

## 论著·基础研究

# 组织型转谷氨酰胺酶与转化生长因子 $\beta 1$ 在幼鼠肾间质损伤中的表达及意义<sup>\*</sup>

赵晓华<sup>1</sup>, 张 炜<sup>2</sup>, 刘宝环<sup>1</sup>, 李冠慧<sup>1</sup>

(1. 河北省沧州市人民医院颐和院区儿科, 河北沧州 061000; 2. 河北省沧州市人民医院耳鼻喉科, 河北沧州 061000)

**摘要:**目的 探讨组织型转谷氨酰胺酶(tTG)和转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ )在幼鼠肾间质损伤中的表达及意义。方法 清洁级雄性Wistar幼年大鼠60只,采用随机数字表法分为假手术组、模型组和试验组,每组20只。模型组和试验组幼鼠建立单侧输尿管结扎模型,试验组从建模后第2天起灌胃给予苯那普利和氯沙坦各6 mg/(kg·d),1次/天。于造模后第3、7、14、28天,分别处死5只大鼠,取肾组织,采用Masson染色检测肾组织常规病理变化,采用RT-PCR法检测tTG和TGF- $\beta 1$ mRNA表达水平。结果 造模后第3、7、14、28天,模型组和试验组肾间质纤维组织相对面积明显高于假手术组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),且试验组明显低于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。造模后第3、7、14、28天,模型组和试验组tTG和TGF- $\beta 1$ mRNA均明显高于假手术组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),且试验组明显低于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。tTG与TGF- $\beta 1$ 和肾间质纤维组织相对面积呈正相关关系,TGF- $\beta 1$ 与肾间质纤维组织相对面积呈正相关关系。结论 tTG和TGF- $\beta 1$ 互相作用参与肾间质纤维化过程,苯那普利可能通过调节tTG和TGF- $\beta 1$ 表达水平实现其肾保护作用。tTG和TGF- $\beta 1$ 具有成为肾间质纤维化治疗的潜在有效靶点。

**关键词:**肾间质纤维化; 组织型转谷氨酰胺酶; 转化生长因子 $\beta 1$ ; 苯那普利

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.17.003

**中图法分类号:**R692

**文章编号:**1673-4130(2018)17-2088-04

**文献标识码:**A

## Expression and significance of tissue transglutaminase and transforming growth factor $\beta 1$ in renal interstitial injury in young rats

ZHAO Xiaohua<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>2</sup>, LIU Baohuan<sup>1</sup>, LI Guanhui<sup>1</sup>

(1. Department of pediatrics, Yihe hospital, Cangzhou people's hospital, Cangzhou, Hebei 061000, China;

2. Department of otolaryngology, Cangzhou people's hospital, Cangzhou, Hebei 061000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression and significance of tissue transglutaminase (tTG) and transforming growth factor  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) in renal interstitial injury in young rats. **Methods** 60 male Wistar rats were randomly divided into sham operation group, model group and experimental group. The model of unilateral ureteral ligation was established in the model group and the experimental group. The experimental group received benazepril and losartan 6mg / (kg·d), 1 time / d from the 2nd day after the modeling. Five rats were sacrificed at 3 d, 7 d, 14 d and 28 d after model establishment. Renal tissue was taken and routine pathological changes were observed by Masson staining. The expression of tTG and TGF- $\beta 1$  mRNA was detected by RT-PCR. **Results** The relative area of renal interstitial fibrous tissue in the model group and the experimental group was significantly higher than that in the sham operation group at 3 d, 7 d, 14 d and 28 d, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ), and the experimental group was significantly lower than the model group, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). The levels of tTG and TGF- $\beta 1$  mRNA in the model group and the experimental group were significantly higher than those in the sham operation group at 3 d, 7 d, 14 d and 28 d, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ), and the experimental group was significantly lower than the model group, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). There was a significant correlation between tTG and TGF- $\beta 1$  and the relative area of renal interstitial fibrous tissue. The relative area of TGF- $\beta 1$  and renal interstitial fibrous tissue had a significant correlation. **Conclusion**

\* 基金项目:沧州市科技支撑计划项目(151302099)。

作者简介:赵晓华,女,主治医师,主要从事儿科常见病多发诊断治疗工作。

本文引用格式:赵晓华,张炜,刘宝环,等.组织型转谷氨酰胺酶与转化生长因子 $\beta 1$ 在幼鼠肾间质损伤中的表达及意义[J].国际检验医学杂志,2018,39(17):2088-2091.

