

# 骨调素在 5/6 肾切除大鼠慢性肾功能衰竭模型中的表达

吕 军, 余学清, 尹培达, 陈永雄, 关伟明, 李 龙, 沈清瑞

(中山医科大学附属第一医院肾脏内科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨骨调素在慢性进行性肾脏疾病肾组织中的表达及作用。【方法】大鼠慢性肾功能衰竭模型用 5/6 肾切除方法制作, 并在第 0、2、4、8、12、16 周分别检测各项生化指标, 设立假手术组作为对照组。用免疫组化双标记和原位杂交技术检测骨调素在肾组织蛋白及基因水平的表达。【结果】与假手术组对比, 模型组肾组织骨调素表达显著上调, 并随病程进展逐渐增高。骨调素表达与巨噬细胞的局部浸润、肾小球硬化及肾小管间质纤维化密切相关。【结论】骨调素在肾组织局部高表达可能是慢性进行性肾脏病变进展过程中的重要机制之一。

关键词: 骨调素; 肾功能衰竭, 慢性; 巨噬细胞

中图分类号: R 692.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04S0-0034-04

## The Expression of Osteopontin in 5/6-Nephrectomized Rats

LU Jun, YU Xue-qing, YIN Pei-da, CHEN Yong-xiong, GUAN Wei-ming, LI Long, SHEN Qing-ru

(Department of Nephrology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University  
of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the role of osteopontin in the chronic progressive kidney disease. 【Method】 The rat model of chronic renal failure were induced by 5/6 nephrectomy and control group were induced by sham-operation. OPN protein and mRNA were detected using double labeling immunostaining and *in situ* hybridization. 【Result】 Compared with sham-operated controls, osteopontin expression was highly increased in the nephrectomy model in parallel with the course of progressive renal disease, and closely correlated with the macrophage infiltration in glomeruli-*interstitium*, glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. 【Conclusion】 Osteopontin may play an important role in the development of chronic renal disease.

**Key words:** osteopontin; kidney failure, chronic; macrophage

已有的研究表明, 血管紧张素转换酶抑制剂和血管紧张素受体拮抗剂可显著减轻大鼠 5/6 肾切除后肾病变和改善肾功能, 提示血管紧张素在慢性肾功能衰竭进展过程中具有重要作用<sup>[1,2]</sup>。最近有研究提示, 骨调素(osteopontin, OPN)表达水平上调在血管紧张素所造成的肾脏病变机制中可能发挥重要作用<sup>[3]</sup>。本研究观察骨调素在大鼠慢性进行性肾衰发展过程肾组织中的表达水平, 及其与巨噬细胞在肾局部浸润、肾病理改变和肾功能损害

间的相关关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

中山医科大学实验动物中心提供的 Sprague-Dauley 大鼠 50 只, 体质量 150~200 g, 随机分为慢性肾衰模型组及假手术组各 25 只。参照文献[2]制成 5/6 肾切除模型。各组大鼠分别于 2、4、8、

收稿日期: 2000-03-28

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(980058); 广东省卫生厅科研基金资助项目(A1998146)

作者简介: 吕 军(1971-), 女, 山东烟台人, 博士生, 医师。

12、16周杀检,并在相应的时间测定血肌酐、尿素氮和24h尿蛋白。

## 1.2 试剂

免疫组化染色用单克隆抗体(小鼠抗骨调素抗体)由美国华盛顿大学 Johnson 教授惠赠,ED1(抗CD68抗体、识别巨噬细胞)由澳大利亚 Monash 医学中心蓝辉耀博士惠赠,PAP和 APAAP 染色系统购于 Dako 公司,敏感性加强型原位杂交检测试剂盒Ⅱ(碱性磷酸酶)购于武汉博士德生物工程有限公司。

