导致细胞外基质沉积,肾小管间质纤维化,而肾间质纤维化程度愈重,愈提示肾脏疾病预后不良^[11]。我们的结果发现,1 周和 2 周时糖尿病组大鼠肾组织中并无明显巨噬细胞浸润,4 周和 8 周时肾间质可见巨噬细胞轻度浸润,呈一定上升趋势。出现该结果可能与以下原因有关:①肾脏疾病的发病多有炎症或免疫反应参与,而糖尿病早期肾损害是由高血糖及其引起的基本代谢紊乱以及血管损害造成的供血不足导致,且 OPN 的表达增高可能是高血糖直接触发,推测 OPN 作为巨噬细胞趋化因子,还需其他因素辅助共同发挥此作用。②文献报道由于 RNA 剪切方式及转录后修饰过程的不同,OPN 有多种成熟形式,其分子结构不同则作用不同甚至相反。糖尿病肾组织有特殊的微环境,其中的众多因素可能影响 OPN 分子的结构从而影响其功能。③在正常肾组织中也有少量 OPN 表达,但其并不引起巨噬细胞浸润。Giachelli 等^[12]认为,正常肾组织中 OPN 存在于细胞内,然后

直接分泌到尿液中,不与间质细胞相互作用,因此并不引起巨噬细胞浸润,只有当肾小管严重受损坏坏死时,OPN 被释放到细胞外基质,才引起巨噬细胞浸润。本研究结果中,1、2 和 4 周时 OPN 阳性表达主要局限在肾小管细胞内,肾小球有部分表达,但晚于肾小管,而间质中仅在 8 周时才发现较明显表达。由于本课题中仅研究了糖尿病肾损害早期 OPN 与巨噬细胞浸润之间的关系,其后期是否趋化巨噬细胞浸润应做进一步研究。

参考文献

[1] 史永红,段惠军,何宁,等. 氟沙坦对糖尿病大鼠肾小球信号蛋白 JAK2 和 STAT3 表达的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2005,17(11):662-666.

[2] 刘清娟,何宁,刘淑霞,等. 糖尿病大鼠肾小管上皮细胞转化与肝细胞生长因子和 Smad7 蛋白的表达[J]. 中国危重病急救医学, 2005,17(11):675-678.

[3] Senger D R, Perruzzi C A, Papadopoulos A. Elevated expression of secreted phosphoprotein I (osteopontin, 2ar) as a consequence of neoplastic transformation [J]. *Anticancer Res*, 1989,9(5):1291-1299.

[4] Miyazaki Y, Setoguchi M, Yoshida S, et al. The mouse osteopontin gene, expression in monocytic lineages and complete nucleotide sequence[J]. *J Biol Chem*, 1990,265(24):14432-14438.

[5] Sodhi C P, Batlle D, Sahai A, et al. Osteopontin mediates

hypoxia-induced proliferation of cultured mesangial cells; role of PKC and p38 MAPK[J]. *Kidney Dis*, 2000,58(2):691-700.

[6] Takemoto M, Yokote K, Yamazaki M, et al. Enhanced expression of osteopontin by high glucose; involvement of osteopontin in diabetic macroangiopathy[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 902:357-363.

[7] Padanilam B J, Martin D R, Hammerman M R. Insulin-like growth factor 1-enhanced renal expression of osteopontin after acute ischemic injury in rats[J]. *Endocrinology*, 1996,137(5): 2133-2140.

[8] Xie Y, Nishi S, Iguchi S, et al. Expression of osteopontin gentamicin-induced acute tubular necrosis and its recovery process[J]. *Kidney Int*, 2001,59(3):959-974.

[9] Stahl R A. Chemoattractive cytokines (chemokines) and immune renal injury[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 1995,10(3): 307-309.

[10] Okada H, Moriwaki K, Kalluri R, et al. Osteopontin expressed by renal tubular epithelium mediates interstitial monocyte infiltration in rats[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000, 278(1):F110-121.

[11] 孙伟,曾安平,王钢,等. IgA 肾病肾间质内层粘连蛋白与纤维连接蛋白局部沉积与长期预后关系的探讨[J]. 中国危重病急救医学, 2000,12(4):202-204.

[12] Giachelli C M, Pichler R, Lombardi D, et al. Osteopontin expression in angiotension I-induced tubulointerstitial nephritis[J]. *Kidney Int*, 1994,45(2):515-524.

