



[DOI]10.3969/j.issn.1001-9057.2020.06.014

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2020.06.014

· 临床研究 ·

蛋白酪氨酸激酶 2/信号传导与转录激活因子 3 信号通路在大鼠肾脏移植慢性排斥反应中的作用机制

蒋欣 曲青山 房军 梁韶峰 孙东

[摘要] **目的** 探讨蛋白酪氨酸激酶 2/信号传导与转录激活因子 3(JAK2/STAT3)信号通路在大鼠肾脏移植慢性排斥反应中的作用机制。**方法** 将 60 只大鼠分为空白对照组[供鼠(10 只)、受鼠(10 只)均为 Lewis 大鼠]、阳性对照组[供鼠(10 只)为 F344 大鼠,受鼠(10 只)为 Lewis 大鼠]和 STAT3 拮抗组[供鼠(10 只)为 F344 大鼠,受鼠(10 只)为 Lewis 大鼠],检测其术前及术后 12 周血肌酐(SCr)及尿素氮(BUN)水平并比较。比较 3 组大鼠肾脏组织病理学变化和慢性移植损伤指数(CADI)评分。采用免疫组化检测转化生长因子(TGF)- β_1 /果蝇母性 DPP 同源蛋白(Smad)3、 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)纤维化指标。采用蛋白质印记法(Western blot)检测 TGF- β_1 、 α -SMA、JAK2 和 STAT3 蛋白的表达。**结果** 空白对照组和 STAT3 拮抗组大鼠血清 SCr 及 BUN 水平均低于阳性对照组($P < 0.05$)。阳性对照组大鼠肾脏组织弥漫性炎症细胞浸润表现较明显,其他两组大鼠中炎症细胞浸润较少。阳性对照组大鼠 CADI 评分明显高于其他两组($P < 0.05$)。空白对照组和 STAT3 拮抗组大鼠肾脏组织中 TGF- β_1 、 α -SMA、JAK2 和 STAT3 蛋白表达水平明显低于阳性对照组($P < 0.05$)。**结论** STAT3 的特异性抑制剂可在大鼠肾脏移植慢性排斥反应中抑制 JAK2/Smad3 信号通路所引起的炎症反应,对肾脏移植起到一定的保护作用。

[关键词] 蛋白酪氨酸激酶 2/信号传导与转录激活因子 3 信号通路; 肾脏移植; 慢性排斥反应

Mechanism of Janus family of tyrosine kinases 2/signal transduction and transcription activator 3 signaling pathway in chronic rejection of kidney transplantation in rats Jiang Xin, Qu Qingshan, Fang Jun, Liang Shaofeng, Sun Dong. Department of Organ Transplantation, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450000 China

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism of Janus family of tyrosine kinases 2/signal transduction and transcription activator 3(JAK2/STAT3) signaling pathway in chronic rejection of kidney transplantation in rats. **Methods** Sixty rats were divided into blank control group (the 10 donor and 10 recipient rats were all Lewis rats), positive control group (10 donor rats were F344 rats, 10 recipient rats were Lewis rats) and STAT3 antagonistic group (10 donor rats were F344 rats, 10 recipient rats were Lewis rats). The levels of serum creatinine (SCr) and blood urea nitrogen (BUN) were measured and compared before and 12 weeks after operation. The renal histopathological changes and chronic allograft damage index (CADI) scores of the 3 groups were compared. TGF- β_1 /Smad3 and α -smooth muscle actin (α -SMA) fibrosis index were detected by immunohistochemistry. The expression of TGF- β_1 , α -SMA, JAK2 and STAT3 protein were detected by Western blotting. **Results** The serum levels of SCr and BUN in the blank control group and STAT3 antagonistic group were lower than those in the positive control group ($P < 0.05$). In the positive control group, diffuse inflammatory cell infiltration was more obvious, while the inflammatory cell infiltration were less in the other 2 groups. The CADI scores in the positive control group were significantly higher than those in the other 2 groups. The expression levels of TGF- β_1 , α -SMA, JAK2 and STAT3 protein in the kidney of rats in the blank control group and STAT3 antagonistic group were significantly lower than those in the positive control group ($P < 0.05$). **Conclusion** STAT3 specific inhibitors can inhibit the inflammatory response induced by JAK2/Smad3 signaling pathway in the chronic rejection of renal transplantation, and play a protective role in renal transplantation.

