

大鼠离体肾灌注技术评价尿肝型脂肪酸结合蛋白 在马兜铃酸致肾损伤中的价值

周绮, 张泽安, 金若敏*

(上海中医药大学药物安全评价研究中心, 上海 201203)

[摘要] 目的:探讨大鼠离体肾灌注体系中尿肝型脂肪酸结合蛋白与马兜铃酸(AA)肾损伤的关系。方法:建立大鼠离体肾灌注模型,按 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 恒速灌注,空白组给予正常灌注液,马兜铃酸组给予 $7 \text{ mg} \cdot (50 \text{ mL})^{-1}$,灌注给药 10 min 后,不同时间点收集灌注液和尿液,分别检测钾、钠、氯离子浓度,计算离子清除率,ELISA 方法检测尿液肝型脂肪酸结合蛋白浓度。结果:马兜铃酸组钾、钠离子清除率在给药后 0.5h 明显下降,分别从给药前的 $(99.54 \pm 14.55)\%$ 和 $(27.93 \pm 6.66)\%$ 下降至 $(33.16 \pm 9.59)\%$ 和 $(9.70 \pm 2.62)\%$,与空白组相比差异显著;尿肝型脂肪酸结合蛋白在给药灌注后即刻明显升高,从给药前 $(7.42 \pm 0.12) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 升高至 $(8.18 \pm 0.47) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$,与空白组相比差异显著。结论:尿肝型脂肪酸结合蛋白在评价马兜铃酸致急性肾小管损伤方面优于传统指标离子清除率,是一个早期且敏感的肾小管损伤生物标志物。

[关键词] 马兜铃酸肾病;大鼠离体肾脏灌注体系;肝型脂肪酸结合蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0216-04

[收稿日期] 20101026(011)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(2009CB522807)(973 计划);国家“重大新药创新”科技重大专项项目(2009ZX0902-002)

[第一作者] 周绮,博士在读,专业:中西医结合基础,从事药物肝肾毒性的病理学研究, Tel:021-51323053, E-mail:zhou.qi@sohu.com

[通讯作者] *金若敏,研究员,上海中医药大学药物安全评价研究中心主任, Tel:021-51322401, E-mail:rmj801@126.com

山草苈蓉分离 PGBR,并研究 PGBR 对肺癌细胞增殖和凋亡的影响。

肿瘤细胞的典型特征是逃逸了正常细胞增殖的调控体系而自主地无限生长。本 MTT 试验结果显示,在所用浓度范围内 PGBR 能有效地抑制 A549 细胞的增殖,呈现出良好的时效与量效关系。而肿瘤的发生和发展不仅是肿瘤增殖和分化异常所致,而且还是肿瘤细胞凋亡异常的结果。大多数抗肿瘤药物都能诱导敏感肿瘤细胞发生凋亡,其抗肿瘤效能与肿瘤细胞在药物诱导下发生细胞凋亡的活性有关。因此,诱导瘤细胞凋亡已成为肿瘤治疗的一个新热点^[4]。本实验结果表明,PGBR 可诱导肺癌 A549 细胞凋亡,同时能明显改变癌细胞的周期分布,使细胞阻滞于 G_0/G_1 期,促使细胞发生凋亡。细胞凋亡的过程是程序化的、多基因调控的。与细胞凋亡相关的蛋白大致有 Bcl-2 家族, p53, Fas, c-Myc, k-Ras 等,细胞是否进入凋亡通道取决于这些凋亡相关蛋白的综合调控结果^[5]。在本实验中,PGBR 可使肺癌细胞 p53 和 Fas 蛋白水平增高, Bcl-2 表达下降, Bax 表达增高。说明 PGBR 可能通过上调 p53

和 Fas 表达和降低 Bcl-2/Bax 比值而诱导 A549 细胞凋亡。总之,PGBR 可通过诱导肺癌细胞凋亡和细胞周期阻滞而发挥抗肺癌作用,其抗癌作用机制需进一步的探讨。

[参考文献]

