

1,25-二羟维生素D₃对大鼠肾间质纤维化的作用研究

荣智利, 张旭, 张翠薇, 高岑, 江燕, 马跃荣
泸州医学院病理教研室, 四川泸州 646000

[摘要] 目的: 研究1,25-二羟维生素D₃[1,25-(OH)₂D₃]对单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠肾间质纤维化的影响。方法: 45只大鼠随机分为假手术组($n=15$)、UUO组($n=15$)和1,25-(OH)₂D₃干预组($n=15$),建立UUO大鼠肾间质纤维化模型,干预组于术后第1天起每天腹腔注射1,25-(OH)₂D₃,假手术组及UUO组腹腔注射等量生理盐水。分别于术后第3天、第7天和第14天处死大鼠,每次5只,取梗阻侧肾脏行HE、Masson染色及 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)免疫组化标记,观察肾损伤程度和肾间质纤维化程度;取血测定肌酐和尿素氮水平观察肾功能;处死前1天收集24h尿液,检测尿中蛋白含量。结果:与假手术组相比,UUO组和干预组各时间点HE、Masson染色和 α -SMA表达变化明显,呈逐渐加重趋势,差异有统计学意义($P<0.05$);肌酐、尿素氮及24h尿蛋白含量术后第3和第7天时表现为升高,术后第14天时出现下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。与UUO组相比,干预组各时间点各项指标变化明显改善,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:1,25-(OH)₂D₃可抑制UUO大鼠肾间质纤维化进程,改善肾功能。

[关键词] 1,25-二羟维生素D₃;单侧输尿管梗阻;肾间质纤维化

[中图分类号] R692.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-7210(2012)01(a)-018-04

The effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ on interstitial fibrosis to kidney after unilateral ureteral obstruction in rats

RONG Zhili, ZHANG Xu, ZHANG Cuiwei, GAO Ceng, JIANG Yan, MA Yuerong

Institute of Nephrology, Luzhou Medical College, Sichuan Province, Luzhou 646000, China

[Abstract] Objective: To investigate the effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25-(OH)₂D₃] on interstitial fibrosis to kidney after unilateral ureteral obstruction (UUO) in rats. **Methods:** 45 rats were randomly divided in to 3 groups: sham operated group ($n=15$) which was given 1, 25-(OH)₂D₃ by intraperitoneal injection one day on post operative every day, UUO group ($n=15$) and 1, 25-(OH)₂D₃ treatment group ($n=15$) which were all given normal saline by intraperitoneal injection equivalently. They were sacrificed at the 3rd, 7th and 14th days respectively after UUO, every time for only 5. Interstitial fibrosis of obstructed kidney was graded according to HE and Masson staining. The expression of α -SMA was examined by immunohistochemistry. The samples blood were collected to detect the concentration blood serum creatinine and blood urea nitrogen. Daily urinary protein were determined in these rats one day before sacrificed. **Results:** The degree of interstitial impairment and fibrosis of obstructed kidney and the expression of α -SMA in the UUO group and treatment group were significantly higher than those in the sham operated group (all $P<0.05$). The blood serum creatinine, blood urea nitrogen and daily urinary protein in the UUO group and treatment group were increased at the 3rd and 7th days after UUO, but they were decreased at the 14th day (all $P<0.05$). Compared with UUO group, all which in treatment group were significantly decreased (all $P<0.05$). **Conclusion:** 1, 25-(OH)₂D₃ can alleviate interstitial fibrosis and renal function in rats after UUO.

[Key words] 1, 25-dihydroxyvitamin D₃; Unilateral ureteral obstruction; Renal interstitial fibrosis

肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)是一个多步骤、连续的动态过程,是各种慢性肾脏疾病发展至终末期的共同通路和主要病理改变^[1],其变化的程度和范围决定了肾功能的恶化程度^[2-4]。单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)大鼠是一种经典的 RIF 动物模型,既可短期

内致使肾间质纤维化,模拟慢性肾病时肾间质的病理表现,又可使病变局限在肾小管和肾间质,不引起肾小球及其他组织的损伤^[5]。近期研究显示,1,25-二羟维生素D₃[1,25-dihydroxyvitamin D₃, 1,25-(OH)₂D₃]主要通过与其特异性受体结合发挥经典的骨盐调节作用,并参与免疫调节、调控激素分泌和细胞有丝分裂、抑制细胞增殖、分化及凋亡等过程^[6]。1,25-(OH)₂D₃受体可选择性表达于肾脏的近曲小管、远曲小管、集合管和髓袢升支^[7],但其是否在 RIF 形成过程中发挥作用不详。本研究利用 1,25-(OH)₂D₃干预 UUO 大鼠,观察其对 RIF 形成有无影响,以探讨其在 RIF 过程中的作用。

