

• 研究报告 •

血必净联合罗格列酮对局灶节段性肾小球硬化大鼠肾脏的保护作用

张碧丽 李志军 宋兰云 张瑄 王文红

【关键词】 肾小球硬化, 局灶节段性; 罗格列酮; 血必净; 转化生长因子-β1; 血管内皮生长因子

局灶节段性肾小球硬化(FSGS)是多种肾小球疾病发展的共同病理途径。糖皮质激素作为治疗 FSGS 方案的核心药物,对肾病综合征的治疗发挥了巨大作用,但多数患者呈现激素耐药,且长期使用激素可导致明显的毒副作用。本实验观察血必净和罗格列酮延缓 FSGS 模型大鼠进展的疗效,旨在探讨其可能的作用机制,并比较中西药联合治疗是否能起到更有效的肾脏保护作用。

1 材料与方

1.1 动物模型的建立及分组

Wistar 雄性大鼠 33 只,体重 180~200 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。按随机数字表法分为假手术组、模型组、血必净治疗组、罗格列酮治疗组、血必净与罗格列酮联合治疗组。用质量分数为 3%的戊巴比妥(30 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,行左侧肾脏摘除术,分别于术后 1 周末及 3 周末经大鼠尾静脉注射阿霉素 5 mg/kg 及 3 mg/kg。假手术组只剥离至脂肪组织后缝合,同期经尾静脉注射等量生理盐水。5 周时模型已成功。术后 5 周起各干预组每日给予相应药物(血必净注射液 8 ml·kg⁻¹·d⁻¹腹腔注射,罗格列酮 5 mg·kg⁻¹·d⁻¹溶于生理盐水中灌胃),均连用 4 周。

1.2 检测指标与方法

1.2.1 血、尿生化指标:分别于实验 6 周和 8 周末动态观察 24 h 尿蛋白定量及血、尿生化指标,包括总蛋白(TP)、白蛋白(Alb)、胆固醇(Cho)、肌酐及尿肌酐,并计算内生肌酐清除率(CCr)。

1.2.2 肾组织病理学检查:于实验 8 周末处死动物,取右肾,经体积分数为 10%的中性甲醛水溶液固定,石蜡包埋,切片厚约 3 μm,行苏木素-伊红(HE)及

基金项目:天津市医药卫生基金资助项目(03ky32)

作者单位:300074 天津市儿童医院肾内科(张碧丽,张瑄,王文红),病理科(宋兰云);天津市第一中心医院(李志军)

作者简介:张碧丽(1959-),女(汉族),北京市人,教授,硕士生导师,主任医师。

表 1 各组大鼠 6 周和 8 周末血、尿生化指标变化(±s)

时间	组别	动物数	24 h 尿蛋白定量(mg)	TP(g/L)	Alb(g/L)	Cho(mmol/L)	CCr(ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹)
6 周	假手术组	5	37.83±9.85	61.87±2.95	39.97±0.82	2.03±0.20	5.24±0.12
	模型组	6	148.75±25.34 ^b	33.45±11.88 ^b	15.60±3.43 ^b	10.85±5.18 ^b	1.26±0.04 ^b
	血必净组	7	114.60±14.94 ^{bc}	46.52±13.82 ^a	15.24±1.49 ^b	6.52±1.70 ^b	1.30±0.04 ^b
	罗格列酮组	7	118.50±33.28 ^b	45.13±3.88 ^a	14.73±2.35 ^b	6.47±1.60 ^b	1.30±0.03 ^b
	联合治疗组	8	97.20±21.63 ^{bd}	53.80±9.87 ^d	17.25±4.59 ^b	6.36±1.19 ^b	1.45±0.03 ^{bd}
8 周	假手术组	5	43.67±11.22	60.68±7.43	36.93±4.07	1.92±0.10	5.23±0.10
	模型组	6	152.00±16.67 ^b	29.20±11.70 ^b	8.35±1.85 ^b	11.81±1.78 ^b	0.93±0.03 ^b
	血必净组	7	62.00±5.23 ^{ade}	51.10±5.99 ^{de}	19.53±2.61 ^{bd}	4.55±0.03 ^{bd}	1.11±0.11 ^{bce}
	罗格列酮组	7	61.50±7.05 ^{ade}	53.67±7.29 ^{de}	20.90±1.30 ^{bd}	3.70±0.21 ^{bd}	1.11±0.09 ^{bce}
	联合治疗组	8	44.00±6.56 ^d	55.73±6.61 ^d	22.05±2.28 ^{bd}	3.26±0.42 ^{ad}	1.26±0.01 ^{bd}

