

罗格列酮对单侧输尿管梗阻大鼠肾脏的抗氧化保护作用

林沁^{1*}, 顾勇², 林善铤²

(1. 南京军区福州总医院肾脏内科, 福州 350025; 2. 复旦大学附属华山医院肾脏内科, 上海 200040)

[摘要] **目的:**观察新型胰岛素增敏剂罗格列酮对单侧输尿管梗阻(UUO)的肾间质损伤的抗氧化保护作用。**方法:**将雄性SD大鼠随机分成三大组:假手术对照组(Sham组, $n=6$)、UUO模型组(结扎左侧输尿管制作UUO模型, $n=18$)、UUO罗格列酮干预组(UUO+RSG组, $n=18$)。除Sham组外,其余2组根据不同的观察时间细分为3、7、14 d亚组($n=6$)。分别测定大鼠左肾皮质匀浆中脂质过氧化物标志物MDA以及抗氧化酶CAT、SOD含量。**结果:**与Sham组相比,UUO模型组大鼠梗阻侧肾皮质在3、7、14 d时MDA含量分别升高了8.9($P=0.000$)、3.5($P=0.000$)和0.7倍,而CAT含量分别下降了66.0%、72.6%和83.8%($P=0.000$),SOD分别下降了42.0%、50.2%和67.7%($P<0.005$)。与UUO模型组相比,UUO+RSG组大鼠梗阻侧皮质MDA含量在3、7 d时分别减少了80.0%和65.3%($P=0.000$),14 d时差异不显著;在3、7、14 d时CAT分别增加了96.2%、92.1%和102.9%($P<0.005$),SOD分别增加了33.3%、35.1%和55.4%($P<0.005$)。**结论:**RSG能减少单侧输尿管梗阻侧肾皮质脂质过氧化物的产生,同时增加抗氧化酶的含量,从而改善单侧输尿管梗阻大鼠氧化应激。

[关键词] 罗格列酮;输尿管梗阻;氧化应激;丙二醛;过氧化氢酶;超氧化物歧化酶

[中图分类号] R 977.15; R 693.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)02-0192-04

Antioxidative effects of rosiglitazone on rat kidney with unilateral ureteral obstruction

LIN Qin^{1*}, GU Yong², LIN Shan-yan² (1. Department of Nephrology, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350025, China; 2. Department of Nephrology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the antioxidative effect of rosiglitazone(RSG), a new insulin sensitizer, on kidney of rats with unilateral ureteral obstruction (UUO). **Methods:** Male adult Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups: Sham-operated group ($n=6$), UUO model group (UUO model was established by ligating the left ureter, $n=18$), and UUO+RSG group (UUO model rats were treated with RSG, $n=18$). The latter 2 groups were divided into subgroups according to the times (3 d, 7 d and 14 d) after intervention ($n=6$). Malondialdehyde (MDA), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) contents in the homogenized lysate of obstructive renal cortex were determined. **Results:** Compared with those in Sham-operated group, MDA contents in UUO group increased by 8.9 ($P=0.000$), 3.5 ($P=0.000$) and 0.7 times on d 3, d 7 and d 14, respectively, while the contents of CAT and SOD decreased dramatically, with CAT contents reduced by 66.0%, 72.6% and 83.8%, respectively ($P=0.000$) and SOD contents reduced by 42.0%, 50.2% and 67.7%, respectively ($P<0.005$). Compared with those in UUO model group, MDA contents in UUO+RSG group decreased by 80.0% and 65.3% on d 3 and d 7 ($P=0.000$), respectively; no significant difference was found between the 2 contents on d 14; CAT contents were increased by 96.2%, 92.1% and 102.9%, respectively ($P<0.005$) and SOD content were increased by 33.3%, 35.1% and 55.4% ($P<0.005$), respectively. **Conclusion:** Rosiglitazone can suppress oxidative stress in rats with UUO by reducing lipid peroxidation production and improving antioxidative enzyme contents.

