

环孢素 A 对肾小管上皮细胞 MMP-2 和 MMP-9 表达和活性的影响

岳智慧, 孙良忠*, 李易娟, 莫 樱, 蒋小云, 陈述枚
(中山大学附属第一医院儿科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】观察环孢素 A(CSA)对近端肾小管上皮细胞基质金属蛋白酶-2 和-9(MMP-2 和 MMP-9)表达和活性的影响。【方法】体外培养大鼠近端肾小管上皮细胞株 NRK52E 细胞至完全融合时,分别给予不同浓度的 CSA 0, 0.42, 0.84, 4.2, 8.4 $\mu\text{mol/L}$, 实验观察 48 h 和 72 h。收集培养液,用明胶酶谱法检测 MMP-2 和 MMP-9 活性。提取总 RNA,逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 水平。【结果】CSA 刺激 NRK52E 细胞呈剂量依赖性抑制 MMP-2 活性和 mRNA 表达。与对照组(CSA 0 $\mu\text{mol/L}$)比较,CSA 0.42, 0.84, 4.2, 8.4 $\mu\text{mol/L}$ 的 MMP-2 活性分别下降为 27%, 24%, 11%, 9%;差异均有统计学意义, $P < 0.05$ 。CSA 刺激 NRK52E 细胞增加 MMP-9 活性和 mRNA 表达。与对照组比较,CSA 4.2 $\mu\text{mol/L}$ 刺激 48 h MMP-9 活性上调为 438%, 72 h 上调为 237%, 差异均有统计学意义, $P < 0.05$ 。【结论】CSA 对肾小管上皮细胞 MMP-2 表达和活性呈剂量依赖性抑制,以及对 MMP-9 表达和活性的诱导作用可能与 CSA 所致肾小管间质损害相关。

关键词: 环孢素 A; 基质金属蛋白酶; 肾小管上皮细胞

中图分类号: R34

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2010)01-0091-04

Effect of Cyclosporine A on Activity and Expression of MMP-2 and MMP-9 in Renal Tubular Epithelial Cells

YUE Zhi-hui, SUN Liang-zhong*, LI Yi-juan, MO Ying, JIANG Xiao-yun, CHEN Shu-mei
(Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To observe the effect of cyclosporine A (CSA) on the activity and expression of MMP-2 and MMP-9 in renal tubular epithelial cells. 【Methods】NRK52E cells were cultured until its reached confluent. Then NRK52E cells were exposed to different concentration of CSA (0, 0.42, 0.84, 4.2, and 8.4 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h or 72 h respectively. MMP-2 and MMP-9 activities were detected by gelatin zymography. The expression of MMP-2 and MMP-9 mRNA were detected by RT-PCR. 【Results】MMP-2 activity and mRNA levels were decreased in a dose dependent manner after exposed to different concentration of CSA for 48 h or 72 h in NRK52E cells. Compared with control (CSA 0 $\mu\text{mol/L}$), CSA 0.42, 0.84, 4.2, 8.4 $\mu\text{mol/L}$ decreased the MMP-2 activities to 27%, 24%, 11%, and 9% respectively; The differences are significant, $P < 0.05$. But the MMP-9 activity and mRNA levels were increased after exposed to CSA for 48 h or 72 h in NRK52E cells. Compared with control group, CSA 4.2 $\mu\text{mol/L}$ exposure increased MMP-9 activity to 438% in 48 h, and 237% in 72 h; the differences are significant as well, $P < 0.05$. 【Conclusion】A dose-dependent decrease in the expression and activity of MMP-2, and the up-regulation of the expression and activity of MMP-9 by CSA in renal epithelial cells may related to CSA associated tubulointerstitial damage.