(收稿日期:2008-02-02)

(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

失血性休克时麻醉剂对犬胃黏膜灌流的影响

胃肠道是失血性休克导致低灌流时最先受影响的器官之一。在失血性休克和复苏期间,麻醉剂的使用能影响血流动力学和组织氧输送。国外学者研究了海罗芬、七氟醚、异氟烷 3 种麻醉剂对失血性休克犬胃黏膜血流动力学和血氧浓度的影响。实验中 3 种麻醉剂浓度均为 1.00 最小肺泡麻醉浓度(MAC),使用胃黏膜张力计测定胃黏膜二氧化碳分压(PgCO₂)和动脉血二氧化碳分压(PaCO₂)。通过放血将犬的平均动脉压(MAP)降至 40~50 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa),并维持 45 min 以上,然后回输失血进行复苏。他们观察了失血 45 min 以及回输失血 15 min 和 60 min 的血流动力学、血氧浓度和 PgCO₂ 变化。结果显示:失血犬的动脉压、心脏指数和血氧浓度均明显降低(P 均<0.05),但各组之间差异无统计学意义(P 均>0.05)。海罗芬组麻醉犬的 PgCO₂ 明显低于其他两组(P 均<0.05)。因此得出结论:失血性休克复苏时,使用同等剂量麻醉剂,海罗芬对胃黏膜灌注的保护作用优于七氟醚和异氟烷。

