

·专题报道 ·

# 基质金属蛋白酶 1/组织金属蛋白酶抑制因子 1 在常染色体显性遗传性多囊肾组织中的表达

崔心刚<sup>1,2</sup>,安瑞华<sup>2\*</sup>,王立明<sup>3</sup>,朱有华<sup>3</sup>,梅长林<sup>4</sup>

(1. 第二军医大学长征医院泌尿外科,解放军泌尿外科中心,上海 200003;2. 哈尔滨医科大学附属第一医院泌尿外科,哈尔滨 150001;3. 第二军医大学长征医院器官移植科,解放军器官移植研究所,上海 200003;4. 长征医院肾内科,解放军肾脏病研究所)

[摘要] 目的:探讨基质金属蛋白酶 1(MMP1)/组织金属蛋白酶抑制因子(TIMPI)在正常肾脏、常染色体显性遗传性多囊肾病(ADPKD)肾脏以及肾移植平均(2.5 ±1.2)年后切除的 ADPKD 肾组织中的表达差异。方法:用基因表达谱芯片筛选正常肾脏、ADPKD 肾脏及肾移植后 ADPKD 肾脏的差异表达基因;以 RT-PCR 法验证其中差异表达的 MMP1/ TIMPI。结果:基因芯片筛选发现在正常肾组织与 ADPKD 肾组织中存在 463 条差异表达基因,肾移植后 ADPKD 肾组织对比 ADPKD 肾组织存在 130 条差异表达基因。筛选结果表明 ADPKD 以及肾移植后 ADPKD 肾脏 MMP1/ TIMPI 表达较正常肾组织明显上调 ( $P < 0.05$ ),而前两者间无显著差异。RT-PCR 法证实 MMP1/ TIMPI 在 ADPKD 肾脏以及肾移植后 ADPKD 肾组织中的表达均明显上调,明显高于正常肾脏组织 ( $P < 0.05$ ),而前两者间无显著差异。结论:ADPKD 的病理改变可能与 MMPs/ TIMPs 基因表达失衡有关,MMPs 抑制剂可能会对其有一定的治疗作用。

[关键词] 基质金属蛋白酶 1;组织金属蛋白酶抑制因子 1;肾;肾移植;多囊肾,常染色体显性

[中图分类号] R 692 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2006)11-1174-04

## Expression of matrix metalloproteinases-1/ tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in kidney of patients with autosomal dominant polycystic kidney disease

CUI Xir-gang<sup>1,2</sup>, AN Rui-hua<sup>2\*</sup>, WANGLi-ming<sup>3</sup>, ZHU You-hua<sup>3</sup>, MEI Chang-lin<sup>4</sup> (1. Department of Urology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Urology Center of PLA, Shanghai 200003, China; 2. Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Harbin University, Harbin 150001; 3. Department of Organ Transplantation, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Organ Transplantation Institute of PLA, Shanghai 200003; 4. Department of Nephrology, Changzheng Hospital, Kidney Disease Research Institute of PLA)

[ABSTRACT] Objective: To investigate the differential expression of matrix metalloproteinases-1 / tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (MMP-1/ TIMP-1) between normal kidney, kidneys of patients with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), and the original kidneys after renal transplantation (OKRT). Methods: DNA microarray technique was used to analyze the differential gene expression in the above 3 tissues. Semi-quantitative RT-PCR was performed to verify the differentially expressed genes. Results: There were 463 differentially expressed genes between normal kidney and ADPKD tissues and 130 differentially expressed genes between ADPKD and the OKRT tissues. Expression of MMP1/ TIMP1 in the ADPKD and the OKRT tissues were significantly higher than that in the normal kidney tissue ( $P < 0.05$ ), with no significant difference found between the former 2 groups. Results of RT-PCR were consistent with the microarray findings. Conclusion: The pathogenesis of ADPKD may be related with the high expression of MMPs/ TIMPs and the inhibitor of MMPs may have therapeutic effect on ADPKD.