注:与假手术组比较,*P<0.05,^bP<0.01;与模型组比较,^cP<0.05,^dP<0.01,与联合治疗组比较,^eP<0.05

高碘酸-希夫(PAS)染色。光镜下观察组织病理学变化;计算肾小球硬化指数(SI),评价肾小球的硬化程度;每份标本取 10 个肾小球,用图像分析系统测定肾小球面积(GA)、肾小球细胞外基质(ECM)面积,计算 ECM/GA 比值。

1.2.3 肾组织免疫组化:用过氧化物酶标记的链霉卵白素(SP)法检测大鼠肾脏转化生长因子-β1(TGF-β1)、血管内皮生长因子(VEGF)的表达,光镜下观察染色结果,用图像分析系统测量其平均吸光度(A)值。

1.3 统计学处理:采用 SPSS 11.5 统计软件进行数据处理。计量数据以均数±标准差(±s)表示,多组间比较用方差分析,组间两两比较用 LSD 法,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 24 h 尿蛋白定量变化(表 1):实验 6 周和 8 周末,大鼠 24 h 尿蛋白定量较假手术组明显升高(P 均<0.01)。与模型组比较,6 周末血必净组与联合治疗组 24 h 尿蛋白定量显著降低,8 周末各治疗组均显著降低,且联合治疗组比单一药物治疗组下降更显著(P<0.05 或 P<0.01)。

2.2 血清 TP、Alb 及 Cho 变化(表 1):实验 6 周和 8 周末,大鼠 Cho 均较假手术组明显升高(P 均<0.01),TP、Alb 均明显下降(P 均<0.01)。与模型组比较,6 周末联合治疗组 TP 即开始增加,8 周

末各治疗组 TP 和 Alb 均增加更明显、Cho 显著降低(P 均<0.01),联合治疗组 TP 较单一药物治疗组显著升高(P 均<0.05),各治疗组间 Alb、Cho 比较差异无统计学意义(P 均>0.05)。

2.3 CCr 变化(表 1):实验 6 周和 8 周末,大鼠 CCr 均较假手术组明显降低(P 均<0.01)。与模型组比较,6 周末联合治疗组 CCr 显著升高,8 周末各治疗组均显著升高,且联合治疗组高于单一药物治疗组(P<0.05 或 P<0.01)。

2.4 肾脏病理学改变:光镜下观察模型组大鼠肾组织病理学改变较明显,可见部分肾小球肥大,系膜基质增生,球囊粘连,部分毛细血管呈硬化性改变,肾小管腔内可见蛋白管型,肾间质灶状炎性细胞浸润;各治疗组较模型组有不同程度减轻,血必净治疗组炎性细胞浸润明显减轻,联合治疗组可见肾小球毛细血管开放较好,肾小管间质病变程度明显减轻。

2.5 SI 和 ECM/GA 比值变化(表 2):模型组及各治疗组 SI、ECM/GA 比值均明显高于假手术组,各治疗组均较模型组明显降低,且联合治疗组低于单一药物治疗组(P 均<0.01)。

2.6 TGF-β1 表达(表 2,彩色插图 1):假手术组仅有少量 TGF-β1 染色弱阳性区域,模型组 TGF-β1 表达显著增高,联合治疗组 TGF-β1 表达明显减轻。图像分析结果显示,模型组及各治疗组均较

假手术组 TGF-β1 表达增多,各治疗组较模型组表达均明显减少,联合治疗组较单一药物治疗组表达减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);血必净组与罗格列酮组间差异无统计学意义。

2.7 VEGF 表达(表 2,彩色插页图 2):假手术组、模型组与各治疗组大鼠肾小球 VEGF 仅微量表达,阳性表达区域主要集中在肾间质。与假手术组比较,模型组和各治疗组 VEGF 表达均明显增加,各治疗组 VEGF 表达较模型组减少,且联合治疗组 VEGF 的表达低于单一药物治疗组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

