

马兜铃酸对斑马鱼肾损伤因子 (KIM-1) 表达的影响

王雪 韩利文 何秋霞 孙晨 张云 王希敏 刘可春*

齐鲁工业大学 (山东省科学院), 山东省科学院生物研究所, 山东省科学院药物筛选技术重点实验室,
山东省生物检测技术工程实验室 济南 250301

摘要: 采用分子定量方法检测斑马鱼 (*Danio rerio*) 幼鱼组织中 KIM-1 蛋白含量和基因表达水平, 了解马兜铃酸处理后斑马鱼体内肾损伤因子的表达变化情况, 并与幼鱼表型变化相比较, 探讨 KIM-1 作为肾功能特异标志物在斑马鱼肾功能损伤评价中的应用价值。结果显示, 马兜铃酸处理 30 h 后, 幼鱼出现水肿, 水肿发生率呈剂量依赖性特点。0.5 ~ 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 马兜铃酸处理组幼鱼水肿发生率与对照组差异不明显, 但幼鱼 KIM-1 因子的蛋白含量及 *Kim-1* 基因表达水平比正常对照组显著升高, 在马兜铃酸浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最高。表明在肾功能损伤检测中, KIM-1 是一种比表型更早发生变化的指标。

关键词: 斑马鱼; 肾损伤因子 (KIM-1); 马兜铃酸; 肾毒性; 生物标志物

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2018) 04-622-06

Effect of Aristolochic Acid on Expression of KIM-1 in Zebrafish

WANG Xue HAN Li-Wen HE Qiu-Xia SUN Chen ZHANG Yun
WANG Xi-Min LIU Ke-Chun*

Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Key Laboratory for Drug Screening Technology of Shandong
Academy of Sciences, Shandong Provincial Engineering Laboratory for Biological Testing Technology, Jinan 250301, China

Abstract: To explore the application possibility of kidney injury molecule-1 (KIM-1) as a specific biomarker in the evaluation of the renal function, we studied the changes of kidney injury molecule-1 content and its mRNA level in Zebrafish (*Danio rerio*) after aristolochic acid treatment. The results were compared with the phenotypic changes of Zebrafish. The larvae showed periocular and pericardial edema in a dose-response manner after exposure to aristolochic acid for 30 hours (Table 1). Although the incidence of edema in 0.5 - 5.0 $\mu\text{mol/L}$ aristolochic acid treated groups had no significant difference compared with the control, the protein content and mRNA expression level of KIM-1 in larvae tissue were significantly higher than the control (Table 1, Fig. 1). The peak appeared in the 2 $\mu\text{mol/L}$ aristolochic acid treated group (Fig. 2, 3). From the result we can conclude that KIM-1 is a more sensitive indicator for detection of renal injury, whose

基金项目 山东省自主创新重大专项 (No. 2014ZZCX0215);

* 通讯作者, E-mail: hliukch@sdas.org;

第一作者介绍 王雪, 女, 硕士; 研究方向: 药物毒性评价与活性筛选; E-mail: wangxue8809@163.com。

收稿日期: 2017-10-21, 修回日期: 2018-01-16 DOI: 10.13859/j.cjz.201804013

changes are earlier than the morphological changes in zebrafish.

Key words: Zebrafish, *Danio rerio*; Kidney injury molecule (KIM-1); Aristolochic acid; Nephrotoxicity; Biomarker

作为主要排泄器官, 肾的重要功能是排出体内的代谢废物及毒素物质, 而肾也容易成为毒性物质蓄积并引发急性损伤的靶器官。随着社会的快速发展, 人们接触有毒物质几率增大, 中毒性肾损伤的发病率呈逐渐升高趋势, 严重威胁着人类 (*Homo sapiens*) 的健康。发现化合物对肾的毒性, 掌握其肾毒性作用规律, 对早期预防和有效治疗中毒性肾损伤具有重要意义。