TTG 和 TGF- $\beta$ 1 与肾间质纤维化密切相关, 且 benazepril 可以发挥其保护作用, 通过下调 TTG 和 TGF- $\beta$ 1 的表达, 降低肾间质纤维化。TTG 和 TGF- $\beta$ 1 有潜在的靶点, 可作为治疗肾间质纤维化的靶点。

**Key words:** Renal interstitial fibrosis; tTG; TGF- $\beta$ 1; benazepril

肾间质纤维化是一种进行性病理改变, 是几乎所有慢性肾脏病的共同病理基础。研究显示, 组织型转谷氨酰胺酶(tTG)可以使细胞外基质蛋白之间形成难以降解的氨基酸肽键促进基质蛋白的沉积, 因此 tTG 被认为是导致肾脏纤维化的重要诱导因子<sup>[1]</sup>。转化生长因子  $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)与结缔组织生长因子和血管紧张素等共同作用于肾脏组织和细胞, 使得肾小管上皮细胞和肾间质细胞凋亡增加, 细胞外基质合成增加, 最终导致细胞外基质的大量沉积而出现肾间质纤维化<sup>[2-3]</sup>。本研究建立单侧输尿管梗阻致肾间质纤维化的模型, 分析肾间质纤维化不同时间点 tTG 与 TGF- $\beta$ 1 的表达水平及相关关系, 并进一步探讨血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)及血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂(ARB)对幼鼠肾间质纤维化过程中 TGF- $\beta$ 1 和 tTG 的影响。现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物及分组** 雄性 wistar 幼鼠 60 只(山西医科大学实验动物中心提供), 3~4 周龄, 体质量 80~100 g, 正常饮食, 适应性喂养 3 d, 按照随机数字表法分为假手术组、模型组和试验组, 各 20 只。

**1.1.2 主要试剂** Masson 染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司); RT-PCR 试剂盒(大连宝生物公司); 全蛋白提取试剂盒(碧云天生物技术研究所); 苯那普利(北京诺华制药有限公司); 其他试剂均为分析纯国产试剂。

**1.1.3 主要仪器** 超净工作台(AIRTECH, 苏州净化设备有限公司), 精密电子天平(美国 Adventurer 公司), 紫外分光光度计(上海第三分析仪器厂), 酶标仪(上海安亭科学仪器厂), RT-PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司), 双垂直蛋白电泳仪(北京市六一仪器厂)。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物模型的构建** 采用输尿管下端结扎术制作大鼠单侧输尿管结扎模型<sup>[4]</sup>。手术前 12 h 禁食不禁饮, 麻醉(10% 水合氯醛), 大鼠取仰卧位, 常规碘酒酒精消毒, 于腹部正中央行竖切口 1~2 cm, 分离皮下组织及肌层, 暴露膀胱, 游离输尿管, 将左侧输尿管两侧结扎, 剪断两个结扎点之间的输尿管。术后缝合皮肤。假手术组仅分离输尿管, 不进行输尿管结扎, 其余过程同模型组和试验组。

**1.2.2 给药方案** 造模后第 2 天, 试验组大鼠给予苯那普利(6 mg/kg)于生理盐水中灌胃, 每天 1 次, 假手术组和模型组每天给予等量生理盐水灌胃。

### 1.2.3 观察指标

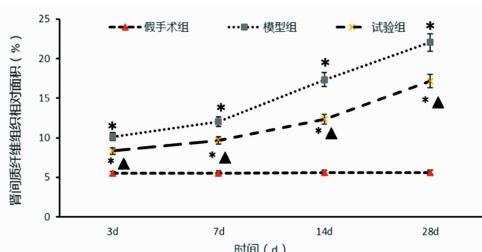
**1.2.3.1 Masson 染色** 造模后第 3、7、14、28 天, 分别取每组 5 只大鼠, 麻醉后处死, 切取左肾, 将肾脏沿长轴纵向剖为两半, 于 10% 多聚甲醛溶液中固定过夜, 石蜡包埋, 冰冻切片采用 Masson 染色, 严格按照 Masson 染色试剂盒说明书操作。显微镜下绿色为胶原纤维, 红色为细胞胞浆, 蓝色为细胞核。随机选取 6 个不重复高倍视野( $\times 200$ ), 求和取平均值作为肾间质纤维化得分, 计算公式为: 肾间质纤维组织相对面积=(绿色区域面积/视野总面积)×100%。

