

肾衰灵对 5/6 肾切除大鼠肾脏 TGF- β 1 mRNA 表达的影响

冯继伟*

(上海市浦东新区公利医院肾内科, 上海 200135)

[摘要] 目的: 观察肾衰灵对慢性肾衰(CRF)大鼠肾组织层粘连蛋白(LN)、III型胶原(C-III)及转化生长因子 β 1(TGF- β 1)mRNA 表达的影响。方法: 采用 5/6 肾切除法建立慢性肾衰肾小球硬化大鼠模型, 随机分为正常组、模型组、赖诺普利组、肾衰灵组, 8 周后测定各组大鼠肾组织 LN、C-III 及 TGF- β 1 mRNA 表达及肾脏病理变化。结果: 模型组大鼠肾组织 LN、C-III 及 TGF- β 1 mRNA 表达与正常组相比均明显增加($P < 0.05$), 肾衰灵、赖诺普利组明显低于模型组($P < 0.05$), 肾衰灵组明显低于赖诺普利组($P < 0.05$)。肾衰灵组肾脏病理变化明显减轻。结论: 肾衰灵对 5/6 肾切除大鼠肾脏有明显保护作用, 肾衰灵可显著降低大鼠肾组织 TGF- β 1 相对 mRNA 表达, 使 LN、C-III 型胶原的合成减少, 减轻肾组织中细胞外基质的沉积和肾小球的硬化, 从而达到延缓肾功能衰竭的目的。

[关键词] 肾衰灵; 慢性肾衰; 层粘连蛋白; III型胶原; 转化生长因子 β 1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)08-0083-03

肾小球硬化(GS)是各种慢性肾脏疾病的最终结局, 是慢性肾衰竭的主要病理基础之一, 其特征是: 肾小球内细胞外基质(ECM)合成增多, 降解减少, 导致过多的 ECM 积聚。细胞外基质成分包括各型胶原、非胶原糖蛋白(纤维连接蛋白、层粘连蛋白)、弹性蛋白、蛋白多糖和氨基聚糖等。细胞因子通过作用于肾小球细胞表面的相应受体而发挥生物学效应, 它们在促进肾小球系膜细胞增殖、细胞外基质(ECM)积聚和在肾小球硬化进展中起重要作用。其中转化生长因子 β (TGF- β)是最重要的细胞因子。具有调节细胞生长、分化, 以及免疫抑制、免疫趋化等多种生物学功能, 参与机体许多生理和病理过程, 其中尤以在组织器官免疫和非免疫损伤后的纤维化形成过程中的作用最为引人注目^[1]。5/6 肾切除大鼠模型是研究肾小球硬化所致慢性肾衰的常用模型, 其病理改变在于早期出现肾脏代偿性肥大, 肾小球高灌注、高滤过和高压, 继而出现肾小球硬化和间质性损害。本研究采用大鼠 5/6 肾切除动物模型, 观察肾衰灵对 CRF 大鼠肾组织层粘连蛋白(LN)、III型胶原(C-III)及转化生长因子 β 1(TGF- β 1)相对

mRNA 表达的影响, 初步探讨其防治肾纤维化及慢性肾功能衰竭的效果。

1 材料

1.1 实验动物 清洁级雄性 Wistar 大鼠(200 \pm 15)g, 50 只, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 许可证号: SCXK(沪)2003-0003。饲养于上海中医药大学附属曙光医院实验动物中心(具有上海市实验动物管理委员会颁发的合格证书, 合格证号: 动字第 02-63)。清洁级饲养, 人工光照, 明暗各 12 h, 45% 左右相对湿度的普通设施中, 自由饮食, 饲料由上海必凯公司提供。适应性饲养 1 周。

1.2 实验药物 肾衰灵组成: 黄芪 30 g, 党参 15 g, 白术 15 g, 茯苓 15 g, 熟地 15 g, 淫羊藿 15 g, 半夏 9 g, 黄连 6 g, 制大黄 9 g, 桃仁 10 g, 当归 15 g, 积雪草 30 g。赖诺普利(上海五洲药业股份有限公司, 规格 10 mg, 批号: 060304)。