[KEY WORDS] rosiglitazone; unilateral ureteral obstruction; oxidative stress; malondialdehyde; catalase; superoxide dismutase

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(2): 192-195]

氧化应激在多种肾脏损害的发病机制中均起重要作用。以往的许多实验证实,单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)模型存在氧化应激。作为细胞信号因子,氧自由基介导和放大了UUO所致的炎症损伤、刺激了成纤维细胞的增生,导致了肾间质纤维化^[1]。罗格列酮(rosiglitazone, RSG)是噻唑烷二酮类(thiazolidinediones, TZDs)的口服胰岛素增敏剂^[2],它除了能增加细胞对胰岛素敏感性,改善胰岛素抵抗外,还有抗炎性和抗脏器纤维化等非代谢性调节作用^[3]。近来有零星

的研究报道 TZDs 类药物具有抗氧化应激作用,有研究显示,罗格列酮能保护心血管、肠道和肾脏缺

[基金项目] 国家自然科学基金(30200125);霍英东基金(81038);上海市卫生局科委基金(03JC14084)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30200125), Huoyingdong Foundation (81038) and Fund of Science Committee of Health Department of Shanghai Municipal Government(03JC14084)。

[作者简介] 林沁,博士,副主任医师。

* Corresponding author. E-mail: lqin69@hotmail.com

血-再灌注损伤^[4~6],但对于其在UUO中对氧化应激的影响目前国内外均无报道,本文对此方面进行了实验观察。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂 健康雄性SD清洁级大鼠42只,8周龄,体质量180~200 g,由复旦大学医学院实验动物中心提供。饲养环境为每笼4只,温度(22±2)℃,相对湿度(55±2)%。丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒及蛋白定量试剂盒(双缩脲法)购自南京建成生物公司。

1.2 实验模型制作 大鼠以10%水合氯醛(0.03 ml/kg)腹腔注射麻醉后,右侧卧位固定于手术台上,剪毛后用碘乙醇溶液、75%乙醇消毒手术区,行左侧腹旁正中切口,逐层切开皮肤、肌肉及腹壁各层,暴露并分离左侧输尿管,用5-0丝线结扎两道,上一道结扎点位于左肾下极水平,然后在两道结扎点间剪断输尿管,逐层缝合,制作UUO模型。

1.3 分组及给药方法 将大鼠随机分成三大组:(1)假手术对照组(Sham)6只,仅开腹并游离左侧输尿管,但不从中结扎和剪断,术后14 d处死;(2)UUO模型组18只;(3)UUO罗格列酮干预组(UUO+RSG)18只。UUO模型组和UUO+RSG组根据不同的观察时间细分为3、7、14 d亚组,每亚组6只。RSG以0.75%灭菌的甲基纤维素配制,于UUO术前48 h开始以灌胃方式给药(30 mg·kg⁻¹·d⁻¹);UUO模型组给予等体积0.75%甲基纤维素灌胃,灌胃量不大于2 ml。在不同的观察时间点处死动物,留取左侧肾脏,分离肾皮质后置于-70℃冻存。

1.4 肾组织病理 肾组织经4%的多聚甲醛缓冲液固定,制成石蜡切片。常规3 μm切片,进行PAS和MASSON染色。光镜下观察PAS染色切片皮质肾间质炎细胞浸润程度和纤维化等病理学改变,双盲给予PAS染色下肾间质病变计分,标准为:0分(间质病变占间质总量<5%);1分(间质病变占间质总量5%~15%);2分(间质病变占间质总量15%~30%);3分(间质病变占间质总量30%~60%);4分(间质病变占间质总量>60%或有局灶性坏死)。每张切片在放大200倍情况下取10个不重叠的视野,分别对每个视野进行打分,平均分为该标本的间质病变计分。采用Moriyama等的方法^[7]对MASSON染色肾组织切片进行半定量分析,具体步骤如下:采用北航医学图像分析管理系统,在同

一条件下对每张标本选取15个不重复视野(40×),将呈现为绿色的纤维区域(去除肾小球和大血管)视作阳性目标,以阳性面积与统计场总面积的比值作为肾小管间质的纤维化指数。采用北航医学图像采集和分析系统软件对MASSON染色进行计算机辅助分析。

1.5 大鼠左肾皮质匀浆MDA、SOD、CAT测定 应用考马斯亮蓝法测定匀浆液蛋白质浓度,依照南京建成生物公司试剂盒提供的方法操作,测定大鼠左肾皮质匀浆液MDA、SOD、CAT含量。

1.6 统计学处理 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用SPSS 10.0软件进行统计学分析,采用单因素方差分析及SNK检验比较各组间差异。

