

· 短篇论著 ·

抗纤灵对5/6肾切除大鼠肾组织 α -SMA和I型胶原的影响

王东 王云满 彭文 何立群

【摘要】 目的 采用5/6肾切除方法建立慢性肾衰竭动物模型,观察抗纤灵对5/6肾切除大鼠肾组织 α -SMA和I型胶原的影响。**方法** 将SD大鼠随机分为假手术组和造模组,造模组以5/6肾切除方法建立慢性肾衰竭动物模型,1周后按血肌酐水平将造模大鼠分为模型组、福辛普利组和抗纤灵组。福辛普利组给予 $3.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 福辛普利灌胃,抗纤灵组给予 $23 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 抗纤灵灌胃,模型组和假手术组给予等量生理盐水灌胃,8周后采用免疫组化、实时荧光定量PCR(RT-PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)测定各组大鼠肾组织 α -SMA和I型胶原基因和蛋白的表达。**结果** 模型组大鼠肾组织中肾小管及间质区I型胶原及 α -SMA表达较假手术组明显升高($P < 0.01$),抗纤灵组与模型组比较均明显下降($P < 0.01$);模型组大鼠表达 α -SMA mRNA和I型胶原 mRNA水平较假手术组明显升高($P < 0.001$),抗纤灵组与模型组比较均明显下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);模型组大鼠表达 α -SMA和I型胶原蛋白水平较假手术组明显升高($P < 0.001$),抗纤灵组与模型组比较均显著下降($P < 0.001$)。**结论** 抗纤灵可降低肾间质成纤维细胞 α -SMA的表达,减少肌成纤维细胞的活化与形成,继而使细胞外基质I型胶原生成减少,从而延缓慢性肾衰竭大鼠肾纤维化进程,保护残肾功能。

【关键词】 肌动蛋白类; 胶原I型; 肾功能衰竭,慢性; 抗纤灵

慢性肾功能衰竭(chronic renal failure, CRF)是指各种原发或继发性慢性肾脏疾病(chronic kidney disease, CKD)患者进行性肾功能损害所出现的一系列症状或代谢紊乱的临床综合征。在引起CRF的原发性肾脏病中,原发性肾小球肾炎占46.87%,糖尿病肾病占16.99%,高血压肾小动脉硬化占16.95%,其他占19.19%。肾纤维化是各种原因引起的CKD进展到CRF的共同途径和主要病理基础。肾纤维化包括肾小球硬化和肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)^[1]。大量研究表明RIF较肾小球病变在CKD进展中的意义更加重要^[2]。但无论肾间质,还是肾小管、肾小球,它们在纤维化过程中都涉及炎症因子、生长因子和黏附分子等多种活性物质诱导肾间质成纤维细胞、肾小管上皮细胞或肾小球系膜细胞等肾脏固有细胞发生表型转化,使之转化为 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)阳性的肌成纤维细胞(myofibroblast, MyoF)^[3]。MyoF具有很强的增殖能力,可合成I型胶原(collagen I),分泌大量细胞外基质(extracellular matrix, ECM),并抑制ECM降解,使ECM过度积聚,在肾纤维化的发展中有重要的作用^[4]。本文通过采用5/6肾切除建立CRF大鼠模型,观察抗纤灵对5/6肾切除大鼠肾组织 α -SMA和I型胶原的作用,探讨其可能的作用机制。

一、材料与与方法

1. 实验动物:健康SPF级雄性SD大鼠40只,体重(200±20)g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,许可证号:

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.23.056

基金项目:国家科技重大专项(2009ZX09311-003);国家自然科学基金项目(81173219);科技部中医药行业科研专项(201007005);高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20093107110006);上海市科委创新行动计划项目(11DZ1973100);上海市教育委员会E-研究院建设计划资助项目(E03008);上海高校创新团队建设项目

作者单位:200021 上海中医药大学附属曙光医院肾内科(王东、何立群);上海中医药大学附属普陀医院肾内科(王云满、彭文);上海市中医临床重点实验室(何立群);上海市高校中医内科E-研究院(何立群)

