

## 促红细胞生成素及其受体在慢性环孢素 A 肾毒性大鼠肾组织中的表达

雷东明<sup>1</sup>, 邹洪斌<sup>2</sup>, 高弼虎<sup>3</sup>, 金英顺<sup>1</sup>, 刘金莲<sup>1</sup>, 罗康<sup>1</sup>, 金华<sup>1</sup>, 金世兰<sup>1</sup>, 李灿<sup>1\*</sup>

1. 延边大学附属医院肾内科, 延吉 133000
2. 吉林大学第一医院肾内科, 长春 130021
3. 大连大学附属中山医院肾内科, 大连 116001

**[摘要]** **目的** 探讨慢性环孢素 A (CsA) 能否导致贫血, 以及促红细胞生成素 (EPO) 及其受体 (EPOR) 在慢性 CsA 肾毒性大鼠肾组织中的表达变化。**方法** SD 大鼠给予 CsA 15 mg/(kg·d) 皮下注射 4 周建立慢性 CsA 肾毒性模型 (CsA 毒性组), 对照组 1 mL/(kg·d) 皮下注射橄榄油。采用全自动生化分析仪检测两组大鼠的肾功能, 血红蛋白 (Hb)、红细胞压积 (Hct) 水平, 三色 (Masson Trichrome) 染色确定肾小管间质纤维化程度; 免疫组织化学染色和蛋白质印迹法分别检测肾组织 EPO 及 EPOR 蛋白的表达; TUNEL 染色和电子显微镜观察细胞凋亡。**结果** 与对照组相比, CsA 毒性组大鼠肾功能低下, 肾小管间质发生纤维化, 凋亡细胞增多 ( $P < 0.01$ ); 同时 CsA 毒性组大鼠有贫血发生, 表现为 Hb 和 Hct 水平的下降 ( $P < 0.01$ )。免疫组织化学染色和蛋白质印迹分析结果表明, EPO 在 CsA 毒性组肾组织中的表达减少, 而 EPOR 的表达增加 ( $P < 0.01$ )。直线相关分析提示, EPO 蛋白表达与肾小管间质纤维化 ( $r = -0.729, P < 0.001$ ) 和 TUNEL 阳性细胞数 ( $r = -0.841, P < 0.001$ ) 呈负相关。**结论** 慢性 CsA 肾毒性大鼠肾组织中 EPO 蛋白表达减少, 从而导致贫血; CsA 诱导肾小管上皮细胞凋亡与 EPO 蛋白表达减少有关。

**[关键词]** 环孢素 A; 肾毒性; 贫血; 红细胞生成素; 红细胞生成素受体; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R 692 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)08-0823-05

## Expression of erythropoietin and its receptor in renal tissues of rats with chronic cyclosporine A nephrotoxicity

LEI Dong-ming<sup>1</sup>, ZOU Hong-bin<sup>2</sup>, GAO Bi-hu<sup>3</sup>, JIN Ying-shun<sup>1</sup>, LIU Jin-lian<sup>1</sup>, LUO Kang<sup>1</sup>, JIN Hua<sup>1</sup>, JIN Shi-lan<sup>1</sup>, LI Can<sup>1\*</sup>

1. Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin, China
2. Department of Nephrology, First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin, China
3. Department of Nephrology, The Affiliated Zhongshan Hospital of Dalian University, Dalian 116001, Liaoning, China