[基金项目] 四川省教育厅自然科学资助项目(项目编号:07ZA038);四川省卫生厅自然科学资助项目(项目编号:80173)。

[作者简介] 荣智利(1986-),女,病理学与病理生理学专业 2009 级在读硕士研究生;研究方向:肾脏病理。

[通讯作者] 马跃荣(1956-),男,硕士研究生,教授;研究方向:肾脏病理。

1 仪器与试剂

1.1 实验动物

雄性SD大鼠,45只,8周龄,体重(200±20)g,购自泸州医学院医学实验动物中心。

1.2 药物和主要试剂

1,25-(OH)₂D₃(Roche公司,美国),兔抗大鼠α-SMA多克隆抗体(Santa Cruz公司,美国),尿蛋白双缩脲试剂盒(Amresco公司,美国)。

2 方法与结果

2.1 实验方法

2.1.1 实验动物分组及处置 45只SD大鼠随机均分为假手术组、UUO组和1,25-(OH)₂D₃干预组,每组各15只。采用单侧输尿管结扎建立UUO大鼠模型^[8]。1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,局部剃毛和常规消毒铺巾,选腹正中切口依次切开皮肤至腹腔,游离肾脏及输尿管,分别在左侧输尿管近肾盂处和输尿管上1/3处用1-0丝线两次结扎,剪断输尿管,然后逐层连续缝合皮肤。假手术组进入腹腔后仅游离肾脏和输尿管而不结扎离断,余手术方式与UUO组相同。干预组于术后第1天起每天腹腔注射30 ng/(kg·d)的1,25-(OH)₂D₃^[9],假手术组及UUO组每天腹腔注射等量生理盐水。分别于术后第3、7和14天处死大鼠,每次5只,取梗阻侧肾脏测量其大小及形态,固定包埋后,制片行HE、Masson和α-SMA染色;开胸经心脏取血检测肌酐和尿素氮水平;各组大鼠于处死前1天收集24 h尿液,检测尿蛋白含量。

2.1.2 肾脏病理检查 每张HE、Masson和α-SMA切片随机选取10个不重复视野(×200,HPF),组内求和取其平均值作为每组最终数据。**①HE染色判定肾间质损伤及纤维化程度:** HE切片依据Radford^[10]标准设定8个参数指标(肾小管扩张、小管萎缩、小管上皮细胞空泡变性、间质水肿、间质炎细胞浸润、间质纤维化程度、红细胞管型、蛋白管型),每个参数按0~3分评定(0分,正常;1分,轻度受损,病变范围<15%;2分,中度受损,病变范围15%~50%;3分,重度受损,病变范围>50%),由两个观察者盲法评分取其平均值,每个样本的评分为0~24分。**②Masson染色判定纤维化程度:** Masson染色是用于显示组织中纤维的一种染色方法,染色切片中胶原纤维呈绿色,肌肉、纤维素和红细胞均呈红色,细胞核呈蓝色,正常肾组织中仅肾小管基底膜染成绿色。RIF进程中胶原纤维逐步取代正常肾单位,肾实质萎缩减少。本实验通过对胶原纤维染色,运用Image Pro Plus 6.0图像分析软件计算镜下绿染面积占整个视野的百分比,以了解受损肾脏的纤维化程度。**③α-SMA免疫组化染色:** 在本实验中α-SMA用于标记肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB),其阳性信号为细胞浆呈现棕黄色颗粒。运用Image Pro Plus 6.0图像分析软件计算染色阳性细胞的积分光密度值(指将阳性细胞内染色量化为综合面积和灰度值所得到的结果,其值越大,提示抗原表达水平越高,反之亦然)。

2.1.3 肾功能检测 采血后3 000 r/min离心分离血清,于日本7180型全自动生化分析仪上检测血肌酐、尿素氮水平(此血生化检查由泸州医学院附属医院检验科协助完成);根据尿蛋白双缩脲试剂盒的操作说明,检测24 h尿蛋白含量。