[KEY WORDS] matrix metalloproteinases-1; tissue inhibitor of metalloproteinase-1; kidney; kidney transplantation; polycystic kidney, autosomal dominant

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(11): 1174-1177]

常染色体显性遗传性多囊肾病(ADPKD)是常见的遗传性肾病,在终末期肾衰的患者中占到5%~10%,多数需要肾脏移植,目前没有有效的治疗方法<sup>[1]</sup>。ADPKD一个重要病理学特征就是细胞外基质的堆积,而MMP1/TIMP1系统在调节细胞外基质平衡方面又起到重要的作用。因此,本研究应用基因芯片技术和RT-PCR观察MMP1/TIMP1

[基金项目] 黑龙江省博士后基金(LRB04-228);第二军医大学长征医院“三重三优”优秀青年后备人才基金。Supported by Fund for Postdoctor Candidate of Heilongjiang Province(LRB04-228) and the Key Superior Program of Changzheng Hospital.

[作者简介] 崔心刚,博士,讲师、主治医师。现在哈尔滨医科大学附属第一医院泌尿外科博士后流动站,哈尔滨 150001。

\* Corresponding author. E-mail: anruihua@yahoo.com.cn



在正常肾脏、ADPKD 肾脏、肾移植后 ADPKD 肾脏组织中的表达差异, 探讨 ADPKD 和 MMP1/TIMP1 可能的相关性。

## 1 材料和方法

1.1 取材 正常肾脏、ADPKD 肾脏、肾移植后 ADPKD 肾脏组织各 6 例, 均取自第二军医大学长征医院泌尿外科 2002~2004 年的手术切除标本, 经病理确诊。患者平均年龄分别为  $(48 \pm 3.7)$  岁、 $(51 \pm 4.2)$  岁和  $(54 \pm 9.2)$  岁。ADPKD 患者病程平均  $(12.7 \pm 4.3)$  年, 均有典型的病史和家族史。肾移植后 ADPKD 患者肾移植术后时间平均为  $(2.5 \pm 1.2)$  年, 因泌尿系统感染 (2 例)、血尿 (4 例) 切除患侧肾脏。组织阻断血流 2 min 内用无 RNA 酶铝箔包裹, 存入液氮。

1.2 RNA 抽提和 mRNA 纯化 改良酚氯仿一步法抽提总 RNA, 样品经分光光度计检测光密度值, 电泳 RNA 条带。用 Oligotex mRNA Midi Kit (Quagen 公司) 纯化 mRNA, 操作按照说明书进行, 并电泳检测。

### 1.3 基因芯片筛选差异表达基因

1.3.1 芯片材料及设备 4 张 4 096 点表达谱芯片分 2 组: 前组 2 张, 正常肾脏对比 ADPKD 肾脏; 后组 2 张, ADPKD 肾脏对比肾脏移植后 ADPKD 肾脏。芯片杂交试剂盒均由上海联合基因公司提供。

1.3.2 探针制备 参照 Schena 等<sup>[2]</sup>的方法反转录标记 cDNA 探针并纯化, 前组用 Cy3-dUTP 标记正常肾组织 mRNA, Cy5-dUTP 标记 ADPKD 肾组织的 mRNA, 后组用 Cy3-dUTP 标记 ADPKD 肾组织 mRNA, Cy5-dUTP 标记肾移植后 ADPKD 肾组织 mRNA, 各 5  $\mu$ g, 乙醇沉淀后溶解在 20  $\mu$ l 5  $\times$ SSC + 0.2% SDS 杂交液中。

1.3.3 杂交和洗涤 将芯片和杂交探针分别在 95  $^{\circ}$ C 水浴中变性 5 min, 与预热的杂交液混合起来, 置杂交密封仓内加以密闭。恒温杂交箱内 60  $^{\circ}$ C 杂交 15~17 h, 依次以 2  $\times$ SSC、0.2% SDS、0.1% SSC 洗涤 10 min, 室温避光晾干。

1.3.4 检测和分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray4000 扫描芯片, Gene Pix Pro3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度, 计算 Cy5/Cy3 的值, 用以下 3 个条件判断基因差异表达的标准: (1) Cy5 和 Cy3 比值的自然对数的绝对值  $> 0.69$  (基因

的表达变化差异在 2 倍以上); (2) Cy3、Cy5 的值皆大于 200 或其一大于 800; (3) 芯片两两对比, 取两张芯片上均差异表达的基因为研究对象。经过计算, 4 张芯片的均一化系数分别为 1.056、0.944、0.984、1.012。