**1.2.3.2 RT-PCR 检测肾组织 tTG 和 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达水平** 造模后第 3、7、14、28 天, 分别取每组 5 只大鼠, 麻醉后处死, 切取左肾, Trizol 法分别提取各组大鼠总 RNA。总 RNA 采用纯化柱纯化。逆转录得 cDNA, 引物设计:  $\beta$ -actin(239 bp) 上游引物为 5'-AGG CAT CCT GAC CCT GAA GTA-3', 下游引物为 5'-GAG GCA TAC AGG GAC AAC ACA G-3'; tTG(396 bp) 上游引物为 5'-GGC AAT GAC TTT G-3', 下游引物为 5'-ATA CAG GGA ATC AGA AAG TGG GTT C-3'; TGF- $\beta$ 1(403 bp) 上游引物为 5'-CCA CCT GCA AGA CCA TCG AC-3', 下游引物为 5'-TCC TGC CCG AAT GTC TGA CG-3'。逆转录为 cDNA, 应用 RT-PCR 检测 tTG 和 TGF- $\beta$ 1 mRNA 转录水平。以  $\beta$ -actin 作为内参照, 同一标本的  $\beta$ -actin 产物表达水平校正各自目的基因的表达水平, 相对表达水平等于目的基因表达水平与  $\beta$ -actin 表达水平的比值。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 22.0 进行分析处理。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 符合正态性和方差齐, 选用单因素方差分析及两两比较的 SNK-Q 检验, 不满足正态性或方差齐则选用秩和检验, 相关性分析采用 pearson 相关性分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

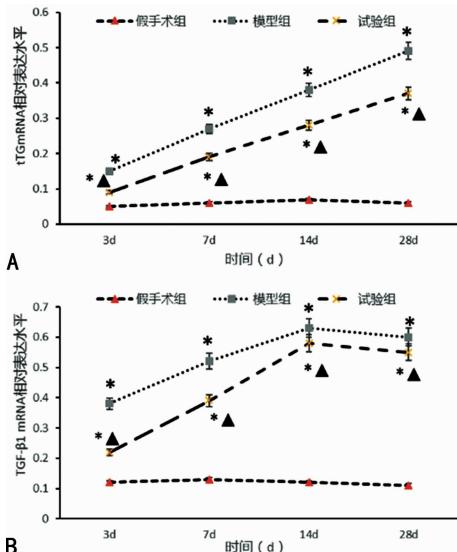
**2.1 Masson 染色结果** 术后三组幼鼠恢复良好, 无明显感染和死亡情况发生。Masson 染色结果显示假手术组肾间质无明显绿染, 模型组绿染面积明显增加, 试验组小部分绿染, 方差分析结果显示肾间质纤维组织相对面积比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 且随着时间延长, 模型组和试验组绿染面积逐渐增加, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。两两比较显示, 模型组和试验组肾间质纤维组织相对面积明显高于假手术组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 且试验组明显低于模型组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 1。



注:与假手术组比较, \*  $P < 0.05$ ;与模型组比较, ▲  $P < 0.05$

图 1 各组大鼠各时间点 Masson 染色面积百分比

**2.2 tTG 和 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达水平** 三组 tTG mRNA 吸光度值比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),且随着时间延长,模型组和试验组吸光度值逐渐增加,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。两两比较显示,模型组和试验组 tTG mRNA 均明显高于假手术组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),且试验组明显低于模型组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。三组 TGF- $\beta$ 1 mRNA 吸光度值比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),且随着时间延长,模型组和试验组吸光度值逐渐增加,在第 14 天达到高峰。两两比较显示,模型组和试验组 TGF- $\beta$ 1 mRNA 均明显高于假手术组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),且试验组明显低于模型组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 2。



注:与假手术组比较, \*  $P < 0.05$ ;与模型组比较, ▲  $P < 0.05$

图 2 各组大鼠各时间点 tTG 和 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达水平

**2.3 相关性分析** tTG 与 TGF- $\beta$ 1 和肾间质纤维组织相对面积呈正相关关系,TGF- $\beta$ 1 与肾间质纤维组织相对面积呈正相关关系。见表 1。

表 1 tTG 和 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达相关性分析

指标	tTG	TGF- $\beta$ 1	肾间质纤维组织相对面积
tTG	—	0.868	0.912
TGF- $\beta$ 1	0.868	—	0.815
肾间质纤维组织相对面积	0.912	0.815	—