[Key words] Janus family of tyrosine kinases 2/signal transduction and transcription activator 3 signaling pathway; Kidney transplantation; Chronic rejection

肾脏移植是肾病终末期最有效的治疗手段。随着新型免疫抑制剂的不断出现及组织配型、器官保存技术的不断提高,移植肾 1 年存活率已提高至 90% 以上,而远期存活率并无明显变化,10 年存活率不到 50%^[1-2]。移植肾慢性排斥反应是导致其远期功能丧失的主要原因,但目前临床上缺乏明确有效的防治方法^[3]。间质纤维化、肾小管萎缩和累积内膜的血管壁增厚等损伤主要是由移植肾的慢性排斥反应所致。炎症是移植肾排斥反应至慢性移植物功能丧失的重要病理生理因素^[4]。蛋白酪氨酸激酶(JAK)是一类非跨膜型的酪氨酸激酶。信号传导与转录激活因子(STAT)在信号转导和转录激活上有重要作用^[5]。有研究显示 JAK 和 STAT 在正常肾小管上皮细胞中表达水平较低,而在肾脏移植患者肾小管上皮细胞中表达水平相对较高^[6]。JAK/STAT 通路对肾间质纤维化和肾小管上皮细胞的损伤具有一定调控作用,并对病理性活化有一定促进作用^[7]。本研究在 JAK/STAT 通路调控肾小管上皮细胞损伤作用的基础上探讨 JAK2/STAT3 通路在大鼠肾脏移植慢性排斥反应中的作用机制。

材料与方法

1. 材料:8~12 周龄无特定病原体雄性近交系大鼠 60 只购自郑州大学药物研究所[许可证号 SCXK(豫)2018-0004],体质量 200~250 g。AMD3100 拮抗剂购自 Sigma-Aldrich 公司; α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体、JAK2 抗体、转化生长因子(TGF)- β_1 抗体、果蝇母性 DPP 同 1 原蛋白 3(Smad3)蛋白抗体均购自英国 Cambridge 公司;BH2 显微镜购自日本 OLYMPUS 公司。

2. 方法

(1)实验分组方法:将 60 只大鼠分为 3 组,空白对照组[供鼠(10 只)、受鼠(10 只)均为 Lewis 大鼠]、阳性对照组[供鼠(10 只)为 F344 大鼠,受鼠(10 只)为 Lewis 大鼠]和 STAT3 拮抗组[供鼠(10 只)为 F344 大鼠,受鼠(10 只)为 Lewis 大鼠]。3 组大鼠均在手术当天至术后 10 d 皮下注射低剂量环孢素 A,剂量为 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;STAT3 拮抗组大鼠注射环孢素 A 后给予 AMD 3100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 尾静脉注射。

(2)肾脏移植手术:3 组大鼠均在手术后 12 周麻醉处死并取材。参考文献[8]将所有大鼠麻醉后,供体大鼠固定剖开腹腔,分离其动、静脉,采用 10/0 尼龙线将供体左肾动、静脉带瓣分别与受体腹主动脉和下腔静脉行端-侧吻合,采用 7/0 尼龙线将供体输尿管末端的膀胱肌瓣与受体膀胱肌顶部吻合,取出供体左肾。受体大鼠的手术方法和供体大鼠一致,供体和受体大鼠肾脏移植手术同时进行,手术完毕后给予所有大鼠

庆大霉素 150 mg/kg 肌肉注射,预防感染。

(3)肾功能测定:分别抽取所有大鼠术前和术后 12 周的尾静脉血 2 ml,冻存于 -80°C 冰箱中,用于检测血肌酐(SCr)及尿素氮(BUN)水平。

(4)肾脏组织病理学检测:于术后第 12 周处死大鼠,迅速将肾脏组织固定、脱水、石蜡包埋后切片,进行苏木素-伊红(HE)染色。每个样本在 400 倍镜下随机观测 5 个视野进行评价。采用慢性移植物损伤指数(CADI)评分标准对 3 组大鼠肾脏样本进行慢性排斥反应病理评分。该评分标准包括肾间质炎症、肾间质纤维化、肾小管萎缩、基底膜基质增多、肾小球硬化、动脉内膜增生 6 个部分,每个部分分值为 0~3 分,CADI 评分即为六者总和。