**[Abstract]** **Objective** To examine whether cyclosporine A (CsA) treatment can induce anemia and changes in expression of erythropoietin (EPO) and its receptor (EPOR) in renal tissues of rats with chronic CsA nephrotoxicity. **Methods** Sprague-Dawley rats were treated daily with subcutaneous injection of vehicle (olive oil, 1 mL/kg, control group) or CsA (15 mg/kg, CsA nephrotoxicity model group) for 4 weeks. The renal function and hemoglobin (Hb) and hematocrit (Hct) levels were analyzed by Automatic Biochemistry Analyzer in the two groups. Masson Trichrome staining was used to examine the extent of tubulointerstitial fibrosis. Immunohistochemistry and Western blotting analysis were used to examine the expression of EPO and EPOR protein. And cell apoptosis was observed by TUNEL assay and electron microscope. **Results** Compared with the control group, CsA nephrotoxicity group showed renal insufficiency, tubulointerstitial fibrosis, and significantly more apoptotic cells ( $P < 0.01$ ). Meanwhile, CsA nephrotoxicity group also had anemia, manifested by significantly decreased Hb and Hct levels ( $P < 0.01$ ). Immunohistochemistry and Western blotting analysis showed that CsA treatment significantly decreased EPO expression and significantly increased EPOR expression compared with the control group ( $P < 0.01$ ). Furthermore, we also found that EPO protein expression was negatively associated with tubulointerstitial fibrosis ( $r = -0.729, P < 0.001$ ) and the number of TUNEL-positive cells ( $r = -0.841, P < 0.001$ ). **Conclusion** Renal EPO expression is decreased in rats with chronic CsA nephrotoxicity, which resulting in anemia; and tubular epithelial cell apoptosis induced by CsA is related to decrease of EPO protein.

**[收稿日期]** 2013-03-21 **[接受日期]** 2013-05-08

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81160092). Supported by National Natural Science Foundation of China (81160092).

**[作者简介]** 雷东明, 硕士. E-mail: leidongming@aliyun.com

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 0433-2660065, E-mail: lican@ybu.edu.cn

[Key words] cyclosporine A; nephrotoxicity; anemia; erythropoietin; erythropoietin receptors; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(8): 823-827]

长期使用环孢素 A(cyclosporine A, CsA)易导致各种并发症,常见的有肾毒性、肝毒性、神经毒性、糖代谢紊乱、多毛症、口腔溃疡等,其中慢性 CsA 肾毒性是移植肾功能延迟(delayed graft function)最常见的原因,严重影响移植肾功能和患者的生存率。在肾移植患者中,服用 CsA 1年后慢性 CsA 肾毒性的发病率仅为 15%,但其 5年和 10年后的发病率分别增至 65%和 100%<sup>[1]</sup>。因此,充分认知该药并发症具有重要临床意义。慢性 CsA 肾毒性以进行性肾功能下降、肾小管间质炎症以及带状纤维化为特征,其分子发病机制极其复杂,可能与肾素-血管紧张素系统、炎性介质、氧化应激、转化生长因子、细胞凋亡等因素有关<sup>[2-3]</sup>。然而,长期使用 CsA 是否会导致贫血,至今国内外报道较少。本实验利用慢性 CsA 肾毒性大鼠模型,旨在探讨慢性 CsA 肾毒性与贫血的关系,以及促红细胞生成素(EPO)及其受体(EPO receptor, EPOR)在慢性 CsA 肾毒性中的表达变化。

## 1 材料和方法

1.1 动物模型 成年雄性 SD 大鼠(Charles River Technology, 韩国),体质量 230~245 g,喂食低盐饮食(0.05%钠, Teklad Premier, Madison, WI, 美国)。随机分成两组,每组 8只:(1)对照组(vehicle, VH),1 mL/(kg·d)皮下注射橄榄油(Sigma, 美国)4周;(2)CsA 毒性组,15 mg/(kg·d)皮下注射 CsA(Novartis Pharma, Basel, 瑞士)4周。

1.2 基本测定 监测两组大鼠的体质量变化。处死大鼠前,将大鼠放入代谢笼(Tecniplast Gazzada S. a. r. l., 意大利)中,采血,采用全自动生化分析仪(Coulter-STKS, Coulter Electronics, 美国)测定血清肌酐(SCr)、血尿素氮(BUN)、血红蛋白(Hb)、红细胞压积(Hct)。血 CsA 浓度采用单克隆抗体放射免疫分析法(Monoclonal Radioimmunoassay, Incstar, Stillwater, MN)测定。

1.3 肾脏病理检查 处死大鼠,取肾组织,用过碘酸-赖氨酸-多聚甲醛(periodate-lysine-paraformaldehyde, PLP)液固定,石蜡包埋后切片(厚 4 μm)。脱蜡后行三色(Masson Trichrome)染色。肾小管间质纤维化(tubulointerstitial fibrosis, TIF)程度测定:在每张切片上至少观察 20 个非重叠区域,用数