Key words: cyclosporine A; matrix metalloproteinase; renal tubular epithelial cell

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(1):91-94;133]

环孢素 A(cyclosporine A, CSA)在各种免疫性疾病、肾移植术后和难治性肾病综合征等的治

疗中疗效显著,但其潜在的肾毒性使它的临床应用受到了很大的限制。CSA 导致肾损害的机制仍

收稿日期: 2009-06-08

基金项目: 广东省自然科学基金博士启动项目(06300772);广东省医学科学基金(A2006034)

作者简介: 岳智慧, 硕士, 讲师, 研究方向: 小儿呼吸和肾脏疾病, E-mail: yuezhizhihui810@yahoo.com.cn; * 通信作者: 孙良忠, 博士, 副主任医师, 研究方向: 小儿肾脏病, E-mail: sunlzh@mail.sysu.edu.cn

未十分清楚。CSA 对肾脏的损害一般与剂量相关,病理主要表现为肾小管上皮细胞损害,肾间质纤维化和肾血管病变^[1]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)是一组降解细胞外基质和基底膜成分的酶类,其中 MMP-2 和 MMP-9 属于明胶酶,主要可以降解基底膜的胶原成分,对间质胶原也有一定的降解作用^[2]。它们过度表达可破坏肾小管基底膜的完整性,使发生转分化的肾小管上皮细胞可以进入肾间质,促进肾间质纤维化;而表达不足则可导致细胞外基质降解障碍,细胞外基质积聚,同样促进肾间质纤维化^[3-5]。但有关 CSA 对肾小管上皮细胞 MMP-2 和 MMP-9 表达和活性的影响,目前报道结果并不一致,增高、降低和无改变均有报道^[6-8]。本研究通过观察不同剂量 CSA 对近端肾小管上皮细胞 MMP-2 和 MMP-9 表达和活性的影响,以进一步探讨 CSA 对肾小管间质损害的机制。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

NRK52E (正常大鼠近端肾小管上皮细胞株,由中山大学附属第一医院肾脏病实验室提供)细胞,接种在 10 cm 培养皿,培养至完全融合时,去血清培养 24 h^[9-10]。然后分别给予不同浓度的 CSA (美国,辉瑞制药公司),浓度范围参照临床用药时肾小管腔内 CSA 的浓度 (0.42 ~ 42 $\mu\text{mol/L}$)^[6,11],分别给予 0, 0.42, 0.84, 4.2, 8.4 $\mu\text{mol/L}$ 。实验观察 48 h 和 72 h。每项实验重复 3 ~ 5 次。

1.2 明胶酶谱法

培养液 MMP-2 和 MMP-9 活性用明胶酶谱法检测^[12]。简述如下,按照上述时间点收集培养液,取等量培养液加入加样缓冲液,在含 1 mg/mL 明胶的 100 g/L 聚丙烯凝胶中电泳。电泳结束后,用 25 mL/L 的 Triton X100 漂洗凝胶。然后放入缓冲液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 48 h。5 g/L 考马斯亮兰 G250 中染色,再用脱色。凝胶中蓝色背景下不着色条带代表酶活性。条带的相对分子量用分子量分析软件 (Molecular Analyst version 4.0, Bio-rad) 测定分析。用光密度扫描仪 (美国 Bio-rad) 扫描图像,并作光密度分析。条带的范围和反相光密度代表酶的活性高低,以其乘积为实际观测值,用与对照组比较的相对值表示变化程度。

1.3 总 RNA 提取

总 RNA 提取:用一步法总 RNA 提取试剂盒 (北京赛百盛基因技术有限公司)。简述如下,细胞培养至设定时间后,移除培养液,加入 1 mL Redzol 裂解细胞,将细胞裂解液转移至离心管,室温静置 5 min,加入 0.2 mL 氯仿振荡混匀,室温静置 2 min,1 200 r/min ($r = 4.25 \text{ cm}$) 离心 15 min,混悬液分为 3 层,将上层含有总 RNA 的液体转移至新的离心管,加入 0.2 mL 无水乙醇,轻轻混匀,将液体转移至过滤柱,室温静置 5 min,1 200 r/min ($r = 4.25 \text{ cm}$) 离心 2 min,去除滤液。加入 600 μL RNA 洗涤液至过滤柱,离心去除滤液,再离心后将过滤柱移至一个新的离心管,加入 50 μL DEPC 水,静置 2 min,离心收集洗脱液,再加入 30 μL DEPC 水洗脱 1 次。收集洗脱液,分装, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待测。