通讯作者:何立群,Email:Heliquan59@yahoo.com.cn

SCXK(沪)2008-0016。实验期间自由饮水,摄食饲料由上海中医药大学动物实验中心提供,适应性喂养1周后进行实验。室温20~24℃,相对湿度45%。

2. 实验药物与试剂:抗纤灵(组成:丹参30g,制大黄15g,桃仁15g,全当归15g,牛膝15g)由上海中医药大学附属曙光医院制剂室提供。福辛普利(商品名:蒙诺,10mg/片)由中美上海施贵宝制药有限公司生产。

兔抗大鼠I型胶原抗体,兔抗大鼠 α -SMA抗体,羊抗兔二抗,均购自Abcam公司; β -actin,购自Santa Cruz公司;ECL显影液,购自Millipore公司;胶片购自柯达公司;Trizol法总RNA抽提试剂盒,cDNA第一链合成试剂盒、荧光定量PCR试剂盒,均由BioTNT公司提供。

3. 模型建立:大鼠以2%戊巴比妥钠按40mg/kg剂量腹腔注射麻醉,备皮,用75%酒精消毒手术区后铺巾,距左脊肋骨1.5cm处斜向外方切口,经后腹膜取肾,暴露肾脏,分离肾周脂肪及包膜后,弧形切除2/3肾组织(主要切除皮质部分)约0.6g,用明胶海绵压迫止血片刻,再滴加数滴纤维蛋白原和凝血酶溶液,稍等片刻,当切面上不再有活动性出血后复位剩余左肾,缝合;1周后再次手术切除整个右肾。2次手术共切除肾脏约80%。

另取正常SD大鼠10只,仅作背部切口,分两次剥离左右肾包膜,保留肾上腺,作为假手术组。

4. 分组方法:大鼠进入实验室适应性饲养1周后,随机取10只为假手术组,其余30只为造模组,将造模组大鼠按上述方法制作CRF动物模型,术后1周内内眦采血,测定肾功能,根据血肌酐(Scr)随机分组,每组10只,分组如下:模型组、福辛普利组、抗纤灵组。

5. 给药方法与疗程:抗纤灵制成每ml含3.2g生药的水煎剂,用量按临床成人每kg体重用量的20倍折算,即按 $23 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给大鼠灌胃,连续8周。

福辛普利制成每ml含0.5mg药物的水溶液,用量按临床成人每kg体重用量的20倍折算,即按 $3.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给大鼠

灌胃,连续8周。

假手术组和模型组给予同体积生理盐水灌胃,连续8周。

6. 取材:治疗8周后处死大鼠,取出肾组织,于液氮中速冻后,置-80℃冰箱保存待测。

7. 检测指标与检测方法:采用免疫组化法(SP两步法)测定 α -SMA和I型胶原的表达,步骤如下:烤片,68℃,20min;常规二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,二甲苯I 20min,二甲苯II 20min,无水酒精I 10min,无水酒精II 10min,95%酒精2min,90%酒精2min,85%酒精2min,80%酒精2min,75%酒精2min,70%酒精2min。自来水洗三次,每次2min,放入3%过氧化氢中灭活内源性消化酶,37℃孵育10min,PBS冲洗5min×3次;置0.01mmol/L枸橼酸缓冲液(pH 6.0)中煮沸(95℃ 15min),自然冷却20min以上,PBS冲洗5min×3次。正常羊血清工作液封闭,37℃孵育10min,弃去,勿洗;滴加一抗4℃冰箱孵育过夜,PBS冲洗5min×3次(用PBS缓冲液代替一抗作阴性对照),滴加生物素标记二抗,37℃孵育30min,PBS冲洗5min×3次。滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液,37℃孵育30min,PBS冲洗5min×3次。DAB反应染色,自来水充分冲洗后,苏木素进行复染,常规脱水,透明,干燥,封片。采用Image-Pro Plus 5.1图像分析系统计算,利用软件进行灰度值测量。