在某些致病因素的作用下,肾小球内各种固有细胞都受到不同程度的刺激,产生大量的细胞因子及炎症趋化因子,介导炎症细胞的浸润及固有细胞的活化,使毛细血管祥塌陷、ECM 产生增多,FSGS 逐步产生^[1]。凝血-纤溶系统紊乱等因素也直接参与并加重了肾小球的硬化过程。TGF-β1 作为一种独特致纤维化的细胞因子,已被公认是肾小球硬化治疗的靶点。VEGF 是目前所知最有选择性的血管内皮细胞促有丝分裂剂,具有促进血管内皮细胞增生、增加微血管通透性、诱导血管生成等多种功能。实验证明,TGF-β1 可以刺激肾小管上皮细胞合成和分泌 VEGF^[2]。

血必净注射液含中药红花、川芎、当归、赤芍、丹参等,可拮抗炎症细胞因子减少血小板聚集,消除促凝因素,恢复凝血-纤溶系统动态平衡,具有活血化瘀、扩张微循环的作用^[3];且能有效拮抗内毒素,抑制内毒素诱导单核/巨噬细胞产生炎症介质,下调促炎介质水平,保护内皮细胞^[4]。朱辟疆等^[5-6]研究发现,大黄加活血化瘀中药如丹参、红参、当归、莪术等具有显著的抗纤维化作用,表现在抑制促纤维化因子及纤维化细胞的增殖、活化,抑制胶原等基质成分合成和沉积,激活与 ECM 降解有关酶的活性,降低血中 TGF-β1、纤维连接蛋白(FN)、层粘连蛋白(LN)等机制,抑制肾间质纤维化,从而延缓肾功能衰竭的进展。本实验结果显示,给予血必净治疗后大鼠 24 h 尿蛋白排泄降低,CCr 升高;肾间质炎性细胞浸润显著减轻,SI 及 ECM/GA 比值降低;肾组织 TGF-β1、VEGF 的表达减少。表明活血化瘀中药血必净注射液可以从血生化水平、组织病理水平及细

表 2 各组大鼠 8 周末 SI、ECM/GA 比值、TGF-β1 及 VEGF 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	SI	ECM/GA 比值	TGF-β1(A 值)	VEGF(A 值)
假手术组	5	20.13±1.65	10.02±0.01	0.053±0.007	0.077±0.015
模型组	6	157.00±21.46 ^b	35.56±2.14 ^b	0.281±0.030 ^b	0.175±0.029 ^b
血必净组	7	108.13±25.77 ^{bdf}	20.28±2.92 ^{bdf}	0.177±0.012 ^{bdf}	0.123±0.008 ^{bde}
罗格列酮组	7	90.63±12.48 ^{bdf}	18.17±0.02 ^{bdf}	0.158±0.025 ^{bde}	0.124±0.009 ^{bde}
联合治疗组	8	49.50±12.56 ^{bd}	14.88±1.25 ^{bd}	0.121±0.012 ^{bd}	0.104±0.006 ^{bd}

注:与假手术组比较,^b $P < 0.01$;与模型组比较,^d $P < 0.01$;与联合治疗组比较,^e $P < 0.05$,^f $P < 0.01$

胞因子水平等不同层面改善 FSGS,可作为 FSGS 时治疗选择的新靶点。

罗格列酮属于噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂,通过激活过氧化物酶体增殖活化受体-γ(PPAR-γ)而发挥作用,目前临床主要用于 2 型糖尿病的治疗。文献报道 PPAR-γ 可能在肾脏局部损伤和纤维化进程中发挥重要的保护作用,可作为机体损伤和炎症应激反应中的一个重要靶点^[7]。近来研究表明,罗格列酮能够通过改善肾小球内血流动力学及高凝状态,修复内皮细胞功能,改善血管通透性,减少尿微量 Alb 的排泄^[8]。有报道噻唑烷二酮类药物可抑制纤溶酶原激活物抑制物-1、单核细胞趋化蛋白-1、血管细胞黏附分子-1 和细胞间黏附分子-1 等炎症因子对肾血管、肾小球滤过膜和肾小管间质的损害,降低肾小球滤过膜的通透性,减少蛋白尿的排泄,抑制 FSGS 的发生^[9]。研究发现噻唑烷二酮类药物可抑制体外培养系膜细胞增生,还可逆转系膜细胞表型转化,导致细胞生长停滞,降低 ECM 生成,从而干预或逆转 FSGS 的过程^[10]。其机制可能与 PPAR-γ 被活化后能下调某些致纤维化因子,如 TGF-β1、VEGF 及 FN 等,阻止了系膜细胞增殖有关,从而减少 ECM 积累,达到延缓 FSGS 的作用。本实验也表明罗格列酮能够下调 TGF-β1、VEGF 的表达,减轻肾脏病理改变,减少蛋白尿的排泄,达到延缓 FSGS 进展的作用,提示罗格列酮可成为防治 FSGS 的一个新选择。