(5)免疫组化检测 TGF- β_1 /Smad3 和 α -SMA 纤维化指标:取肾脏组织以 3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶后,放置柠檬缓冲液中,以 98°C 加热 15 min,取出冷却至室温进行修复抗原。滴加一抗于 4°C 孵育过夜,用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 5 min,共漂洗 3 次。每张切片滴加 $50 \mu\text{ml}$ 辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素, 37°C 下孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次。每张切片滴加二氨基联苯胺(DAB)显色液,镜下观察控制显色反应,自来水洗终止,复染核后用中性树胶封片。

(6)蛋白质印记法(Western blot)检测 TGF- β_1 、 α -SMA、JAK2 和 STAT3 蛋白的表达:从 -80°C 冰箱取出 3 组大鼠的肾脏组织加入裂解液和蛋白酶抑制剂充分匀浆, 4°C 以 $12\,000 \text{ r/min}$ 离心 15 min 取上清液,每组取 30 mg 蛋白电泳并电转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,室温 10% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗 4°C 下孵育过夜,加入二抗室温孵育 1 h。应用 Odyssey 红外荧光扫描成像系统对膜上蛋白质进行检测并行定量分析。

3. 统计学处理:应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析;计数资料比例和百分比表示组间比较采用 χ^2 检验,不同时间点比较采用重复测量方法分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1.3 组大鼠存活率及肾脏移植前后肾功能比较:术后 12 周内空白对照组(12/16, 75%)、阳性对照组(6/13, 46%)及 STAT3 拮抗组(10/15, 67%)大鼠存活率比较差异无统计学意义,术前 3 组大鼠血清 SCr 及 BUN 水平比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。术后 12 周空白对照组和 STAT3 拮抗组大鼠血清 SCr 及 BUN 水平均低于阳性对照组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 3 组大鼠肾脏移植前后血清 SCr 及 BUN 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	SCr($\mu\text{mol/L}$)		BUN(mmol/L)	
		手术前	术后 12 周	手术前	术后 12 周
空白对照组	16	127.28 $\pm$ 15.62	153.87 $\pm$ 17.04	6.19 $\pm$ 0.11	7.95 $\pm$ 0.26
阳性对照组	13	133.25 $\pm$ 15.83	186.25 $\pm$ 18.31 ^a	7.23 $\pm$ 0.18	10.42 $\pm$ 0.51 ^a
STAT3 拮抗组	15	129.45 $\pm$ 15.76	159.42 $\pm$ 17.28 ^b	6.68 $\pm$ 0.17	8.57 $\pm$ 0.29 ^b

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与阳性对照组比较,^b $P < 0.05$

2.3 组大鼠肾脏移植后的肾脏组织病理学变化和 CADI 评分结果比较:肾脏移植 12 周后,HE 染色结果发现空白对照组和 STAT3 拮抗组大鼠肾脏组织肾小球硬化、肾小管萎缩扩张变形、炎症细胞浸润及间质纤维化等慢性排斥反应的病理表现较轻,阳性对照组大鼠肾脏组织弥漫性炎症细胞浸润的病理表现较为明显,见图 1。阳性对照组大鼠 CADI 评分[(7.92 $\pm$ 0.86)分]明显高于 STAT3 拮抗组[(3.82 $\pm$ 0.41)分]和空白对照

组[(3.24 $\pm$ 0.33)分],差异有统计学意义($P < 0.05$)。空白对照组和 STAT3 拮抗组大鼠 CADI 评分比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3.3 组大鼠免疫组化检测结果比较:阳性对照组大鼠肾小管中可见大量 TGF- β_1 及 Smad3 阳性细胞,肾间质和肾小管中可见大量 α -SMA 阳性细胞;而在空白对照组和 STAT3 拮抗组中 TGF- β_1 、Smad3 和 α -SMA 阳性细胞明显减少。见图 2。