2.1.4 统计学方法

用SPSS 17.0统计软件进行统计学处理,所有数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间计量资料比较用单因素方差分析(One-way ANOVA test),两两比较采用Dunnett-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.2 肾脏病理学改变结果

2.2.1 肉眼病理改变 假手术组患侧肾脏大小形态正常;UUO组和干预组梗阻侧肾脏均明显肿大,颜色变浅,表面张力增加,有尿液潴留,切面肾实质变薄,肾盂肾盏扩张,皮髓质分界不清,肾乳头缺血萎缩,并随着时间的延长而加重,以UUO组病变更为明显。

2.2.2 光镜下病理改变 **①HE切片**假手术组各时间点肾组织无明显改变。UUO组术后第3天肾小管轻度少量扩张,上皮细胞浊肿变性,肾间质轻度水肿,伴炎细胞局灶性浸润;术后第7天,肾小管进一步扩张,以皮髓交界处尤为明显,上皮细胞空泡变性,管腔内见细胞或蛋白,伴炎细胞弥漫性浸润和部分小管间质轻度纤维化;术后第14天,皮髓质变薄,小管扩张明显,甚至扩张呈囊性,部分管腔塌陷,上皮细胞空泡变性显著,出现大量坏死,间质内巨噬细胞、淋巴细胞弥漫性浸润和成纤维细胞增生及胶原形成,纤维化明显,各时间点肾间质评分差异明显,有统计学意义($P < 0.05$)。**②Masson切片**显示假手术组绿染区域主要位于小管基底膜及其周围,小管间质几乎无染色。术后第3天,UUO组皮髓交界区出现轻度纤维化,并随着梗阻时间的延长绿染面积扩大,表现为肾间质进行性增宽,胶原纤维增加,染色加深,各时间点绿染面积所占百分比比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**③假手术组α-SMA**仅表达于血管平滑肌细胞,肾小球、肾小管及间质均未见表达。UUO组术后第3天可见肾间质内α-SMA少量表达;术后第7天肾小管上皮细胞出现阳性表达,皮髓交界处出现轻微纤维化;术后第14天表达达到高峰,皮质区和皮髓交界区明显,各时间点α-SMA的累积光密度值(IOD)比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**④干预组与假手术组相比**,各时间点各项指标明显增高;而较之UUO组,各时间点各项指标明显改善,其肾损伤、间质纤维化程度及α-SMA阳性率明显改善,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1、图1。

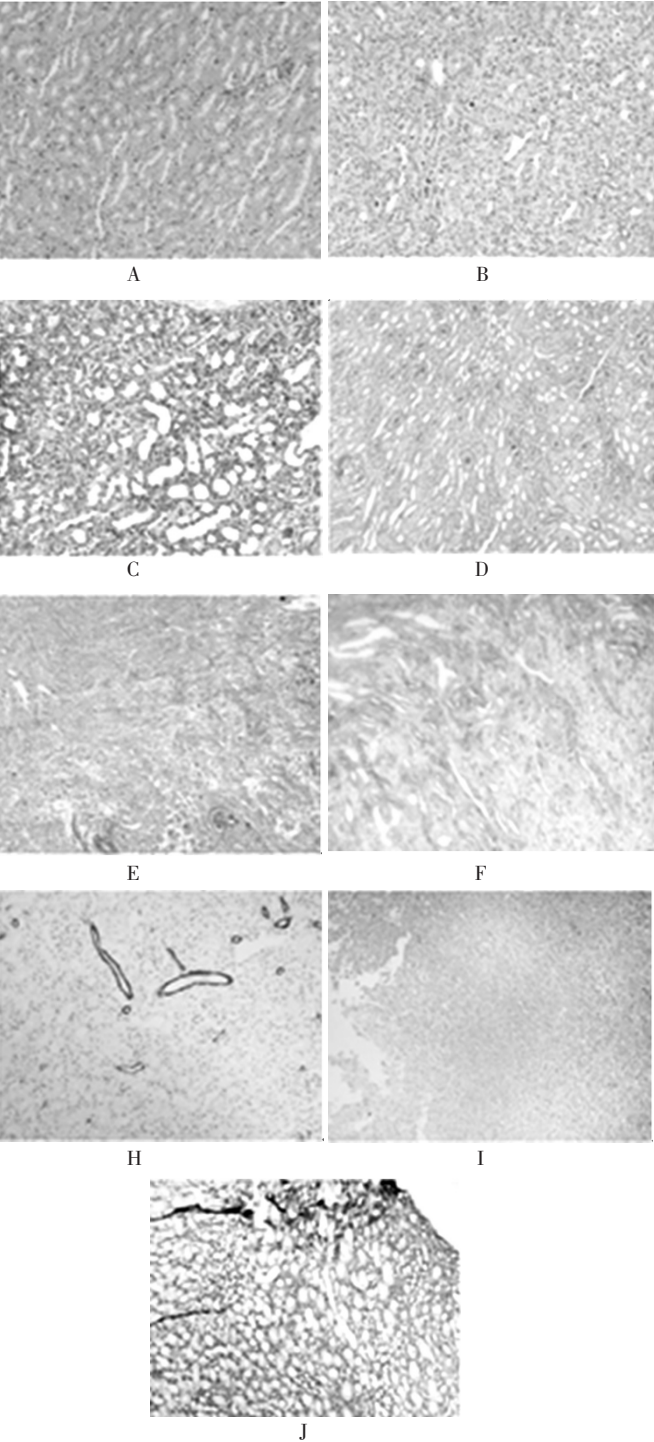
表1 各组大鼠不同时间点光镜下病理改变($\bar{x} \pm s, n=5$)