1.3 仪器及试剂 层粘连蛋白(LN)、III型胶原(C-III)试剂盒、免疫组化之一抗和二抗等(武汉博士德公司)。肾组织转化生长因子 β 1(TGF- β 1)mRNA 试剂盒、DEPC、Trizol、M-MuLV、Taq 酶、dNTP、Real-time 检测仪(7300Sequence Detection System), ABI-7300, ABI(美国 Invitrogen 公司), 探针和引物(广州达辉公司合成)

2 方法

2.1 造模及分组 造模组应用 Platt 法切除大鼠 5/6

[收稿日期] 2009-06-01

[基金项目] 上海市浦东新区科技项目(项目编号 PW2006A14)

[通讯作者] * 冯继伟, Tel: 13023208654; E-mail: fengjiwei11@

163.com

肾组织制作 CRF 模型。2% 戊巴比妥钠按 40 mg/kg 剂量腹腔注射麻醉。大鼠左肾切除 2/3, 术后 10 d 行右肾全切除。两次手术共切除肾脏约 80%。随机分为模型组 10 只、肾衰宁组 10 只、赖诺普利组 10 只, 并使治疗前各组间肌酐值无统计学差异 ($P > 0.05$), 另设正常组 10 只。

2.2 给药方法 治疗药物根据人鼠剂量换算约为人剂量的 20 倍, 治疗组用中药肾衰灵方 $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。阳性药对照组用赖诺普利 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 正常组和模型组予等量蒸馏水灌胃, 各组大鼠每天灌胃 1 次, 每次 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 连续 8 周。

2.3 取材 治疗结束后各组大鼠首先分别置代谢笼内留取 24 h 尿液, 末次给药后禁食 12 h, 摘眼球采血, 分离血清后待测。

2.4 检测指标与检测方法

2.4.1 肾组织层粘连蛋白(LN)、II型胶原(C-III)免疫组化法。(上海中医药大学实验中心检测)。

2.4.2 肾组织转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 相对 mRNA 采用 RT-PCR 法。

PCR 试验所需试剂盒组成 ($5 \times$ 逆转录 buffer, dNTPs, MMLV, DEPC 处理水, $5 \times$ 定量 PCR buffer, Taq 酶, ddH₂O, 上游引物 F, 下游引物 R, TaqMan probe)。数据采用仪器自带软件分析: ABI Prism 7300 SDS Software。(上海中医药大学实验中心检测)。每个样品的靶基因的相对 mRNA 表达水平可以用以下公式计算: 相对 mRNA 表达 = $2^{-\Delta Ct} \times 100\%$, ΔCt 值 = 靶基因 Ct 值 - GAPDH 的 Ct 值。本次实验每组 3 个样品。

2.4.3 肾组织病理 用光镜(HE 染色, PAS 染色)。

2.5 统计学处理

所有数据均用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS11.0 软件进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 肾衰灵对 CRF 大鼠 LN, C-III 阳性面积的影响 结果见表 1。

表 1 对 CRF 大鼠 肾脏 LN, C-III 阳性面积的影响 ($\mu\text{m}^2, \bar{x} \pm s$)

分组	剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	n	LN	C-III
正常组	—	10	11 674 \pm 6 145 ²⁾	7 572 \pm 2 950 ²⁾
模型组	—	9	30 356 \pm 3 966	22 930 \pm 2 482
肾衰灵组	30	10	16 474 \pm 1 883 ^{2,3)}	10 574 \pm 2 196 ^{2,3)}
赖诺普利组	0.02	9	17 432 \pm 1 817 ¹⁾	13 398 \pm 2 549 ²⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与赖诺普利组比较, ³⁾ $P < 0.05$ (下同)

3.2 肾衰灵对 CRF 大鼠 TGF- β_1 相对 mRNA 的影响 结果见表 2。

表 2 对 CRF 大鼠肾脏 TGF- β_1 相对 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分组	剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	n	TGF- β_1
正常组	—	10	0.85 \pm 1.44 ¹⁾
模型组	—	9	2.11 \pm 1.76
肾衰灵组	30	10	0.04 \pm 0.03 ^{1,3)}
赖诺普利组	0.02	9	0.81 \pm 1.15 ¹⁾

