

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00278

缬沙坦对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的影响

周健淞¹, 陈 刚², 沈液渠², 吴 美², 何立群^{2*}

1. 南通大学第三附属医院肾内科, 无锡 214041

2. 上海中医药大学附属曙光医院肾内科, 上海 201203

[摘要] **目的** 探讨血管紧张素 II Ⅰ型受体拮抗剂(AT1RA)缬沙坦对单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠肾间质纤维化(RIF)的影响及其可能机制。**方法** 35 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和缬沙坦组($n=10$),建立大鼠 UUO 模型,于术后 4 周检测血清肌酐(SCr)、血尿素氮(BUN)、血浆血管紧张素 II (Ang II),尿 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)、尿 β₂-微球蛋白(β₂-MG);取梗阻侧肾组织,以 H-E、Masson 染色观察肾小管间质病变,免疫组织化学染色观察 α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、纤维连接蛋白(FN)、纤溶酶原激活物抑制剂 1(PAI-1)、转化生长因子 β₁ (TGF-β₁)及肝细胞生长因子(HGF)在肾间质的阳性染色,并进行半定量分析。**结果** 与假手术组相比,模型组大鼠 SCr、BUN、血浆 Ang II,尿 NAG、β₂-MG 水平以及 α-SMA、FN、PAI-1、TGF-β₁ 表达均显著升高($P<0.01$)。与模型组相比,缬沙坦组大鼠 SCr、BUN、尿 NAG 及 β₂-MG 水平差异无统计学意义($P>0.05$),但血浆 Ang II 及肾间质 α-SMA、FN、PAI-1、TGF-β₁ 表达均显著降低,HGF 表达则显著增高($P<0.01$)。**结论** 缬沙坦虽然对 UUO 大鼠肾小球、肾小管功能改善不明显,但能抑制 Ang II 的生成,可能通过下调 TGF-β₁ 的过度表达,上调 HGF 的表达,抑制 α-SMA、FN、PAI-1 的表达,从而抑制肾小管上皮细胞间充质转分化(EMT),减少细胞外基质(ECM)沉积,达到改善 RIF 的作用。

[关键词] 单侧输尿管梗阻;肾间质纤维化;血管紧张素 II ;α-平滑肌肌动蛋白;转化生长因子 β₁;肝细胞生长因子

[中图分类号] R 693.2

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2010)03-0278-05

Effects of valsartan on renal interstitium fibrosis in rats after unilateral ureteral obstruction

ZHOU Jian-song¹, CHEN Gang², SHEN Ye-qu², WU Mei², HE Li-qun^{2*}

1. Department of Nephrology, the Third Affiliated Hospital of Nantong University, Wuxi 214041, Jiangsu, China

2. Department of Nephrology, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

[Abstract] **Objective** To study the effect of valsartan, an angiotensin II type I receptor antagonist(AT1RA), on renal interstitium fibrosis(RIF)in rats with unilateral ureteral obstruction (UUO), and to discuss the possible mechanisms. **Methods** Thirty-five Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham-operation, model and valsartan groups. The rat UUO model was established. From the day after operation, the rats in sham-operation and model groups received intragastric valsartan and sodium chloride in tales doses. The serum creatinine(SCr), blood urea nitrogen(BUN), angiotensin- II (Ang II) in blood plasma, N-acetyl-β-D-glucosaminidase(NAG)and 24 h urine β₂-microglobulin(β₂-MG)were examined 4 weeks after operation. The renal tissues of the obstructed sides were harvested; H-E staining and Masson staining were used to observe the tubulointerstitial lesions; and immunohistochemistry staining was used for semiquantitative analysis of alpha-smooth muscle actin(α-SMA), fibronectin(FN), plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1), transforming growth factor-beta 1(TGF-β₁), and hepatocyte growth factor(HGF). **Results** Compared with those in the sham-operation group, SCr, BUN, Ang II, NAG and β₂-MG levels, and the expression of α-SMA, FN, PAI-1, and TGF-β₁ in model group were significantly higher($P<0.01$). The levels of SCr, BUN, NAG and β₂-MG were comparable between valsartan group and the model group($P>0.05$). The expression levels of α-SMA, FN, PAI-1, and TGF-β₁ in valsartan group were significantly lower than and the expression of HGF was significantly higher than those in the model group($P<0.01$). **Conclusion** Valsartan does not improve the tubular and glomerular functions, but it can inhibit production of Ang-II. Valsartan may inhibit renal interstitial fibrosis by inhibiting renal tubule epithelial mesenchymal transdifferentiation and reducing extracellular matrix deposition through blocking up Ang II, inhibiting overexpression of α-SMA, FN, PAI-1, and TGF-β₁, and inducing the HGF expression.

