

• 论著 •

# 肝素防治局灶节段性肾小球硬化的实验研究

张碧丽 李志军 宋兰云 周红 王文红 张喧

**【摘要】 目的** 观察肝素钙注射液防治局灶节段性肾小球硬化(FSGS)的可能性。**方法** 18 只 Wistar 大鼠随机分为正常对照组(A 组)、肝素治疗组(B 组)和模型组(C 组)。采用小剂量分次阿霉素-间羟胺-高脂饲料法建立大鼠 FSGS 模型,B 组于实验第 29 d 予肝素钙注射液治疗。各组均测定 24 h 尿蛋白、血生化指标及肾脏组织血流量,并在光镜和电镜下检查肾脏形态、肾小球硬化指数(SI)及细胞外基质(ECM)。**结果** 治疗后2 周(实验 6 周)时肝素治疗组尿蛋白排泄量开始降低,实验 12 周时肝素治疗组胆固醇升高的幅度低于模型组。肝素治疗组肾组织血流量明显增加。光镜检查显示,肝素治疗组 SI 及 ECM/肾小球面积(GA)均明显减低;电镜检查显示,肝素治疗组毛细血管腔通畅,基底膜改变及足突融合均较模型组明显减轻。**结论** 肝素对 FSGS 有一定的防治作用。

**【关键词】** 肝素; 肾小球硬化,局灶节段性

**中图分类号:**R692. 6;R965 **文献标识码:**A **文章编号:**1003 - 0603(2004)01 - 0026 - 03

## Experimental study on prevention and treatment of focal segmental glomerulosclerosis with heparin

ZHANG Bi - li \*, LI Zhi - jun, SONG Lan - yun, ZHOU Hong, WANG Wen - hong, ZHANG Xuan. \* Department of Nephrology, Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300074, China

**【Abstract】 Objective** To observe the preventive and therapeutic feasibility of heparin calcium injection in rats with focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). **Methods** Eighteen male Wistar rats were divided into three groups: normal control group (A, n=6), heparin - treated rats (B, n=6) and model group (C, n=6). Rat model of FSGS was constructed with low - dose adriamycin, metaraminol and high lipid feed method. Group B was treated with heparin. 24 - hour urinary protein was measured at the 0, 2nd, 4th, 6th and 12th week. Serum total protein, albumin,cholesterol, blood urea nitrogen(BUN) and serum creatinine (SCr) were determined at 0, 2nd, 6th and 12th week. Renal cortex blood flow was performed at the 12th week . Renal pathology changes were evaluated at the 12th week as well. **Results** 24 - hour urinary protein was decreased in heparin treatment group after 6th week. The serum cholesterol level in heparin treatment group was lower than that in model group at 12th week. Renal cortex blood flow was increased significantly in heparin - treated group. Glomerular sclerotic index (SI) and glomerular extracellular matrix (ECM)/glomerular area (GA) were decreased significantly in heparin treatment group . Electron microscopy revealed that there was no glomerular capillary cavities obstruction in heparin - treated group, basement membrane change and foot precesses fusion were markedly alleviated in comparison with model group. **Conclusion** Heparin may be play a valuable role in the prevention and treatment of FSGS.

**【Key words】** heparin; focal segmental glomerulosclerosis

**CLC number:**R692. 6;R965 **Document code:**A **Article ID:**1003 - 0603(2004)01 - 0026 - 03

局灶节段性肾小球硬化(FSGS)是一种常见的原发性肾小球疾病,在小儿肾脏疾病中发病率亦较高,目前尚无特殊治疗。本实验中通过给予 FSGS 模型大鼠肝素钙注射液治疗,以探讨其防治 FSGS 的可能性,为 FSGS 的临床应用提供一些实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料与分组:**雄性 Wistar 大鼠 18 只,体质量(170±15)g,鼠龄(45±5)d,由市卫生局实验动物

中心提供。大鼠随机分为正常对照组(A 组)、肝素治疗组(B 组)与模型组(C 组),每组各 6 只。B 组和 C 组于实验第 1 d 及第 22 d 时分别从尾静脉注射质量分数为 0.1%的阿霉素(深圳万乐药业有限公司提供)3 mg/kg 和 2 mg/kg,同时饲以含体积分数为 5%的胆固醇(中国科技开发院天象人生物工程有限责任公司提供)和 5%猪油的高脂饲料;每日肌肉注射间羟胺 0.2 mg/kg(天津市氨基酸公司提供),至实验结束。对照组则从尾静脉注射同等容积的生理盐水,自由摄食基础饲料。肝素治疗组于实验第 29 d 开始每日予肝素钙注射液(天津市生物化学制药厂提供)100 U/kg 皮下注射。