## 1.3 免疫组化染色及原位杂交方法

免疫组化双重染色检测骨调素蛋白与巨噬细胞的表达情况<sup>[4]</sup>,原位杂交方法按试剂盒说明书进行。常规 HE 染色,显微镜下观察肾小球和肾小管-间质的损害。高倍镜下计数20个肾小球相关抗体(骨调素、巨噬细胞)阳性细胞平均数,即为每个肾小球阳性细胞数  $n(ED1^+)/gcs^{-1}$  和  $n(OPN^+)/gcs^{-1}$ 。肾小管间质计算50个高倍视野(40×)ED1<sup>+</sup>细胞数,即为  $n(ED1^+)/mm^{-2}$ ,骨调素表达以50个高倍视野下阳性肾小管数与总肾小管的百分数表示,即  $OPN^+\%$ 。

## 1.4 统计学处理

所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,在 GraphPad Prism (美国微软公司)统计软件程序下操作,以  $P < 0.05$  为有统计学差异的标准。

## 2 结果

### 2.1 肾组织骨调素表达的原位杂交

正常肾脏组织,皮质部的极少部分远端肾小管上皮细胞有弱骨调素表达,髓质小管上皮细胞和集合管有较强表达(图1A)。在慢性肾衰模型组,手术后2周,皮质肾小管出现轻度表达,此时肾小球内尚无明显改变。4周开始,皮质肾小管上皮细胞及肾小球包曼囊侧壁上皮细胞骨调素表达进行性增加,呈局灶性分布(图1B)。12周时,表达达到高峰,此时节段及球性硬化的肾小球周围肾小管骨调素表达趋向弥漫性分布的特征,个别肾小球内可见新月体形成,此部位可见阳性细胞堆积(图1C)。16周时,表达略有减弱,但仍维持较高水平。在肾小管间质,手术后2周,皮质部远曲小管即出现骨调素表达;随着病程的进展(4~16周),表达持续增强,并与肾小管炎症、扩张及萎缩等改变密切相关。各时间点骨调素在肾小管的表达与假手术组相比, $P$ 值均小于0.01。

### 2.2 肾组织骨调素及巨噬细胞表达免疫组化染色

慢性肾衰大鼠肾组织中,肾小球和小管巨噬细胞的浸润与骨调素表达有明显的相关关系(肾小球  $r = 0.63$ ,  $P < 0.01$ ; 肾小管间质  $r = 0.89$ ,  $P < 0.01$ ),见表1。2周时,巨噬细胞在肾小球和肾小