- [1] Quan J S, Piao L, Wang X, et al. Rossicaside B protects against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2009, 105:380.
- [2] 尹学哲,许惠仙,金爱花,等. 草苈蓉环烯醚萜苷对移植鳞癌 VX2 荷瘤兔的抑瘤作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6):134.
- [3] Lin L C, Chen K T. New phenylpropanoid glycoside from *Boschniakia rossica* [J]. Chin Pharmaceutical J, 2004, 56: 77.
- [4] Tan T T, White E. Therapeutic targeting of death pathways in cancer: mechanisms for activating cell death in cancer cells[J]. Adv Exp Med Biol, 2008, 615: 81.
- [5] Lu Q L, Poulsom R, Wong L, et al. Bcl-2 expression in adult and embryonic non-haematopoietic tissues [J]. J Pathol, 1993, 169(4): 431.

[责任编辑 邹晓翠]

Role of Liver Fatty Acid Binding Protein in Kidney Damage Induced by Aristolochic Acid in Rat Evaluated by Perfusion of Isolated Kidney

ZHOU Qi, ZHANG Ze-an, JIN Ruo-min*

(Center for Drug Safety Evaluation Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[**Abstract**] **Objective:** To discuss the relationship between the liver fatty acid binding protein and kidney damage induced by aristolochic acid in rats evaluated by perfusion of isolated kidney. **Method:** Rat perfusion model of isolated kidney was established at the constant flow of $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The control group was administrated with normal perfusate, while the experimental group was given aristolochic acid (7 mg in 50 mL). After 10 min of perfusion, the perfusate and urine at different time points were collected. Then concentration of K, Na, Cl was determined and their clearance was calculated. The content of liver fatty acid binding protein was detected by Elisa. **Result:** Compared with the control group, the clearance of K and Na in the experimental group given aristolochic acid began to decrease from $(99.54 \pm 14.55)\%$ and $(27.93 \pm 6.66)\%$ of pre-perfusion to $(33.16 \pm 9.59)\%$ and $(9.70 \pm 2.62)\%$ of 30 min after perfusion respectively, and liver fatty acid binding protein immediately increased significantly from $(7.42 \pm 0.12) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ of pre-perfusion to $(8.18 \pm 0.47) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ at the moment of after perfusion respectively. **Conclusion:** Liver fatty acid binding protein is superior to the clearance of traditional indicators in the evaluation of acute tubular injury induced by aristolochic acid. It is an early and sensitive biomarker of renal tubular injury.

[**Key words**] aristolochic acid nephropathy; perfusion of rat isolated kidney; liver fatty acid binding protein

目前已知马兜铃酸肾病 (aristolochic acid nephropathy, AAN) 损伤靶点主要位于肾小管上皮细胞, 肾间质成纤维细胞和肾小血管内皮细胞^[1]。马兜铃酸肾病急性型主要侵袭近端肾小管上皮细胞, 导致其坏死或凋亡, 病理表现为典型的急性肾小管坏死 (acute tubular necrosis, ATN), 肾小管“裸膜”, 少数炎细胞浸润, 与某些抗生素引起的 ATN 相比, AAN 再生细胞少, 表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 表达低, 表现为明显的损伤后修复不良^[2]。这也导致 AAN 停药后仍可能进展为慢性肾纤维化。现在 AAN 的发生机制仍不十分明确。由于 AAN 的早期诊断很困难, 故临床上确诊马兜铃酸肾病时多属中末期, 而治疗也多数应用激素, 或透析等对症治疗。

肝型脂肪酸结合蛋白 (liver fatty acid binding protein, L-FABP) 是一种表达在肾脏近端小管细胞内的小分子蛋白质, 相对分子质量约为 14 400, 它作为参与游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 在肾小管内代谢的关键蛋白, 受脂肪酸的调节, 在急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 时, 作为反映肾损伤的早期标志物。急性马兜铃酸肾病是否亦与脂质代谢障

碍有关, L-FABP 是否也可作为 AAN 的早期标志物, 国内外未见报道。本实验探讨 AA 对 L-FABP 的影响及 L-FABP 的早期预警作用, 希冀对其治疗方法提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠, $(300 \pm 20) \text{ g}$, 雄性, 由上海中医药大学动物实验中心提供, 合格证号 SCXK (沪) 2008-0016, 清洁级, 在 $23 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温, 12 h/12 h 光照周期条件下饲养, 自由摄食饮水。