4.3 组大鼠肾脏组织中 JAK2/STAT3 及纤维化指标表达水平比较:空白对照组和 STAT3 拮抗组大鼠肾脏组织中 JAK2、STAT3、TGF- β_1 及 α -SMA 蛋白表达水平明显低于阳性对照组($P < 0.05$),上述蛋白水平表达在空白对照组和 STAT3 拮抗组间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见图 3。

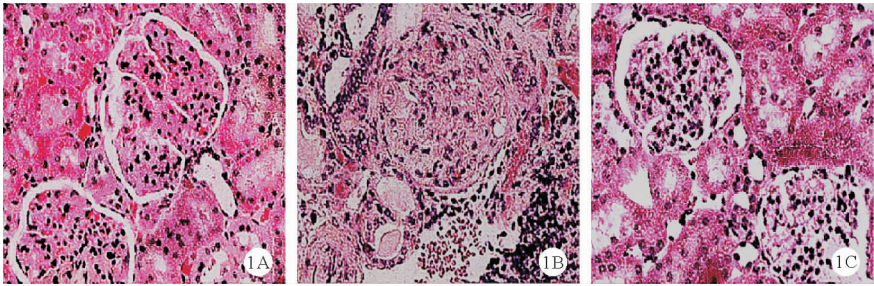


图 1 3 组大鼠移植后的肾脏组织病理学变化[A:空白对照组;B:阳性对照组;C:STAT3 拮抗组;HE 染色, $\times 400$]

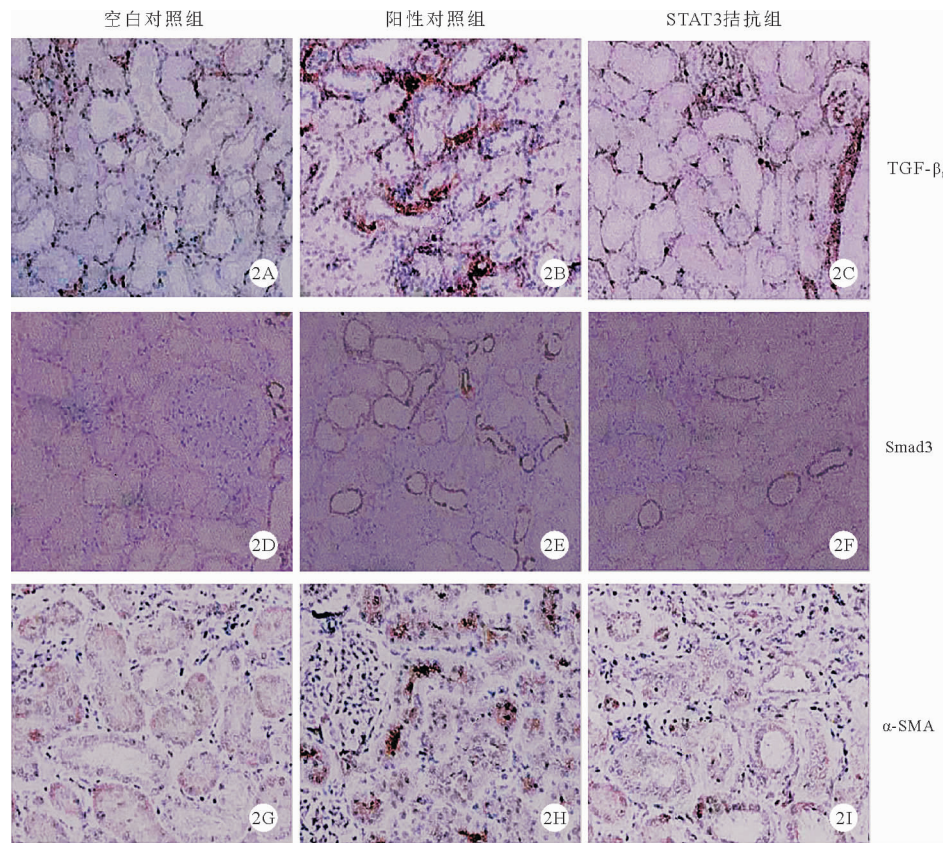
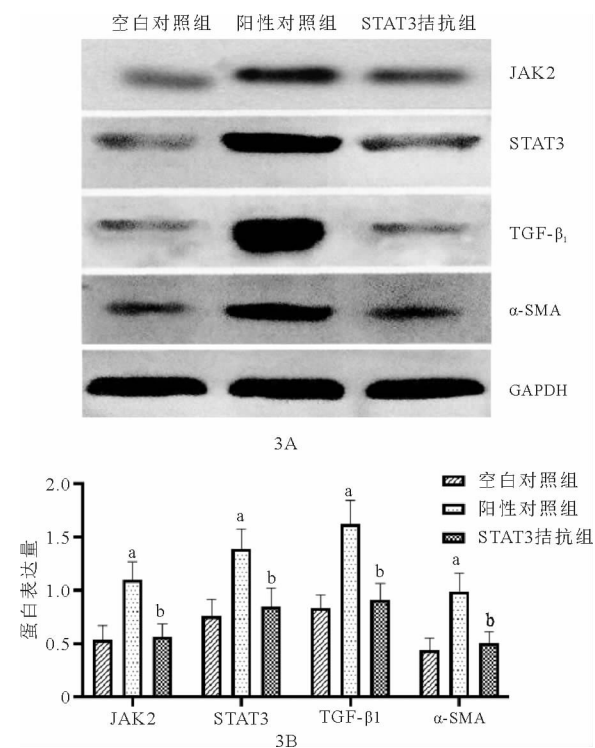