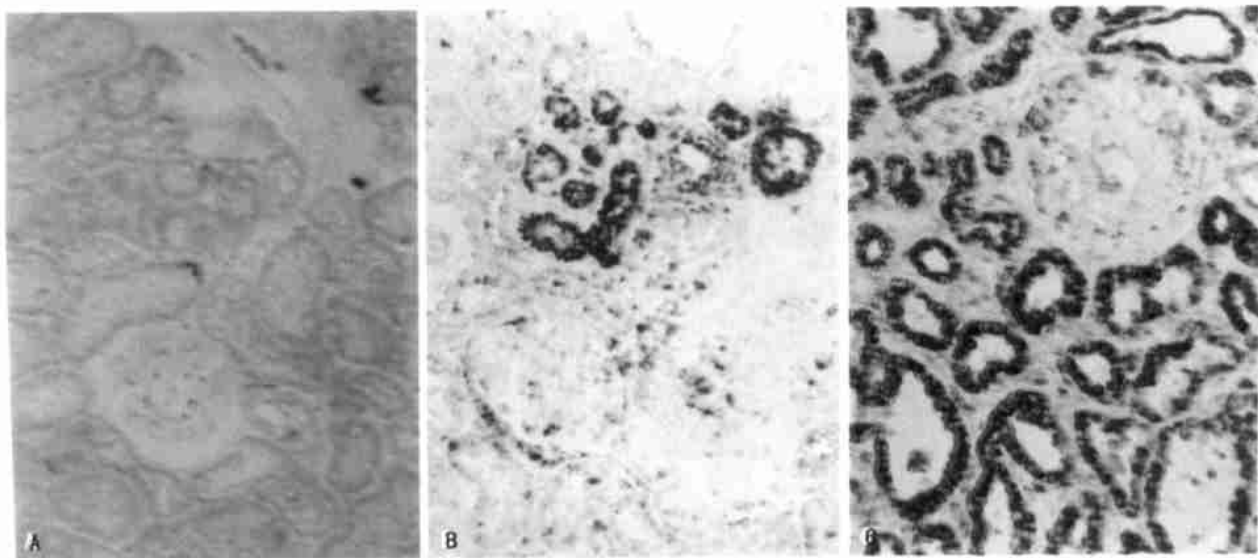


图1 肾组织骨调素表达

Fig. 1 Expression of osteopontin in kidney tissue *in situ* hybridization

A: normal kidney tissue B: model groups at 4 weeks C: model groups at 12 weeks. a strong osteopontin mRNA expression seen within areas of severe tissue damage such as tubular atrophy, hypertrophy and fibrosis

表1 肾小球和肾小管间质骨调素及巨噬细胞(ED1)的表达

Table 1 Expression of osteopontin(OPN) and ED1 in glomeruli and tubulointerstitium

$t/W$ <sup>1)</sup>	2		4		8		12		16	
Group <sup>2)</sup>	OP	CON	OP	CON	OP	CON	OP	CON	OP	CON
Glomeruli										
$n(OPN^+)/_{ges}^{-1}$	0.18±0.04	0±0	1.66±0.17 <sup>4)</sup>	0.34±0.18	1.92±0.12 <sup>4)</sup>	0.32±0.09	3.3±1.3 <sup>4)</sup>	0.26±0.07	2.02±0.33 <sup>4)</sup>	0.26±0.25
$n(ED1^+)/_{ges}^{-1}$	2.16±0.34	0.28±0.06	2.4±1.74 <sup>4)</sup>	0.34±0.15	2.8±1.48 <sup>4)</sup>	0.2±0.1	2.96±1.14 <sup>4)</sup>	0.24±0.08	2.6±1.29 <sup>4)</sup>	0.3±0.3
TI <sup>3)</sup>										
OPN <sup>+</sup> (%)	18.2±6.37	1.62±0.5	38.4±4.78 <sup>4)</sup>	6.62±1.37	45.38±8.6 <sup>4)</sup>	7.2±0.8	56.7±12.7 <sup>4)</sup>	3.92±1.68	53.52±8.25 <sup>4)</sup>	4.3±1.73
$n(ED1^+)/_{mm}^{-2}$	42.3±6.37	16.4±6.58	128.3±23.22 <sup>4)</sup>	30.5±14.35	225±83.35 <sup>4)</sup>	18.5±12.2	251.5±110.5 <sup>4)</sup>	23±5.34	338±113.26 <sup>4)</sup>	30±16.58

1) W: week. 2) OP: group of 5/6 nephrectomy ( $n=5$ ); CON: group of sham-operated controls ( $n=5$ ). 3) TI: tubulointerstitium. 4) 2, 4, 8, 12, 16 weeks operated groups compared with sham-operated controls  $P<0.01$

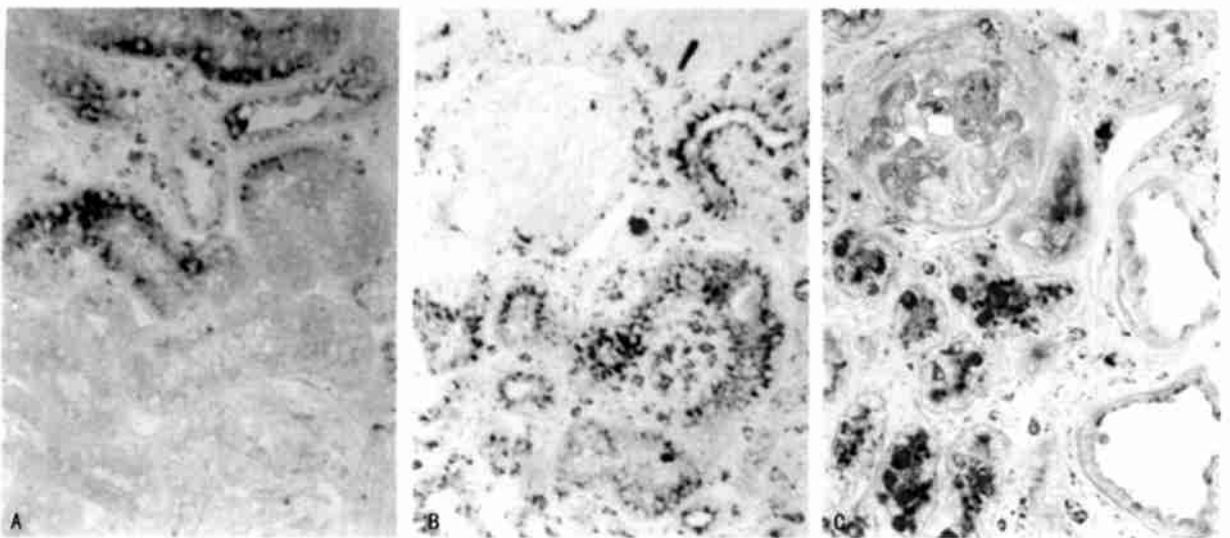
图2 模型组免疫组化双标记骨调素和阳性巨噬细胞(ED1<sup>+</sup>)表达