1.4 逆转录聚合酶链式反应分析

取 1 μg 总 RNA 进行逆转录聚合酶链式反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)。采用北京赛百盛基因技术有限公司的一步法傻瓜 RT-PCR 试剂盒。实验步骤参照试剂盒提供的说明书。利用 Oligo6.0 和 primer premier 5.0 设计引物。引物序列及反应参数如下: 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH),上游: 5' CAG CCC AGC AAG GAT ACT GA 3', 下游: 5' TTT GAG GGT GCA GCG AAC TT 3'。反应参数为 45 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min; 共 30 个循环,扩增片段为 191 bp。MMP-2,上游: 5' TTC TGA CGG GCC GTA CAA TC 3', 下游: 5' TGG GCG GGA GAA AGT AGC AC 3'。反应参数为 45 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min; 共 30 个循环,扩增片段为 208 bp。MMP-9,上游: 5' CTT TGT AGG GTC GGT TCT G 3', 下游: 5' CCT GTG AGT GGG TTG GAT T 3'。反应参数为 45 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min; 共 29 个循环,扩增片段为 466 bp。各反应以 GAPDH 作为反应参照,用 UVP-2000 凝胶图像分析系统进行分析。

1.5 数据统计分析

MMP-2 和 MMP-9 酶活性用与对照组比较的相对值表示其变化程度, MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 表达水平用与 GAPDH mRNA 水平比较的

相对值表示。两组间比较用 Mann-Whitney 检验,多组间比较用 Kruskal-Wallis 检验,多组间两两比较用 Bonferroni 修正差别检验法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CSA 刺激 NRK52E 细胞呈剂量依赖性抑制 MMP-2 活性和 mRNA 表达。

明胶酶谱结果显示 CSA 刺激 NRK52E 细胞 48 h 和 72 h, 可抑制 MMP-2 活性。MMP-2(包括对照培养液)主要为活性形式 MMP-2, 相对分子质量为 62 k。与对照组比较, 48 h MMP-2 活性下调为 77%, 72 h 下调为 21%; 差异均有显著性, $P < 0.05$ (图 1)。CSA 对 MMP-2 活性的抑制呈剂量依赖性, 与对照组(CSA 0 $\mu\text{mol/L}$)比较, CSA 0.42, 0.84, 4.2, 8.4 $\mu\text{mol/L}$ 的 MMP-2 活性分别下降为 27%, 24%, 11%, 9%; 差异均有显著性, $P < 0.05$ (图 2)。RT-PCR 结果显示 CSA 刺激 NRK52E 细胞 72 h, 呈剂量依赖性抑制 MMP-2 的 mRNA 表达(图 3)。提示 CSA 在转录水平对 MMP-2 的表达起抑制作用。

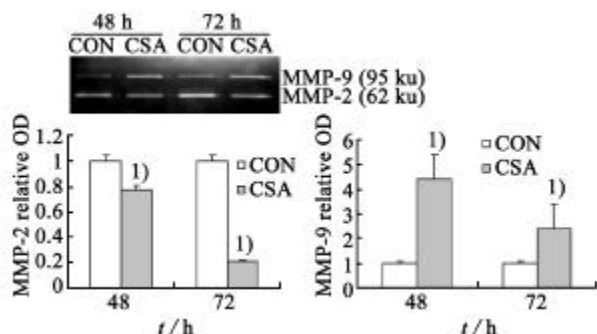


图 1 CSA 刺激 NRK52E 细胞对 MMP-2 和 MMP-9 活性的影响

Fig.1 The effect of cyclosporine on the activity of MMP-2 and MMP-9 in NRK52E cells

MMP-2 activity decreased and MMP-9 activity increased in NRK52E cells after exposed to 4.2 $\mu\text{mol/L}$ CSA for 48 h and 72 h. 1) Compared with control (CON), $P < 0.05$. Gelatin Zymography