图 2 3 组大鼠免疫组化检测结果比较[链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结(SP)染色, $\times 400$]



注:与空白对照组比较, $aP < 0.05$;与阳性对照组比较, $bP < 0.05$

图3 3组大鼠肾脏组织中 JAK2/STAT3 及纤维化指标表达水平比较

讨 论

慢性排斥反应进程由多种因子共同作用导致,临床上大多表现为肾小球滤过率下降、出现蛋白尿和高血压等。在慢性排斥反应引起的移植肾损伤发生发展过程中,非免疫因素也起着至关重要的作用,其中包括缺血再灌注损伤、急性肾小管坏死、高血压等。本研究结果显示,术后 12 周空白对照组和 STAT3 拮抗组大鼠血清 SCr 及 BUN 水平均低于阳性对照组,证明了使用 ADM3100 拮抗剂能延缓肾脏移植慢性排斥导致的肾损伤。既往研究结果也显示 AMD3100 对移植肾损伤的保护主要是通过其免疫调节作用,可在炎症早期降低炎症趋化因子水平,减轻炎症损害^[9]。

在慢性排斥反应导致的移植肾损伤发展过程中,炎症细胞浸润产生了大量包括表皮生长因子、胰岛素样生长因子、血小板源生长因子(PDGF)和 TGF-β₁ 等细胞因子,目前认为 TGF-β₁ 与肾纤维化最为密切。TGF-β₁ 可通过 Smad3 依赖的信号通路直接激活或诱导成纤维细胞向肌成纤维细胞(MF)的转化^[10]。本研究中免疫组化检测结果显示,阳性对照组大鼠肾脏组织肾小管中可见大量 TGF-β₁ 及 Smad3 阳性细胞,在肾间质和肾小管中可见大量的 α-SMA 阳性细胞;而在空白对照组和 STAT3 拮抗组中 TGF-β₁、Smad3 和 α-SMA 阳性细胞明显减少。由此可见,STAT3 拮抗对肾纤维化有一定的抑制作用。α-SMA 是肾固有细胞转