字化显微镜分析仪(TDI Scope Eye™ Version 3.0 for Windows, Olympus, 日本),选择 Polygon 程序算出每 0.5 mm<sup>2</sup> TIF 的百分比,取平均值。

1.4 EPO 及 EPOR 蛋白表达的检测 (1)免疫组织化学染色:石蜡包埋切片经二甲苯脱蜡和梯度乙醇脱水,室温下以 0.3%过氧化氢/甲醛处理 30 min。微波修复抗原(98℃ 5 min)后用非免疫性血清封闭,滴加 EPO 和 EPOR 抗体(Santa Cruz, 美国)孵育 12~16 h。然后二抗反应,室温孵育 2 h。以 DAB 为底物显色后,苏木精复染,常规树脂封片。染色程度测定:用数字化显微镜分析仪,选择 Polygon 程序算出每 0.5 mm<sup>2</sup> 染色面积的百分比。(2)蛋白质印迹分析:新鲜肾组织用蛋白质溶解缓冲液制成匀浆;4℃下离心(1 500 r/min,离心半径 8.84 cm)后,取上清液测定蛋白浓度(Bio-Rad, 美国);取 20 μg 样本进行 SDS-PAGE;转膜后,滴加 EPO、EPOR 抗体(1:1 000)孵育 12~16 h;加 HRP 标记的驴抗兔 IgG(Amersham, 瑞典)反应 1 h;ECL 增强发光显色和曝光。以对照组为标准(100%)测定条带的光密度,以 β-actin 校正。

1.5 细胞凋亡检测 (1)TUNEL 染色:石蜡包埋切片置二甲苯脱蜡和梯度乙醇中脱水后,按原位凋亡测定试剂盒说明步骤检测凋亡细胞。每张切片上至少观察 20 个非重叠区域,用数字化显微镜分析仪对 TUNEL 阳性细胞进行计数,取平均值。(2)电镜观察:超薄切片脱水, poly/Bed 812 树脂中包埋,0.1%四氧化锇固定,用乙酸铀酰和柠檬酸铅染色,透射电镜(Jeol 1200EX, Tokyo, 日本)分析图像。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间均数比较采用 *t* 检验,EPO 蛋白表达与 TIF 和细胞凋亡数间的相关关系采用直线相关分析进行检验。检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 慢性 CsA 肾毒性模型的验证 与对照组相比,CsA 毒性组大鼠体质量下降( $P < 0.01$ ),血 CsA 浓度达到( $2\ 370.6 \pm 37.9$ ) ng/mL( $P < 0.01$ );同时,CsA 毒性组大鼠肾功能低下,表现为 SCr 和

BUN 上升( $P < 0.01$ , 表 1)。病理学检查可见, CsA 毒性组大鼠肾组织中有 TIF 形成(图 1), 每  $0.5 \text{ mm}^2$

TIF 百分比为  $(33.7 \pm 4.2)\%$  ( $P < 0.01$ )。以上结果说明成功建立了慢性 CsA 肾毒性大鼠模型。

表 1 两组大鼠体质量、血 CsA 浓度、肾功能、Hb 和 Hct 水平的比较

Tab 1 Body mass, serum CsA concentration, renal function, and Hb and Hct levels of rats in two groups

Group	Body mass $m/g$	Serum CsA $\rho_B/(ng \cdot mL^{-1})$	SCr $c_B/(\mu mol \cdot L^{-1})$	BUN $c_B/(mmol \cdot L^{-1})$	$n=8, \bar{x} \pm s$	
					Hb $\rho_B/(g \cdot L^{-1})$	Hct (%)
VH	$277.0 \pm 3.0$	$0 \pm 0$	$36.7 \pm 4.7$	$11.3 \pm 0.5$	$166 \pm 7$	$43.2 \pm 1.4$
CsA	$254.0 \pm 3.6^{**}$	$2\,370.6 \pm 37.9^{**}$	$73.9 \pm 4.8^{**}$	$28.6 \pm 1.2^{**}$	$144 \pm 2^{**}$	$37.8 \pm 0.8^{**}$