Fig. 2 Expression of osteopontin and macrophage in kidney tissue of nephrectomized rats using double labeling immunostaining

A: model groups at 2 weeks. B: model groups at 8 weeks showing that focal tubular osteopontin is associated with ED1<sup>+</sup> macrophage infiltrating and development of tubulitis. C: model groups at 16 weeks. Red: macrophage; Blue: osteopontin

管局部仅有轻度浸润, 4至16周, 随着骨调素表达逐渐增强, 在表达阳性部位的肾小管周围, 巨噬细胞浸润也明显增加(图2A、B、C)。

### 2.3 骨调素表达、巨噬细胞浸润与肾功能间的相关

慢性肾功能衰竭大鼠肾小球骨调素表达、巨噬细胞的浸润与24h尿蛋白量密切相关, 与肌酐清除率呈较弱相关关系; 肾小管骨调素表达、间质中的巨噬细胞与肌酐清除率密切相关( $r$ 分别为-0.53, -0.64,  $P$ 均小于0.01), 与24h尿蛋白量中度相关。

## 3 讨论

传统观点认为, 5/6肾切除的慢性肾功能衰竭

模型进行性肾损伤主要是非免疫因素的参与, 即肾血流动力学改变, 包括肾内毛细血管高血压, 高灌注和高滤过, 最终导致肾小球硬化和小管间质纤维化。最近的研究发现, 细胞免疫尤其是单核-巨噬细胞的肾脏局部浸润在5/6肾切除的慢性肾功能衰竭模型肾小球硬化及间质纤维化过程中起相当重要的作用, 但机制尚不清楚<sup>[5, 6]</sup>。

骨调素是一种高度酸性磷酸化的糖蛋白, 含有精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸(RGD)细胞粘附分子序列, 可由肾小管上皮细胞、破骨细胞及巨噬细胞等分泌, 具有强大的单核-巨噬细胞趋化和粘附作用<sup>[7]</sup>。我们及其他学者的研究均证实, 在肾小球肾炎大鼠模型, 肾组织骨调素表达水平显著增高, 并与肾组织巨噬细胞浸润, 肾病理损伤和肾功能下降

密切相关。应用抗骨调素抗体中和其功能活性可显著抑制大鼠实验性新月体肾炎模型肾组织的骨调素蛋白及基因水平表达,减少巨噬细胞局部浸润,减轻肾组织病理损伤,显著改善肾功能,研究结果提示骨调素在肾小球肾炎发病机制中确实发挥重要作用<sup>[4]</sup>。至于骨调素在慢性肾功能衰竭进展中的表达及作用至今尚无报道。为此,我们观察了5/6肾切除大鼠慢性肾功能衰竭模型发展过程中骨调素表达及其与肾组织巨噬细胞浸润、肾病理改变和肾功能的关系。结果表明,在正常大鼠的肾组织内,骨调素表达较少,主要位于肾脏髓质部的肾小管和集合管,皮质部则仅在极少部分远曲小管上皮细胞有较弱表达。在慢性肾功能衰竭大鼠模型中,2周开始在皮质部小管部位即有骨调素表达,而此时无明显的巨噬细胞浸润。4周开始上述部位表达明显增多,呈局灶分布,部分肾小球包曼囊侧壁上皮细胞也出现了骨调素表达上调。随着病情的发展,可见节段性或球性硬化的肾小球周围小管骨调素分布倾向弥漫性改变。此外,尚可见个别肾小球内新月体形成,伴随骨调素局部表达增强,以上结果提示骨调素在肾组织的表达上调与疾病的进展相关。同时原位杂交结果表明,肾组织骨调素显著增高主要是肾固有细胞(包括肾小球和肾小管上皮细胞)自分泌的结果,而非浸润的炎症细胞旁分泌。