化和肾脏纤维化的重要环节和标志^[11]。在正常的肾脏组织中,α-SMA 只在血管中层平滑肌细胞表达,在 TGF-β₁ 等促纤维因子的刺激下,可以激活肾脏固有细胞的 α-SMA 基因,使细胞表达 α-SMA 并分化为 MF 或类 MF 细胞^[12]。MF 细胞和类 MF 细胞是肾脏细胞外基质的主要来源,是肾脏纤维化的主要原因。本研究结果发现 TGF-β₁、α-SMA、JAK2 和 STAT3 蛋白表达水平在空白对照组和 STAT3 拮抗组均低于阳性对照组,由此可见,STAT3 拮抗可明显降低 JAK2 和 STAT3 的表达水平,且 JAK2/STAT3 在大鼠移植肾慢性排斥反应模型的肾脏中高表达,STAT3 拮抗可有效保护肾功能,延缓慢性排斥反应的进程,减轻肾脏组织中炎症细胞浸润,从而减少 TGF-β₁/Smad3 通路的激活,抑制 α-SMA 的表达,最终减轻肾脏纤维化^[13]。

综上所述,STAT3 的特异性抑制剂可在肾脏移植慢性排斥反应中抑制 JAK2/Smad3 信号通路所引起的炎症反应,对肾脏移植起到一定的保护作用。由于时间、人力等问题,本实验存在一定的不足,未对各组大鼠术后不同时间点的 SCr、BUN、血压及磷酸化 JAK2、STAT3 等进行检测,在以后的研究中应进一步充实实验内容,为以后肾脏移植慢性排斥的研究提供依据。

参 考 文 献

- [1] 魏建伟,万里燕,卢方平. 血液透析对终末期肾病患者药代动力学及用药的影响[J]. 临床内科杂志,2019,36(7):502-504.
- [2] Miller AJ, Kiberd BA, Alwayn IP. Donor-Recipient Weight and Sex Mismatch and the Risk of Graft LOSS in Renal Transplantation[J]. Clin J Am Soc Nephrol,2017,12(4):669-676.
- [3] Nankivell BJ, Kuypers DR. Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss[J]. Lancet,2011,378(9800):1428-1437.
- [4] Haas M, Sis B, Racusen LC. Banff2013 meeting report: inclusion of e4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions[J]. Am J Transplant,2014,14(2):272-283.
- [5] Gelain A, Mori M, Meneghetti F, et al. Signal Transducer and Activator of Transcription Protein 3(STAT3): An Update on its Direct Inhibitors as Promising Anticancer Agents[J]. Curr Med Chem,2019,26(27):5165-5206.
- [6] Yadav A, Kumar B, Lang JC. A muscle-specific protein myoferlin modulates IL-6/STAT3 signaling by chaperoning activated STAT3 to nucleus[J]. Oncogene,2017,36(46):6374-6382.
- [7] Lei Z, Duan H, Zhao T. PARK2 Inhibits Osteosarcoma Cell Growth Through the JAK2/STAT3/VEGF Signaling Pathway[J]. Cell Death Dis,2018,9(3):375.
- [8] Karatzas T, Santiago S, Xanthos T, et al. An easy and safe model of kidney transplantation in rats[J]. Microsurgery,2007,27(8):668-672.
- [9] 唐浩,徐岳,曾嵩,等. SDF-1/CXCR4 信号通路在大鼠移植肾慢性排斥反应中的作用及其机制研究[J]. 中华器官移植杂志,2017,38(6):365-371.
- [10] 韩安邦,张健,路迎冬. 芪苈强心胶囊对心肌梗死大鼠心肌纤维化及 TGF-β₁/Smad3 信号通路的影响[J]. 北京中医药大学学报,2017,40(1):41-47.
- [11] Lu JR, Han HY, Hu J. Mechanism Research of Bu-Shen-Huo-Xue Formula Against Renal Fibrosis in Rats with 5/6 Nephrectomy via E-cadherin, α-SMA, and TGF-β₁ [J]. Clin Nephrol,2018,90(1):653-658.
- [12] Zhong L, Wei Z. Protective effect of berberine on renal fibrosis caused by diabetic nephropathy[J]. Mol Med Rep,2017,16(2):1055-1062.
- [13] 任德伟,钟锦,杨敬. 上调 miR-200c 通过抑制 TGF-β₁/Smad3 通路减轻单侧输尿管梗阻小鼠肾纤维化[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2018,27(3):221-226.

(收稿日期:2019-06-17)

(本文编辑:余晓曼)