

阿奇霉素对阿霉素肾病大鼠基因表达谱的影响

郁晓腾^{1,2}, 张碧丽^{2*}

1. 天津医科大学研究生院, 天津 300070

2. 天津市儿童医院 肾内科, 天津 300074

摘要: **目的** 利用基因芯片技术了解阿霉素肾病大鼠基因表达谱及其经阿奇霉素干预后的变化。**方法** 将81只大鼠随机分为对照组、模型组、阿奇霉素组, 通过尾静脉注射法建立阿霉素肾病模型, 检测第4、8周时大鼠血生化指标及24 h尿蛋白变化。利用Agilent公司生产的Agilent SurePrint G3 Rat Gene Expression (8×60 k) 基因芯片检测第8周时各组大鼠的肾脏基因表达谱, 并利用生物信息学方法对检测结果进行分析。**结果** 与模型组比较, 阿奇霉素组24 h尿蛋白、总胆固醇、血肌酐均显著降低 ($P<0.01$), 白蛋白、总蛋白、内生肌酐清除率均明显升高 ($P<0.01$)。通过芯片检测得到了各组大鼠的肾脏基因表达谱。与对照组比较, 模型组共有185个基因发生差异性表达; 而与模型比较, 阿奇霉素组共有824个基因发生差异性表达。**结论** 阿霉素肾病的发生涉及众多基因的改变, 阿奇霉素干预治疗可以改变其基因表达谱及在基因水平上使其肾脏组织异常的基因表达实现回归, 对进一步探索阿奇霉素干预阿霉素肾病的作用机制提供了线索。

关键词: 阿奇霉素; 阿霉素肾病; 基因芯片; 基因表达谱

中图分类号: R966; R983

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2015)10-1185-07

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2015.10.002

Effects of azithromycin on gene expression profile in adriamycin nephropathy rats

YU Xiao-teng^{1,2}, ZHANG Bi-li²

1. Graduate School of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2. Department of Nephrology, Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300074, China

Abstract: Objective To study the gene expression profile of adriamycin nephropathy rats and the changes after the intervention of azithromycin by gene chip technology. **Methods** Eighty-eight rats were randomly divided into control group, model group, and azithromycin group. The model was established by tail vein injection of adriamycin, and the changes of blood biochemical and 24 h urine protein in rats at 4th and 8th week were detected. Agilent SurePrint G3 Rat Gene Expression (8×60k) gene chip were used to detect the gene expression profile, and the results were analyzed by bioinformatics method. **Results** Eighty-eight rats were randomly divided into control group, model group, and azithromycin group. The model was established by tail vein injection of adriamycin, and the changes of blood biochemical and 24 h urine protein in rats at 4th and 8th week were detected. Agilent SurePrint G3 Rat Gene Expression (8 × 60 k) gene chip were used to detect the gene expression profile, and the results were analyzed by bioinformatics method. **Conclusion** The occurrence of adriamycin nephropathy involves the changes of many genes and the gene expression profile can be changed with the intervention of azithromycin, which can provide further evidence to explore the effect of azithromycin on adriamycin induced nephropathy.

Key words: azithromycin; adriamycin nephropathy; gene chip; gene expression profile

阿霉素肾病的形态学改变和动物表现类似人类肾病综合征, 是目前公认的理想的人体肾病综合征模型^[1]。阿霉素代谢产物可直接损伤肾小球上皮细胞, 造成足细胞形态学改变, 破坏肾小球滤过膜的结构

和功能, 进而导致蛋白尿的发生。研究表明肾病综合征与体内免疫功能失调和由此所致的炎症损伤有关^[2], 阿奇霉素除具有抗菌作用外, 还兼有免疫调节的作用, 在阿霉素肾病大鼠中应用能起到减轻肾

收稿日期: 2015-07-17

基金项目: 天津市应用基础及前沿技术研究计划项目 (13JCYBJC22300)

作者简介: 郁晓腾 (1990—), 男, 硕士研究生, 研究方向为儿科肾脏病学。Tel: 13116071655 E-mail: 1042711736@qq.com

*通信作者 张碧丽, 女, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事小儿肾脏疾病的研究。Tel: (022)87787613 E-mail: zhangbili218@163.com