[Key words] unilateral ureteral obstruction; renal interstitium fibrosis; angiotensin II ; alpha-smooth muscle actin;

[收稿日期] 2009-11-27

[接受日期] 2010-02-09

[基金项目] 上海市重点学科建设项目(Y0302). Supported by Shanghai Leading Academic Discipline Project(Y0302).

[作者简介] 周健淞, 硕士. E-mail: zhoujiansong82@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-53821650-355, E-mail: heliqun59@yahoo.com.cn

transforming growth factor-beta 1;hepatocyte growth factor

[Acad J Sec Mil Med Univ,2010,31(3):278-282]

目前研究认为,肾小球硬化、肾小血管硬化和肾小管间质纤维化是肾功能减退过程中的3个始动因素^[1],肾间质纤维化(RIF)是慢性肾脏疾病进展到终末期肾功能衰竭的共同形态学表现,肾小管间质损伤与肾功能减退的关系较肾小球损害更为密切,决定着肾脏疾病的预后^[2]。在RIF的发病过程中,肾素-血管紧张素系统(RAS)被激活。缬沙坦(valsartan)是血管紧张素ⅡⅠ型受体拮抗剂(AT1RA),我们设想缬沙坦能否通过对RAS的拮抗作用来减轻或延缓RIF的进程。因此,本研究通过制备单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠模型,从而造成大鼠RIF,观察缬沙坦对UUO大鼠RIF的影响,并探讨其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物 清洁级雄性SD大鼠35只,体重(180±20)g(购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,合格证号:SCXK(沪)2003-0003,在上海中医药大学实验动物中心饲养,人工光照,明暗各12h,自由饮食。

1.2 实验药物与试剂 缬沙坦胶囊(北京诺华制药有限公司,批号:H20040217);血清肌酐(SCr)和尿N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)试剂盒(上海申索佑福医学诊断用品有限公司),血尿素氮(BUN)试剂盒(济南希森美康医用电子有限公司),尿β₂-微球蛋白(β₂-MG)放免试剂盒(北京原子高科股份有限公司),血浆血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)放免试剂盒(北京北方生物技术研究),SABC免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);小鼠抗大鼠α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)单克隆抗体,兔抗大鼠纤维连接蛋白(FN)、纤溶酶原激活物抑制剂1(PAI-1)、转化生长因子β₁(TGF-β₁)及肝细胞生长因子(HGF)多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.3 动物模型建立及处理 随机选取10只大鼠作为假手术组,其余25只按如以下方法建立UUO模型:先以3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,从距左脊肋骨0.5cm处作斜向外方切口,游离肾脏及输尿管,将左侧肾脏用组织钳托起,取中段部位用止血钳夹住,在输尿管两端各用丝线结扎后剪断输尿管,分层缝合,肌注青霉素预防感染。假手术组除不结扎输尿管外,其余步骤同上。由于麻醉及手术操作不当,术中及术后共死亡5只,剩余20只大鼠按体质量

量随机分为模型组和缬沙坦组,每组各10只。采用灌胃给药4周,缬沙坦组给药量为60kg体质量成人剂量的10倍(13mg·kg⁻¹·d⁻¹),假手术组、模型组给予等量生理盐水。