2 结果

2.1 实验大鼠基础指标观察 每组大鼠一般情况好,体质量无显著差别。各组大鼠左侧肾盂及输尿管扩张,内为梗阻后的残余尿。UUO模型组与UUO+RSG组残余尿量无显著差异,各组动物血清生化指标正常,组间无显著差异。

2.2 大鼠左肾组织的病理学改变

2.2.1 PAS染色 与Sham组大鼠相比,UUO模型组14 d肾组织间质增宽,有较多的炎症细胞浸润,肾小管扩张,偶见肾小管腔内有中性粒细胞聚集,并可见肾小管上皮细胞萎缩、坏死、脱落。UUO+RSG组上述改变明显减轻。Sham、UUO模型、UUO+RSG三组肾间质病变计分分别为0、2.245 0±0.540 7、1.491 9±0.454 5,组间均有差异($P<0.05$)。

2.2.2 MASSON染色 Sham组切片可见肾小球基底膜和包膜处及肾小管基底膜有少量绿色着染,小管间几无空隙。UUO模型组14 d肾组织间质增宽且广泛着绿色,显示基质成分增加,纤维化程度明显。UUO+RSG组纤维化程度减轻。Sham、UUO、UUO+RSG三组肾间质纤维化指数分别为0.025±0.005、0.092±0.217、0.045±0.152,组间均有差异($P<0.05$)。

2.3 左侧肾脏皮质匀浆MDA含量测定 UUO模型组3 d时大鼠梗阻侧肾皮质MDA含量显著升高,比Sham组升高8.9倍($P=0.000$),提示UUO早期有大量反应氧代谢产物生成。随着UUO持续时间的延长,梗阻侧皮质MDA含量有所下降。UUO模型组7、14 d时MDA量分别较Sham组升高了3.5倍($P=0.000$)和0.7倍($P>0.05$)。UUO+RSG组3、7 d时梗阻侧肾皮质MDA含量与UUO模型

组相比分别减少了 80.0% 和 65.3% (两者 $P=0.000$)。见表 1。

表 1 大鼠梗阻侧肾脏皮质匀浆 MDA、CAT 和 SOD 含量

Tab 1 MDA, CAT and SOD contents in renal cortex homogenized lysate of rats with unilateral ureteral obstruction

($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	MDA (nmol/mg prot)	CAT (U/g Hb)	SOD (NU/mg prot)
Sham	0.27±0.19	233.20±37.89	104.06±16.64
UUO model			
3 d	2.66±1.14**	79.21±17.20**	60.32±14.84**
7 d	1.21±0.57**	64.00±19.08**	51.85±12.19**
14 d	0.47±0.10**	37.67±18.76**	33.57± 8.03**
UUO+RSG			
3 d	0.53±0.15**△	155.43±30.93**△△	80.38±13.10**△
7 d	0.42±0.15**△	122.96±53.08**△△	70.03±11.95**△
14 d	0.45±0.14**	76.44±27.83**△△	52.16± 3.63**△

* $P<0.01$ vs sham group; △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$ vs UUO model group

2.4 左侧肾脏皮质匀浆 CAT 含量测定 与 Sham 组相比, UUO 模型组梗阻侧皮质抗氧化酶 CAT 含量随 UUO 损伤时间延长而显著减少, UUO 3、7、14 d 时肾皮质 CAT 含量分别较假手术对照组下降 66.0%、72.6% 和 83.8% ($P=0.000$)。与 UUO 模型组相比, UUO+RSG 3、7、14 d 时肾皮质 CAT 含量分别增加了 96.2%、92.1% 和 102.9% ($P=0.000, P=0.002, P=0.000$)。见表 1。

2.5 左侧肾脏皮质匀浆 SOD 含量测定 与 Sham 组相比, UUO 模型组梗阻侧皮质抗氧化酶 SOD 的含量随 UUO 损伤时间延长而显著减少, 3、7、14 d 时肾皮质 SOD 的含量分别较 Sham 组下降 42.0%、50.2% 和 67.7% ($P=0.001, P=0.000, P=0.000$)。UUO+RSG 组 SOD 的含量显著增加, 3、7、14 d 时分别较 UUO 模型组增加 33.3%、35.1% 和 55.4% ($P=0.001, P=0.001, P=0.000$)。见表 1。