脏免疫损伤及降低尿蛋白的作用^[3-4]。基因芯片技术依据核酸分子杂交原理检测待测样品的基因序列及表达信息,具有高通量及自动化的特点,其可实现在 mRNA 水平上同时平行研究数万个基因的表达关系^[5]。本研究通过建立阿霉素肾病大鼠模型,利用 Agilent 公司生产的 Agilent SurePrint G3 Rat Gene Expression (8×60k) 基因芯片,检测正常大鼠及阿奇霉素干预前后阿霉素肾病大鼠的肾脏基因表达谱,观察比较经阿奇霉素干预后阿霉素肾病大鼠基因表达谱的改变。

1 材料和方法

1.1 动物、试剂及主要仪器

健康雄性 Wistar 大鼠 81 只,体质量 (180±20) g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK (京) 2012-0001;注射用盐酸阿霉素,规格 5 mg/瓶,产品批号 130710,海正药业有限公司生产;阿奇霉素片,规格 0.5 g/片,产品批号 D1420231135,辉瑞制药有限公司生产;金属代谢笼由天津实验动物中心提供。mirVana miRNA Isolation Kit (美国 Ambion 公司);QIAGEN RNeasy Mini Kit (德国 Qiagen 公司);NanoDrop 分光光度计 (美国 Thermo 公司);PCR 仪 (美国 ABI 公司);台式多功能冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司);2100 Bioanalyzer、杂交炉、扫描仪及 GeneSpring 分析软件 (美国 Agilent 公司)。基因表达谱芯片为美国 Agilent 公司生产的 Agilent SurePrint G3 Rat Gene Expression (8×60k) 芯片。

1.2 分组和给药

81 只大鼠适应性喂养 3 d 后开始实验。将全部大鼠采用完全随机数字表法分为对照组、模型组、阿奇霉素组,每组 27 只,除对照组外,其余两组大鼠均采用 2 次尾静脉注射注射用盐酸阿霉素制备阿霉素肾病大鼠模型,第 1 次注射 4 mg/kg,1 周后第 2 次注射 3.5 mg/kg。对照组同期尾静脉注射同等剂量的生理盐水。试验第 4 周末检测 81 只大鼠血生化、24 h 尿蛋白,除对照组外其余大鼠均出现 24 h 尿蛋白 > 100 mg/d,提示模型制作成功^[19-20]。第 5 周起,阿奇霉素组早晨 ig 0.025 g/mL 阿奇霉素水溶液,1 次/d。对照组、模型组灌胃给与同等量的生理盐水 1 次,各组大鼠均自由饮水及摄食基础饲料。连续灌胃 4 周。

药物等效剂量换算 以人的标准量阿奇霉素 10 mg/(kg·d) 等效换算为大鼠用量,换算系数为

6.25,阿奇霉素给量 = $6.25 \times 10 \text{ mg/(kg·d)} = 62.5 \text{ mg/(kg·d)}$ 。前期研究提示该治疗量的阿奇霉素能有效降低阿霉素肾病大鼠尿蛋白水平,减轻炎症反应,发挥免疫调节作用,并具有较好的安全性^[14]。

1.3 标本采集

1.3.1 尿液标本 实验第 4、8 周末,各组大鼠放置在代谢笼,禁食不禁水,收集 24 h 尿液,记录总尿量,混匀后留取 2 mL 用于检测 24 h 尿蛋白、尿肌酐,计算内生肌酐清除率 (Ccr)。

$$\text{Ccr} = (\text{尿肌酐} \times 24 \text{ h 尿量}) / (\text{血肌酐} \times 1.44 \times \text{体质量 g})$$

1.3.2 血液标本 实验第 4、8 周末,采用内眦取血法对所有大鼠取血 2 mL,2 000 r/min 离心 10 min,收集血清,用于检测血生化指标:总蛋白 (TP)、白蛋白 (Alb)、总胆固醇 (Tcho)、血肌酐 (Scr)。

1.3.3 肾组织 实验第 8 周末,各组大鼠随机抽取 9 只,取其一侧肾脏,用准备好的冻存管分装组织,迅速投入液氮冻存。

1.4 基因表达谱芯片检测

1.4.1 总 RNA 的抽提、纯化和质检 利用 Ambion 公司生产的 mirVana miRNA Isolation Kit 试剂盒提取总 RNA。利用 QIAGEN RNeasy Mini Kit (美国 Qiagen 公司) 纯化样本总 RNA 后,取 2 μL 用 NanoDrop 分光光度计及 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行定性及定量检测,评估总 RNA 的浓度、纯度、完整性及 A_{260}/A_{280} 吸收率。结果所取样本经检测均达到 $\text{RIN} \geq 7.0$, $28\text{S}/18\text{S} > 0.7$ 且 A_{260}/A_{280} 吸收率为 1.9~2.2,提示总 RNA 质量好,可以进行芯片实验。