黄彬,编译自《J Invest Surg》,2008,21(1):15-23;胡森,审核

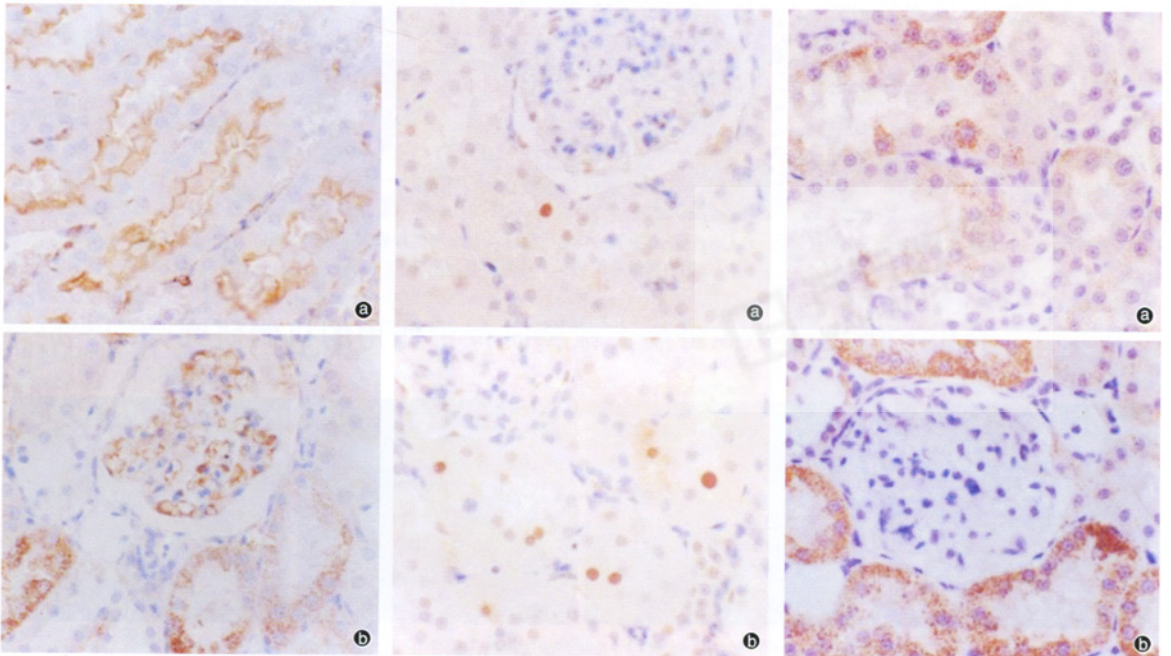
白细胞介素-6 活化转录激活因子 3 防止低血容量性循环衰竭

约半数创伤的死亡原因是低血容量性循环衰竭(HCC)。最近美国研究人员通过轻度创伤加重度失血性休克(HS)建立了大鼠 HCC 模型。模型伴有主动脉血流峰值骤降 50%,并有心肌细胞凋亡,以及持续加重的低血压。对此过程的干预主要是通过细胞凋亡的复苏。给予白细胞介素-6(IL-6)能活化心肌细胞内信号转导蛋白和转录激活因子 3(STAT3),防止心功能障碍和心肌细胞凋亡的发生,使死亡率降低 50%。用 STAT3 选择性抑制剂(T40214)对大鼠进行预处理可抑制 IL-6 介导的 STAT3 活化和心肌细胞复苏,阻滞了 IL-6 对心肌细胞的保护作用。先天缺乏 STAT3 和 STAT3β 的大鼠心脏对 HS 所致的心肌细胞凋亡可完全耐受。对心肌细胞凋亡相关基因的分析显示,与对照组比较,HS 大鼠 29%的凋亡相关基因表达发生了改变;给予 IL-6 后凋亡相关基因表达恢复正常,而用 T40214 预处理后 IL-6 介导的正常化受阻。因此研究者认为,心功能障碍、心肌细胞凋亡及凋亡相关基因改变都参与了 HCC 的发生,给予 IL-6 则能通过活化 STAT3 来抑制心肌细胞凋亡及凋亡相关基因的表达。此发现为预防 HCC 以及降低创伤后死亡率的研究提供了依据。

包呈梅,周国勇,编译自《PLoS ONE》,2008,3(2):e1605;胡森,审核

骨桥蛋白在糖尿病大鼠肾组织中的表达及意义

(正文见287页)



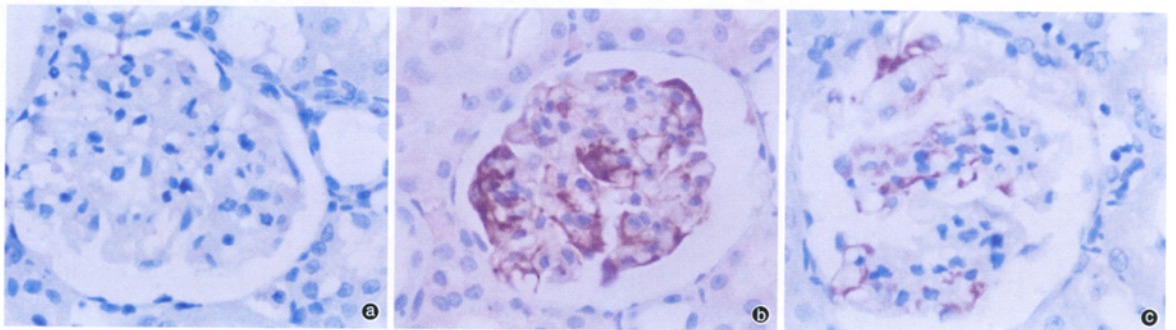
①:对照组, ②:糖尿病组
图1 两组大鼠注射STZ后8周OPN的表达(免疫组化, ×400)

①:对照组, ②:糖尿病组
图2 两组大鼠注射STZ后1周PCNA的表达(免疫组化, ×400)

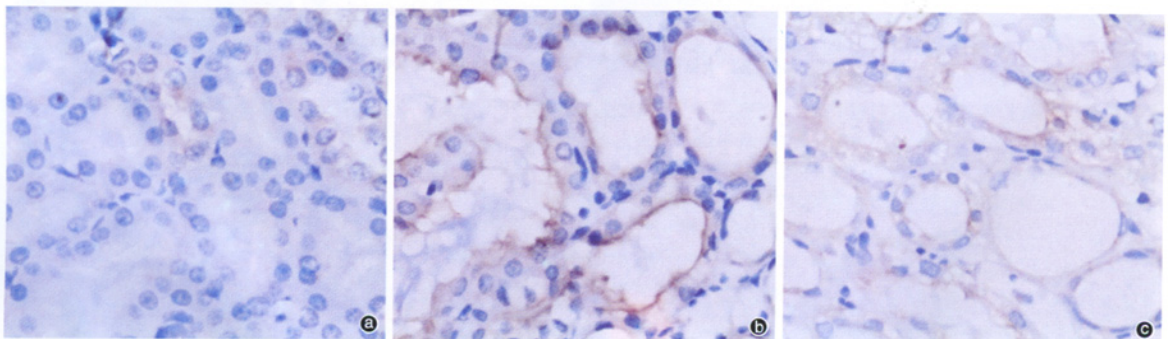
①:对照组, ②:糖尿病组
图4 两组大鼠注射STZ后8周OPN mRNA的表达(原位杂交, ×400)

血必净联合罗格列酮对局灶节段性肾小球硬化大鼠肾脏的保护作用

(正文见299页)



①:假手术组, ②:模型组, ③:联合治疗组
图1 各组大鼠肾小球内TGF-β1表达(免疫组化, ×400)



①:假手术组, ②:模型组, ③:联合治疗组
图2 各组大鼠肾间质内VEGF表达(免疫组化, ×400)