药物毒副作用是导致肾损伤的重要原因之一, 药物对肾的毒性作用具有部位选择性, 如庆大霉素、顺铂、万古霉素等主要损害肾近曲小管, 嘌呤霉素、阿霉素主要表现为肾小球毒性, 呋塞米、锂等主要作用于肾小管及收集管 (Vaidya et al. 2010)。在肾损伤发生初始, 往往仅在肾局部组织出现异常, 肾整体功能尚未受到影响, 基于此, 临床常用的如血肌酐、血尿素氮等这些源于肾小球滤过功能异常的检测指标, 在肾损伤的早期诊断上具有明显的滞后性缺点。目前, 对肾损伤的研究越来越侧重于发现一些灵敏度高、特异性强、能够早期检测到肾损伤的生物标志物。Prozialeck 等 (2007a) 介绍了在重金属镉导致肾损伤的鼠尿液中存在的几种标志物因子, 包括金属硫蛋白 (metallothionein)、Clara 细胞分泌蛋白-16 (clara cell protein-16)、肾损伤因子 (kidney injury molecule-1, KIM-1) 和 β 2-微球蛋白 (β 2-microglobulin), 并从特异性、灵敏度几方面对几种因子进行比较, 认为 KIM-1 在肾损伤早期发现中具有更多的优势。KIM-1 作为评价肾损伤的标志物之一, 已获得美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 和欧洲医药评价署 (European Medicines Evaluation Agency, EMEA) 的认可, 用于新药对肾损伤的早期评估 (徐旭 2010)。

马兜铃酸 (aristolochic acids, AAs) 又被称为马兜铃总酸、增噬力酸或木通甲素, 是多种具有类似结构的马兜铃酸分子的总称, 属硝基菲羧酸。马兜铃酸存在于马兜铃属 (*Aristolochia*) 及细辛属 (*Asarum*) 等马兜铃科植物中, 是这些中药材的主要活性成分, 应用中发现, 马兜铃酸能引起肾近曲小管坏死, 诱导细胞 DNA 损伤, 导致肾间质纤维化及肾萎缩发生, 对多种动物具有肾毒性, 引起低分子蛋白尿、严重贫血症状, 称为“马兜铃酸肾病”。本文选用肾发育成熟的斑马鱼 (*Danio rerio*) 幼鱼为模型, 用马兜铃酸进行处理, 并对幼鱼体内 KIM-1 表达情况进行检测, 探讨 KIM-1 作为检测指标在斑马鱼肾损伤模型中的适用性, 为斑马鱼模型在肾毒性化合物评价及肾功能损伤研究中的应用提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验所用为 AB 系野生型斑马鱼, 在水温 28.5 °C、保持 14 h 光照/10 h 黑暗的光照周期条件下养殖, 每日于 9:00 时和 15:00 时喂食两次颗粒饲料。排卵前日将斑马鱼成鱼按雌雄比 2:1 放入具筛板 (防止成鱼将卵吃掉) 的产卵缸内, 中间放置隔板, 次日亮灯前抽去隔板, 在光照刺激下排卵, 收集鱼卵, 用培养水 (NaCl 5 mmol/L, KCl 0.17 mmol/L, CaCl₂ 0.4 mmol/L, MgSO₄ 0.16 mmol/L, 用去离子水配制) 冲洗 3 遍, 然后放入新培养水中, 在 28.5 °C, 相同光照条件下发育至 3 d 大小。

1.2 方法

1.2.1 分组及给药 马兜铃酸 (分子量 341.27, 纯度 \geq 99.0%, 购自中国食品药品检定研究院) 溶于二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO), 4 °C 保存。实验时取储液, 用培养水

稀释得到 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{mol/L}$ 6 个浓度工作液,以培养水溶液(DMSO 含量不大于 0.5% 体积比)作为空白对照组,分别加入 6 孔板内,每孔终体积 6 ml。随机选取发育 3 d 的健康斑马鱼幼鱼,移入 6 孔板内,每孔 50 条。加盖后放入 28.5 $^{\circ}\text{C}$ 光照培养箱,相同光照条件下孵育 24 h。实验重复 3 次。