1.4.2 cDNA、cRNA 的合成和标记 将每组样本总 RNA 分别随机分为 3 个小组,将每个小组中 3 个样本的总 RNA 进行混合,按照 Agilent 公司生产的单色 RNA Spike In Kit 试剂盒合成 cDNA。以含 PolyT 的 cDNA 单链为模板,采用 Agilent 公司的 LowInput Quick-Amp Labeling Kit 试剂盒以 Cy3 标记的 NTP 为原料合成生物素标记的 cRNA,应用 QIAGEN RNeasy Mini Kit 纯化合成的 cRNA。使用 NanoDrop 分光光度计检测标记后的 cRNA 的浓度及纯度。

1.4.3 cRNA 样品片段化及芯片杂交 提取已用 Cy3 标记的 cRNA 1.65 μg 加入 Blocking Agent 11 μL, Fragmentation Buffer 2.2 μL,加水至 55 μL,将上述片段化液在 60 °C 温浴进行片段化 30 min,冰浴 1 min。继续加入 GEx Hybridization Buffer 55 μL 混匀。加上述溶液 110 μL 于芯片上,在 65 °C, 10

r/min 条件下滚动杂交 17 h。取出芯片置于芯片配套专用洗液 1 中洗涤 1 min，再将芯片置于芯片配套专用洗液 2 中洗涤 1 min (37 ℃)，晾干。

1.4.4 芯片扫描和数据处理 芯片杂交结果采用 Agilent 荧光扫描仪进行扫描，Feature Extraction 软件处理原始图像及提取原始数据，最后应用 Genespring 软件进行标准化和后续处理。按照 $P < 0.05$ ，基因表达倍数 ≥ 2.0 和基因表达倍数 ≤ -2.0 为阈值筛选差异表达基因。然后对差异基因进行 Gene Ontology 和 pathway 分析，以判定差异基因主要影响的生物学功能或者通路。

1.5 统计学处理

对血和尿的生化指标采用 SPSS 22.0 软件进行处理。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间数据比较采用单因素方差分析；组内比较采用配对 t 检验。

2 结果

2.1 大鼠 24 h 尿蛋白定量及血生化指标

实验第 4 周，模型组、阿奇霉素组 24 h 尿蛋白 > 100 mg/d，提示造模成功，且模型组、阿奇霉素组 Tcho、Scr 均明显高于对照组 ($P < 0.05$)，Alb、TP、Ccr 均明显低于对照组 ($P < 0.01$)；实验第 8 周，阿奇霉素组与模型组比较，24 h 尿蛋白、Tcho、Scr 均显著降低 ($P < 0.01$)，Alb、TP、Ccr 均明显升高 ($P < 0.01$)；阿奇霉素组第 8 周与第 4 周比较 24 h 尿蛋白、Tcho、Scr 均显著降低 ($P < 0.01$)，Alb、TP、Ccr 均明显升高 ($P < 0.01$)。见表 1。

2.2 芯片信号扫描图

芯片杂交后扫描得到的荧光强度图见图 1，可见荧光信号点距分布均匀、规则、亮度适中，表明芯片杂交效果良好。

表 1 各组大鼠血、尿指标的动态变化

Table 1 Dynamic changes of blood and urine of the rats in each group

组别	观察时间	24h 尿蛋白/mg	Alb/(g·L ⁻¹)	TP/(g·L ⁻¹)	Tcho/(mmol·L ⁻¹)	Scr/(μmol·L ⁻¹)	Ccr/(mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹)
对照	4 周	4.40±0.82	40.32±4.94	64.47±4.72	2.63±0.46	21.77±1.13	2.07±0.19
	8 周	4.23±0.65	42.54±4.92	65.68±4.05	2.61±0.46	22.41±2.91	2.12±0.41
模型	4 周	221.40±74.53*	24.87±3.32*	53.91±4.93*	4.65±2.25*	39.60±6.03*	1.32±0.24*
	8 周	354.83±70.87	16.77±3.15	46.73±7.09	8.61±3.24	51.18±5.88	0.31±0.14
阿奇霉素	4 周	222.17±77.68*	25.83±3.40*	54.33±4.79*	4.41±1.22*	40.80±5.72*	1.25±0.33*
	8 周	74.78±12.44▲#	34.79±6.73▲#	60.32±4.13▲#	3.54±0.75▲#	31.56±8.47▲#	1.79±0.68▲#