采用RT-PCR法测定 α -SMA mRNA和I型胶原mRNA的表达。按照Genbank数据库中公开发表的基因序列,采用Primer Express引物设计软件,分别设计了 α -SMA和I型胶原的引物。步骤如下:采用Trizol法总RNA抽提试剂盒提取细胞总RNA;提取出的mRNA进行逆转录,成为cDNA模板;以cDNA为模板,进行RT-PCR实验。引物序列:I型胶原:5'-CGTGGAAACCTGATGTATGCT-3'(上游引物),5'-ACTCCTATGACTTCTGCGTCTG-3'(下游引物),长度172bp; α -SMA:5'-CCGAGATCTCACCGACTACC-3'(上游引物),5'-TCCAGAGCGACATAGCACAG-3'(下游引物),长度120bp;内参(β -actin):5'-CCTCTATGCCAACACAGT-3'(上游引物),5'-AGCCACCAATCCACACAG-3'(下游引物),长度156bp。扩增条件:95℃变性5min,然后按下述条件循环40次,95℃变性5s,60℃退火30s。程序运行结束后,分析各基因的实时扩增曲线和溶解曲线。取Ct值(扩增动力曲线拐点),按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算待测目的基因相对表达量。

采用Western blot法测定 α -SMA和I型胶原蛋白的表达步骤如下:切取新鲜冻存肾组织,匀浆器充分研磨、匀浆,加入RIPA buffer蛋白裂解液,4℃,14 000 r/min,离心15min,提取肾组织细胞质蛋白,Bradford法测定蛋白浓度。在10%的聚丙烯酰胺(sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶上电泳,电压60V 30min,80V 90min。室温恒压100V转膜60min,分离蛋白,使之转移至PVDF膜上,用TBS缓冲液洗膜5min。5%脱脂奶粉封闭1h,按1:3000加入 α -SMA和I型胶原一抗,1:5000加内参 β -actin抗体,4℃摇床轻摇过夜。去一抗,TBST缓冲液洗3次,每次5min,再加入相应辣根过氧化物酶标记的第二抗体(1:10 000),室温孵育1h,TBST缓冲液洗3次,每次5min。ECL试剂显色并曝光成像,凝胶成像系统成像,用Bio Rad quantity one软件对条带进行半定量分析,I型胶原和 α -SMA蛋白质相对含量分别用其与 β -actin特异性条带的积分光密度之比表示。

8. 统计学处理:应用SPSS 16.0软件进行统计分析。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 免疫组化法检测各组大鼠肾组织I型胶原、 α -SMA蛋白的表达:模型组大鼠肾组织中肾小管及间质区I型胶原及 α -SMA水平明显高于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组相比,抗纤灵、福辛普利可显著降低大鼠的I型胶原、 α -SMA水平,差异有统计学意义($P < 0.01$);两治疗组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图1,2,表1。

2. RT-PCR法检测各组大鼠肾组织I型胶原mRNA、 α -SMA mRNA的表达:模型组的I型胶原mRNA、 α -SMA mRNA水平明显高于假手术组,差异有统计学意义($P < 0.001$)。与模型组相比,抗纤灵、福辛普利可显著降低大鼠的I型胶原mRNA、 α -SMA mRNA水平,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);两治疗组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

表1 各组大鼠肾组织I型胶原、 α -SMA蛋白的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	I型胶原	α -SMA
假手术组	10	1.24 ± 0.15	0.79 ± 0.13
模型组	10	18.56 ± 1.98 ^a	11.54 ± 1.34 ^a
福辛普利组	10	11.67 ± 1.25 ^b	6.82 ± 1.07 ^b
抗纤灵组	10	12.09 ± 1.19 ^b	6.34 ± 1.16 ^b

注:与假手术组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.01$

表2 各组大鼠肾组织I型胶原mRNA、 α -SMA mRNA的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	I型胶原mRNA	α -SMA mRNA
假手术组	10	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.16
模型组	10	9.23 ± 0.14 ^a	2.19 ± 0.20 ^a
福辛普利组	10	2.07 ± 0.10 ^b	1.37 ± 0.23 ^b
抗纤灵组	10	1.96 ± 0.07 ^b	1.56 ± 0.16 ^c