1.4 观察指标 在UUO术后4周,各组大鼠先经腹主动脉采血,分别检测SCr、BUN及血浆AngⅡ;并收集24h尿液检测NAG、β₂-MG。处死大鼠,取梗阻侧肾组织,H-E、Masson染色观察肾小管间质病变,免疫组织化学染色观察α-SMA、FN、PAI-1、TGF-β₁及HGF在肾间质的表达,并运用图像分析系统进行半定量分析。

1.5 指标检测方法

1.5.1 肾脏组织病理学观察 将10%甲醛溶液固定的肾组织常规石蜡包埋切片,经H-E和Masson染色后,光镜下观察肾小管间质的病理改变。采用MIQAS医学图像定量分析系统(上海求为生物科技有限公司)对组织切片进行半定量分析,400倍光镜下采集Masson染色肾脏病理图像,绿色为纤维化阳性染色区。每张切片随机采集5个不重叠视野(不含肾小球及小血管),分别测量每个视野中阳性染色的相对面积,取其平均值。

1.5.2 免疫组织化学检测 免疫组化采用SABC法。常规石蜡切片脱蜡至水;0.3%H₂O₂抑制内源性过氧化物酶10min;用0.02mol/LPBS(pH7.2~7.4)微波诱导抗原修复,加热至沸腾后断电,微波炉中放置10min,室温自然冷却至常温;5%BSA封闭液室温反应30min;一抗(1:50)4℃过夜后,37℃再反应1h;生物素化羊抗兔IgG37℃反应30min;试剂SABC37℃反应30min;DAB显色10min;苏木精复染5min,Na₂HPO₄饱和溶液返蓝,中性树胶封片;以0.01mol/L的PBS代替一抗作阴性对照。采用MIQAS医学图像定量分析系统进行半定量分析,每张切片在400倍光镜下随机采集5个不重叠视野(不含肾小球及小血管),棕黄色为阳性染色区。测量每个视野阳性染色面积和光密度值,得出阳性相对面积,取平均值。

1.6 统计学处理 采用SPSS13.0软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,任意两组间比较采用LSD检验,方差不齐时采用非参数H检验,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况观察 假手术组大鼠活动灵活,被毛

光泽,体质量增长均匀。模型组大鼠活动差,被毛蓬乱,精神萎靡,多尿,体质量增长较慢。缬沙坦组大鼠整体状况均较模型组有明显改善。由于病理损害、灌胃操作不当等原因,模型组死亡 3 只,缬沙坦组死亡 1 只。

2.2 UUO 大鼠肾功能指标及血浆 Ang II 的改

变 由表 1 可见,模型组大鼠 S_{Cr}、BUN 及尿 NAG、β₂-MG 均较假手术组升高($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组相比,缬沙坦组 S_{Cr}、BUN 及尿 NAG、β₂-MG 差异则无统计学意义($P>0.05$)。模型组大鼠血浆 Ang II 较假手术组显著增高,缬沙坦组 Ang II 则较模型组降低($P<0.05$)。

表 1 三组大鼠肾功能指标及血浆 Ang II 的比较
Tab 1 Comparison of renal function indices and plasma Ang II in three groups

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

Group	S _{Cr} c _B /(μmol·L ⁻¹)	BUN c _B /(mmol·L ⁻¹)	Plasma Ang II ρ _B /(ng·L ⁻¹)	Urine NAG z _B /(U·L ⁻¹)	Urine β ₂ -MG ρ _B /(ng·L ⁻¹)
Sham	36.83±4.86	5.53±0.64	472.31±93.64	14.50±2.35	10.64±4.60
Model	47.00±7.54*	8.55±1.76**	1 097.84±181.46*	19.83±3.97*	24.09±6.33*
Valsartan	46.33±10.21	8.37±0.69	874.83±194.47△	17.83±4.45	18.74±5.21

S_{Cr}:Serum creatinine; BUN:Blood urea nitrogen; NAG:N-acetyl-β-D-glucosaminidase; β₂-MG:β₂-microglobulin; Ang II :Angiotensin II .
* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs sham group; △ $P<0.05$ vs model group