3.3 肾衰灵方对大鼠肾组织一般形态学变化的影响 见图 1~4。

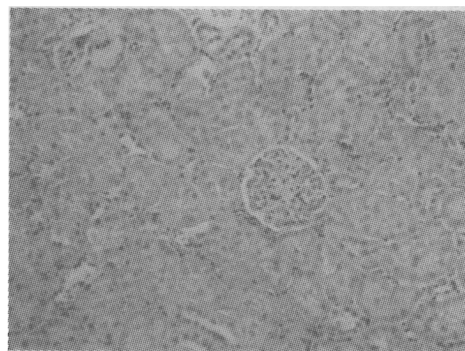


图 1 正常组 HE 染色 ($\times 100$)

肾小球结构正常, 肾小球包曼氏囊腔清晰, 基底膜厚度正常, 毛细血管襻开放; 肾曲管结构清楚

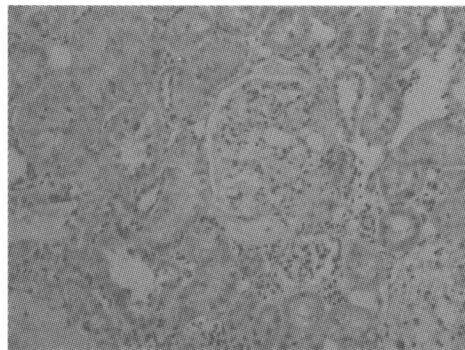


图 2 模型组 HE 染色 ($\times 100$)

肾小球毛细血管襻增厚, 球囊塌陷, 囊腔消失, 异常细胞浸入增生, 系膜细胞局部增生, 基底膜增厚, 肾小球囊壁层增厚, 偶见肾小球毛细血管襻减少、萎缩, 肾曲管扩张, 管腔内大量蛋白管型

正常组 HE 染色肾小球结构正常, 肾小球包曼氏囊腔清晰, 基底膜厚度正常, 毛细血管襻开放; 肾曲管结构清楚。PAS 染色肾小球毛细血管襻结构正常, 基底膜呈线状无增厚。模型组 HE 染色肾小球毛细血管襻增厚, 球囊塌陷, 囊腔消失, 系膜细胞局部增生, 基底膜增厚, 肾小球囊壁层增厚, 偶见肾小球毛细血管襻减少、萎缩, 肾曲管扩张, 管腔内大量蛋白管型。PAS 染色肾小球囊壁层基底膜增厚, 肾

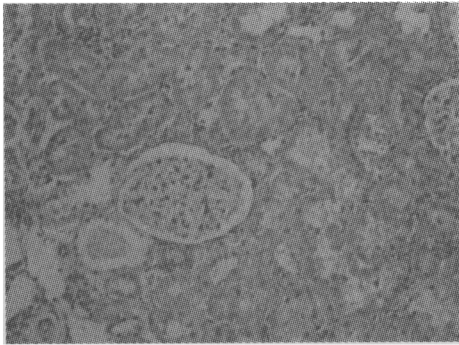


图 3 肾衰灵组 HE 染色 (×100)

肾小球病变轻微,包曼氏囊存在,局部毛细血管襻壁轻度增厚,局灶见有系膜细胞增生

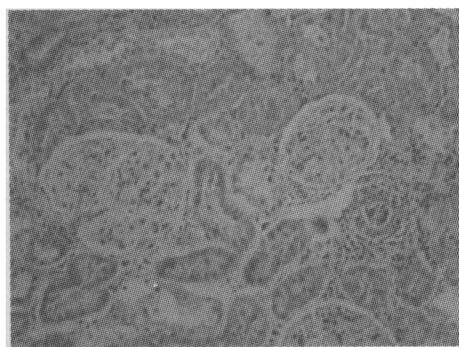


图 4 赖诺普利组 HE 染色 (×100)