与对照组比较：* $P < 0.05$ ；与模型组比较：▲ $P < 0.05$ ；与同组 4 周比较：# $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; ▲ $P < 0.05$ vs model group; # $P < 0.05$ vs same group four weeks after treatment

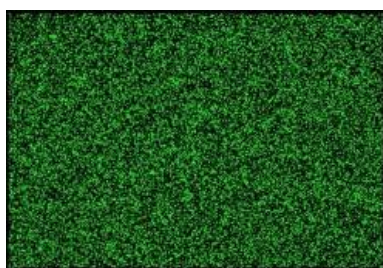


图 1 芯片信号扫描图

Fig. 1 Chip signal scan

单荧光芯片的原始数据经过标准化处理，转化 $\log_2$ 为底的对数后形成的散点图见图 2。水平轴表示该点在样品芯片中标准化后的信号值，垂直轴表示该点在对照芯片中标准化以后的信号值。落在图形对角线上的点代表这个探针点在两张芯片中信号值无差异，而落在图形对角线两侧 45° 线之外的点代表这个探针点在两张芯片中信号值差异 > 2 倍。

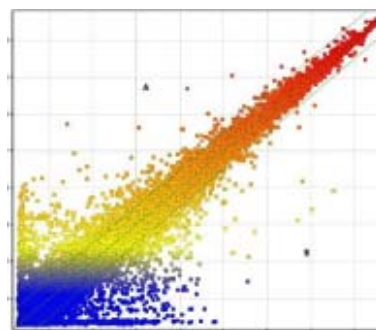


图 2 杂交信号强度散点图

Fig. 2 Hybrid signal intensity scatter diagram

2.3 差异基因筛选结果

经分析发现，与对照组比较，模型组共 185 个基因发生差异性表达。模型组部分差异表达的基因见表 2。

经 Gene Ontology 分析，上述差异基因主要涉及的生物学过程有细胞分裂、细胞分化、炎症反应

及免疫反应等。经 pathway 分析, 上述差异基因涉及的信号通路有 p53 信号通路、B 细胞受体信号通路、AMPK 信号通路、细胞因子 - 细胞因子受体通

路等, 见图 3。

与模型组比较, 阿奇霉素组共 824 个基因发生差异性表达。阿奇霉素组部分差异表达的基因见表 3。

表 2 模型组与对照组相比部分差异基因上、下调情况

Table 2 Up and down regulation of differential genes between the model group and the control group

功能分类	芯片探针号	上/下调倍数	基因代码	GeneBank 登录号	编码蛋白/功能
免疫	A_44_P1043157	2.83	CXCL9	NM_145672	趋化因子 9
	A_44_P1039128	2.19	CXCL10	NM_139089	趋化因子 10
	A_64_P157743	2.21	CCL20	NM_019233	趋化因子 20
	A_44_P404843	2.05	CXCR3	NM_053415	趋化因子受体 3
	A_44_P1004840	2.32	TNFSF9	NM_181384	肿瘤坏死因子超家族 9
	A_64_P351634	2.16	CSF	NM_001029901	集落刺激因子 1
细胞凋亡	A_43_P11800	-2.06	BAX	U49729	Bcl-2 相关 X 蛋白
细胞周期 蛋白	A_44_P507571	2.47	CCNE1	NM_001100821	细胞周期蛋白 E1
	A_44_P272210	2.69	CCNE2	NM_001108656	细胞周期蛋白 E2
	A_42_P580844	3.02	CDK1	NM_019296	细胞周期依赖性激酶 1
	A_44_P534089	2.11	CCNB1	NM_171991	细胞周期蛋白 B1
	A_44_P461544	2.74	CCNB2	NM_001009470	细胞周期蛋白 B2
信号转导	A_44_P404843	2.05	CXCR3	NM_053415	趋化因子受体 3
	A_64_P006898	2.96	CD19	NM_001013237	CD19 抗原
	A_43_P15598	3.31	CD79B	NM_133533	CD79B 抗原
物质转运	A_44_P306551	-2.24	CACNA1A	NM_012918	P/Q 型电压依赖性钙通道 α 亚单位
	A_64_P062643	-8.78	PKD2L1	NM_001106352	多囊肾疾病因子 1
	A_64_P136884	2.13	UPK3A	NM_001130507	尿路上皮特异性蛋白 1
细胞增殖、 分化	A_64_P054243	-8.26	Pax3	NM_053710	配对盒基因 3
	A_64_P127971	3.38	POU1F1	NM_013008	POU 结构域转录因子 1

