

## CyPA 与慢性肾衰竭相关性及其作用研究

徐 剑, 周晓萍, 罗惠民, 孟 瑚, 袁红伶, 熊丽焱  
(云南省第一人民医院肾内科, 云南昆明 650032)

**[摘要]** **目的** 研究亲免疫 A (CyPA) 在正常人及慢性肾衰竭 (CRF) 患者外周血中的浓度水平变化, 明确 CyPA 是否与慢性肾衰竭有关联性及可能的作用机制. **方法** CRF 患者及正常人对照组各 50 例, 采用 ELISA 法分别测定 (1) 正常人外周血 CyPA, 同时测定 AngII、TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\alpha$ 、单核细胞趋化蛋白 (MCP-1). (2) 慢性肾衰竭患者厄贝沙坦治疗前抽取外周血测定 CyPA, AngII、TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\alpha$ 、单核细胞趋化蛋白 (MCP-1) 水平. 治疗 1 月后再次抽取外周血测定外周血 CyPA, AngII、TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\alpha$ 、单核细胞趋化蛋白 (MCP-1) 水平. 比较组间差异及分析 CyPA 与 CRF 的相关性及 CyPA 与 AngII、TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\alpha$ 、MCP-1 等炎症因子的关联性. **结果** (1) CRF 组外周血 CyPA 水平治疗前后均高于健康对照组; (2) 在 CRF 组与正常对照组中, 外周血 CyPA 水平与 AngII、TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\alpha$ 、MCP-1 等存在组间差异 ( $P < 0.01$ ); (3) 经 spearman 相关分析, 在对照组中, 慢性肾衰竭治疗前, 及慢性肾衰竭厄贝沙坦治疗后, CyPA 均与 AngII 及 TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\alpha$ 、MCP-1 有相关性. **结论** CyPA 可能与 AngII 协同作用, 增加炎症细胞因子趋化水平, 促进了 CRF 患者炎症反应, 加重肾小球、肾小管及间质损伤. 炎症反应是慢性肾衰竭加速进展的重要原因之一. 通过选择性的抑制 CyPA 或阻断 CyPA 受体可能为我们提供了一条新的可供选择的途径.

**[关键词]** CyPA; 慢性肾衰竭; 相关性

**[中图分类号]** R692.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 11-0058-05

## Correlation of CyPA with Chronic Renal Failure

XU Jian, ZHOU Xiao-ping, LUO Hui-min, MENG Hu, YUAN Hong-ling, XIONG Li-yan  
(Dept. of Kidney Internal Medicine, The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan  
650032, China)

**[Abstract]** **Objective** This study was aimed to investigate CyPA concentration levels in the peripheral blood in normal persons and patients with chronic renal failure (CRF), in order to determine whether CyPA is associated with CRF and its possible mechanism. **Methods** 50 CRF patients and 50 normal persons were selected. The level of CyPA in the peripheral blood, AngII, TNF, IL-6, IL-1, and monocyte chemoattractant protein (MCP-1) of the normal persons were measured by ELISA. And these indicators of patients with CRF were also measured before and after treatment with irbesartan. The differences between the two groups were compared, the correlation between CyPA and CRF, and the relevance of CyPA with AngII, TNF, IL-6, IL-1 and MCP-1 were analyzed. **Results** (1) The levels of CyPA in peripheral blood of CRF group were higher than those in control group, whether before or after treatment. There were significant differences in the levels of CyPA, AngII, TNF, IL-6, IL-1 and MCP-1 between the CRF group and the control group ( $P < 0.01$ ). The results of Spearman analysis showed that there were correlations between CyPA and the levels of AngII, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\alpha$  and MCP-1 in the control group and the CRF group before and after treatment with irbesartan. **Conclusion** CyPA might played the synergistic effect with AngII and increased the levels of inflammatory cytokines, which revealed that CyPA may act as an inflammatory cell medium, promote inflammatory reaction in CRF patients, increase glomerular, renal tubular and interstitial

**[基金项目]** 云南省应用基础研究基金资助项目 (2011FZ275)

**[作者简介]** 徐剑 (1978~), 男, 云南昆明市人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事慢性肾衰竭及肾纤维化研究工作.

**[通讯作者]** 周晓萍. E-mail: amilyzou@hotmail.com

injury. CyPA may be a new marker of inflammation in CRF. Inflammation is one of the important causes which speed up the development of CRF. The selective inhibiting or blocking CyPA receptors may provide a new treatment of CRF.