VH: Vehicle; CsA: Cyclosporine A; SCr: Serum creatinine; BUN: Blood urea nitrogen; Hb: Hemoglobin; Hct: Hematocrit.  $^{**} P < 0.01$  vs VH group

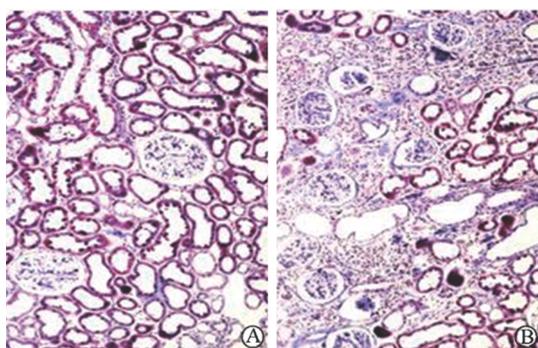


图 1 两组大鼠 TIF 程度的比较

Fig 1 Tubulointerstitial fibrosis (TIF) of rats in two groups

A: VH (vehicle) group; B: CsA (cyclosporine A) group. Masson Trichrome staining. Original magnification:  $\times 200$

2.2 CsA 可导致贫血 如表 1 所示, CsA 注射 4 周后, 大鼠 Hb 和 Hct 水平下降, 与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 说明慢性 CsA 可导致贫血的发生。

2.3 CsA 对 EPO 及 EPOR 蛋白表达的影响 免疫组化结果表明 EPO 和 EPOR 蛋白在正常肾组织主要表达于外髓区域、皮质的肾小管上皮细胞。然而, 在 CsA 毒性组肾组织中, EPO 的表达减少, 相反 EPOR 的表达增加(图 2)。蛋白质印迹分析进一步证实免疫组化结果, 与对照组相比, CsA 毒性组 EPO 的表达减少  $[(43 \pm 6)\% \text{ vs } (105 \pm 6)\%, P < 0.01]$ , 而 EPOR 的表达增加  $[(538 \pm 66)\% \text{ vs } (97 \pm 3)\%, P < 0.01]$ , 见图 3。

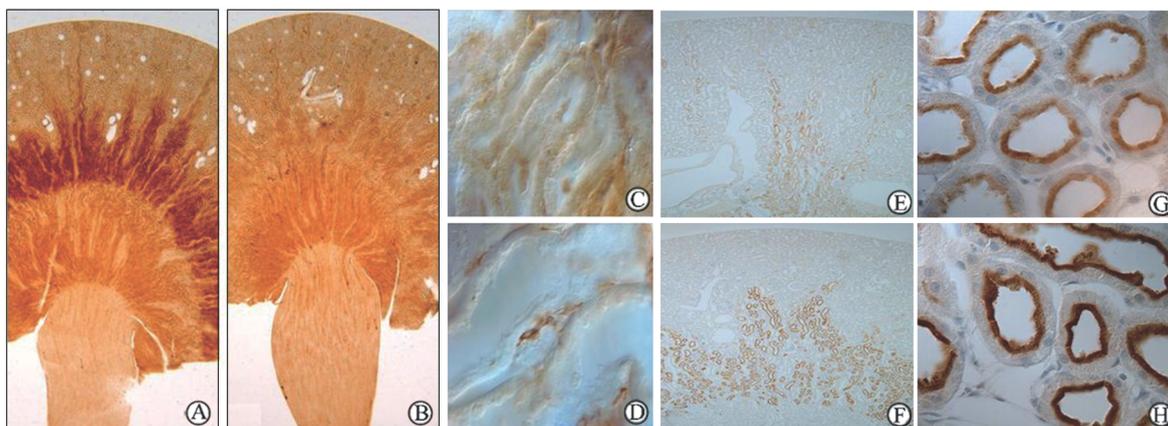


图 2 两组大鼠肾组织 EPO 和 EPOR 蛋白表达的免疫组化结果

Fig 2 Immunohistochemistry results of EPO and EPOR protein expression in renal tissues of rats in two groups