正值代表基因上调, 负值代表下调

Positive represented genes up-regulation and negative regulated represented genes down-regulation

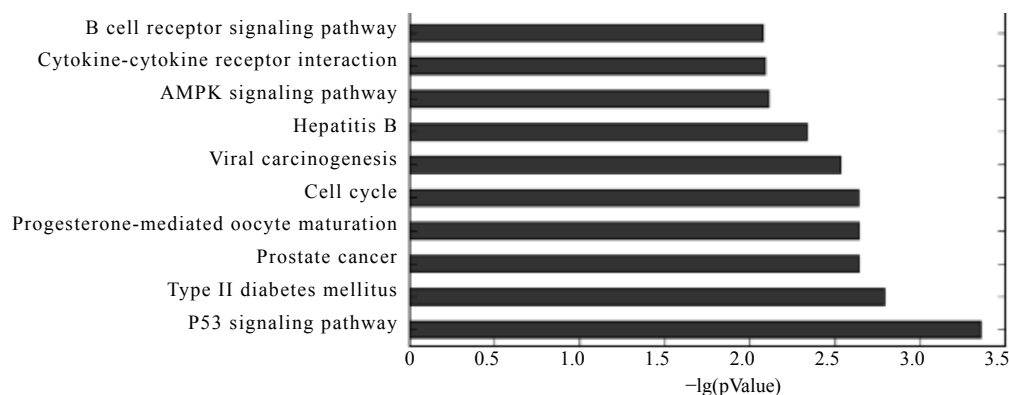


图 3 模型组较对照组差异基因的 pathway 通路分析

Fig. 3 Pathway analysis of differentially expressed genes between model and control group

表 3 阿奇霉素组与模型组相比部分差异基因上/下调情况

Table 3 Up and down regulation of differential genes between azithromycin and model group

功能分类	芯片探针号	上/下调倍数	基因代码	GeneBank 登录号	编码蛋白/功能
免疫	A_44_P1039128	-2.00	CXCL10	NM_139089	趋化因子 10
	A_43_P11985	-2.47	CCL20	NM_019233	趋化因子 20
	A_64_P053012	2.96	CD163	NM_001107887	血红蛋白清道夫受体
	A_64_P062874	4.27	FGF-20	NM_023961	成纤维细胞生长因子
代谢	A_44_P801714	2.00	SCD1	NM_001013951	固醇辅酶 A 去饱和酶 1
	A_44_P387780	3.19	CYP8B1	NM_031241	固醇 12 α 羟化酶
	A_44_P1016480	2.19	LPL	NM_012598	脂蛋白脂肪酶
发育	A_64_P041219	-4.28	PCSK1	NM_017091	前蛋白转化酶枯草溶菌素 1
	A_43_P15281	-2.93	TP63	NM_019221	肿瘤蛋白 P63
	A_44_P415349	2.08	GATA6	NM_019185	GATA 结合蛋白 6
信号转导	A_44_P404843	-2.05	CXCR3	NM_053415	趋化因子配体 3
	A_44_P233932	4.28	NOTCH1	NM_001105721	Notch 家族
防御	A_44_P230370	6.12	DEFA5	NM_173329	防御蛋白 α 5
	A_44_P1023480	7.85	NP4	NM_012598	防御素 NP-4 前体
转录调控	A_64_P229432	5.88	PPAR- γ	NM_001145367	过氧化物酶增值物激活受体
	A_64_P040190	3.12	TCF7L2	NM_001191052	转录因子 7
	A_64_P055960	-15.30	ESR2	NM_012754	雌激素受体 2

正值代表基因上调, 负值代表下调

Positive represented genes up-regulation and negative regulated represented genes down-regulation

经 Gene Ontology 分析, 上述差异基因主要涉及的生物学过程包括上皮细胞的分化、脂肪酸代谢、损伤修复、吞噬作用的调节等。经 pathway 分析, 差异基因涉及的通路有 PPAR- γ 信号通路、cAMP 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等, 见图 4。

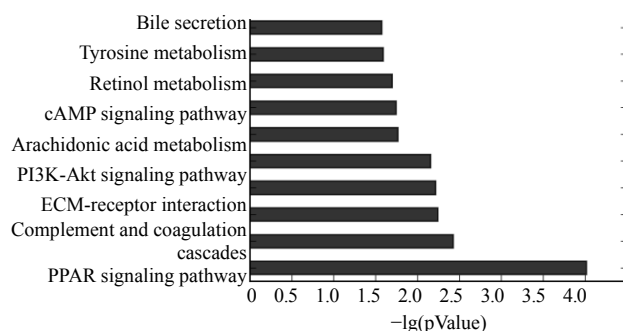


图 4 阿奇霉素组较模型组差异基因的 pathway 通路分析
Fig. 4 Pathway analysis of differentially expressed genes between azithromycin and model group