注:与假手术组比较,^a $P < 0.001$;与模型组比较,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.05$

3. Western blot法检测各组大鼠肾组织I型胶原、 α -SMA蛋白的表达:模型组的I型胶原、 α -SMA蛋白水平明显高于假手术组,有统计学意义($P < 0.001$)。与模型组相比,抗纤灵组、福辛普利组可显著降低大鼠的I型胶原、 α -SMA蛋白水平,有统计学意义($P < 0.001$);两治疗组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图3,表3。

表3 各组大鼠肾组织I型胶原、 α -SMA蛋白表达半定量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	I型胶原	α -SMA
假手术组	10	1.57 ± 0.01	1.05 ± 0.07
模型组	10	7.97 ± 0.05 ^a	2.50 ± 0.07 ^a
福辛普利组	10	2.21 ± 0.01 ^b	1.72 ± 0.06 ^b
抗纤灵组	10	2.22 ± 0.03 ^b	1.99 ± 0.01 ^b

注:与假手术组比较,^a $P < 0.001$;与模型组比较,^b $P < 0.001$

三、讨论

肾小球硬化和RIF是CRF的主要病理改变。及早延缓、阻止甚至逆转肾纤维化,对于防治终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)具有重大意义^[5]。目前尚无有效的治疗肾纤维化的