EPO: Erythropoietin; EPOR: Erythropoietin receptor; VH: Vehicle; CsA: Cyclosporine A. A-D: EPO; E-H: EPOR; A, C, E, G: VH group; B, D, F, H: CsA group. Original magnification:  $\times 40$  (A, B, E, F);  $\times 200$  (C, D, G, H)

2.4 CsA 诱导肾实质细胞凋亡 如图 4 所示, 与对照组相比, CsA 毒性组大鼠肾小管上皮细胞 TUNEL 阳性细胞数增多( $P < 0.01$ ); 电子显微镜进

一步确定 CsA 毒性组细胞中存在吞噬小体。

2.5 EPO 蛋白表达与 TIF 程度和凋亡细胞数负相关 直线相关分析表明, CsA 毒性组大鼠 EPO 蛋白

的表达与 TIF 程度 ( $r = -0.729, P < 0.001$ ) 和 TUNEL 阳性细胞数 ( $r = -0.841, P < 0.001$ ) 呈负相关(图 5)。

### 3 讨论

在临床实践中,钙调素抑制剂 CsA 和他克莫司 (FK506) 仍作为第一线强有力的免疫抑制剂应用于肾移植、难治性肾病综合征、各种继发性肾小球肾炎。此外,大量研究证实 CsA 和 FK506 还用于治疗 EPO 抗体诱导的纯红细胞再生障碍性贫血<sup>[4-5]</sup>。然而,长期使用 CsA 或 FK506 易导致各种严重的并发症,如肾毒性和继发糖尿病等。但 CsA 是否导致贫血迄今为止还不十分清楚。本实验利用动物模型,首先观察 CsA 是否引起贫血,其次揭示导致贫血的分子机制。结果发现,慢性 CsA 肾毒性大鼠 Hb 和 Hct 水平低于正常对照组 ( $P < 0.01$ ),表明慢性 CsA 毒性确实能导致贫血的发生。

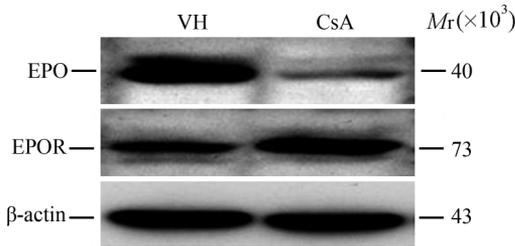


图 3 两组大鼠肾组织 EPO 和 EPOR 表达的蛋白质印迹分析结果

Fig 3 EPO and EPOR protein expression in renal tissues of rats in two groups as determined by Western blotting analysis  
EPO: Erythropoietin; EPOR: Erythropoietin receptor; VH: Vehicle; CsA: Cyclosporine A

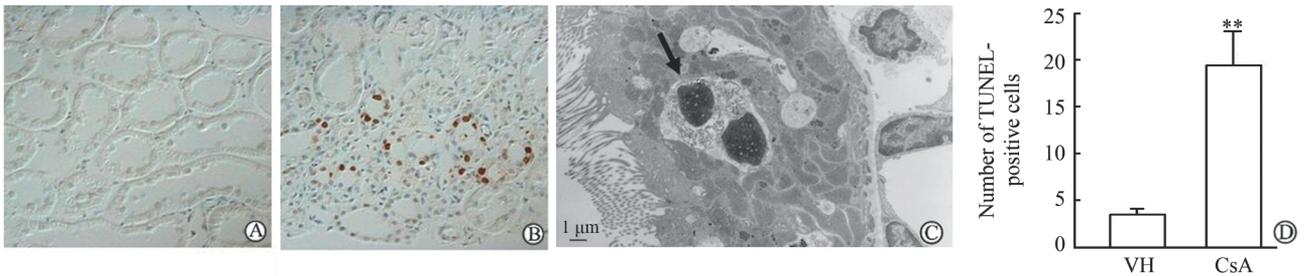


图 4 两组大鼠肾实质细胞凋亡的比较

Fig 4 Apoptosis of cells in renal tissues of rats in two groups

VH: Vehicle; CsA: Cyclosporine A. A, B: TUNEL staining of VH and CsA groups, respectively; C: Electron microscopy (arrow showing the phagosome); D: Numbers of TUNEL apoptosis cells of VH and CsA groups, respectively.  $** P < 0.01$  vs VH group.  $n = 8, \bar{x} \pm s$