FSGS 是多种致病因素共同作用的结果,本实验结果表明,血必净与罗格列酮中西药联合治疗比单一用药可以以更显著减少 FSGS 大鼠的蛋白尿的排泄,促进 CCr 的恢复;在肾脏病理学改变及 TGF-β1、VEGF 的表达水平改变中,联合治疗组均优于单一药物治疗组。提示血必净与罗格列酮联合应用在较短时间内可更有效延缓 FSGS 的进展,在对 FSGS 大鼠的肾保护作用中显示出联合

治疗的优势。

参考文献

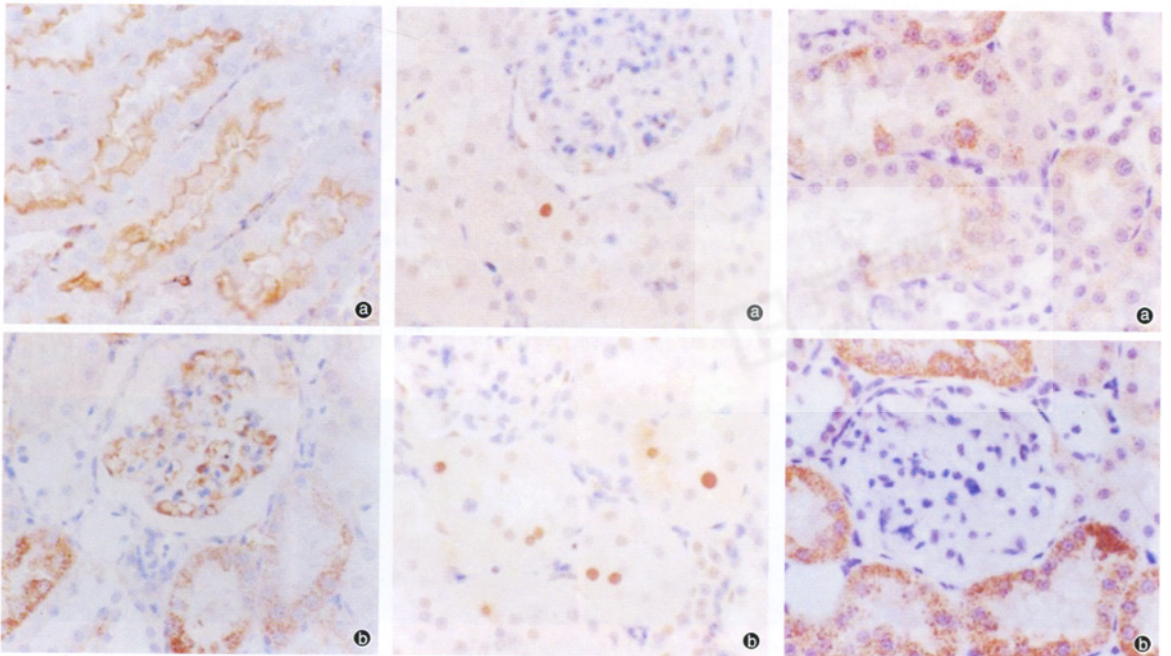
- Nagata M. Pathogenesis of glomerulosclerosis; role of epithelial interactions [J]. Clin Exp Nephrol, 2000, 4: 173.
- Nakagawa T, Lan H Y, Zhu H J, et al. Differential regulation of VEGF by TGF-β and hypoxia in rat proximal tubular cells [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2004, 287(4): 658-664.
- 梁显泉,李志军,刘红栓,等.血必净注射液治疗脓毒症 42 例[J].中国中西医结合急救杂志,2005,12(4):251-252.
- 曹书华,王今达.血必净对感染性多器官功能障碍综合征大鼠组织及内皮损伤保护作用的研究[J].中国危重病急救医学,2002,14(8):489-491.
- 朱辟疆,韦先进,周逊,等.中药抗纤维化治疗慢性肾衰竭的临床研究[J].中国中西医结合急救杂志,2002,9(4):206-209.
- 朱辟疆,韦先进,周逊,等.肾衰竭抗肾间质纤维化的实验研究[J].中国中西医结合急救杂志,2003,10(3):346-349.
- 阳晓,张海燕,张亚杰,等.PPAR-γ 和 α-SMA 在单侧输尿管梗阻大鼠肾组织中的表达及其意义[J].中国危重病急救医学,2005,17(10):611-614.
- Sarafidis P A, Bakris G L. Protection of the kidney by thiazolidinediones: an assessment from bench to bedside [J]. Kidney Int, 2006, 70(7): 1223-1233.
- Moraes L A, Piquera L, Bishop D, et al. Peroxisome proliferators-activated receptors and inflammation [J]. Pharmacol Ther, 2005, 14(1): 2-4.
- Guo B, Koya D, Isono M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit TGF-beta1 induced fibronectin expression in glomerular mesangial cells [J]. Diabetes, 2004, 53(1): 200-208.