2.3 肾脏组织病理观察 肉眼观察,假手术组大鼠两侧肾脏外观正常。模型组大鼠左肾(术侧)肿大,有囊性感,内含混浊的褐色尿液,肾实质变薄,肾盂扩张,肾盏乳头受压;右肾稍肿大,颜色稍浅,组织结构清楚。缬沙坦组大鼠上述病理改变较模型组有所改善。

光镜观察,假手术组大鼠肾小球、肾小管结构基本正常,小管周围肾间质无增宽。模型组大鼠上皮细胞胞质疏松,间质水肿并伴有淋巴细胞、单核细胞浸润,纤维组织增生,部分肾小管萎缩、管腔闭塞或扩张、坏死,部分管腔内有红细胞管型,小管间质区增宽,皮质极薄,小管结构遭到严重破坏,说明 UUO 造模大鼠肾间质纤维化成功。缬沙坦组大鼠上述病理改变较模型组减轻。

Masson 染色结果显示,假手术组大鼠肾小管间质见少量绿色阳性染色,胶原纤维表达轻微(图 1A),模型组大鼠肾小管上皮细胞胞质及肾间质见广泛的绿色阳性深度染色(图 1B),表达量与假手术组比较显著增多[(0.08±0.03) vs (0.01±0.02), $P<0.05$];缬沙坦组大鼠肾间质见散在绿色染色,程度较轻,表达量较模型组减少(0.03±0.000 2, $P<0.05$,图 1C)。

2.4 免疫组化染色结果 假手术组大鼠 α-SMA 主要表达于血管平滑肌细胞,在肾间质表达极少(图 2A);模型组大鼠肾小管上皮细胞胞质及肾间质可见广泛的棕黄色阳性染色表达(图 2B);与模型组相比,缬沙坦组 α-SMA 表达显著减少(图 2C,表 2)。

假手术组大鼠肾间质 FN 及 PAI-1 表达极少(图 2D、2G),模型组大鼠肾间质及肾小管上皮细胞胞质可见广泛的 FN 及 PAI-1 棕黄色阳性染色表达

(图 2E、2H);与模型组相比,缬沙坦组 FN 及 PAI-1 表达明显减少(图 2F、2I,表 2)。

假手术组大鼠 TGF-β₁ 在皮髓质交界区肾小管有微弱的表达(图 2J),模型组大鼠肾小管上皮细胞胞质中有广泛的呈棕黄色的 TGF-β₁ 阳性染色表达(图 2K);与模型组相比,缬沙坦组表达也明显减少(图 2L,表 2)。假手术组大鼠 HGF 阳性染色主要表达于间质细胞(图 2M),模型组大鼠 HGF 表达较假手术组差异无统计学意义;与模型组相比,缬沙坦组大鼠肾间质 HGF 表达显著增加(图 2N、2O,表 2)。

3 讨 论

RIF 是多种细胞、生长因子、细胞因子共同参与,相互作用,最终导致细胞外基质(ECM)合成增多,降解减少,过度沉积的结果^[3]。成纤维细胞是肾脏纤维化的效应细胞,病理情况下成纤维细胞增殖、移动并合成生长因子、血管活性物质和基质蛋白等,导致炎性细胞浸润,ECM 的降解和合成失衡,促进 RIF 的发展^[4]。

研究证实,TGF-β₁ 是促进纤维化最强有力的细胞因子,在 RIF 发生发展中的多个环节起作用;HGF 是一种重要的抗纤维化细胞因子,能够通过各种机制阻断 TGF-β₁ 的 Smad 转导通路,作用环节主要表现在 ECM 的合成与降解、肾小管上皮细胞间充质转分化(EMT)的发生与逆转等方面^[5-6]。Kal-luri 和 Neilson^[7]报道在 RIF 的发生过程中,36% 的成纤维细胞来源于肾小管 EMT,肾小管上皮细胞失去上皮表型,获得间充质细胞的特征,表达 α-SMA^[4],是导致病理条件下肾间质中 ECM 过度沉

积的主要细胞^[8]。FN 在细胞增殖和分化、黏附和移动等方面均起着重要作用,对维持 ECM 的形态和稳定也有重要影响。FN 的合成增加在一定程度上代表了 ECM 的过度积聚。ECM 积聚是引起肾内毛细血管内皮细胞损伤及 RIF 的重要病理基础,丝