处理结束后,取出每组幼鱼在 SZX16 体视显微镜(日本 Olympus)下观察幼鱼形态变化情况,计数形态异常幼鱼,并拍照。

1.2.2 幼鱼体内 KIM-1 蛋白含量检测 处理结束后,收集每组中存活幼鱼,计数,然后用灭菌水冲洗 3~5 遍,放入 1.5 ml 离心管内,尽量吸净水分,然后加入 100 μl PBS (pH 7.4) 缓冲液,匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心后取上清,根据 KIM-1 ELISA 检测试剂盒(santacruz)说明加入酶标板板孔内,加入酶标试剂反应显色,然后放入 Spectra MR 型酶标仪(美国 Dynex),以空白孔调零,测量各孔 A_{450} 值,根据拟合的 Logistic 曲线(四参数)方程计算每组样品中 KIM-1 蛋白浓度,按公式:(样品中 KIM-1 蛋白浓度 \times 100/幼鱼尾数) \times 50,换算为 50 尾幼鱼 KIM-1 蛋白含量。

1.2.3 qPCR 处理结束后,收集每组中存活幼鱼,用灭菌水冲洗后,尽量吸净水分,向每管分别加入 Trizol(美国 Invitrogen)试剂,匀浆,提取幼鱼组织的总 RNA,用 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA 合成试剂盒(大连宝生物工程有限公司)逆转录成 cDNA,以此 cDNA 为模板加入 iTaq Universal SYBR Green Supermix(美国 Bio-Rad)进行 qPCR,检测各组斑马鱼仔鱼组织中 *Kim-1* 基因的表达情况,以 β -actin 作为内参基因。qPCR 反应体系为 20 μl ,反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 63 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。采用 $2^{-\Delta\Delta Cq}$ 法分析基因的相对表达量: $\Delta Cq_{\text{处理组}} = Cq_{\text{处理组目的基因}} - Cq_{\text{处理组内参基因}}$, $\Delta Cq_{\text{对照组}} = Cq_{\text{对照组目的基因}} - Cq_{\text{对照组内参基因}}$, $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{\text{处理组}} - \Delta Cq_{\text{对照组}}$, 以 $2^{-\Delta\Delta Cq}$ 表示处理组目的基因的表达倍数。

β -actin 基因扩增引物为分别为 5'-CGC TGC CTC TTC TTC CTC C-3'和 5'-GAT GTC CAC GTC GCA CTT CA-3', *Kim-1* 基因扩增引物为分别为 5'-ACA GAG TTT CGA GGG TGA CAA-3'和 5'-TGG ATT GGT CCA GCC AGA TC-3'。

1.2.4 统计学分析 采用 SPSS13.0 对实验数据进行分析,各组数据以平均值 \pm 标准误 (Mean \pm SE) 表示,采用独立样本 *t* 检验比较组间差异的显著性, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 形态变化

受精 3 d 大小(days post fertilization, dpf) 斑马鱼幼鱼经马兜铃酸处理 30 h 后,显微镜下观察(图 1),0.5~5.0 $\mu\text{mol/L}$ 马兜铃酸组幼鱼形态、游动情况与对照组比无明显变化,无畸形出现。10.0 $\mu\text{mol/L}$ 马兜铃酸组 68% 幼鱼出现明显水肿,主要表现在眼周、心包部位出现明显组织腔隙扩张(图 1),幼鱼活动力明显下降。0.5~10.0 $\mu\text{mol/L}$ 马兜铃酸组幼鱼死亡较少,与对照组死亡率(先天发育原因)无明显差异,当马兜铃酸浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时,超过 90% 的幼鱼死亡(表 1),存活的少量幼鱼全部出现严重水肿。

2.2 幼鱼体内 KIM-1 蛋白含量变化

处理结束后,20 $\mu\text{mol/L}$ 马兜铃酸组因幼鱼死亡较多(死亡率超过 90%),存活的幼鱼数量不足以用于 KIM-1 蛋白含量检测,其余各处理组存活幼鱼经匀浆,离心后取上清,根据 ELISA 试剂盒步骤检测各组样品 A_{450} 值,并计算幼鱼体内 KIM-1 蛋白含量。对照组幼鱼体内 KIM-1 蛋白含量为 (0.308 \pm 0.051) ng (以 50 尾幼鱼计),马兜铃酸处理后幼鱼体内 KIM-1 蛋白含量上升,其中,2 $\mu\text{mol/L}$ 马兜铃酸组达到最高,为 (0.879 \pm 0.063) ng (以 50 尾幼鱼计),与对照组有显著差异。但随着马兜铃酸浓度进一步升高,KIM-1 蛋白含量出现下降(图 2)。