## 1.2 检测项目与方法:

基金项目:天津市卫生局科研基金资助项目(99KY023)

作者单位:300074 天津市儿童医院内科(张碧丽,宋兰云,周红,王文红,张喧);300192 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,主任医师,天津市肾病学会委员,已发表论文 20 余篇。

1.2.1 血、尿生化指标:动态观察各组大鼠注射阿霉素前(0 周)及注射后 2、4、6、12 周时 24 h 尿蛋白。测定各组大鼠 0、2、6、12 周血生化指标,包括血清中总蛋白(TP)、白蛋白(Alb)、胆固醇(Cho)、尿素氮(BUN)及肌酐(Cr)。

1.2.2 肾脏组织血流量:在实验第 12 周末,于处死大鼠前,用 RBF-Ⅱ型电解式组织血流仪(日本)分别测定各组每只大鼠肾脏组织血流量。

1.2.3 病理检查:

1.2.3.1 光镜检查:实验第 12 周末动物均被处死,取一侧肾组织,3 μm 切片,行高碘酸雪夫氏反应法(PAS)和苏木素-伊红(HE)染色,观察组织变化。并采用肾小球硬化指数(sclerotic index, SI)来评价肾小球硬化的程度<sup>[1]</sup>。运用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图像测量系统,在 400 倍下行病理图像分析,每个标本分别取 6 个大小相近的肾小球,分别测定肾小球面积(GA)、细胞外基质面积(ECM)及 ECM 与 GA 比值(ECM/GA)。

1.2.3.2 电镜检查:A 组及 B 组随机抽取 3 只大鼠, C 组 6 只大鼠全取,利用 H600-Ⅳ型透射电子显微镜进行观察。

1.3 统计学处理:采用 SPSS9.0 for Windows 统计软件处理数据,组间比较用方差分析和 *q* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 血、尿生化结果:

2.1.1 各组尿蛋白的变化:表 1 结果显示,实验第 4 周时(治疗开始前)肝素组与模型组尿蛋白排泄量与对照组相比均开始增加。肝素治疗组从 6 周时(即治疗开始后 2 周)尿蛋白排泄量开始降低,至第 12 周时肝素治疗组与模型组相比尿蛋白排泄量呈现显著降低(*P* < 0.001)。

表 1 各组 24 h 尿蛋白动态变化( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| Tab. 1 Dynamic change of 24-hour urinary protein in each group( $\bar{x} \pm s, n = 6$ ) mg/24 h |             |             |              |                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|--------------|----------------|
| 组别                                                                                               | 0 周         | 2 周         | 6 周          | 12 周           |
| A 组                                                                                              | 4.20 ± 0.82 | 4.92 ± 1.53 | 4.92 ± 2.90  | 5.82 ± 2.63    |
| B 组                                                                                              | 3.43 ± 1.70 | 7.70 ± 2.59 | 13.73 ± 3.89 | 19.23 ± 5.64   |
| C 组                                                                                              | 3.93 ± 0.72 | 8.00 ± 1.97 | 19.93 ± 7.75 | 216.63 ± 65.96 |
| F 值                                                                                              | 0.82        | 1.23        | 5.54**       | 51.11***       |
| q 值 A : B                                                                                        |             |             | 8.99**       | 16.76**        |
| A : C                                                                                            |             |             | 11.03**      | 36.48***       |
| B : C                                                                                            |             |             | 4.65*        | 31.03***       |

注: \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001

2.1.2 血清 TP 与 Alb 的变化:表 2 和表 3 结果显示,与正常对照组及肝素治疗组比较,12 周时模型

组 TP 及 Alb 均明显降低(*P* < 0.01 和 *P* < 0.05)。

表 2 各组血清中 TP 变化( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Tab. 2 Change of serum TP in each group( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| 组别        | 0 周          | 2 周          | 6 周          | 12 周         |
|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| A 组       | 74.06 ± 4.00 | 68.70 ± 4.74 | 75.96 ± 6.41 | 66.22 ± 2.01 |
| B 组       | 75.07 ± 2.93 | 66.38 ± 1.34 | 73.78 ± 2.26 | 63.88 ± 2.33 |
| C 组       | 75.97 ± 2.51 | 66.35 ± 3.24 | 73.52 ± 2.23 | 61.13 ± 1.69 |
| F 值       | 0.70         | 2.28         | 2.01         | 3.54*        |
| q 值 A : C |              |              |              | 5.50**       |
| B : C     |              |              |              | 4.11*        |