氨酸蛋白酶系统是 ECM 降解中最重要的降解酶系统之一,尿激酶 PA(uPA)具有内源性的抗肾纤维化活性,PAI-1 作为 uPA 的抑制剂,被认为是促进肾间质纤维化强有力的启动因子^[9]。

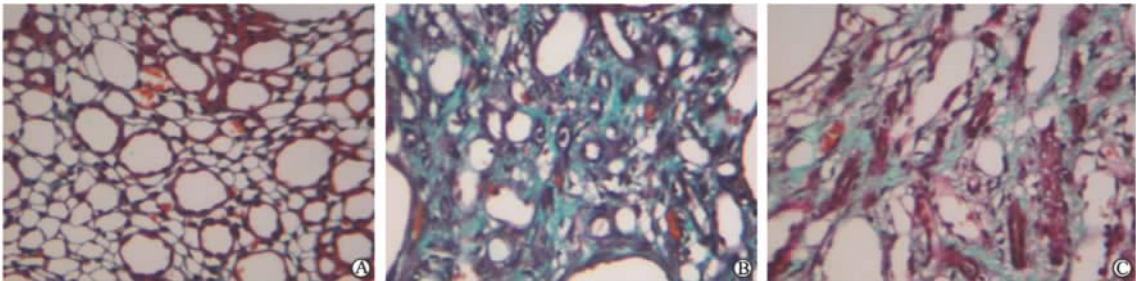


图 1 Masson 染色结果

Fig 1 Masson staining of collagen

A:Sham group; B:Model group; C:Valsartan group. Original magnification:×400

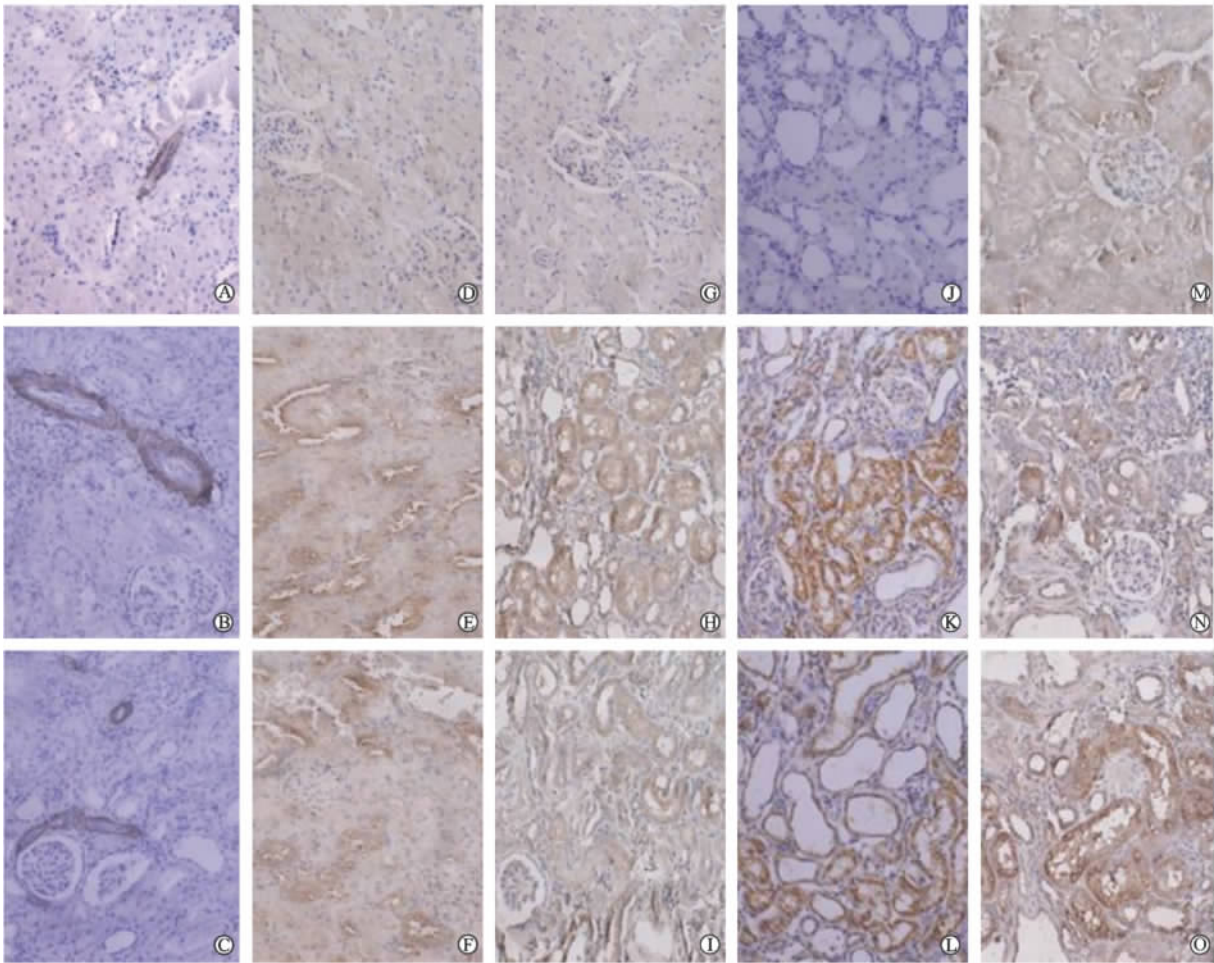


图 2 三组大鼠肾组织 α-SMA(A~C)、FN(D~F)、PAI-1(G~I)、TGF-β₁(J~L)及 HGF(M~O)的免疫组化染色情况

Fig 2 Immunohistological staining of α-SMA(A-C),FN(D-F),PAI-1(G-I),TGF-β₁(J-L) and

HGF(M-O) in renal tissues of rats in 3 groups

A,D,G,J,M: Sham group; B,E,H,K,N: Model group; C,F,I,L,O: Valsartan group. α-SMA: α-smooth muscle actin; FN: Fibronectin; PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1; TGF-β₁: Transforming growth factor-β₁; HGF: Hepatocyte growth factor. Original magnification: ×400

表 2 三组大鼠肾组织 α -SMA、FN、PAI-1、TGF- β_1 及 HGF 的免疫组化阳性染色面积
Tab 2 Immunohistological analysis results (positive stained areas) of α -SMA, FN, PAI-1, TGF- β_1 ,