表 1 不同浓度马兜铃酸处理 30 h 对斑马鱼幼鱼的影响

Table 1 The effect of various concentrations of aristolochic acid on Zebrafish larvae

马兜铃酸浓度 Concentration of aristolochic acid ($\mu\text{mol/L}$)	死亡率 Mortality (%)	水肿率 Edema (%)	游动能力 Mobility
0	9.3 ± 1.8	7.3 ± 1.2	正常游动 Normal mobility
0.5	11.3 ± 2.3	8.6 ± 1.1	正常游动 Normal mobility
1.0	10.6 ± 3.0	7.2 ± 3.1	正常游动 Normal mobility
2.0	12.7 ± 2.3	6.3 ± 2.5	正常游动 Normal mobility
5.0	12.0 ± 2.0	10.0 ± 3.5	正常游动 Normal mobility
10.0	13.3 ± 3.1	$68.7 \pm 9.5^*$	鱼体倾斜, 游动少 Body tilting, lack mobility
20.0	$91.3 \pm 3.1^*$	100 ± 0	鱼体倾斜, 几乎不游动 Body tilting, lack mobility

* 表示与对照组相比, 差异显著, $P < 0.05$ 。* $P < 0.05$ vs the control group.

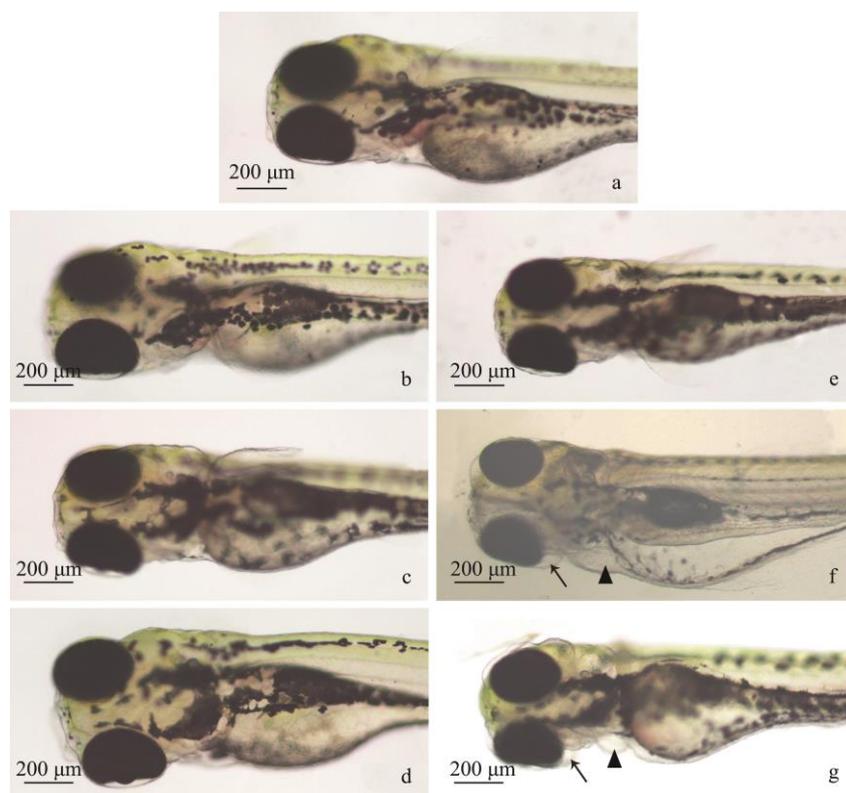


图 1 马兜铃酸处理后斑马鱼幼鱼的形态变化

Fig. 1 Phenotypes of Zebrafish larvae after aristolochic acid treatment

a. 对照组; b. 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组; c. 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组; d. 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组; e. 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 组; f. 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 组; g. 20.0 $\mu\text{mol/L}$ 组。

a. The control group; b. 0.5 $\mu\text{mol/L}$ group; c. 1.0 $\mu\text{mol/L}$ group; d. 2.0 $\mu\text{mol/L}$ group; e. 5.0 $\mu\text{mol/L}$ group; f. 10.0 $\mu\text{mol/L}$ group; g. 20.0 $\mu\text{mol/L}$ group.

箭头. 眼周水肿; 三角. 心包水肿。Arrow head. Periorbital edema; Triangle: Pericardial edema.