### 3 讨 论

肾间质纤维化是一种在多种因子刺激下导致的肾脏间质细胞和细胞间质增多,特别是基质蛋白降解减少、合成增加,导致肾小管间质和肾小球纤维化的疾病<sup>[5]</sup>。肾小球和肾血管硬化是肾间质纤维化的主要病理表现。输尿管梗阻导致的肾脏病理改变与多种肾病引起的肾小管间质病理改变相似<sup>[6-7]</sup>。因此,本研究建立大鼠单侧输尿管结扎模型,该模型可导致肾小管间质改变,被认为是研究肾间质纤维化的极好的动物模型。本研究 Masson 染色结果显示假手术组肾间质无明显绿染,模型组绿染面积明显增加,试验组小部分绿染,方差分析结果显示肾间质纤维组织相对面积比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),且随着时间延长,模型组和试验组绿染面积逐渐增加,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。两两比较显示,模型组和试验组肾间质纤维组织相对面积明显高于假手术组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),且试验组明显低于模型组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。表明大鼠单侧输尿管结扎模型可导致严重的肾间质纤维化,苯那普利可明显缓解肾间质纤维化过程。

tTG 也被称为 2 型转谷氨酰胺酶,属于转谷氨酰胺酶家族中的一员,广泛存在于多种组织的细胞核、细胞质、线粒体和细胞膜中,具有多种生物学功能,除了酰基转移酶活性外,tTG 还具有  $\text{Ca}^{2+}$  非依赖的三磷酸鸟苷水解酶、蛋白激酶和二硫化物异构酶活性<sup>[8-9]</sup>。作为一种  $\text{Ca}^{2+}$  依赖蛋白酶,在正常情况下由于 GTP/GDP 抑制效应和低  $\text{Ca}^{2+}$  水平,tTG 受到严密的调控,其催化蛋白质交联的功能不能表现。在肾间质纤维化过程中,由于肾脏细胞受损,储存在细胞肌质网和内质网中的  $\text{Ca}^{2+}$  内稳态被打破,  $\text{Ca}^{2+}$  水平上升,激活 tTG 的催化蛋白质交联功能,导致细胞内蛋白质分子发生交联,从而影响细胞正常功能甚至导致细胞凋亡<sup>[10]</sup>。

TGF- $\beta$  包括 TGF- $\beta$ 1~5,其中 TGF- $\beta$ 1 主要表达于肾脏中的肾小管上皮细胞,而在肾小球中表达相对较少。TGF- $\beta$ 1 具有促进细胞外基质合成和纤维细胞增殖的作用,其表达水平升高与肾纤维化关系密切,TGF- $\beta$ 1 被认为是肾纤维化过程中最重要的作用因子之一<sup>[11-12]</sup>。正常情况下,TGF- $\beta$ 1 可抑制细胞的增殖,但其表达上升可导致大量合成纤维连接蛋白、胶原蛋白和层粘连蛋白,刺激成纤维细胞增殖,最终导致肾小管上皮向间质细胞转化。同时,TGF- $\beta$ 1 被证实在细胞外基质成分的分子改变从而介导细胞外基质的堆积过程中具有重要作用<sup>[13]</sup>。

本组数据显示,方差分析结果显示三组 tTG mRNA 吸光度值比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),且随着时间延长,模型组和试验组吸光度值逐渐增加,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。两两比较显示,模型组和试验组 tTG mRNA 均明显高于假手术组,差异

有统计学意义( $P<0.05$ ),且试验组明显低于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。三组 TGF- $\beta 1$  mRNA 吸光度值比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),且随着时间延长,模型组和试验组吸光度值逐渐增加,在第 14 天达到高峰。两两比较显示,模型组和试验组 TGF- $\beta 1$  mRNA 均明显高于假手术组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),且试验组明显低于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。表明肾间质纤维化过程中 tTG 和 TGF- $\beta 1$  表达上调,苯那普利的肾保护作用可能通过下调 tTG 和 TGF- $\beta 1$  表达水平实现。一方面,tTG 的合成受到 TGF- $\beta 1$  的调节,另一方面 tTG 可催化 TGF- $\beta 1$  连接蛋白与细胞外基质交联,从而使 TGF- $\beta 1$  释放出活性结构<sup>[14-15]</sup>。相关性分析结果表明 tTG 和 TGF- $\beta 1$  在肾间质纤维化过程中互相作用,参与肾间质纤维化过程。

#### 4 结 论

tTG 和 TGF- $\beta 1$  互相作用参与肾间质纤维化过程,苯那普利可通过下调 tTG 和 TGF- $\beta 1$  表达水平实现其肾脏保护作用。tTG 和 TGF- $\beta 1$  具有成为肾间质纤维化治疗的潜在有效靶点。