检查指标	组别	动物处死时间		
		第3天	第7天	第14天
HE 肾间质	假手术组	1.20±0.84	1.20±0.45	1.00±0.71
损伤评分(分)	UUO组	4.40±1.14 ^a	13.60±2.51 ^{ac}	19.80±1.48 ^{acd}
	干预组	2.80±0.85 ^{ab}	9.60±1.14 ^{abc}	14.20±1.30 ^{abcd}
Masson 绿染面积	假手术组	3.21±0.33	3.26±0.40	3.37±0.47
百分比(%)	UUO组	5.39±0.61 ^a	12.14±1.57 ^{ac}	47.19±2.86 ^{acd}
	干预组	3.98±0.14 ^{ab}	3.98±0.14 ^{abc}	31.59±2.36 ^{abcd}
α-SMA 的 IOD 值	假手术组	197.65±0.87	199.29±3.26	198.23±1.50
	UUO组	433.91±23.08 ^a	656.55±23.47 ^{ac}	856.00±21.15 ^{acd}
	干预组	325.92±20.28 ^{ab}	461.98±21.93 ^{abc}	595.54±6.75 ^{abcd}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与UUO组比较,^b $P < 0.05$;与第3天比较,^c $P < 0.05$;与第7天比较,^d $P < 0.05$

2.3 各组肾功能比较结果

与假手术组相比,术后第3、7和14天UUO组与干预组



A.假手术组 HE 染色;B.UUO 组 HE 染色;C.处理组 HE 染色;D.假手术组 Masson;E.UUO 组 Masson;F.处理组 Masson;H.假手术组 α -SMA 染色; I.UUO 组 α -SMA 染色;J.处理组 α -SMA 染色
图 1 各组大鼠第 14 天肾脏 HE、Masson、 α -SMA 染色比较($\times 200$)

肌酐、尿素氮及 24 h 尿蛋白含量均明显高于假手术组,差异有统计学意义(均 $P<0.05$),其中第 3、7 天各指标呈现上升趋势,第 14 天时表现为下降;与 UUO 组相比,干预组各时间点各项指标明显改善,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);而假手术组术后各时间点各项指标差异不明显,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠不同时间点肾功能变化($\bar{x}\pm s,n=5$)

检查指标	组别	动物处死时间		
		第 3 天	第 7 天	第 14 天
血肌酐($\mu\text{mol/L}$)	假手术组	36.60 $\pm$ 0.99	37.10 $\pm$ 0.62	36.94 $\pm$ 0.92
	UUO 组	77.46 $\pm$ 0.98 ^a	148.48 $\pm$ 7.49 ^a	69.82 $\pm$ 0.98 ^a
	干预组	54.42 $\pm$ 0.60 ^{ab}	83.10 $\pm$ 0.77 ^{ab}	52.36 $\pm$ 0.69 ^{ab}
尿素氮(mmol/L)	假手术组	4.98 $\pm$ 0.29	5.04 $\pm$ 0.26	5.04 $\pm$ 0.13
	UUO 组	5.04 $\pm$ 0.26	18.16 $\pm$ 0.36 ^a	10.02 $\pm$ 0.23 ^a
	干预组	7.34 $\pm$ 0.17 ^{ab}	11.22 $\pm$ 0.36 ^{ab}	8.96 $\pm$ 0.27 ^{ab}
24 h 尿蛋白 (mg/24 h)	假手术组	11.64 $\pm$ 0.38	11.56 $\pm$ 0.18	11.58 $\pm$ 0.19
	UUO 组	13.00 $\pm$ 0.24 ^a	23.56 $\pm$ 0.47 ^a	15.94 $\pm$ 0.34 ^a
	干预组	12.52 $\pm$ 0.39 ^{ab}	16.98 $\pm$ 0.47 ^{ab}	13.48 $\pm$ 0.43 ^{ab}