我们的研究结果还发现,肾组织骨调素上调表达与巨噬细胞浸润密切相关,在肾病理损害严重的部位,骨调素表达呈强阳性,肾小管周围巨噬细胞浸润明显增多;骨调素阴性或较弱的部位,巨噬细胞明显减少或缺如,提示骨调素表达上调与肾病理损害有关,骨调素在巨噬细胞局部浸润过程中可能发挥重要作用。我们也注意到,骨调素在肾皮质部小管表达早于肾小球部位,且与肾小管病变(包括肾小管扩张、肾小管炎及退行性变)密切相关,这与其他作者的发现是一致的<sup>[8]</sup>,上述结果提示我们,骨调素可能与5/6肾切除慢性肾功能衰竭模型肾小管-间质病变关系更为密切。

我们发现,在肾小球或小管间质,浸润的巨噬

细胞数目较骨调素阳性细胞数与肾功能改变和肾组织损害更相关,推测其可能的原因之一是骨调素最终要通过趋化巨噬细胞参与肾脏的损害机制,而活化的巨噬细胞又能进一步扩大炎症反应;其二可能包括了MIF-1和CSF-1等多种对巨噬细胞具有趋化作用的炎症介质在其中共同发挥作用。本实验研究结果表明,慢性肾功能衰竭的发展过程中,肾固有细胞骨调素表达显著增高,促进巨噬细胞在肾组织局部浸润,在慢性肾功能衰竭进行性进展中发挥了重要作用,进一步提示细胞免疫可能在5/6肾切除的慢性肾功能衰竭发病机制中发挥重要作用。

#### 参考文献:

- [1] Wu L L, Cox A, Roe C, *et al*. Transforming growth factor  $\beta$ 1 and renal injury following subtotal nephrectomy in the rat: role of the renin-angiotensin system [J]. *Kidney Int*, 1997, 51(5): 1553.
- [2] Brunner F P, Thiel G, Hermle M, *et al*. Long-term enalapril and verapamil in rats with reduced renal mass [J]. *Kidney Int*, 1989, 36(6): 969.
- [3] Giachelli C M, Pichler R, Lombardi D, *et al*. Osteopontin expression in angiotensin II-induced tubulointerstitial nephritis [J]. *Kidney Int*, 1994, 45(2): 515.
- [4] Yu X Q, Nicolic-Paterson D, Mu W, *et al*. A function role for osteopontin in experimental crescentic glomerulonephritis in the rat [J]. *Proc Assoc Am Physicians*, 1998, 110(1): 50.
- [5] Van G H, Ding G, Kees-Folts D, *et al*. Macrophages and renal disease [J]. *Lab Invest*, 1994, 71(4): 456.
- [6] Wu L L, Yang N S, Roe C J, *et al*. Macrophage and myofibroblast proliferation in remnant kidney: role of angiotensin II [J]. *Kidney Int Suppl*, 1997, 63: s221.
- [7] Bulter W T. The nature and significance of osteopontin [J]. *Connect Tissue Res*, 1989, 23(2-3): 123.
- [8] Pichel R, Giachelli C M, Lombardi D, *et al*. Tubulointerstitial disease in glomerulonephritis: potential role of osteopontin (uropontin) [J]. *Am J Pathol*, 1994, 144(5): 915.

(编辑 黄小延)