3 讨论

UUO 模型中由于输尿管结扎后张力应激所致的肾血浆流量的下降(肾组织缺血、缺氧), 巨噬细胞和肾小管上皮细胞受活化激发的炎症反应等, 均能产生大量的反应氧代谢产物(reactive oxygen species, ROS), 而是否导致组织及细胞氧化应激损伤不单单取决于 ROS 生成, 还取决于机体对 ROS 的中和和清除体系即抗氧化酶的含量。本实验中发现 UUO 肾皮质匀浆液中代表细胞膜受自由基损伤产生脂质过氧化物的标志物 MDA 明显升高, 以 UUO 3 d 时为最高, 随 UUO 时间延长有所降低, 说明在

UUO 早期有大量的 ROS 产生。这可能与 UUO 早期血流动力学改变所致的肾缺血和再灌注损伤^[8]以及炎症细胞活化产生“呼吸爆发”, 释放大量 ROS 有关^[1]。同时, 两种机体最主要的抗氧化酶 SOD 和 CAT 的含量在 UUO 3 d 即明显减少, 并随 UUO 时间延长而持续降低。而 RSG 干预在 UUO 早期即能显著减轻 UUO 时细胞受到的氧自由基攻击, 减少肾组织 MDA 含量, 并能使肾组织中因 UUO 损伤而减少的抗氧化酶 SOD 和 CAT 含量有所回升。

RSG 抗氧化的机制目前国外研究较少, 推测其可能机制之一是其抗炎作用。在 UUO 模型中肾间质炎性细胞浸润以及炎症后继发的间质纤维化是该模型的始动和核心事件。我们的研究发现, RSG 显著抑制了 UUO 大鼠间质单核巨噬细胞的集聚, 减少了炎性因子 MCP-1、TNF α 、M-CSF 等的表达^[9], 而众所周知, 炎症过程可以产生大量有杀伤能力的 ROS, 消耗机体正常情况下存在的抗氧化物。因而, 当 RSG 抗 UUO 肾小管间质炎症反应的同时, 必然减少 ROS 的产生和由此导致的抗氧化酶的消耗, 减少损伤所致的氧化应激, 本研究结果证实了这样的假说。Sivarajah 等^[6]报道 2 种 TZDs 类药物 RSG 和环格列酮(ciglitazone)通过抑制缺血-再灌注肾脏组织中中性粒细胞浸润而减少肾脏氧化应激损伤。

另外, RSG 是细胞核内过氧化物酶体增殖物激活剂受体 γ (PPAR γ) 的高选择性配体, 可通过 PPAR γ 途径影响一系列基因的表达。有研究结果显示 PPAR 与 DNA 上 PPAR 反应元件 PPRE (PPAR response element) 的结合参与了 SOD 基因启动子的调控。PPARs 与 DNA 上的 PPRE 结合能诱导大鼠细胞 SOD 基因的表达^[10], TZDs 能增加培养的人脐静脉内皮细胞 Cu, Zn-SOD 的表达^[11]。此外, PPAR γ 活化可能诱发大鼠过氧化物酶体增殖, 其特异性标志酶即为过氧化氢酶。Bagi 等^[4]报道, RSG 3 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹ 能通过 PPAR γ 途径减少糖尿病大鼠冠脉氧化应激, 减少自由基生成, 同时增加 CAT 活性和 NO 的生物利用度, 但对 SOD 无影响。但也有部分的研究结果^[12,13]证实, TZDs 类药物的抗氧化作用不通过 PPAR γ 途径作用, 提示该类药物治疗抗氧化作用的机制具有多样性。

本研究属国内首次探索 TZDs 类药物对氧化应激的作用, 揭示了 RSG 通过减少脂质过氧化物的产生和增加抗氧化酶含量, 起到恢复 UUO 状态下自由基的产生和抗氧化物合成之间的平衡, 减少 UUO 所致的氧化应激。

[参考文献]