注: \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01

表 3 各组血清中 Alb 变化( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Tab. 3 Change of serum Alb in each group( $\bar{x} \pm s, n = 6$ ) g/L

| 组别        | 0 周          | 2 周          | 6 周          | 12 周         |
|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| A 组       | 35.50 ± 1.19 | 33.86 ± 2.24 | 36.86 ± 2.46 | 32.30 ± 0.75 |
| B 组       | 36.42 ± 1.00 | 33.22 ± 1.53 | 34.08 ± 0.85 | 30.80 ± 1.32 |
| C 组       | 36.30 ± 1.07 | 33.20 ± 1.23 | 30.67 ± 0.92 | 29.93 ± 0.82 |
| F 值       | 0.95         | 1.80         | 1.12         | 3.31*        |
| q 值 A : C |              |              |              | 6.47**       |
| B : C     |              |              |              | 4.32*        |

注: \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01

2.1.3 血清 Cr 与 BUN 结果:各组检测结果在实验的不同时期及各组间均无显著差异。

2.1.4 血清 Cho 变化:表 4 结果显示,实验 2 周时(治疗开始前)肝素组与模型组血清 Cho 均开始明显升高,12 周时肝素治疗组 Cho 升高的幅度低于模型组(*P* < 0.05)。

表 4 各组血清中 Cho 变化( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Tab. 4 Change of serum Cho in each group( $\bar{x} \pm s, n = 6$ ) mmol/L

| 组别        | 0 周         | 2 周         | 6 周         | 12 周        |
|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| A 组       | 1.34 ± 0.07 | 2.67 ± 0.91 | 2.75 ± 0.33 | 2.02 ± 0.19 |
| B 组       | 1.50 ± 0.25 | 4.73 ± 0.96 | 3.67 ± 0.69 | 3.45 ± 0.35 |
| C 组       | 1.23 ± 0.25 | 4.56 ± 0.84 | 4.34 ± 0.49 | 4.37 ± 0.57 |
| F 值       | 2.17        | 6.39***     | 4.66**      | 12.81***    |
| q 值 A : B |             | 3.69*       |             | 4.01*       |
| A : C     |             | 4.70*       | 6.22**      | 5.63**      |
| B : C     |             |             |             | 3.97*       |

注: \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001

2.2 肾脏组织血流量变化:A、B、C 组肾脏组织血流量分别为(29.94 ± 3.15)ml · min<sup>-1</sup> · 100 g<sup>-1</sup>、(23.26 ± 2.50)ml · min<sup>-1</sup> · 100 g<sup>-1</sup>和(16.62 ± 1.64)ml · min<sup>-1</sup> · 100 g<sup>-1</sup>。肝素治疗组肾脏组织血流量较模型组明显增加(*q* = 4.21, *P* < 0.05);而与对照组相比较,模型组肾脏组织血流量明显减少(*q* = 7.93, *P* < 0.01)。

2.3 肾脏病理改变:

2.3.1 光镜检查结果:A、B 及 C 3 组大鼠 SI 分别

为  $19.67 \pm 2.94$ 、 $143.33 \pm 10.93$  和  $173.33 \pm 4.32$ ，模型组明显高于肝素治疗组 ( $q = 7.51, P < 0.01$ )。表 5 结果显示，与对照组比较，模型组 ECM/GA 明显升高 ( $P < 0.001$ )，而肝素治疗组 ECM/GA 则明显低于模型组 ( $P < 0.001$ )。

表 5 各组大鼠 ECM/GA 结果比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Tab. 5 Comparison of ECM/GA among in each groups ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| 组别        | GA ( $\times 10^4 \mu m^2$ ) | ECM ( $\times 10^4 \mu m^2$ ) | ECM/GA (%)      |
|-----------|------------------------------|-------------------------------|-----------------|
| A 组       | $437.92 \pm 182.04$          | $0.17 \pm 0.10$               | $0.02 \pm 0.01$ |
| B 组       | $360.83 \pm 141.95$          | $0.63 \pm 0.92$               | $1.21 \pm 1.71$ |
| C 组       | $254.17 \pm 27.29$           | $84.61 \pm 9.19$              | $3.24 \pm 0.23$ |
| F 值       |                              |                               | 104.5***        |
| q 值 A : B |                              |                               | 28.06***        |
| A : C     |                              |                               | 53.47***        |
| B : C     |                              |                               | 30.91***        |

注：\*\*\*  $P < 0.001$

2.3.2 电镜检查结果：模型组大部分肾小球上皮细胞足突融合广泛，基底膜边缘不清，厚薄不均；毛细血管腔闭塞，其内可见有血浆样物质沉积；近端肾小管退行性变、坏死；近端肾小管基质增多，可见间质细胞增生，同时可见炎症细胞浸润。肝素治疗组可见毛细血管腔通畅，基底膜改变及上皮细胞足突融合的程度均较模型组明显减轻，未见炎症细胞浸润及间质细胞增生。