[Key words] CyPA; Chronic renal failure; Correlation

亲免素 (Cyclophilin) 是高度保守、广泛分布的蛋白家族, 也称为亲环素。CypA 具有肽脯氨酰顺反异构酶 (PPIase) 活性, 调节蛋白质的折叠和转运。虽然 CyPA 最初被认为主要功能是作为一种细胞内蛋白质, 但在最近的动物模型及多种人类疾病研究中表明, CyPA 在炎症刺激下可从细胞中分泌, 作为自分泌 / 旁分泌因子介导细胞通信, 加剧了氧化应激及炎症反应<sup>[1]</sup>。既往研究表明 CyPA 在肾脏中具有相对较高的水平, 特别是邻近肾小管上皮细胞部位, 在 CsA 治疗后 CyPA 在肾脏刷状缘膜蛋白再分布, 其参与 CsA 的肾毒性作用<sup>[2-4]</sup>。目前的研究中发现, CRF 动物的肾组织内某些细胞因子如 TGF $\beta$ 、IL-1、血管紧张素 II、内皮素 -1 等, 参与肾小球、肾小管及间质损伤, 促进细胞外基质增多, 如基质金属蛋白酶 (MMP) 的下调, 纤溶酶原激活抑制物 (PAI-1) 表达上调。在某些生长因子及炎症因子诱导下, 肾小管上皮细胞、肾小球上皮细胞、肾间质细胞、成纤维细胞均可转变为肌成纤维细胞, 为肾间质纤维化、肾小球硬化过程中的重要原因。

体外的研究表明, 血管紧张素 II (AngII) 可以促进亲免素 A (CyPA) 的分泌, CyPA 可增加 IL-6、IL-1、TNF $\alpha$  等炎症因子的分泌, 这些因子可使内皮受损, 导致白细胞粘附炎症反应加重肾组织损伤, 引起肾衰。但在慢性肾衰竭患者中 CyPA 与 AngII 和炎症因子的关联性, 目前尚不清楚。本研究通过检测正常人, 慢性肾衰患者外周血中 CyPA 及炎症因子、AngII 水平, 探讨慢性肾衰竭患者 CyPA 与炎症因子和 AngII 之间的关联性。

CRF 患者及正常人对照组各 50 例, 其中正常对照组血样采集自我院体检中心, CRF 患者组入选对象为我院 2013 年 1 月至 2013 年 12 月 GFR < 15 mL/min, 确诊慢性肾衰竭 (尿毒症期) 行血液透析治疗住院患者。排除标准: 存在临床感染 (呼吸道, 消化道, 泌尿生殖系等感染), 活动性免疫系统疾病, 恶性肿瘤, 心功能不全未控制, 3 个月内使用过免疫抑制剂, 高钾血症, 双侧肾动脉狭窄等厄贝沙坦使用禁忌症者排除入选本研究。

## 1 材料与方 法

### 2.1 材 料

CyPA 及其多抗 (兔抗人 IgG 多克隆抗体) 购自美国 cloud-clone 公司产品, TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\alpha$ 、MCP-1 购自杭州联科生物技术有限公司。厄贝沙坦为法国赛诺菲 - 安万特公司, 150 mg/d。

### 1.2 方 法

CyPA 检测 采用酶联免疫吸附法将 CYPA 抗体包被于 96 孔微孔板中, 制成固相载体, 向微孔中分别加入标准品或标本, 其中的 CYPA 与连接于固相载体上的抗体结合, 然后加入生物素化的 CYPA 抗体, 将未结合的生物素化抗体洗净后, 加入 HRP 标记的亲环素, 再次彻底洗涤后加入 TMB 底物显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 CYPA 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度 (O.D.值), 计算样品浓度。各标准品及样本 O.D.值扣除空白孔 O.D.值后作图 (七点图) 以标准品的浓度为纵坐标, O.D.值为横坐标, 绘出标准曲线, 1.30, 根据样品 O.D.值, 由标准曲线查出相应的浓度, 乘以稀释倍数; 即为样品的实际浓度。采用双抗体夹心酶联免疫吸附检测技术分别检测外周血 AngII、TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\alpha$ 、MCP-1 水平。