2.2 CSA 刺激 NRK52E 细胞可增加 MMP-9 活性和 mRNA 表达。

明胶酶谱结果显示 CSA 刺激 NRK52E 细胞 48 h 和 72 h, 均可增加 MMP-9 活性。MMP-9(包

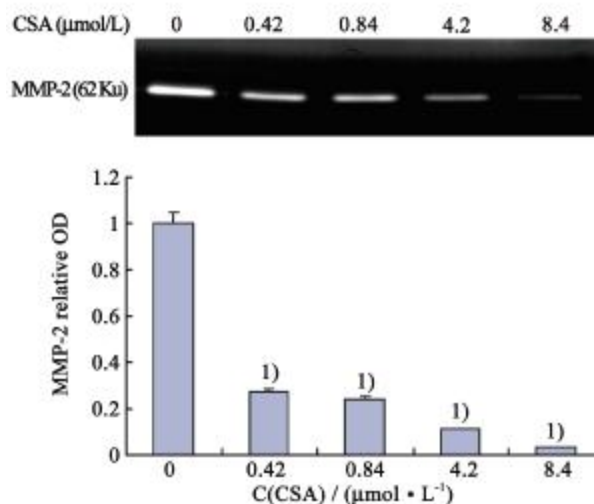


图 2 不同浓度 CSA 刺激 NRK52E 细胞对 MMP-2 活性的影响

Fig.2 The effect of different concentration of cyclosporine on the activities of MMP-2 in NRK52E cells

MMP-2 activity decreased in a dose dependent manner. 1) Compared with control (CON), $P < 0.05$. Gelatin Zymography

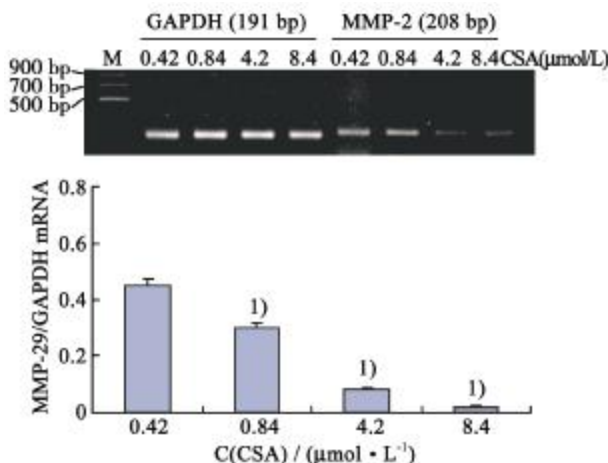


图 3 不同浓度 CSA 刺激 NRK52E 细胞对 MMP-2 mRNA 表达的影响

Fig.3 The effect of cyclosporine on the expression of MMP-2 mRNA in NRK52E cells

The expression of MMP-2 mRNA decreased in dose-dependent manner after exposed to CSA for 72 h. 1) Compared with low dose CSA (0.42 $\mu\text{mol/L}$), $P < 0.05$. RT-PCR

括对照培养液)主要为前体形式,相对分子质量为 92 k。与对照组比较, 48 h MMP-9 活性上调为 438%, 72 h 上调为 237%, 差异均有显著性, $P < 0.05$ (图 1)。RT-PCR 结果显示 CSA 刺激 NRK52E 细胞 48 h 和 72 h, 均可增加 MMP-9 的 mRNA 表

达(图 4)。提示 CSA 在转录水平对 MMP-9 的表达起上调作用。

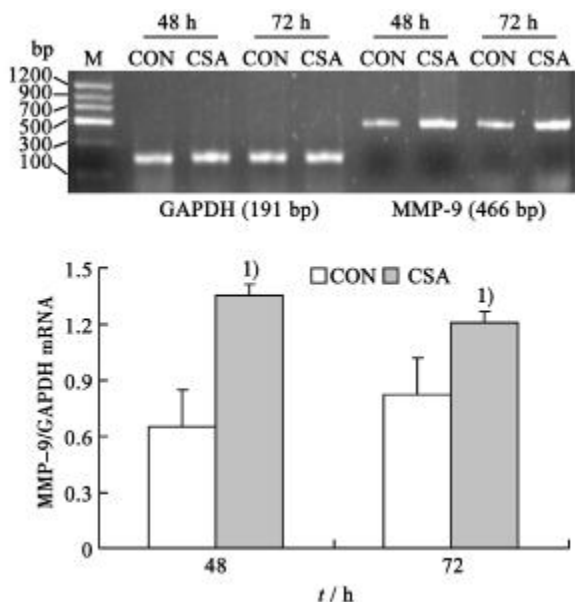


图 4 CSA 刺激 NRK52E 细胞对 MMP-9 mRNA 表达的影响

Fig.4 The effect of cyclosporine on the expression of MMP-9 mRNA in NRK52E cells

The expression of MMP-9 mRNA increased after exposed to 4.2 $\mu\text{mol/L}$ CSA for 48 h and 72 h. 1) Compared with control (CON), $P < 0.05$. RT-PCR