3 讨论

肝素具有人们所熟知的抗凝、抗血栓和促进纤溶的作用，并作为抗凝剂被广泛应用于医学多个领域<sup>[2-4]</sup>。本研究显示，与模型组相比，肝素治疗组尿蛋白排泄量减少，血胆固醇升高幅度减低，肾脏组织血流量明显增加，SI 与 ECM 均明显减低。提示肝素钙注射液可延缓 FSGS 的进展，对 FSGS 有一定的防治作用。肝素防治 FSGS 尚基于以下的药理作用。

3.1 调节细胞增殖与调节肾小球细胞外基质的代谢：小剂量肝素抑制系膜细胞和血管平滑肌细胞增殖，促进内皮细胞和成纤维细胞增殖，大剂量肝素也能抑制内皮细胞的增殖。体外试验结果证实：肝素对肾小球系膜细胞增生有明显抑制作用，随着剂量增加其抑制作用增强。肝素对不同细胞的不同调节作用对于促进创伤修复、防止过度增殖和 FSGS 可能具有重要意义<sup>[5]</sup>。实验研究发现，肝素还可抑制细胞外基质成分基因的表达，提高细胞外基质的分解酶活性以加速基质成分的降解，同时还能直接影响细胞外基质成分的组装和解聚，从而明显减轻肾小球系膜基质的增生，防止 FSGS 的形成<sup>[6-8]</sup>。

目前研究认为，ECM 的过度积聚是 FSGS 的重要标志。肝素治疗组 ECM/GA 明显低于模型组，提示肝素可从组织学上延缓 FSGS 的进展。

3.2 扩张血管与降压作用：肝素具有扩张血管和降低血压的作用<sup>[5]</sup>，从而拮抗 FSGS 持续进展的主要启动因素之一高血压，防止产生 FSGS。

3.3 对脂代谢的影响：肝素可以促进脂蛋白脂酶的释放和保护其活性，因而可以降低血脂<sup>[5]</sup>，从而缓解肾小球硬化的进展。本研究中治疗组胆固醇升高的幅度低于模型组，为较理想的结果。

3.4 抗炎作用：模型组病理结果提示有明显的炎症反应，而肝素治疗组未见炎症细胞浸润。研究显示，肝素能降低炎症细胞活性，如能与单核细胞结合，诱导细胞表型转化，降低单核细胞介导的细胞促凝活性；能抑制中性粒细胞产生超氧阴离子及细胞内酶，如组织蛋白酶 G、N-乙酰葡萄糖苷酶和弹性蛋白酶；肝素还抑制系膜细胞分泌白细胞介素-6 (IL-6)，促进内皮细胞释放超氧化物歧化酶，抑制内皮细胞表达单核细胞趋化蛋白-1。肝素还可以与硫酸类肝素反应性核小体抗原-抗体复合物相互作用，阻止这些免疫复合物与肾小球基底膜结合，并延缓和减轻肾脏病变的进展，减少蛋白尿的排泄，防止发生 FSGS<sup>[5,9]</sup>。

参考文献：

1 Raj L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats [J]. Kidney Int, 1984, 26: 137.

2 朱宁, 杜显峰. 两种低分子肝素和肝素钙在血液透析中抗凝效果对比研究 [J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(1): 34-36.

3 陈金良, 傅向华, 马宁, 等. 溶栓前肝素治疗对急性心肌梗死后左室重构的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(3): 164-166.

4 何艳燕, 潘伟, 宋红梅, 等. 肝素预防过敏性紫癜性肾炎肾损害的临床随机对照研究 [J]. 中华儿科杂志, 2002, 40(2): 99-102.

5 陈香美, 徐启河. 肝素治疗肾小球疾病的机理研究进展 [J]. 中华肾脏病杂志, 1998, 14(5): 331-333.

6 Striker L J, Peten E P, Elliot S J, et al. Mesangial cells turnover: effect of heparin and peptide growth factors [J]. Lab Invest, 1991, 64: 446-456.

7 张洁, 湛怡璞, 李美花, 等. 低分子量肝素对肾小球系膜细胞及细胞外基质作用的研究 [J]. 中华肾脏病杂志, 2001, 17 (1): 27-30.

8 Floege J F, Eng E, Young B A, et al. Heparin suppresses expansion in experiment mesangioproliferation [J]. Kidney Int, 1993, 43: 369-370.

9 Burg M, Ostendorf T, Mooney A, et al. Treatment of experimental mesangialproliferative glomerulonephritis with non-anticoagulant heparin; therapeutic efficacy and safety [J]. Lab Invest, 1997, 76: 505-516.

(收稿日期: 2003-11-19 修回日期: 2003-12-17)

(本文编辑: 李银平)