and HGF in renal tissues of rats in 3 groups

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

Group	α -SMA	FN	PAI-1	TGF- β_1	HGF
Sham	0.34±0.03	0.34±0.05	0.16±0.09	0.32±0.08	0.08±0.03
Model	1.78±0.29*	2.00±0.24*	0.94±0.13*	1.46±0.41*	0.20±0.11
Valsartan	0.81±0.16 $\Delta\Delta$	1.16±0.14 $\Delta\Delta$	0.38±0.10 Δ	0.96±0.36 Δ	0.70±0.15 $\Delta\Delta$

α -SMA: α -smooth muscle actin; FN: Fibronectin; PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1; TGF- β_1 : Transforming growth factor- β_1 ; HGF: Hepatocyte growth factor. * $P<0.05$ vs sham group; $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ vs model group

在各种病因所致 RIF 的发病过程中, RAS 被激活。肾小管间质纤维化时, 系膜细胞合成增多, 进而肾脏局部的 Ang II 活性增高, 通过直接或间接诱导 TGF- β 的表达, 刺激肾脏局部单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 和 PAI-1 的表达, 促进肾小管间质成纤维细胞的增殖、分化, 导致大量单核巨噬细胞浸润肾小球, ECM 合成增多, 降解减少。高雯等^[10] 研究认为 Ang II 能够以协同的方式参与 TGF- β_1 导致的 EMT, 可能以此方式加重肾小管间质的纤维化。