肾小球包曼氏囊壁增厚,囊腔变小,异常细胞增生,毛细血管壁普遍增厚,可见肾小球部分硬化,间质有散在淋巴细胞浸润,部分肾曲管扩张,内有少量蛋白管型

小球基底膜血管襻明显增厚且与包曼氏囊壁粘连,肾小管管腔见有大量蛋白管型。肾衰灵组 HE 染色肾小球病变轻微,包曼氏囊存在,局部毛细血管襻壁轻度增厚,局灶见有系膜细胞增生。PAS 染色局部毛细血管襻壁轻度增厚,偶见肾小管管腔内有少量蛋白管型。赖诺普利组 HE 染色肾小球包曼氏囊壁增厚,囊腔变小,异常细胞增生,毛细血管壁普遍增厚,可见肾小球部分硬化,间质有散在淋巴细胞浸润,部分肾曲管扩张,内有少量蛋白管型。PAS 染色毛细血管襻壁轻度增厚,肾曲管内有蛋白管型,系膜增生,肾血管球硬化表现。

4 讨论

肾小球硬化是绝大多数肾小球疾病进展至后期的一种共同的组织学改变,而细胞外基质(ECM)的显著增生是肾小球硬化的重要标记,而 LN, FN, C-IV 是组成 ECM 的重要成分。LN 是近年发现的一种重要结构的糖蛋白,主要分布于 GBM 的透明层中,与 IV 型胶原共同维持 GBM 的网状结构。在 CRF 时,随着肾小球纤维化的进展,C-IV, LN 的血清含量均异

常增高^[2,3]。II 型胶原(C-III)是一种间质胶原,它主要分布于肾小球与肾小囊壁粘连处及间质中,随着 CRF 进展,间质胶原(如 I、II 型胶原等)在间质中积聚增多,间质纤维化逐渐加重;而且在肾小球病变后期,肾小囊壁损伤、断裂后,间质中的炎症细胞、间质胶原进入球囊腔内,导致纤维化新月体形成,和/或促进肾小球硬化^[4]。由于 LN, FN, C-III, C-IV 在肾组织内的过多积聚,导致肾小球硬化和间质纤维化,进而表现为肾功能的恶化。实验结果表明,模型组大鼠肾组织 LN, C-III 阳性面积表达,与正常组相比均明显增加($P < 0.05$),肾衰灵、赖诺普利组明显低于模型组($P < 0.05$),肾衰灵组明显低于赖诺普利组($P < 0.05$)。

TGF- β 是一个多功能细胞因子,具有调节细胞增殖、细胞分化以及细胞凋亡等功能。然而,TGF- β 最重要的生物学功能是调节 ECM 积聚。ECM 积聚是肾小球硬化的病理基础。TGF- β 已被公认是肾小球硬化治疗的靶标。实验结果表明,模型组大鼠肾组织 TGF- β 1 相对 mRNA 表达,与正常组相比均明显增加($P < 0.05$),肾衰灵、赖诺普利组明显低于模型组($P < 0.05$),肾衰灵组明显低于赖诺普利组($P < 0.05$)。

肾衰灵对 5/6 肾切除大鼠肾脏有明显保护作用,可显著降低大鼠肾组织 TGF- β 1 相对 mRNA 表达,使 LN、C-II 型胶原的合成减少,减轻肾组织中细胞外基质的沉积和肾小球的硬化,进而达到延缓肾功能衰竭的目的。

[参考文献]

- [1] Border WA, Noble NA, Ketteler M. TGF- β : a cytokine mediator of glomerulosclerosis and a target for therapeutic intervention[J]. *Kidney Int*, 1995, 47(Suppl 49): 59-61.
- [2] Border WA, Okuds S, Nakamura T, et al. Extracellular matrix and glomerular disease[J]. *Semin Nephrol*, 1989, 9(4): 307-317.
- [3] Rohde H, Vargas L, Hahn E, et al. Radio immunoassay for type IV procollagen peptide and its application to human renal disease[J]. *Eur J Clin Invest* 1979, 9(6): 451-459.
- [4] 周春华. 免疫电镜技术研究肾小球硬化过程中细胞外基质的变化[J]. *中华肾脏病杂志*, 1995, 11(增刊): 21-23.