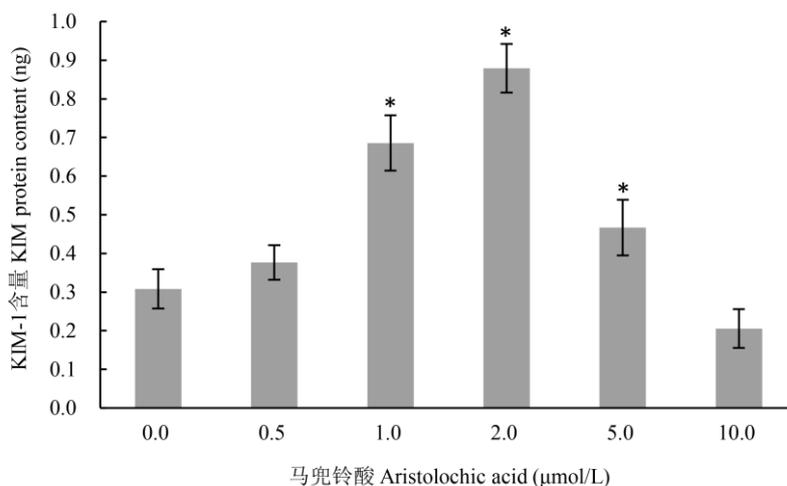


图 2 不同处理组幼鱼体内 KIM-1 蛋白含量

Fig. 2 KIM-1 protein contents in Zebrafish larvae tissue in different treatment groups

* 与对照组比, $P < 0.05$. * $P < 0.05$ vs the control group.

2.3 qPCR 检测幼鱼体内 *Kim-1* 表达水平变化

qPCR 结果显示, 0.5 ~ 2.0 μmol/L 马兜铃酸组幼鱼体内 *Kim-1* 基因表达量随药物浓度升高呈上升趋势, 各组均显著高于对照组, 马兜铃酸浓度继续升高时, *Kim-1* 基因表达量并未继续上升, 反而出现下降, 但仍高于对照组, 并有显著性差异 (图 3)。

KIM-1 是 I 型跨膜蛋白 (cell membrane glycoprotein), 属免疫球蛋白基因超家族。在正常肾, KIM-1 几乎不表达, 肾发生损伤后, 肾近曲小管上皮细胞表面的 KIM-1 表达量显著提高, 主要参与近曲小管的修复过程 (Yin et al. 2016), 能调节上皮细胞间的粘附及上皮细胞向近曲小管基底膜的附着, 以形成连续的上皮细胞层 (Prozialeck et al. 2007b)。在这个过程中, KIM-1 胞外功能区域被金属蛋白酶介导裂

3 讨论

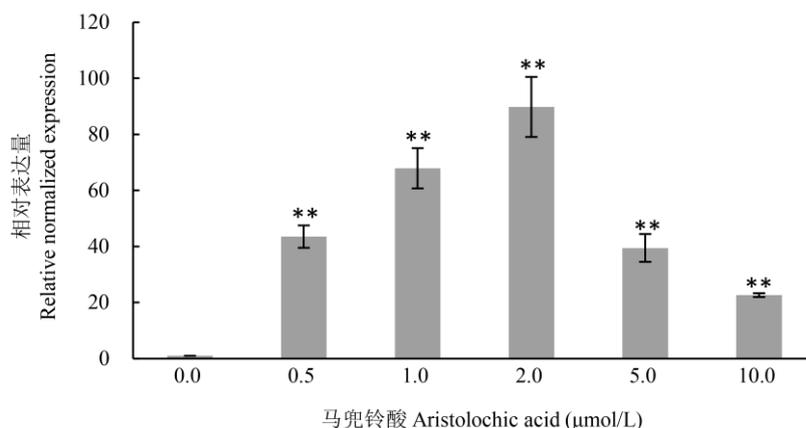


图 3 不同处理组幼鱼组织中 *Kim-1* 基因表达情况

Fig. 3 Expression levels of *Kim-1* gene in the whole zebrafish larvae in different treatment groups