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与 UUO 组比较,^b $P<0.05$

3 讨论

RIF 发生机制错综复杂,可概括为细胞外基质增多、肾小管上皮细胞转分化(epithelial mesenchymal transition,EMT)和多种细胞因子及血管活性物质的激活与相互作用。近年研究表明,MFB 的激活是 RIF 形成的关键^[11],而其中 1/3 的 MFB 由 EMT 而来^[12],这种 EMT 的细胞过度增殖,可分泌多种细胞因子致使细胞外基质合成与降解失衡,最终导致 RIF 的发生。RIF 的病理过程是由病变初期的炎症细胞浸润,继而 EMT 发生和肾间质成纤维细胞活化增殖,共同产生大量细胞外基质并发生沉积,最后肾小管萎缩消失,小管间质纤维化^[4]。正常成熟的肾小管上皮细胞表达角蛋白,肾间质细胞表达波形蛋白,均无 α -SMA 的表达;而 MFB 是成纤维细胞的活化形式,胞浆内含肌动蛋白,可表达 α -SMA。MFB 广泛存在于纤维化肾组织中,因此 α -SMA 作为 MFB 的重要标志,可指示 RIF 的病理进程^[13]。而 RIF 又与肾功能关系密切,可作为准确预测肾功能恶化程度的指标^[3]。UUO 模型是目前研究 RIF 最常用的较成熟模型,具有无高血压、蛋白尿、血脂异常及毒性损害等特点,适合 RIF 病理机制和防治的研究^[5]。1,25-(OH)₂D₃ 主要通过与其受体结合发挥其多样生物学作用,如参与维持钙磷平衡;与其他转录因子相互作用,影响基因转录;与其他激素、生长因子及细胞因子等相互作用,参与联系多个信号传导途径,从而发挥复杂而精细的调节作用。有研究表明,肾功能降低与血清中 1,25-(OH)₂D₃ 的减少呈正比关系^[14]。这就说明 1,25-(OH)₂D₃ 可通过某些途径对肾功能起保护作用,减缓肾脏的病理改变。

本实验结果显示,随着时间延长,UUO 组肾间质损伤和纤维化程度逐渐加重, α -SMA 标记阳性的 MFB 逐渐增多;至术后第 14 天,肾间质纤维化明显, α -SMA 表达达到高峰。而肌酐、尿素氮和 24 h 尿蛋白水平于术后第 3、7 天与梗阻侧肾脏损伤相平行,各项指标明显升高;至第 14 天,各项指标明显改善,这可能与实验所取血液为全身血液,而此时健侧肾脏发挥了全面代偿作用有关。干预组与 UUO 组各时间点相比,干预组各项指标改善明显。另有体外实验证明,1,25-(OH)₂D₃ 能抑制转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 ,TGF- β_1)诱发的 α -SMA 表达,并呈剂量依从关系^[15]。TGF- β_1 是目前已知最强烈的促纤维化因子,可诱导 EMT 和成纤维细胞活化;而 1,25-(OH)₂D₃ 的体内信号传导途径与 TGF- β_1 存在有广泛交互的作用^[16]。1,25-(OH)₂D₃ 在 RIF 中

发挥保护作用的可能机制是通过拮抗 TGF- β_1 诱导的 EMT 和减少蛋白尿而实现的。

RIF 是一个多因子参与、多路径调控的复杂病理过程,其机制还有待进一步的研究。本研究对 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ 在 RIF 中所起的干预作用作了初步探讨,为进一步研究 RIF 发病机制及寻找治疗方法提供了一定证据和思路。

[参考文献]