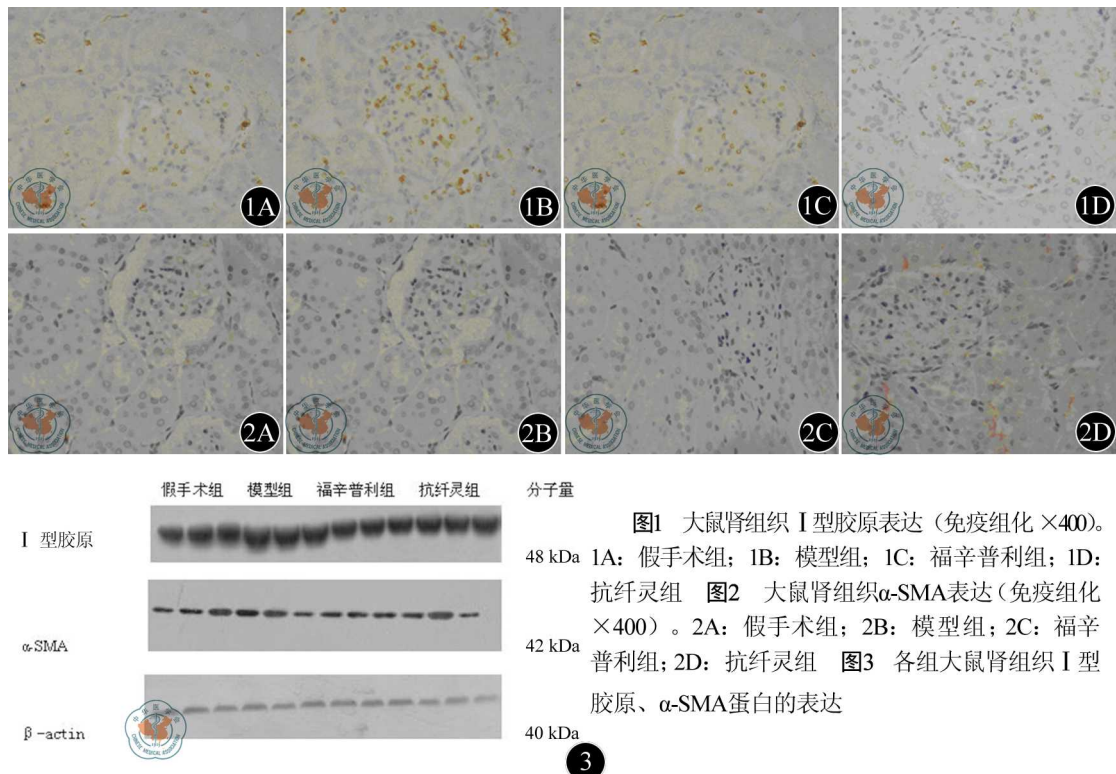


图1 大鼠肾组织 I 型胶原表达(免疫组化 ×400)。1A: 假手术组; 1B: 模型组; 1C: 福辛普利组; 1D: 抗纤灵组 图2 大鼠肾组织 α-SMA 表达(免疫组化 ×400)。2A: 假手术组; 2B: 模型组; 2C: 福辛普利组; 2D: 抗纤灵组 图3 各组大鼠肾组织 I 型胶原、α-SMA 蛋白的表达

3

方法,现代医学^[6-7]多采用血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)和血管紧张素 II 受体拮抗剂(ARB)类药物来拮抗肾纤维化、延缓肾功能进展,取得一定的疗效。因此,本研究采用 ACEI 类药物福辛普利为阳性对照组,探讨抗纤灵可能的抗肾纤维化机制。

研究表明,肾纤维化的形成不仅涉及系膜细胞的增殖、单核细胞的浸润以及成纤维细胞增殖等多种病变,而且还与 ECM (I、III、IV 型胶原等)的降解减少或积聚过多有关^[8-9]。系膜细胞、成纤维细胞和单核细胞等在各种细胞因子、炎症介质刺激下,可发生表型转化,产生能表达 α-SMA 的 MyoF,后者合成 ECM 的能力显著增强。在各种肾脏疾病中 α-SMA 表达增加,能促进肾纤维化的发展。它是成纤维细胞受损激活和表型转化的标志,同时作为 MyoF 的特异性标志蛋白,可能也是预测 RIF 进展的理想指标^[10]。肾小球硬化常常伴随着肾小管间质损伤,RIF 在某种程度上较肾小球病变更能预示肾脏的损伤和临床预后。MyoF 与 RIF 的发生关系最为密切,是 RIF 发生的重要效应细胞,而肾间质成纤维细胞向 MyoF 的表型转化是 MyoF 的主要来源之一。肾间质 MyoF 的变化在 CRF 中的作用不只是为了它的预后意义,同时也决定了治疗策略。测定肾间质 MyoF 数量和 α-SMA 的表达对于判断肾脏疾病的进展和预后,用于指导治疗是一个相对简便和有效的手段。

祖国医学没有“肾纤维化”一词,归属于中医“虚劳”、“关格”等范畴。钟建等^[11]认为正虚、浊毒、瘀血是导致和促进慢性肾纤维化的重要病理因素,提出“补益脾肾”、“祛湿化浊”、“活血化瘀”是改善 CRF 的重要大法。基于此,导师何立群教授根据多年的临床经验,创立以活血化瘀、扶正降浊为原则的抗纤灵,方中丹参、制大黄为主药,丹参益气活血,制大黄清热泄浊活血,辅以牛膝、全当归益肾补血活血,桃仁加强活血祛瘀之力,纵观全方,药味组成精简,对 CRF 临床疗效显著。前期临床试验证实^[12-13]抗纤灵能明显降低 CRF 患者的 Scr、BUN、血清层黏连蛋白(LN)、III 型前胶原(PC-III)、IV 型胶原(C-IV)水平,纠正钙磷

代谢紊乱,改善肾纤维化,延缓 CRF 的进程。动物实验^[14-17]表明抗纤灵方可以减少单侧输尿管结扎(UUO)模型大鼠的微量蛋白尿水平,改善脂代谢紊乱,有效缓解肾组织氧化应激反应,调节 TGF-β1/P38MAPK 信号转导通路,从而发挥拮抗 RIF 的作用。