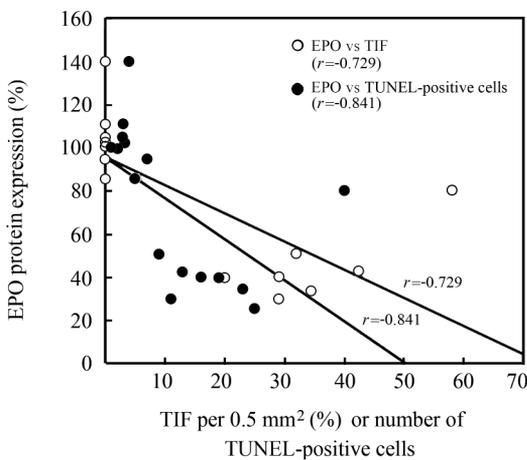


图 5 EPO 蛋白表达与 TIF 程度和凋亡细胞数的相关分析

Fig 5 Correlation analysis of EPO expression with TIF and apoptotic cell number of CsA treated rats  
EPO: Erythropoietin; TIF: Tubulointerstitial fibrosis; CsA: Cyclosporine A

CsA 导致贫血的机制还不十分清楚,可能与以下原因有关:(1) CsA 抑制骨髓发挥细胞毒效能。Sovcikova 等<sup>[6]</sup>报道,给予 Wistar 大鼠不同剂量的 CsA,淋巴细胞、白细胞、红细胞生成均受到抑制,特别是 Hct 呈 CsA 剂量依赖性下降;(2) CsA 致红细胞衰亡(eryptosis)。Niemoeller 等<sup>[7]</sup>报道 CsA 明显增加健康志愿者红细胞膜联蛋白 V 结合率、减少胞质  $Ca^{2+}$  活性和 ATP 浓度,从而诱发红细胞衰亡;(3)我们以往利用动物模型发现肾缺血再灌注损伤<sup>[8]</sup>和慢性 CsA 肾毒性<sup>[9]</sup>的肾小管间质呈缺血坏死改变或纤维化,注射 EPO 均使缺血坏死改变和纤维化好转。因此可推测,CsA 引起急或慢性肾损伤,使肾脏分泌 EPO 减少,从而导致贫血的发生。

为揭示 CsA 致贫血的发病机制,本实验利用免疫组化和蛋白质印迹法检测肾组织 EPO 及其受体

的表达。结果表明, EPO 蛋白的表达在慢性 CsA 毒性组大鼠中减少 ( $P < 0.01$ ), 其主要位于外髓质、皮质的肾小管上皮细胞, 该部位正是 CsA 引起肾损伤的敏感区域。有趣的是, EPOR 蛋白的表达反而增加 ( $P < 0.01$ )。迄今为止, 有关肾内 EPO 及其受体的表达国内外报道甚少。李志辉等<sup>[10]</sup>对 38 例急性肾损伤患儿行肾活检术, 免疫组化发现 EPO 在急性肾损伤患儿肾组织中的表达明显减少, 而 EPOR 蛋白表达增加, 肾小管间质的病理损害程度与 EPO 在肾小管间质的阳性表达面积呈负相关。我们的实验结果与上述报道一致, 表明减少的 EPO 表达可能是引起贫血的发病机制, 而增加的 EPOR 表达可能是对 CsA 所诱导的缺氧缺血性损伤的应激反应。