3 讨论

阿霉素肾病大鼠肾小球滤过膜通透性增加, 大量血浆蛋白通过滤过膜滤出, 是蛋白尿发生的病理

生理基础; 血浆蛋白由尿中大量丢失是形成低蛋白血症的主要原因, 而低蛋白血症会促进肝脏合成脂蛋白增加, 其中的大分子脂蛋白难以从肾脏排出, 导致了高脂血症^[21]。阿霉素肾病大鼠肾功能受损, 血 Scr 升高、CCr 降低。因此, 实验第 4 周, 造模成功的模型组、阿奇霉素组 Tcho、Scr 均明显高于对照组, Alb、TP、Ccr 均明显低于对照组。

本研究发现阿霉素肾病的发生涉及众多基因的改变。通过 Gene Ontology 分析提示, 模型组差异表达的基因涉及的生物学过程主要是炎症及免疫反应, 包括差异基因 CCL20、CXCL9、CXCL10、CXC3R、CSF-1、TNFSF9 等均上调表达, 提示炎症及免疫反应在阿霉素肾病发病中具有重要作用。研究发现^[6-7]在许多自身免疫性疾病中 CXCL9、CXCL10 及其共同受体 CXC3R 的高表达, 可导致 T 细胞活化和自身抗体的出现, 进而导致机体免疫损伤和疾病的发生。张力丹^[8]等发现在狼疮性肾炎小鼠浆膜腔 CCL20 的表达明显升高, 证实其可能参与了狼疮鼠浆膜腔病变的发生并与病情活动及肾损害存在一定相关性。CXCL9、CXCL10、CCL20 皆属于趋化因子家族, 这一类细胞因子与受体结合后在

调控免疫细胞定向迁移、免疫应答过程中起重要作用。肿瘤坏死因子超家族 (TNFSF), 其含有共同结构序列-TNF 同源结构域 (THD), 通过 THD 结构域, TNF 配体与富含半胱氨酸结构域的 TNF 受体结合发挥生物学作用, 在调节免疫和炎症反应及促进细胞凋亡中起重要作用, TNFSF9 是 TNFSF 成员之一, 有研究报道^[9]TNFSF9 在类风湿性关节炎等自身免疫性疾病中高表达。集落刺激因子因子 1 (CSF-1) 是一种巨噬细胞生长因子, 对巨噬细胞的增殖、分化及趋化具有调节作用, 研究认为肾小球上皮细胞过表达的 CSF-1 与其受体 CSF-1R 的结合激活巨噬细胞是导致狼疮性肾炎发生、进展的主要机制^[10]。以上这些炎性因子基因的过表达, 广泛参与免疫及炎症反应过程, 可能会导致肾小球滤过膜的损伤, 进而导致阿霉素肾病的发病。

本研究对模型组差异表达的基因进行 pathway 通路分析, 显示 p53 信号通路的 P 值 < 0.0001 , 其 P 值最小, 代表基因富集程度最高及与该研究最为密切, 查阅该通路包含的 9 个基因, 其中除 BAX 下调表达外, CDK1、CCNB1、CCNB2、BAX、RRM2、CCNE1、CCNE2、CDKN1A 均上调表达。p53 信号通路是调控细胞周期及促进细胞凋亡重要的通路, 当细胞受到损伤因素作用而导致 DNA 受损伤时, p53 基因启动表达, 其表达产物 p53 蛋白属于转录因子, 作用于下游基因, 导致细胞周期停滞或凋亡。p53 基因通过与 p21 基因的启动子结合, 促进下游调控分子 cyclinE、cyclinB 的表达, 使细胞周期停滞于 G1 期或 G2 期; 而 p53 作用于 BAX, 可直接诱导细胞凋亡^[11]。足细胞 (podocyte), 即肾小球脏层上皮细胞, 连同肾小球基底膜及毛细血管内皮细胞一同构成肾小球滤过膜。足细胞相关蛋白编码基因的突变或缺失、细胞因子的作用及足细胞的凋亡等均可造成其结构异常或者数量的减少, 可导致肾小球滤过膜通透性增加, 是 NS 蛋白尿发生的一个重要环节^[12]。推测 p53 信号通路可能通过促进足细胞凋亡, 进而导致足细胞数量减少及肾小球滤过膜通透性的改变, 参与阿霉素肾病的发病。