** 与对照组比, $P < 0.01$. ** $P < 0.01$ vs the control group.

解, 脱落进入尿液中 (Vaidya et al. 2010), 在尿液中能稳定存在较长时间, 不受尿液理化特性的影响。另外, KIM-1 在血细胞、淋巴结、泪腺等部位也有少量表达, 但在这些部位的表达量不受肾损伤的影响 (Vaidya et al. 2010)。因此, 尿液或体内的 KIM-1 水平可以特异反映肾功能的损伤情况。

马兜铃酸是公认的具有肾毒性的化合物。本文中, 用不同浓度马兜铃酸处理 30 h 后, 0.5 ~ 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 马兜铃酸组斑马鱼幼鱼形态、游动情况与对照组比无明显变化, 无畸形出现。马兜铃酸浓度为 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, 部分幼鱼出现眼周、心包及卵黄囊部位的明显水肿, 水肿的出现与马兜铃酸浓度升高、毒性作用增强有关。在 20.0 $\mu\text{mol/L}$ 马兜铃酸处理组, 幼鱼大量死亡, 存活的少量幼鱼均存在严重水肿, 活动能力明显下降。虽然 0.5 ~ 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 马兜铃酸处理组幼鱼形态无明显异常, 但 KIM-1 蛋白含量上升, 均显著高于对照组。qPCR 结果也显示, 马兜铃酸处理后幼鱼体内 *Kim-1* 基因表达水平出现明显上调, 其中 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 马兜铃酸处理组 *Kim-1* 表达量将近为对照组的 90 倍之多, 表明幼鱼肾已发生损伤。这一结果也说明, 在斑马鱼这一模式生物, *Kim-1* 比表型更早发生改变, 是一种灵敏度更高的肾损伤检测指标。

从实验数据看, 在所设的马兜铃酸剂量范围内, 幼鱼体内 *Kim-1* 表达量的升高并不完全符合剂量依赖性特点, 在 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最高点, 然后随着马兜铃酸浓度升高, KIM-1 蛋白含量及 mRNA 表达水平出现明显下降。这与前期在斑马鱼肾损伤研究中得到的肌酐含量检测结果类似 (Wang et al. 2016), 药物导致肾功能受损后, 斑马鱼体内的肌酐含量明显上升, 但达到一定给药浓度后, 肌酐含量又出现下降, 这表明病理状态下, 与肾功能相关的一些指标的变化存在最大限度值, 说明机体对肾功能毒

性损伤的应激反应具有一定的弹性范围。这提示我们在利用动物模型进行肾功能评价时, 要考虑检测指标的变化规律, 合理做出判断。

肾功能损伤起病隐匿、不易逆转, 早发现、早治疗是有效缓解肾功能损伤的关键。肾功能的代偿作用较强, 这使得一些常用检测指标在肾功能严重受损时才出现阳性改变, 延误了治疗。肾损伤引起的肾生理改变伴随出现一些特异的分子变化, 以这些标志物分子变化为指标, 能早发现肾局部或轻微损伤。而在斑马鱼模型中应用这些标志物分子作为指标, 可以更灵敏地发现具有轻微肾毒性的药物或剂量。尤其结合现在常用的网络药理和生物信息学手段, 围绕这些标志物分子的靶点网络开展研究, 将极大地拓宽肾损伤性疾病的治疗思路。

参 考 文 献

- Prozialeck W C, Edwards J R. 2007b. Cell adhesion molecules in chemically-induced renal injury. *Pharmacology & Therapeutics*, 114(1): 74-93.
- Prozialeck W C, Vaidya V S, Liu J, et al. 2007a. Kidney injury molecule-1 is an early biomarker of cadmium nephrotoxicity. *Kidney International*, 72(8): 985-993.
- Vaidya V S, Ozer J S, Dieterle F, et al. 2010. Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. *Nature Biotechnology*, 28(5): 478-485.
- Wang X, Liu K C, Sun G J, et al. 2016. Evaluation of nephrotoxic effects of aristolochic acid on zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Human & Experimental Toxicology*, 35(9): 974-982.
- Yin W, Naini S M, Chen G, et al. 2016. Mammalian target of rapamycin mediates kidney injury molecule 1-dependent tubule injury in a surrogate model. *Journal of The American Society of Nephrology*, 27(7): 1943-1957.
- 徐旭, 汤立达. 2010. FDA 和 EMEA 批准 7 种肾损伤生物标志物正式使用. *药物评价研究*, 33(5): 347-350.