1.4 RT-PCR 验证 MMP1、TIMP1 表达 对基因芯片筛选出的 MMP1、TIMP1 进行验证。主要步骤包括: (1) RNA 抽提、鉴定; (2) 从总 RNA 合成 cDNA; (3) PCR 扩增 (反应体系 50  $\mu$ l)。反应体系包括: 灭菌水 39.5  $\mu$ l、10  $\times$ buffer 5  $\mu$ l、dNTP 1  $\mu$ l、引物 2  $\mu$ l、模板 2  $\mu$ l、Taq 酶 0.6  $\mu$ l (所需试剂均购自上海博亚生物技术有限公司)。温度条件: 变性 94  $^{\circ}$ C 2 min, 29 个扩增循环 (94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火温度 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min), 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 6 min。引物序列如下, MMP1: 上游引物 5'-TGC TCA TGC TTT TCA ACC-3', 下游引物 5'-GAA AGC CCA GTA CTT ATT CC-3', 退火温度 55  $^{\circ}$ C; TIMP1: 上游引物 5'-CCC CAG AAA TCA TCG AGA C-3', 下游引物 5'-GAT TAT GCC AGG GAA CCA G-3', 退火温度 55  $^{\circ}$ C; -actin: 上游引物 5'-GAG CTA TGA GCT GCC TGA CG-3', 下游引物 5'-AGC ACT TGC GGT CCA CGA TG-3'。

1.5 统计学处理 计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 总 RNA 抽提和 mRNA 纯化 正常肾组织总 RNA 浓度为 4.656  $\mu$ g/ $\mu$ l,  $D_{260}/D_{280}$  为 1.175/0.609。ADPKD 肾组织的总 RNA 浓度为 2.852  $\mu$ g/ $\mu$ l,  $D_{260}/D_{280}$  为 0.724/0.366; 移植后 ADPKD 肾组织总 RNA 浓度为 3.128  $\mu$ g/ $\mu$ l,  $D_{260}/D_{280}$  为 0.785/0.384。抽提的总 RNA 和 mRNA 经电泳检测满意。  $D_{260}/D_{280}$  均在 1.8~2.0 间, 达到提取要求。

2.2 表达谱芯片检测结果 在进入研究的 4 096 条基因中, 与正常肾脏比较, ADPKD 肾脏存在 463 条差异表达基因, 上调的有 206 条, 下调的有 257 条 (图 1A)。与 ADPKD 肾脏相比, 移植后 ADPKD 肾脏有 130 条差异表达基因, 上调的有 60 条, 下调的有 70 条 (图 1B)。与正常肾脏比较, ADPKD 肾脏 MMP1 荧光比值为 2.362, TIMP1 比值为 10.910; 与 ADPKD 肾脏相比, 移植后 ADPKD 肾脏组织荧光比值 MMP1 为 0.509, TIMP1 为 1.300。移植后 ADPKD 患者肾脏以及 ADPKD 肾脏组织 MMP1

和 TIMP1 均明显高于正常肾脏组织 ( $P < 0.05$ ),而前两者间无显著差异。

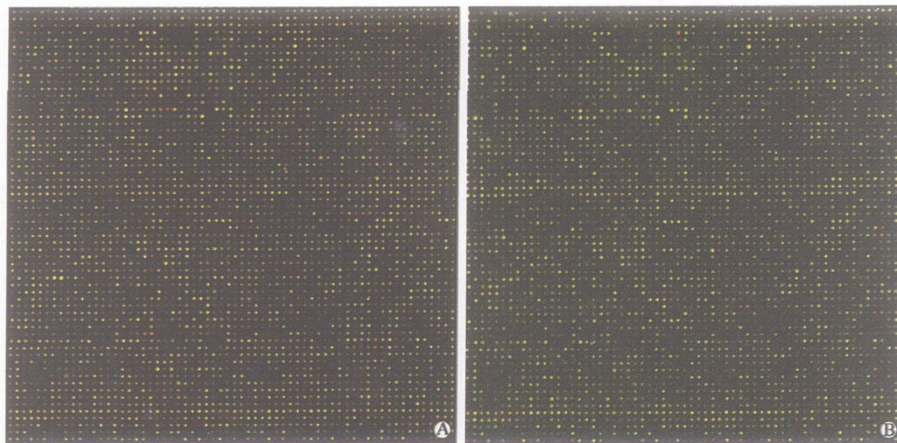


图 1 基因芯片筛选差异表达基因

Fig 1 Microarray screening of differentially expressed genes in 3 groups

A: The differentially expressed genes between normal and ADPKD renal tissues; B: The differentially expressed gene between ADPKD and the original kidney tissues after renal transplantation