细胞凋亡是细胞的一种基本生物学现象, 它在生物体的进化、内环境的稳定以及多个系统的发育中起着重要的作用。正常生理情况下, 细胞凋亡清除老化细胞是有益的; 而在病理状态下, 许多疾病的发生发展与凋亡过程紊乱有直接或间接的关系。我们以往报道过 CsA 可调控凋亡基因 *Bcl-2/Bax* 系统, 从而诱导肾小管上皮细胞凋亡, 而且细胞凋亡与 TIF 呈正相关<sup>[3]</sup>。另外, CsA 还可通过各种生长因子如转化生长因子  $\beta_1$  等调控细胞凋亡程序<sup>[11]</sup>。基于以上理论, 本研究检测了两组大鼠肾组织的细胞凋亡情况, 结果表明慢性 CsA 肾毒性大鼠 TUNEL 阳性细胞数高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 而且 TUNEL 阳性细胞数 ( $r = -0.841, P < 0.001$ ) 和 TIF 程度 ( $r = -0.729, P < 0.001$ ) 与 EPO 蛋白的表达呈负相关。我们推测细胞凋亡导致肾脏丧失大量的肾小管上皮细胞, 而这些肾小管上皮细胞正是分泌 EPO 的源泉。

综上所述, 长期使用免疫抑制剂 CsA 可导致贫血; 肾小管上皮细胞凋亡导致 EPO 表达抑制是其发病的重要分子机制。本研究结果为临床上鉴别复杂原因所致贫血提供了分子理论基础。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] Nankivell B J, Borrowers R J, Fung C L, O'Connell P J, Allen R D, Chapman J R. Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplan-

tation[J]. *Transplantation*, 2004, 78: 242-249.

- [2] 金英顺, 洪英礼, 崔镇花, 刘雨田, 金海峰, 金华, 等. 血管紧张素 II 及其受体在慢性环孢素 A 肾毒性大鼠肾组织中的表达[J]. *第二军医大学学报*, 2010, 31: 1286-1290.
- Jin Y S, Hong Y L, Cui Z H, Liu Y T, Jin H F, Jin H, et al. Expression of angiotensin II and its receptors in a rat model of chronic cyclosporine nephrotoxicity[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2010, 31: 1286-1290.
- [3] Li C, Lim S W, Sun B K, Choi B S, GLowacka S, Cox A, et al. Expression of apoptosis-related factors in chronic cyclosporine nephrotoxicity after cyclosporine withdrawal[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25: 401-411.
- [4] Chng W J, Tan L K, Liu T C. Cyclosporine treatment for patients with CRF who developed pure red blood cell aplasia following EPO therapy[J]. *Am J Kidney Dis*, 2003, 41: 692-695.
- [5] Snanoudj R, Beaudreuil S, Arzouk N, Jacq D, Casadevall N, Charpentier B, et al. Recovery from pure red cell aplasia caused by anti-erythropoietin antibodies after kidney transplantation[J]. *Am J Transplant*, 2004, 4: 274-277.
- [6] Sovcikova A, Tulinska J, Kubova J, Liskova A, Syrova D, Horakova K. Effect of cyclosporin A in Lewis rats *in vivo* and HeLa cells *in vitro*[J]. *J Appl Toxicol*, 2002, 22: 153-160.
- [7] Niemoeller O M, Akel A, Lang P A, Attanasio P, Kempe D S, Hermle T, et al. Induction of eryptosis by cyclosporine[J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2006, 374: 41-49.
- [8] Yang C W, Li C, Jung J Y, Shin S J, Choi B S, Lim S W, et al. Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney[J]. *FASEB J*, 2003, 17: 1754-1755.
- [9] Han S W, Li C, Ahn K O, Lim S W, Song H G, Jang Y S, et al. Prolonged endoplasmic reticulum stress induces apoptotic cell death in an experimental model of chronic cyclosporine nephropathy[J]. *Am J Nephrol*, 2008, 28: 707-714.
- [10] 李志辉, 吴天慧, 寻 励, 段翠蓉, 张 翼, 银 燕, 等. 急性肾损伤患儿肾脏促红细胞生成素及其受体的表达[J]. *实用儿科临床杂志*, 2011, 26: 1315-1317.
- [11] Chung B H, Li C, Sun B K, Lim S W, Ahn K O, Yang J H, et al. Rosiglitazone protects against cyclosporine-induced pancreatic and renal injury in rats[J]. *Am J Transplant*, 2005, 5: 1856-1867.