- [1] Rohle A, Muller GA, Wehrmann M, et al. Pathogenesis of chronic renal failure in the primary glomerulopathies, renal vasculopathies, and chronic interstitial [J]. Kidney Int,1996,49(Suppl 54):S2-S9.
- [2] Gilbert RE, Cooper ME. The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease:more than all aftermath of glomerular injury [J]. Kidney Int,1999,56(5):1627-1637.
- [3] Phillips AO, Steadman R. Diabetic nephropathy: the central role of renal proximal tubular cells in tubulointerstitial injury [J]. Histol Histopath, 2002,17(1):247-252.
- [4] Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis [J]. Pediatr Nephrol,2000,15 (34):290-301.
- [5] Kawada N, Moyama T, Ando A, et al. Increased oxidative stress in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction [J]. Kidney Int,1999,56 (3):1004-1013.
- [6] Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2005,289(7):8-28.
- [7] Lanting L, May N, Anthony ML, et al. Vitamin D receptor gene expression in mammalian kidney [J]. J Am Soc Nephrol,1994,5(5):1251-1258.
- [8] 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(1):96-107.
- [9] Schwarz U, Amann K, Orth SR, et al. Effect of 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ on glomerulosclerosis in subtotaly nephrectomized rats [J]. Kidney Int,1998,53(6):1696-1705.
- [10] Radford MG, Donadio JV, Bergstralh EJ, et al. Predicting renal outcome in IgA nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol,1997,8(2):199-207.
- [11] Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism and therapeutic intervention [J]. J Am Soc Nephrol,2004,15(1):1-12.
- [12] Iwano M, Plith D, Danoff TM, et al. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis [J]. Clin Invest,2002,110(3):341-350.
- [13] Kuhlmann A, Haas CS, Gross ML, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$ decreases podocyte loss and podocyte hypertrophy in the subtotaly nephrectomized rat [J]. Am J Physiol,2004,286(3):F526-F533.
- [14] Ishimura E, Nishizawa Y, Inaba M, et al. Serum levels of 1,25-dihydroxyvitamin D, 24,25-dihydroxyvitamin D and 25-hydroxyvitamin D in nondialyzed patients with chronic renal failure [J]. Kidney Int,1999,55 (3):1019-1027.
- [15] Li YC, Kong J, Wei M, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$ is a negative endocrine regulator of the rennin-angiotensin system [J]. J Clin Invest, 2002,110(2):229-238.
- [16] Nanthakumar S, Gary ML, Terrie A C, et al. Cross-talk between 1, 25 -dihydroxyvitamin D $_3$ and transforming growth factor- β signaling requires binding of VDR and smad 3 proteins to their cognate DNA recognition elements [J]. J Biol Chem,2001,276(19):15741-15746.

(收稿日期:2011-09-05)

2012 年紫禁城国际药师论坛征文通知

“2012 紫禁城国际药师论坛”即将于 2012 年 5 月 11 日~14 日在北京国际会议中心召开,本届论坛由中日医学科技交流协会、日本病院药剂师协会、美国卫生系统药师协会及《药品评价》杂志社共同发起,坚持以“携手实践”为核心主题,围绕“安全用药风险、管理与实践”展开研讨。

征文主题:

- | | |
|-------------------|------------------|
| 1.安全用药风险、管理与实践 | 2.抗感染药物的风险与管理 |
| 3.信息化与用药风险管理 | 4.TDM、基因组学与个体化用药 |
| 5.合理用药科普教育 | 6.注射剂安全用药与风险管理 |
| 7.药学院教育、继续教育及评估工具 | 8.人文话题:沟通 & 伦理 |
| 9.慢性病用药安全与管理 | 10.药物安全性评价与风险管理 |

征文要求:

1. 提交的论文应包含 500~800 字的中、英文摘要;
2. 每位参会代表限交 3 篇以内科研论文、专题报告或综述,每篇字数控制在 3000~5000 字以内,统一采用 Word 文档编辑,文责自负;
3. 提交论文同时需提交中文和英文版个人简历;
4. 经专家评选出的论文将推荐用于大会报告和壁报交流,其他论文将作为会议光盘资料;
5. 为便于及时联络,提交论文时请务必填写通信作者邮箱、办公室电话和手机号码;
6. 征稿邮箱:fcpf2012@163.com
7. 截止日期:2012 年 03 月 02 日

联系方式:

联系人:杜兆华 电 话:010-5710 8106 网 址:www.ejpif.org
地 址:北京市宣武区广安门内大街 208 号信恒大厦 B 座 319 室(100053)