阿奇霉素除具有良好的抗菌活性外, 兼有免疫调节等非抗菌作用。Lin 等^[13]发现, 阿奇霉素通过抑制 Th2 细胞合成促炎性因子 IL-5, 从而降低哮喘患儿气道的高反应性。另有研究表明^[14], 阿奇霉素可以降低阿霉素肾病大鼠肾组织促炎性因子黏附分子 ICAM-1 的表达及减轻肾组织病理改变。本实验

中, 与模型组比较, 阿奇霉素组经阿奇霉素干预后 24 h 尿蛋白、Tcho、Scr 显著降低, Alb、TP、Ccr 明显升高, 提示阿奇霉素能起到缓解阿霉素肾病大鼠肾脏损伤及减轻尿蛋白的作用。通过 Gene Ontology 分析, 阿奇霉素组差异基因主要涉及的生物学过程包括上皮细胞的分化、脂肪酸代谢、损伤修复、吞噬作用的调节等。分析发现, 在模型组中高表达的 CXCL10、CCL20 基因在阿奇霉素组呈下调表达, 提示阿奇霉素可能通过下调编码炎症介质基因的表达控制炎症反应, 同时该组 CD163 (血红蛋白清道夫受体) 表达上调, 研究认为 CD163 特异性表达于巨噬细胞, 能特异性识别血红蛋白 (Hb) 与结合珠蛋白 (HP) 形成的 Hb-HP 复合物而介导 Hb 的清除, 通过多种途径发挥抗炎、抗氧化的功能^[15]。FGF-20 属于成纤维细胞生长因子 (FGF) 家族的一员, 其与受体 FGFR 结合可促进上皮细胞和间质的有丝分裂, 在组织炎症损伤修复中发挥作用^[16]。CD163 及 FGF 的上调表达提示阿奇霉素可能在阿霉素肾病大鼠免疫损伤的修复过程中发挥一定作用。

对阿奇霉素组差异表达的基因进行 pathway 通路分析, 提示与本研究最密切的为 PPAR- γ 信号通路。过氧化物酶增殖物激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) 是一类由配体激活的核转录因子超家族, PPAR- γ 是其一种表型, 在调控细胞周期、抑制炎症反应及脂类代谢中具有重要作用^[17-18]。其与配体结合后调节靶基因的转录表达, 在炎症反应过程中通过竞争炎症通路如 JAK-STAT 通路、NF- κ B 通路、活化 T 细胞核因子信号通路 (NFAT) 等, 进而抑制前炎症因子如细胞因子、趋化因子及酶类的表达等; 而另一方面 PPAR- γ 信号通路参与调控脂肪生成、胆固醇代谢、脂肪酸运输等多种脂类活动, 本研究筛选出与此通路相关的差异基因包括促进脂肪生成的基因 SCD1、胆固醇代谢相关的基因 CYP8 B1、脂肪酸运输相关的基因 LPL, 说明 PPAR- γ 信号通路参与调节阿霉素肾病大鼠脂质代谢, 这可能是与阿奇霉素组较模型组大鼠胆固醇水平降低的原因, 但其具体机制需要进一步研究。

综上所述, 本研究利用基因芯片技术成功获取了对照大鼠、阿霉素肾病大鼠及阿奇霉素干预后大鼠的肾脏基因表达谱, 并比较出各组差异表达的基因及信号通路, 证实阿霉素肾病的发病涉及众多基

因表达变化及阿奇霉素治疗可以改变其肾脏基因表达谱。众多炎症因子参与的炎症和免疫损伤及p53信号通路可能在阿霉素肾病的发病中发挥重要作用,而在阿霉素肾病中应用阿奇霉素可通过降低炎症因子表达及增加抗炎性因子CD163、FGF-20等的表达参与肾脏炎症及免疫损伤的修复,PPAR- γ 信号通路可能参与了调控阿霉素肾病大鼠细胞周期、炎症反应及脂质代谢过程。阿奇霉素可以在基因水平上,使阿霉素肾病大鼠肾组织异常的基因表达实现回归,对进一步探索阿奇霉素干预阿霉素肾病的作用机制提供了线索。