本实验研究显示:模型组大鼠肾组织中肾小管及间质区 I 型胶原及 α-SMA 表达较假手术组明显升高($P < 0.01$),与模型组相比,抗纤灵组可明显降低大鼠的 I 型胶原、α-SMA 表达,与福辛普利对照组的作用无差别($P > 0.05$)。模型组的 I 型胶原 mRNA、α-SMA mRNA 水平明显高于假手术组($P < 0.001$),与模型组相比,抗纤灵组可显著降低大鼠的 I 型胶原 mRNA、α-SMA mRNA 水平($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与福辛普利对照组的作用无差别($P > 0.05$)。模型组的 I 型胶原、α-SMA 蛋白水平明显高于假手术组($P < 0.001$),与模型组相比,抗纤灵组可显著降低大鼠的 I 型胶原、α-SMA 蛋白水平($P < 0.001$);与福辛普利对照组的作用无差别($P > 0.05$)。表明抗纤灵可降低肾间质成纤维细胞 α-SMA 的表达,减少 MyoF 的活化与形成,继而使细胞外基质 I 型胶原生成减少,从而延缓 CRF 大鼠肾纤维化进程,保护残肾功能。

参 考 文 献

[1] 赵琳琳,解汝娟,隋满姝,等. 住院患者慢性肾衰竭的临床特征分析[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2011,5:7370-7373.
 [2] Negri AL. Prevention of progressive fibrosis in chronic renal diseases: antifibrotic agents. J Nephrol,2004,17:496-503.
 [3] Zhang C, Meng X, Zhu C, et al. Role of connective tissue growth factor in renal tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation and extracellular matrix accumulation in vitro. Life Sci,2004,75:367-379.
 [4] Yo koi H, Sugawara A, Mukoyama M, et al. Role of connective tissue growth factor in profibrotic action of transforming growth factor-beta: a potential target for preventing renal fibrosis. Am J Kidney Dis,2001,38:S134-138.
 [5] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data u-

- sing Real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods*, 2001, 25:402-408.
- [6] 周健淞,陈刚,沈液渠,等. 缬沙坦对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的影响. *第二军医大学学报*, 2010, 31:278-282.
- [7] 王丙增,张宏,张旭亚. 福辛普利对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的影响. *中国医学工程*, 2011, 19:30-32.
- [8] 李建民. 肾络瘀痹理论探讨. *中华中医药杂志*, 2004(12):8-10.
- [9] 周全荣,熊晶,李航. 肾纤维化与肾络瘀阻关系的研究现状. *上海中医药杂志*, 2005, 39:63-65.
- [10] Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15:1-12.
- [11] 钟建,史伟,吴金玉. 肾纤维化的中医机制及其干预靶点. *辽宁中医杂志*, 2010, 37:1695-1696.
- [12] 王怡,何立群,郑平东. 抗纤灵冲剂对慢性肾衰竭肾功能及纤维化指标影响的临床研究. *中国中西医结合肾病杂志*, 2002, 3:396-398.
- [13] 陈中萍,何立群. 抗纤灵对慢性肾功能衰竭骨代谢影响的临床研究. *上海中医药杂志*, 2006, 40:34-35.
- [14] 吴锋,沈丽萍,张新志,等. 抗纤灵冲剂对单侧输尿管梗阻及再通后大鼠尿微量蛋白的影响. *时珍国医国药*, 2010, 21:1038-1040.
- [15] 吴锋,张新志,黄迪,等. 动态观察抗纤灵冲剂对单侧输尿管梗阻及再通后大鼠血脂变化的影响. *中华中医药杂志*, 2011, 26:675-678.
- [16] 吴锋,何立群,张新志,等. 抗纤灵冲剂对单侧输尿管梗阻大鼠肾组织氧化应激反应的影响. *中国中西医结合肾病杂志*, 2009, 10:1042-1045.
- [17] 张新志,黄迪,吴锋,等. TGF- β 1/p38MAPK 通路对肾间质纤维化影响及抗纤灵冲剂干预机制的实验研究. *中华中医药杂志*, 2011, 26:245-248.

(收稿日期:2012-05-08)

(本文编辑:张志巍)

王东,王云满,彭文,等. 抗纤灵对5/6肾切除大鼠肾组织 α -SMA和I型胶原的影响[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2012, 6(23):7790-7793.