1.2 药物及试剂 马兜铃酸 A (AA) 购自天津马克生物技术有限公司, 纯度 98.84%, AA 溶液用 Krebs 液配制, $7 \text{ mg} \cdot (50 \text{ mL})^{-1}$ 。大鼠肝脂肪酸结合蛋白 ELISA 试剂盒为 R&B 公司, 其他为国产分析纯。

1.3 灌流液组成 Krebs 液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl 118; KCl 4.7; CaCl_2 2.5, MgSO_4 1.2; KH_2PO_4 1.2; NaHCO_3 25; Glucose 11.1) 为灌流液, 配制后 $0.45 \mu\text{m}$ 孔径滤膜过滤, 调 pH 至 7.4。使用前 1 h 置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 并持续充入 95% O_2 + 5% CO_2 的混合气。

1.4 实验装置和主要仪器 ALC-M 离体肾脏灌流装置 (上海奥尔科特生物科技有限公司); ALC-B6 恒流泵 (上海奥尔科特生物科技有限公司), RM6280

多道生物信号采集处理系统(成都仪器厂),XD683 全自动电解质分析仪(上海迅还医疗仪器公司),XD683 自动进样器(上海迅还医疗仪器公司),2-16K 冷冻离心机(Sigma 公司),Thermo MK3 酶标仪(热电上海仪器有限公司);AR2130 电子天平(奥豪斯国际贸易上海有限公司)。

2 方法

2.1 离体大鼠肾脏灌流模型制备 Wistar 大鼠 6 只,雄性,(300 ± 20)g,随机分为空白组和 AA 组,每组 3 只。戊巴比妥钠 ip 麻醉后,充分暴露腹腔,钝性分离左肾动脉,左肾静脉,左肾输尿管。Krebs 液置于 37 °C 恒温灌流体系中,并持续通入 95% O₂ + 5% CO₂ 的混合气,以灌流液 5 mL·min⁻¹ 恒速予肾动脉插管,再行肾静脉和输尿管插管,末端游离。手术时间控制在 20 min 以内。实验全程用生物信号采集处理系统监测压力,选择灌注压稳定于 130 mmHg ~ 140 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa)的动物,在体灌流平衡 10 min 后分离左肾,置于肾脏恒温浴槽中,再平衡 20 min 进行实验。

2.2 实验过程及样品收集 从肾动脉端用静脉注射泵以 5 mL·min⁻¹ 恒速推注给予 AA 溶液,给药体积 50 mL,空白对照组相应予正常灌流液,持续灌流 10 min。在给药前,给药后即刻,0.5,1 h,分别从静脉流出端和尿管收集灌流液和尿液并记录收集时间,分析天平称质量计算尿液净重,以比重为 1 计算尿量。

2.3 样品处理 样品即刻用全自动电解质分析仪检测 K,Na,Cl 离子浓度。按下列公式进行计算:

尿流率 = 尿量 / 收集时间

钾清除率 = (尿钾 × 尿流率 / 血钾) × 100%

钠清除率 = (尿钠 × 尿流率 / 血钠) × 100%

氯清除率 = (尿氯 × 尿流率 / 血氯) × 100%

用 ELISA 方法检测尿液 L-FABP 浓度。

3 统计分析

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 for Windows 统计分析软件进行统计学处理,组间比较用 *t* 检验。*P* < 0.05 有统计学意义。

4 结果

4.1 AA 对大鼠离体肾灌流体系尿液 L-FABP 浓度影响 结果见表 1。给药即刻,给药后 0.5,1 h 尿液 L-FABP 浓度与空白组相比均明显升高,有显著统计学差异(*P* < 0.01)。各组自身比较,空白组给药前后差异不明显,AA 组与给药前相比,给药即刻,0.5,1 h 尿液 L-FABP 均有升高趋势,但无统计学差异。