(收稿日期:2007-10-31)

(本文编辑:李银平)

骨桥蛋白在糖尿病大鼠肾组织中的表达及意义

(正文见287页)



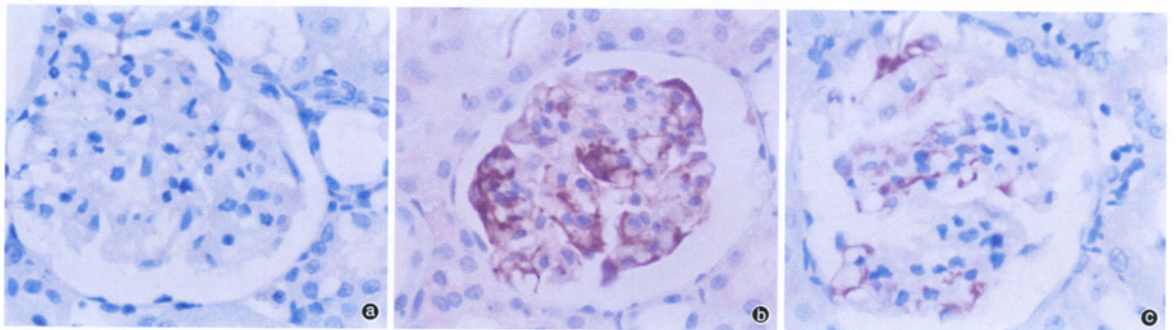
①:对照组, ②:糖尿病组
图1 两组大鼠注射STZ后8周OPN的表达(免疫组化, ×400)

①:对照组, ②:糖尿病组
图2 两组大鼠注射STZ后1周PCNA的表达(免疫组化, ×400)

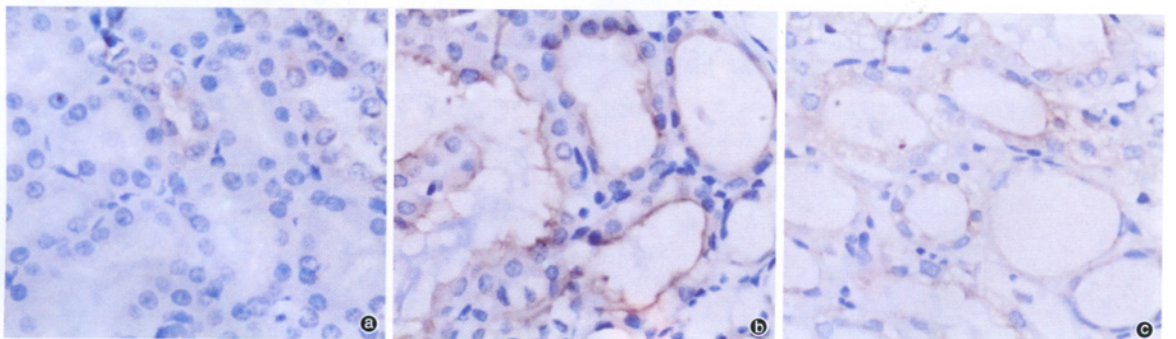
①:对照组, ②:糖尿病组
图4 两组大鼠注射STZ后8周OPN mRNA的表达(原位杂交, ×400)

血必净联合罗格列酮对局灶节段性肾小球硬化大鼠肾脏的保护作用

(正文见299页)



①:假手术组, ②:模型组, ③:联合治疗组
图1 各组大鼠肾小球内TGF-β1表达(免疫组化, ×400)



①:假手术组, ②:模型组, ③:联合治疗组
图2 各组大鼠肾间质内VEGF表达(免疫组化, ×400)