### 1.3 统 计 学 分 析

所有的数据用 SPSS 统计软件包进行处理分析。计量资料的多组数据比较采用随机区组设计的方差分析, 方差不齐时, 改用秩和检验。相关性分析采用 Spearman 相关分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 健康对照组与慢性肾衰竭组 CyPA 水平

在正常对照组中 CyPA 浓度均数为 104.292 pg/mL, 慢性肾衰竭组治疗前浓度均数为 285.509 pg/mL, 慢性肾衰竭组治疗后浓度均数为 129.850 pg/mL, 经方差分析两两比较, 各组间不同指标均有统计学差异 ( $P < 0.01$ ) 见图 1。

## 2.2 2 组 CyPA 水平与炎症因子的相关性

慢性肾衰竭组炎症因子 AngII、TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\alpha$ 、MCP-1 水平较正常对照组高，CyPA 与 AngII、TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\alpha$ 、MCP-1 水平经方差分析，各指标均有统计学差异 ( $P < 0.01$ )，进一步经 LSD 法两两比较，不同指标各组间均有统计学差异 ( $P < 0.01$ )。见表 2。这些指标经方差齐性检验，方差不齐，改用秩和检验。经秩和检验，各指标均有统计学差异 ( $P < 0.01$ )，进一步经秩变换，采用方差分析法，LSD 法两两比较，不同指标各组间均差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )，见表 3。

## 2.3 CyPA 水平与炎症因子的相关分析

CyPA 与 AngII、TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\alpha$ 、MCP-1 水平做 Spearman 相关分析，所有样本的 CyPA 与 AngII 的相关系数为 0.770，与 TNF $\alpha$  的相关系数为 0.756，与 IL-6 的相关系数为 0.807，与

IL-1 $\alpha$  的相关系数为 0.744，与 MCP-1 的相关系数为 -0.736， $P < 0.05$ 。

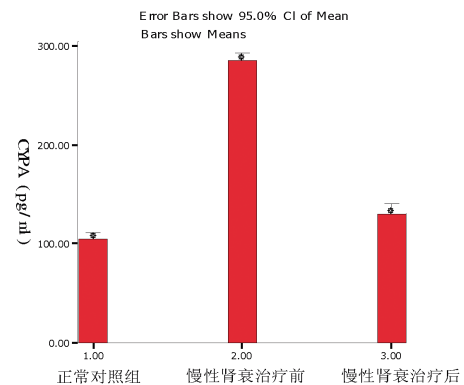


图 1 健康对照组与慢性肾衰竭组 CyPA 水平比较

Fig. 1 The comparison of CyPA levels in healthy group and CRF group

表 1 正常对照组与慢性肾衰竭组 CyPA 水平与炎症因子的相关分析

Tab. 1 The correlation analysis of the level between CyPA and inflammatory factors in control group and CRF group

指标	分组	n	均数	标准差
TNF-a	正常对照组	50	95.814*	12.431
	慢性肾衰治疗前	50	228.156*	19.630
	慢性肾衰治疗后	50	156.142*	18.029
IL-1	正常对照组	50	60.332*	14.121
	慢性肾衰治疗前	50	197.862*	21.956
	慢性肾衰治疗后	50	92.715*	20.521
IL-6	正常对照组	50	22.991*	9.191
	慢性肾衰治疗前	50	190.136*	16.041
	慢性肾衰治疗后	50	64.007*	17.995
MCP-1	正常对照组	50	266.383*	31.811
	慢性肾衰治疗前	50	120.337*	15.743
	慢性肾衰治疗后	50	188.673*	16.009
ANG-II	正常对照组	50	61.746*	19.855
	慢性肾衰治疗前	50	207.025*	26.633
	慢性肾衰治疗后	50	108.966*	11.360
CYPA	正常对照组	50	104.292*	22.187
	慢性肾衰治疗前	50	285.509*	26.316
	慢性肾衰治疗后	50	129.850*	36.412