#### 参考文献

- 胡岳,王涌,邱江锋.组织型转谷氨酰胺酶在肿瘤发生、发展、侵袭和转移中的作用及其作用机制的研究进展[J].肿瘤,2013,33(9):831-836.
- 易晓颖,王辞晓,陈彤,等.补益脾肾方对阿霉素肾病大鼠肾间质 TGF- $\beta 1$ 、HGF 影响随机平行对照研究[J].实用中医内科杂志,2015,29(7):126-128.
- TIAN S, LI C, RAN R, et al. Surfactant protein A deficiency exacerbates renal interstitial fibrosis following obstructive injury in mice[J]. Biochim Biophys Acta, 2017, 1863(2):509-517.
- 高艳霞,蔡宏瑜,万强,等.黄芪山甲对 UUO 模型中肾间质纤维化 TGF- $\beta 1$  及 FN 的影响[J].中国中西医结合肾病杂志,2013,14(12):1090-1091.
- WEI X, XIA Y, LI F, et al. Kindlin-2 mediates activation of TGF- $\beta$ /Smad signaling and renal fibrosis[J]. J Am Soc

(上接第 2087 页)

- 丁玲.果蔬常压冷冻干燥玻璃化转变行为的研究[D].洛阳:河南科技大学,2015.
- 赵立山.水溶液的液固转变以及玻璃化转变的研究[D].北京:北京科技大学,2017.
- 冀浩博,张弘,郑华等.差示扫描量热法测定紫胶树脂玻璃化转变温度的条件研究[J].材料导报,2014,28(8):98-104.
- 杨智,李代喜,张燕等.冷冻干燥过程中重要参数塌陷温度的研究[J].应用化工,2014,43(5):962-965.
- 刘代春,于颖,卢存义.冻干显微镜研究进展[J].机电信

Nephrol, 2013, 24(9):1387-1398.

- [6] LIAO X H, ZHANG L, CHEN G T, et al. Augmenter of liver regeneration inhibits TGF- $\beta 1$ -induced renal tubular epithelial-to-mesenchymal transition via suppressing T $\beta$ R II expression in vitro[J]. Exp Cell Res, 2014, 327(2): 287-296.
- [7] 刘艳姝,桑吉武,刘中柱,等.活性维生素 D<sub>3</sub> 对 UUO 模型大鼠肾间质 OPN、TGF- $\beta 1$  表达的影响[J].黑龙江医药科学,2015,38(4):3-5.
- [8] 赵晓华,马宏,李卫卫,等.组织型转谷氨酰胺酶在幼鼠肾间质损伤中的表达及意义[J].中国药物与临床,2009,9(4):307-309.
- [9] LIM M J, AHN J, YI J Y, et al. Induction of galectin-1 by TGF- $\beta 1$  accelerates fibrosis through enhancing nuclear retention of Smad2[J]. Exp Cell Res, 2014, 326(1):125-135.
- [10] 赵晓华.组织型转谷氨酰胺酶与转化生长因子  $\beta 1$  在幼鼠肾间质损伤中的表达及意义[D].太原:山西医科大学,2009.
- [11] AN H J, KIM J Y, KIM W H, et al. The protective effect of melittin on renal fibrosis in an animal model of unilateral ureteral obstruction[J]. Molecules, 2016, 21(9):1137.
- [12] ZHAN C Y, TANG J H, ZHOU D X, et al. Effects of tanshinone II A on the transforming growth factor  $\beta 1$ /Smad signaling pathway in rat cardiac fibroblasts[J]. Indian J Pharmacol, 2014, 46(6):633.
- [13] 苏青.银杏叶提取物对糖尿病大鼠肾脏 tTG 的影响及有效成分体外筛选[D].长春:吉林大学,2013.
- [14] HOU S X, ZHU W J, PANG M Q, et al. Protective effect of iridoid glycosides from Paederia scandens (LOUR.) MERRILL (Rubiaceae) on uric acid nephropathy rats induced by yeast and potassium oxonate[J]. Food Chem Toxicol, 2014(64):57-64.
- [15] WANG Y, XUE C, DONG F, et al. Hydroxysafflor yellow A attenuates small airway remodeling in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Biol Pharm Bull, 2014, 37(10):1591-1598.

(收稿日期:2018-01-06 修回日期:2018-04-20)

息,2017(32):1-15.

- [12] 贺素艳,张光存,于永全,等.真空预冷后甘蓝组织显微结构和超微结构的改变[J].电子显微学报,2013,32(2):168-172.
- [13] 张凡伟,杨炳南,曹有福,等.响应面法优化刺参的真空冷冻干燥工艺[J].食品科技,2017,42(8):165-169.
- [14] 杨辉.人参和西司他丁钠真空冷冻干燥工艺的研究[D].杭州:浙江大学,2017.

(收稿日期:2018-01-04 修回日期:2018-04-18)