4.2 AA 对大鼠离体肾灌流体系尿中 K,Na,Cl 离子浓度的影响 结果见表 1。灌流给药后 0.5 h AA 组钾清除率明显下降,与空白组相比有显著统计学意义。各组自身比较,空白组给药后 1 h 较给药前下降(*P* < 0.05),AA 组给药后 0.5,1 h 钾清除率均较给药前下降,且有统计学意义(*P* < 0.01)。灌流给药后 0.5 h,AA 组钠清除率明显下降,与空白组相比,有统计学意义(*P* < 0.05)。各组间自身比较,AA 组在给药后 0.5,1 h 钠清除率均较给药前明显下降(*P* < 0.01)。灌流给药后 0.5,1 h AA 组和空白组氯清除率均有下降趋势,但 2 组间,及分别与各组给药前相比,均无统计学差异。

表 1 AA 对大鼠离体肾灌流体系尿 L-FABP 和钾、钠、氯离子清除率的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

时间点	组别	L-FABP/ng·L ⁻¹	钾清除率/%	钠清除率/%	氯清除率/%
给药前	空白	6.98 ± 0.98	108.49 ± 22.55	27.38 ± 4.84	13.92 ± 2.80
	AA	7.42 ± 0.12	99.54 ± 14.55	27.93 ± 6.66	14.56 ± 3.76
给药即刻	空白	6.58 ± 0.61	114.17 ± 23.79	26.78 ± 6.18	12.55 ± 3.14
	AA	8.18 ± 0.47 ²⁾	94.64 ± 35.68	25.14 ± 11.04	9.84 ± 5.36
给药后 0.5 h	空白	6.35 ± 0.26	100.38 ± 18.38	24.34 ± 6.22	7.89 ± 1.09
	AA	8.13 ± 0.86 ²⁾	33.16 ± 9.59 ^{2,4)}	9.70 ± 2.62 ^{1,4)}	4.81 ± 1.42
给药后 1 h	空白	6.75 ± 0.32	65.56 ± 26.31 ³⁾	16.41 ± 6.58	5.61 ± 3.32
	AA	8.24 ± 0.25 ²⁾	35.52 ± 31.39 ⁴⁾	10.80 ± 9.71 ⁴⁾	5.36 ± 4.75

注:与空白组相比¹⁾*P* < 0.05,²⁾*P* < 0.01;各组与自身给药前相比³⁾*P* < 0.05,⁴⁾*P* < 0.01;AA 离体灌流马兜铃酸 7 mg·(50 mL)⁻¹,持续灌流 10 min。

5 讨论

肝型脂肪酸结合蛋白是一种与遗传有关的脂肪酸连接蛋白家族成员,又名 Z-蛋白、亚铁血红素结合蛋白,相对分子质量 14.4 × 10³,在肝脏、小肠、肾脏、

胰腺、胃中均有发现,因为有两个脂肪酸结合位点,因而其与游离脂肪酸的亲合力较其他类型的 FABP 高^[3],可以介导脂肪酸由胞质转运至多种细胞器,如线粒体、过氧化物酶体、内质网、细胞核和脂滴,促进

细胞内胆固醇及中性脂类的代谢,调节脂质代谢中相关蛋白的基因表达^[4]。在肾缺血、含铁血蛋白肾毒性、内毒素血症及尿路梗阻相关性肾损伤中,肾小管细胞内胆固醇、FFA及甘油三酯水平均显著升高,此现象被称为肾小管细胞的“应激反应”^[5]。L-FABP作为FFA的转运蛋白之一,可能作为一个有效的内源性抗氧化剂在肾小管缺氧/再氧化过程中起到一定的保护作用,还能作为反映肾损伤,尤其是肾近端小管损伤的早期标志物。