3 讨论

本研究发现, CSA 对肾小管上皮细胞 MMP-2 和 MMP-9 表达和活性呈相反的调节作用。CSA 对肾小管上皮细胞 MMP-2 表达和活性均有明显的抑制作用, 而且呈剂量依赖性。而对 MMP-9 的表达和活性则有上调作用。由于 MMP-2 和 MMP-9 功能和作用底物并不完全一致^[2], CSA 对肾小管上皮细胞 MMP-2 和 MMP-9 表达和活性呈现的完全不同的调节作用, 提示 MMP-2 和 MMP-9 在体内可能参与并不一致的病理生理过程。

肾小管上皮细胞向间质细胞转分化(epithelial to mesangial transdifferentiation, EMT)是近年来发现在肾间质纤维化中起重要作用的病理生理过程^[3]。MMP-9 和/或 MMP-2 过度表达对破坏肾小管基底膜完整性的破坏是发生 EMT 关键步骤之一^[3,6]。有研究发现^[6,11], 体外用 CSA 处理人近端肾小管上皮细胞, 可导致肾小管上皮细胞发生 EMT

的变化, 同时也观察到了基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)的表达和活性升高。因此, CSA 对肾小管上皮细胞 MMP-9 表达和活性的促进作用可能参与了 CSA 诱导的 EMT 过程, 以及 CSA 诱导的肾间质纤维化; 但这仍需进一步的体内研究证实。

有关 CSA 对肾小管上皮细胞表达 MMP-2 表达和活性的研究, 目前并无一致的结论。既有报道 CSA 可以抑制肾小管上皮细胞 MMP-2 表达和活性, 也有报道增高或无改变的^[6-8]。本研究发现, CSA 不仅可以抑制肾小管上皮细胞 MMP-2 表达和活性, 而且呈剂量依赖性。而 CSA 对肾小管上皮细胞 MMP-2 表达的抑制作用是否与 CSA 所致的肾损害相关, 仍有待进一步研究证实。

MMP-2 也属于明胶酶; 但与 MMP-9 不同的是, MMP-2 对间质胶原, 包括 I、II、III 型胶原和纤维连接蛋白, 均有较强的降解活性^[2]。因此, CSA 对肾小管上皮细胞 MMP-2 表达和活性的抑制有可能使细胞外基质的降解受到抑制, 导致细胞外基质的积聚, 促进肾间质纤维化和肾小球硬化。近年有研究发现^[4], 在移植肾肾病的晚期, 抑制 MMP-2 活性可显著加重肾间质纤维化。在单侧输尿管结扎诱发肾间质纤维化的大鼠模型中, 无论是早期还是晚期, 使用 MMP-2 抑制剂均可显著加重肾间质纤维化; 提示, MMP-2 的表达对于肾间质纤维化有抑制作用^[13]。因此, CSA 对肾小管上皮细胞 MMP-2 表达和活性的抑制作用可能与 CSA 诱发的肾间质纤维化有关。

总之, 本研究发现 CSA 对肾小管上皮细胞 MMP-2 和 MMP-9 表达和活性呈不同的调节作用。CSA 对肾小管上皮细胞 MMP-2 表达和活性呈剂量依赖性的抑制作用, 以及对 MMP-9 表达和活性的诱导作用, 均可能与 CSA 的肾毒性相关。但这仍需要进一步研究证实。

参考文献:

- [1] Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2009, 4(2): 481-508.
- [2] Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs [J]. Cardiovasc Res, 2006, 69(3): 562-573.
- [3] Bani-Hani AH, Campbell MT, Meldrum DR, et al. Cytokines in epithelial-mesenchymal transition: a new

(下转第 133 页 to page 133)