参考文献

- [1] Kobayashi Y, Aizawa A, Takizawa T, *et al.* DNA methylation changes between relapse and remission of minimal change nephrotic syndrome [J]. *Pediatr Nephrol*, 2012, 27(12): 2233-2241.
- [2] Kaneko K, Tsuji S, Kimata T, *et al.* Pathogenesis of childhood idiopathic nephrotic syndrome: a paradigm shift from T-cells to podocytes [J]. *World J Pediatr*, 2015, 11(1): 21-28.
- [3] Wan Y F, Huang Z H, Jing K, *et al.* Azithromycin attenuates pulmonary inflammation and emphysema in smoking-induced COPD model in rats [J]. *Respir Care*, 2015, 60(1): 128-134.
- [4] 张碧丽, 王文红, 张 瑄, 等. 阿奇霉素治疗儿童原发性肾病综合征反复或复发效果探讨 [J]. *天津医药*, 2013, 41(5): 404-407.
- [5] Abootaleb S, Paul C. Challenges and future trends in DNA microarray analysis [J]. *Compr Anal Chem*, 2014, 63: 25-46.
- [6] Petrovic-Djergovic D, Popovic M, Chittiprol S, *et al.* CXCL10 induces the recruitment of monocyte-derived macrophages into kidney, which aggravate puromycin aminonucleoside nephrosis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2015, 180(2): 305-315.
- [7] Fenwick P S, Macedo P, Kilty I C, *et al.* Effect of JAK Inhibitors on Release of CXCL9, CXCL10 and CXCL11 from Human Airway Epithelial Cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0128757.
- [8] 张力丹, 黄翠丽, 罗彦彦, 等. 趋化因子 CCL20 及 CCL22 在狼疮鼠浆膜腔液中的表达及意义 [J]. *免疫学杂志*, 2013, 29(7): 597-600.
- [9] 王淇泓, 周 晔, 胡志德, 等. TNFSF9 在原发性胆汁性肝硬化的表达及其临床意义 [J]. *临床军医杂志*, 2010, 38(4): 558-559.
- [10] 廖文慧, 杜艳军, 曾 锐. IL-34 和 CSF-1 在狼疮肾炎小鼠肾脏的表达及意义 [J]. *华中科技大学学报: 医学版*, 2015, 44(2): 129-133.
- [11] Li D T, Ye Y Q, Deng L, *et al.* Gene expression profiling analysis of deoxynivalenol-induced inhibition of mouse thymic epithelial cell proliferation [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2013, 36(2): 557-566.
- [12] Zhang J, Yanez D, Floege A, *et al.* ACE-inhibition increases podocyte number in experimental glomerular disease independent of proliferation [J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2015, 16 (2): 234-248.
- [13] Lin S J, Lee W J, Liang Y J, *et al.* Azithromycin inhibits IL-5 production of T helper type 2 cells from asthmatic children [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2011, 156(2): 179-186.
- [14] 张碧丽, 宋兰云, 王文红, 等. 阿奇霉素对大鼠阿霉素肾病的干预作用 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2011, 27(3): 203-208.
- [15] Kristiansen M, Graversen J H, Jacobsen C, *et al.* Identification of the haemoglobin scavenger receptor [J]. *Nature*, 2001, 409 (6817): 198-201.
- [16] Lukaszewicz A, Savatier P, Cortay V, *et al.* Contrasting effects of basic fibroblast growth factor and neurotrophin 3 on cell cycle kinetics of mouse cortical stem cells. [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(15): 6610-6622.
- [17] Paintlia A S, Paintlia M K, Singh A K, *et al.* Modulation of Rho-Rock signaling pathway protects oligodendrocytes against cytokine toxicity via PPAR- α -dependent mechanism [J]. *Glia*, 2013, 61(9): 1500-1517.
- [18] Shyni G L, Kavitha S, Indu S, *et al.* Chebulagic acid from Terminalia chebula enhances insulin mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes via PPAR γ signaling pathway [J]. *Biofactors*, 2014, 40(6): 646-657.
- [19] 杨维娜, 于琳华, 郭尚温, 等. 改良阿霉素肾病大鼠模型的建立 [J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2009, 30(4): 445-448.
- [20] 王军建, 胡 锐. 丹参酮 II_A 对阿霉素肾病大鼠肾小球 nephrin 和 TGF- β_1 的表达影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(19): 245-251.
- [21] 王 娟, 张碧丽. Ezrin 和 NEPH1 在多柔比星肾病大鼠肾组织中的表达及泼尼松对其表达的影响 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2013, 28(17): 1323-1326.