Kamijo^[6]等发现肾缺血后早期尿L-FABP水平与缺血时间、肾小管周围毛细血管血流量及住院时间密切相关,进一步实验发现,顺铂或缺血再灌注诱发的AKI中,以及尿路梗阻性肾损伤中都提示了尿L-FABP可能作为AKI小管损伤,尤其是近端小管损伤的早期敏感的生物标志物^[7],而在糖尿病肾病早期,尿L-FABP可能是一个新的慢性小管间质缺血的标志物^[8]。由于L-FABP不仅表达在肾脏,还表达在肝脏,正常生理状态下,肝脏来源的L-FABP释放入血循环,经肾小球滤过,在近端小管细胞上megalin受体的介导下,被重吸收入肾小管^[9]。故而在急性肾损伤时,血清L-FABP的水平受肝细胞状态影响,在评估肾损伤时,血清L-FABP并不具备肾脏的特异性。有研究比较肝病患者、慢性肾病患者及正常人群的血清L-FABP和尿脂肪酸结合蛋白(urine liver fatty acid binding protein, uL-FABP)水平,发现肝病患者和慢性肾病患者血清L-FABP水平均明显升高,但前者uL-FABP水平与正常人群相似,后者则明显高于正常人群^[10],说明uL-FABP具有更高的特异性和敏感性,而不受血清L-FABP的影响,可能作为急性肾损伤早期检测的生物标志物。

马兜铃酸肾病的发病机制主要有肾小管坏死,肾间质纤维化,以及AA-DNA加合物的形成等。脂质代谢在AAN形成中的作用尚未可知。本实验显示,在离体肾灌注体系中,AA影响了肾小管的离子转运功能,在给药后0.5h开始,Na,K,Cl离子清除率下降,引起离子的肾内滞留。而L-FABP在给药即刻尿中的浓度即明显升高,在反映AA诱导的肾小管损伤时,uL-FABP较离子清除率更敏感,变化时间也更早。空白对照组和AA组在给药0.5h,1h时,离子清除率均明显下降,灌注因素与药物因素差

异不明显,而uL-FABP在空白对照组排泄相对稳定,AA组则继续升高,较其他离子清除率等肾小管损伤指标,更能特异地反映肾毒性药物的损伤特点。综上所述,uL-FABP在大鼠离体肾灌注体系马兜铃酸肾损伤中能更好的监测肾小管功能,优于传统的离子清除率。但脂质积聚与AAN的关系,以及是否可从调节脂质代谢的方面进行AAN的治疗,尚需进一步的深入研究。

[参考文献]

- [1] 马红梅,张伯礼. 关木通肾毒性研究[M]. 北京:化学工业出版社,2005,50.
- [2] 杨莉,李晓玫,王海燕. 关木通与抗生素致急性肾小管坏死细胞生物学特征的比较研究[J]. 中国中西医结合杂志,2003,23(5):329.
- [3] Richieri G V, Ogata R T, Kleinfeld A M. Equilibrium constants for the binding of fatty acids with fatty acid-binding proteins from adipocyte, intestine, heart, and liver measured with the fluorescent probe ADIFAB[J]. J Biol Chem, 1994, 269(39): 23918.
- [4] Duplus E, Glorian M, Forest C. Fatty acid regulation of gene transcription [J]. J Biol Chem, 2000, 275(40):30749.
- [5] Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Kimura K. Urinary fatty acid binding protein in renal disease [J]. Clin Chim Acta, 2006, 374(1/2):1.
- [6] Zager R A, Johnson A C, Hanson S Y. Renal tubular triglyceride accumulation following endotoxic, toxic, and ischemic injury[J]. Kidney Int, 2005, 67(1):111.
- [7] Negishi K, Noiri E, Doi K, et al. Monitoring of urinary L-type fatty acid-binding protein predicts histological severity of acute kidney injury[J]. Am J Pathol, 2009, 174(4):1154.
- [8] Von Eynatten M, Baumann M, Heemann U. Urinary L-FABP and anaemia: distinct roles of urinary markers in type-2 diabetes[J]. Eur J Clin Invest, 2010, 40(2):95.
- [9] Oyama Y, Takeda T, Hama H, et al. Evidence for megalin-mediated proximal tubular uptake of L-FABP, a carrier of potentially nephrotoxic molecules [J]. Lab Invest, 2005, 85(4):522.
- [10] Kamijo A, Sugaya T, Hikawa A, et al. Urinary liver-type fatty acid binding protein as a useful biomarker in chronic kidney disease[J]. Mol Cell Biochem, 2006, 284(1/2):175.

[责任编辑 聂淑琴]