2.3 RT-PCR 测定 结果证实 MMP1/ TIMP1 在 ADPKD 肾脏以及移植后 ADPKD 肾脏组织的表达明显上调,明显高于正常肾脏组织 ( $P < 0.05$ );而前两者间无显著差异(表 1)。

表 1 3 组肾脏组织中 MMP1/ TIMP1 RT-PCR 测定结果

Tab 1 MMP1/ TIMP1 expression in 3 tissue samples (n = 6,  $\bar{x} \pm s$ , %)

Group	MMP1	TIMP1
Normal	11.00 ±2.11	3.89 ±1.62
ADPKD	26.53 ±8.50 *	7.72 ±2.03 *
OKRT	24.20 ±6.00 *	9.15 ±1.05 *

\*  $P < 0.05$  vs Normal group; OKRT: The original kidney after renal transplantation

### 3 讨论

肾纤维化几乎是所有肾脏疾病进展到终末期肾衰的共同通路。近来认为肾小球与肾小管间质纤维化的进程存在某些共同的病理机制,在增殖性肾脏疾病中都有细胞外基质 (ECM) 的堆积<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>表明 ECM 的堆积与肾脏组织 ECM 产生增多有关。Eddy 等<sup>[5]</sup>研究发现,ECM 的堆积是由于基质蛋白合成增加及降解受抑制的综合结果。ADPKD 的一个显著特征就是 ECM 的堆积,因此了解 ECM 的堆积情况及机制对了解疾病进展可能有一定的帮助。

MMPs 是一组锌离子依赖酶,在 ECM 代谢的调节中起着非常重要的作用。它是由多肽、N 末端、

中心区和 C 末端组成的一段氨基酸序列,平时以无活性的酶原形式存在。其活性中心有 1 个锌离子, pH 中性时会被钙离子激活<sup>[6]</sup>。其 N 端参与 MMPs 的活化,C 端参与 MMPs 与底物的结合,其锌离子依赖的催化活性中心可与 TIMPs 的 N 端结合,从而被抑制<sup>[7]</sup>。TIMP1 能抑制绝大多数的 MMPs,位于人 Xp11.23-Xp11.4 染色体,广泛存在于组织和体液中,能被多种细胞因子诱导产生,其表达增高能引发多种肾脏疾病<sup>[8]</sup>。多囊肾大鼠模型中,肾小管上皮细胞 TIMP1 的 mRNA 上升 9 倍<sup>[9]</sup>,而且 MMPs/ TIMPs 对 ADPKD 囊壁细胞增生与组织内血管形成也有明显作用<sup>[10]</sup>。MMPs 的主要功能包括:降解除多糖以外的全部 ECM 成分;激活别的 MMPs,形成“瀑布”效应。凡是有 ECM 增多的肾脏疾病都有 TIMP 的高表达或 MMPs/ TIMPs 比值降低。

本实验发现 ADPKD 对比正常肾脏,MMP1、TIMP1 表达均明显上调;对比肾脏移植后的囊肾组织,差异似乎并不明显。ADPKD 囊肾组织中 MMP1 的荧光比值为 2.362,TIMP1 更是高达 10.910,MMPs/ TIMPs 比例失调,证实 ECM 降解失常的确存在。RT-PCR 扩增后 MMP1、TIMP1 在 ADPKD 组织里也有明显的高表达。这些结果表明 ADPKD 囊肾组织和正常的肾脏相比有明显的纤维化和 ECM 堆积、降解异常的情况,这种 ECM 异常的病理学表现正是肾功能逐步恶化的重要标志。如