- [1] Klahr S,Jeremiah M. Obstructive nephropathy and renal fibrosis[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*,2002,283:F861-F875.
- [2] Mudaliar S,Henry RR. New oral therapies for type 2 diabetes mellitus: The glitazones or insulin sensitizers[J]. *Annu Rev Med*,2001,52: 239-257.
- [3] 林沁,马骥,顾勇,等. 罗格列酮对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的保护作用及其机制[J]. *中国临床药理学杂志*, 2003,12:135-138.
- [4] Bagi Z,Koller A, Kaley G. PPARgamma activation, by reducing oxidative stress, increases NO bioavailability in coronary arterioles of mice with type 2 diabetes[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,2004,286:H742-H748.
- [5] Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, et al. Rosiglitazone and 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2, ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), reduce ischaemia/reperfusion injury of the gut[J]. *Br J Pharmacol*, 2003,140:366-376.
- [6] Sivarajah A, Chatterjee PK, Patel NS, et al. Agonists of peroxisome-proliferator activated receptor-gamma reduce renal ischemia/reperfusion injury[J]. *Am J Nephrol*,2003, 23: 267-276.
- [7] Moriyama T, Kawada N, Nagatoya K, et al. Fluvastatin suppresses oxidative stress and fibrosis in the interstitium of mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction[J]. *Kidney Int*,2001,59:2095-2103.
- [8] Allen JT, Vaughan ED Jr, Gillenwater JY. The effect of indomethacin on renal blood flow and ureteral pressure in unilateral ureteral obstruction in awake dogs[J]. *Investig Urol*,1978,15: 324-327.
- [9] 林沁,顾勇,林善琰. 罗格列酮对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质炎症及其纤维化的保护作用[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2005,14:224-229.
- [10] Yoo HY, Chang MS, Rho HM. Induction of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene through the peroxisome proliferator-responsive element by arachidonic acid[J]. *Gene*,1999,234: 87-91.
- [11] Inoue I, Goto SI, Matsunaga T, et al. The ligands/activators for peroxisome proliferation-activated receptor- α (PPAR α) and PPAR γ increase Cu²⁺, Zn²⁺-superoxide dismutase and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells[J]. *Metabolism*,2001,50:3-11.
- [12] Davies GF, Khandelwal RL, Wu L, et al. Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene expression by troglitazone: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma)-independent, antioxidant-related mechanism[J]. *Biochem Pharmacol*,2001,62:1071-1079.
- [13] Alvarez-Maqueda M, El Bekay R, Alba G, et al. 15-deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 induces heme oxygenase-1 gene expression in a reactive oxygen species-dependent manner in human lymphocytes[J]. *J Biol Chem*,2004,279:21929-21937.

[收稿日期] 2005-06-29

[修回日期] 2005-11-18

[本文编辑] 孙岩

Response of memory CD8⁺ T cells to severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus in recovered SARS patients and healthy individuals

Chen H, Hou J, Jiang X, Ma S, Meng M, Wang B, Zhang M, Zhang M, Tang X, Zhang F, Wan T, Li N, Yu Y, Hu H, Yang R, He W, Wang X, Cao X(Institute of Immunology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] To date, the pathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS) in humans is still not well understood. SARS coronavirus (SARS-CoV)-specific CTL responses, in particular their magnitude and duration of postinfection immunity, have not been extensively studied. In this study, we found that heat-inactivated SARS-CoV elicited recall CTL responses to newly identified spike protein-derived epitopes (SSp-1, S978, and S1202) in peripheral blood of all HLA-A * 0201⁺ recovered SARS patients over 1 year postinfection. Intriguingly, heat-inactivated SARS-CoV elicited recall-like CTL responses to SSp-1 but not to S978, S1202, or dominant epitopes from several other human viruses in 5 of 36 (13.8%) HLA-A * 0201⁺ healthy donors without any contact history with SARS-CoV. SSp-1-specific CTLs expanded from memory T cells of both recovered SARS patients, and the five exceptional healthy donors shared a differentiated effector CTL phenotype, CD45RA⁺ CCR7⁻ CD62L⁻, and expressed CCR5 and CD44. However, compared with the high avidity of SSp-1-specific CTLs derived from memory T cells of recovered SARS patients, SSp-1-specific CTLs from the five exceptional healthy donors were of low avidity, as determined by their rapid tetramer dissociation kinetics and reduced cytotoxic reactivity, IFN-gamma secretion, and intracellular production of IFN-gamma, TNF-alpha, perforin, and granzyme A. These results indicate that SARS-CoV infection induces strong and long-lasting CTL-mediated immunity in surviving SARS patients, and that cross-reactive memory T cells to SARS-CoV may exist in the T cell repertoire of a small subset of healthy individuals and can be reactivated by SARS-CoV infection.

[J Immunol, 2005,175: 591-598]