\*注：经方差分析，各指标均有统计学差异 ( $P < 0.01$ )，进一步经 LSD 法两两比较，不同指标各组间均有统计学差异 ( $P < 0.01$ )。

表 2 正常对照组与慢性肾衰竭组 CyPA 水平与炎症因子的相关分析

Tab. 2 The correlation analysis between the level of CyPA and inflammatory factors in control group and CRF

指 标	分 组	group	中位数	四分位数间距
TNF-a	正常对照组	50	93.450*	13.700
	慢性肾衰治疗前	50	228.599*	25.380
	慢性肾衰治疗后	50	157.746*	28.463
IL-1	正常对照组	50	60.357*	20.381
	慢性肾衰治疗前	50	192.994*	33.088
	慢性肾衰治疗后	50	87.937*	21.058
IL-6	正常对照组	50	23.076*	17.032
	慢性肾衰治疗前	50	186.950*	17.816
	慢性肾衰治疗后	50	66.261*	29.966
MCP-1	正常对照组	50	267.437*	40.251
	慢性肾衰治疗前	50	120.985*	17.920
	慢性肾衰治疗后	50	189.424*	15.868
ANG-II	正常对照组	50	59.973*	34.507
	慢性肾衰治疗前	50	211.620*	39.981
	慢性肾衰治疗后	50	109.448*	20.654
CYPA	正常对照组	50	107.205*	32.654
	慢性肾衰治疗前	50	286.637*	38.741
	慢性肾衰治疗后	50	119.869*	38.741

\*注: 经秩和检验, 各指标均有统计学差异 ( $P < 0.01$ ), 进一步经秩变换, 采用方差分析法, LSD 法两两比较, 不同指标各组间均差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) .

表 3 CyPA 水平与炎症因子的相关分析

Tab. 3 The correlation analysis between the level of CyPA and inflammatory factors

分 组	分析方法 -Spearman 相关	TNF-a	IL-1	IL-6	MCP-1	ANG-II	CYPA
CYPA (对照组)	Correlation Coefficient	-0.029	0.093	0.108	0.141	-0.021	1.000
	Sig. (2-tailed)	0.843	0.521	0.454	0.330	0.882	-
	N	50	50	50	50	50	50
CYPA (治疗前)	Correlation Coefficient	-0.020	-0.083	0.171	0.018	-0.063	1.000
	Sig. (2-tailed)	0.892	0.568	0.234	0.900	0.665	-
	N	50	50	50	50	50	50
CYPA (治疗后)	Correlation Coefficient	-0.037	-0.146	0.446**	0.197	0.215	1.000
	Sig. (2-tailed)	0.800	0.312	0.001	0.170	0.134	-
	N	50	50	50	50	50	50
CYPA (所有样本)	Correlation Coefficient	0.756**	0.744**	0.807**	-0.736**	0.770**	1.000
	Sig. (2-tailed)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-
	N	150	150	150	150	150	150

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

### 3 讨论

本研究结果显示: 慢性肾衰竭患者外周血中 CyPA 较正常人显著升高, 其可能作为炎症介质, 介导了化学趋化因子 IL-8, MCP-1 的分泌增加, 促进了炎症细胞 (如中性粒细胞) 向肾脏聚集, 加

重了肾脏固有细胞的损害. 其可能的作用机制是: AngII 激活细胞 NADPH 氧化酶, 产生活性氧自由基 (ROS). ROS 激活 Rho GTP 酶, 导致 CyPA 分泌<sup>[9]</sup>. CyPA 同时也是直接的炎症细胞趋化物质, 可通过活化 NF- $\kappa$ B 通路, 刺激单核巨噬细胞的细胞 / 化学因子表达, 诱导炎症细胞分泌 IL-1、IL-6、IL-8、单核细胞趋化蛋白 -1 (MCP-1)、和

TNF- $\alpha$ . CyPA 通过激活 MMPs 调节胶原蛋白水解活性, 促进炎症细胞迁移<sup>[6,7]</sup>. CyPA 与 AngII 协同作用增加活性氧自由基 (ROS) 的产生, 具有促进 AngII 诱发血管平滑肌增殖的潜在作用<sup>[8]</sup>细胞外基质金属蛋白酶诱导剂 (EMMPRIN) 被推测为 CyPA 的作用受体, 可以被 ROS 激活并刺激 MMPs 生成, 导致血管壁的动脉粥样硬化<sup>[9,10]</sup>. 此外, De Christofferson 等学者的研究证实, CyPA 的释放是一个细胞坏死的标志物, 可能参与了细胞的凋亡<sup>[11]</sup>.