果囊肾的纤维化继续加重, 肾功能必然逐步衰竭。由此我们推测 MMP1/ TIMP1 在肾脏病理学活检中可以作为一个判断囊肾功能变化的指标, 可以比较并判断疾病进展的速度。移植后的 ADPKD 其囊肾 MMP1、TIMP1 的表达与 ADPKD 肾脏相比, 并没有明显差异。这可能是因为肾移植后的 ADPKD 囊肾组织大量纤维化形成, 保留肾已经丧失了功能, 即使肾脏移植术后大量服用环孢素、雷帕霉素等对囊肾纤维化有一定缓解作用的药物, 但对于已经衰竭的肾脏, 仍然无法起到明显的作用。

由此, 我们考虑可以应用 MMPs/ TIMPs 调节剂来治疗 ADPKD。一些细胞因子均可调节 MMPs 活性, 如 EGF、PDGF 正向调节, IFN- $\gamma$  则反向调节, 还有  $\alpha_2$ -巨球蛋白也是体内一种重要的 MMPs 非特异性抑制剂, 具有“诱饵结构”。其被蛋白酶水解, 会引起构象改变, 从而俘获蛋白酶, 阻断 MMPs 与 ECM 结合, 减少 ECM 异常降解, 维持组织稳定<sup>[11]</sup>。如果 MMPs/ TIMPs 系统被良好调节掌控, 就可以尽量减少 ADPKD 肾组织的 ECM 堆积, 达到抑制疾病进展甚至是治疗的目的。

#### [参考文献]

- [1] Tao Y, Kim J, Schrier RW, et al. Rapamycin markedly slows disease progression in a rat model of polycystic kidney disease [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16: 46-51.
- [2] Schena M, Shalun D, Davis RW, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA

- microarray[J]. *Science*, 1995, 270: 467-470.
- [3] Joly D, Berissi S, Bertrands A, et al. Laminin 5 regulates polycystic kidney cell proliferation and cyst formation[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281:29181-29189.
- [4] Grantham JJ. Does extended-release somatostatin slow the growth of renal cysts in autosomal-dominant polycystic kidney disease[J]? *Nat Clin Pract Nephrol*, 2006, 2:66-67.
- [5] Eddy AA. Molecular insights into renal interstitial fibrosis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 1996, 7: 2495-2508.
- [6] Poulalhon N, Farge D, Roos N, et al. Modulation of collagen and MMP-1 gene expression in fibroblasts by the immunosuppressive drug rapamycin: a direct role as an antifibrotic agent [J]? *J Biol Chem*, 2006, 281:33045-33052.
- [7] Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, et al. Structural properties of matrix metalloproteinases [J]. *Cell Mol Life Sci*, 1999, 55: 639-652.
- [8] Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, et al. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions[J]. *Eur J Cell Biol*, 1997, 74: 111-122.
- [9] Schaefer L, Han X, Gretz N, et al. Tubular gelatinase A (MMP-2) and its tissue inhibitors in polycystic kidney disease in the Han:SPRD rat[J]. *Kidney Int*, 1996, 49:75-81.
- [10] Bello-Reuss E, Holubec K, Rajaraman S. Angiogenesis in autosomal-dominant polycystic kidney disease [J]. *Kidney Int*, 2001, 60:37-45.
- [11] Schafer L, Lorenz T, Daemrich J, et al. Role of proteinases in renal hypertrophy and matrix accumulation[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 1995, 10:801-807.

[收稿日期] 2006-08-22

[修回日期] 2006-11-04

[本文编辑] 贾泽军

## 《临床睡眠障碍诊疗手册》已出版

本书根据睡眠障碍的病理生理学特点进行目录编排, 并列各种类型睡眠障碍的国际诊断标准, 突出临床实用性。全书包括 90 余种睡眠疾病, 对于临床常见的睡眠问题, 如失眠、睡眠增多、打鼾、遗尿、磨牙、抽动、梦语、梦魇、睡行及躯体与精神疾病相关性睡眠障碍的发生机制、诊断、鉴别诊断与治疗, 以及睡眠生理、睡眠障碍治疗药物、睡眠障碍客观评估方法和评估量表等, 进行了论述。本书适用于临床各科医师, 特别是神经内科、老年病科、呼吸内科、心血管内科、耳鼻喉科、小儿科和精神科临床医师参考阅读。

由第二军医大学出版社出版、发行, ISBN 7-81060-600-X/R. 477, 定价:49.00 元。

订购电话:021-65493093, 地址:上海市翔殷路 800 号 第二军医大学出版社发行科, 邮编:200433