有研究显示, 抑制 RAS 的药物如血管紧张素转换酶抑制剂 (ACEI)、Ang II 受体拮抗剂 (ATRA), 能通过多条作用途径减轻肾小管间质纤维化所造成的损伤, 其机制已公认与 RAS 相关^[11]。以往对 ATRA 的研究多集中在氯沙坦, Kellner 等^[12] 报道 Ang II 对 UO 导致的细胞凋亡、巨噬细胞浸润、EMT 以及纤维化产生直接的影响, 氯沙坦能够显著地减少上述病理改变。作为一种新型的 AT1RA, 有关缬沙坦的研究甚多, 但大多集中在其降压作用上, 近年来研究发现缬沙坦有独立于降压之外的降蛋白作用, 并广泛应用于伴有大量蛋白尿的各种肾脏疾病, 取得了较好的临床疗效。但缬沙坦在 RIF 方面的研究还不多见, 基于 RAS 激活在 RIF 过程中的作用, 本研究设想, 缬沙坦能否通过对 RAS 的拮抗来发挥其减轻或延缓 RIF 进程的作用。研究结果显示, 缬沙坦虽然对 UO 大鼠肾小球、肾小管功能改善不明显, 但是能够阻断 Ang II 的生成, 通过拮抗 TGF- β_1 的过度表达, 诱导 HGF 的高表达, 抑制 α -SMA、FN、PAI-1 的表达, 从而抑制肾小管 EMT, 减少 ECM 沉积, 达到改善 RIF 的作用。

RIF 的形成涉及到细胞、细胞外基质、细胞因子、血管活性物质等多种因素、多个环节之间相互作用的复杂过程。其病理机制复杂, 往往存在多个环节和靶点, 单一靶点干预效果欠佳, 目前对通过阻断 Ang II 来达到防治 RIF 的研究还停留在体内外动物实验阶段。因此, 采取阻断 Ang II 的方法来延缓肾

间质纤维化是否可行, 是否能够运用于临床, 还有待于以后进一步深入探讨。

[参考文献]

[1] 李 恒, 唐 政. 肾脏固有细胞病理变化与慢性肾功能减退[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2000, 9: 543-536.

[2] 王海燕. 重视和研究小管-间质损害在肾小球疾病发展和预后中的作用[J]. 中华肾脏病杂志, 2000, 16: 5-6.

[3] Razzaque M S, Taguchi T. Cellular and molecular events leading to renal tubulointerstitial fibrosis[J]. Med Electron Microsc, 2002, 35: 68-80.

[4] Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis[J]. Am J Pathol, 2001, 159: 1465-1475.

[5] Yang J, Dai C, Liu Y. Hepatocyte growth factor suppresses renal interstitial myofibroblast activation and intercepts Smad signal transduction[J]. Am J Pathol, 2003, 163: 621-632.

[6] Yang J, Liu Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13: 96-107.

[7] Kalluri R, Neilson E G. Epithelial mesenchymal transition and its implications for fibrosis[J]. J Clin Invest, 2003, 112: 1776-1784.

[8] Neilson E G. Mechanisms of disease: fibroblasts—a new look at an old problem[J]. Nat Clin Pract Nephrol, 2006, 2: 101-108.

[9] Yamaguchi I, Lopez-Guisa J M, Cai X, Collins S J, Okamura D M, Eddy A A. Endogenous urokinase lacks antifibrotic activity during progressive renal injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2007, 293: F12-F19.

[10] 高 雯, 狄 佳, 闻 萍, 江 蕾, 熊明霞, 杨俊伟. 血管紧张素 II 参与肾小管上皮细胞转分化的实验研究[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2009, 29: 623-627.

[11] 章 斌, 王伟铭, 史 浩, 赵 青, 陈 楠. 缬沙坦和雷米普利对 5/6 肾切除大鼠肾间质微血管的作用[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2003, 12: 28-31, 40.

[12] Kellner D, Chen J, Richardson I, Seshan S V, El Chaar M, Vaughan E D Jr, et al. Angiotensin receptor blockade decreases fibrosis and fibroblast expression in a rat model of unilateral ureteral obstruction[J]. J Urol, 2006, 176: 806-812.

[本文编辑] 商素芳, 邓晓群