本研究仍然存在一些不足之处, 前期其他学者的基础研究证实了 CyPA 在肾脏中具有特异性分布, 本研究主要关注点是通过检测外周血 CyPA 证实 CyPA 与慢性肾衰竭是否有相关性. 但 CyPA 做为自分泌和旁分泌因子, 在炎症、缺血缺氧等条件刺激下, 其在肾组织中的分布及调节机制, 尚需要今后在进一步的肾衰动物模型肾脏病理研究中来证实.

综上所述, 本研究证实外周血 CyPA 水平与慢性肾衰竭显著相关, 相较于正常人, 慢性肾衰竭患者外周血 CyPA 水平显著升高. 我们推测 CyPA 可能作为一种新的慢性肾衰竭炎症损伤的靶标志物, 但尚需大样本量长期观察研究加以证实. CyPA 可能与 AngII 协同作用, 增加炎症细胞因子趋化水平, 揭示 CyPA 可能作为一种炎症细胞介质, 促进了 CRF 患者炎症反应, 加重肾小球、肾小管及间质损伤. 炎症反应是慢性肾衰竭加速进展的重要原因之一. 通过选择性的抑制 CyPA 或阻断 CyPA 受体可能为我们提供了一条对慢性肾功能衰竭新的可供选择的治疗途径.

致谢: 感谢昆明医科大学公卫学院蔡乐教授对本文统计学部分做出的贡献.

#### [参考文献]

- [1] PNIGRO, G POMPILO, MC CAPOGROSSI, et al. A key player for human disease [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4:

e888.

- [2] RYFFEL B, WOERLY G, GREINER B, et al. Distribution of the cyclosporine binding protein cyclophilin in human tissue [J]. *Immunology*, 1991, 72(3):399 - 404.
- [3] MARKS W H, HARDING M W, HANDSCHUMACHER R, et al. The immunochemical distribution of cyclophilin in normal mammalian tissues [J]. *Transplantation*, 1991, 52(2):34 - 345.
- [4] MICHEL D, ALAIN L, ARASH S, et al. Association of cyclophilin A with renal brush border membranes; Redistribution by cyclosporine A [J]. *Kidney Int*, 2000, 57(4):1 590 - 1 598.
- [5] SATOH K, NIGRO P, BERK B. Oxidative stress and vascular smooth muscle cell growth: A mechanistic linkage by Cyclophilin A [J]. *Antioxidants & redox signaling*, 2010, 12(5):675 - 682.
- [6] SATOH K, SHIMOKAWA H, BERK B. Cyclophilin a promising new target in cardiovascular therapy [J]. *Circ J*, 2010, 74(11):2 249 - 2 256.
- [7] ZHANG B E I, WANG CONG-HUA, WANG YAN-HONG, et al. The role of CyPA in chemotaxis of neutrophil in rheumatoid arthritis and secretion of interleukin-8 [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2009, 25(5):423 - 425.
- [8] SATOH K, NIGRO P, MATOBA T, et al. Cyclophilin a enhances vascular oxidative stress and development of angiotensin II-induced aortic aneurysms [J]. *Nat Med*, 2009, 15(6): 649 - 656.
- [9] VENKATESAN B, VALENTE A, PRABHU S, et al. EMMPRIN activates multiple transcription factors in cardiomyocytes, and induces interleukin-18 expression via Rac1-dependent PI3K/Akt/IKK/NF- $\kappa$  B and MKK7/JNK/AP - 1 signaling [J]. *J Mol Cell Cardio*, 2010, 49(4): 655 - 663.
- [10] YUAN W E I, GE HENG, HE BEN. Pro-inflammatory activities induced by CyPA-EMMPRIN interaction in monocytes [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 213(2):415-421.
- [11] DE CHRISTOFFERSON, J YUAN. Cyclophilin a release as a biomarker of necrotic cell death [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2010, 17(12):1 942 - 1 943.

(2014 - 09 - 03 收稿)