

## 血浆凝血酶敏感蛋白-1 在肾间质纤维化中的表达

夏运成, 聂静, 李志兰, 孙林, 刘映红, 凌光辉, 彭佑铭, 刘伏友

(中南大学湘雅二医院肾内科, 中南大学肾脏病研究所,  
肾脏病与血液净化学湖南省重点实验室, 长沙 410011)

**[摘要]** 目的:观察不同时间点血浆凝血酶敏感蛋白-1(TSP-1)在蛋白超负荷肾病大鼠中的表达,分析其与肾小管间质纤维化的关系。方法:45只雄性SD大鼠右肾切除后,随机分成牛血清白蛋白(BSA)组和对照组,BSA组大鼠予以腹腔注射牛血清白蛋白,对照组注射生理盐水。分别在第1,5,9周末,检测血常规及生化指标,各时相尿蛋白定量;肾组织行光镜、免疫荧光及电镜检查。采用免疫印迹法检测血浆TSP-1蛋白表达。分析血浆TSP-1表达与肾小管间质病理损害积分之间的相关性。结果:BSA组大鼠24h尿蛋白定量和肾功能均较对照组有明显差异;肾小管间质病理积分和肾小球硬化指数明显增高;IgG荧光强度明显高于对照组;与对照组比较,BSA组大鼠血浆TSP-1蛋白均明显增高。BSA组血浆TSP-1的蛋白表达水平与肾小管间质病理积分呈正相关( $r=0.836, P<0.01$ )。结论:血浆TSP-1与肾间质纤维化呈正相关,血浆TSP-1可能是临床判断肾间质纤维化程度的重要指标。

**[关键词]** 凝血酶敏感蛋白-1; 蛋白尿; 肾间质纤维化

**[中图分类号]** R692.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2009)08-0796-07

## Expression of plasma thrombospondin-1 in renal interstitial fibrosis

XIA Yuncheng, NIE Jing, LI Zhilan, SUN Lin, LIU Yinhong,  
LING Guanghui, PENG Youmin, LIU Fuyou

(Department of Nephrology, Second Xiangya Hospital, Central South University; Institute  
of Nephrology, Central South University; Center of Kidney Disease and Dialysis  
in Hunan Province, Changsha 410011, China)

**Abstract:** **Objective** To observe the expression of plasma thrombospondin-1 (TSP-1) at different time in protein-overload rats and to analyze the relationship between plasma TSP-1 expression and renal interstitial fibrosis. **Methods** Forty-five male Sprague-Dawley rats were randomly divided into a bovine serum albumin (BSA) group and a control group after uninephrectomization. Rats with protein overload nephropathy induced by intraperitoneally injected BSA were used as a model (control group received saline). At the 1st, 5th, and 9th weekend, the level of 24 h proteinuria and renal function was assessed. Pathological changes were observed by electron and fluorescent microscopy. The expression of plasma TSP-1 was detected by Western blot. The relationship between plasma TSP-1 and tubulointerstitial lesions (TIL) score was analyzed. **Results** Twenty-four hour proteinuria and blood urea nitrogen (BUN) significantly increased in protein-overload rats compared with those in the

收稿日期 (Date of reception) 2009-05-13

作者简介 (Biography) 夏运成, 硕士, 高级实验师, 主要从事肾脏疾病的实验研究。聂静、李志兰为本文并列第一作者。

通讯作者 (Corresponding author) 刘伏友, E-mail: lfy410@yahoo.com.cn

基金项目 (Foundation item) 湖南省自然科学基金(06JJ4020)。 This work was supported by the Nature Science Foundation of Hunan, P. R. China (06JJ4020).

control group. While protein-overload rats developed more severe fibrosis in the tubular and interstitium. Glomerulosclerosis index and TIL score were upregulated compared with those in the control group. The expression of TSP-1 increased significantly at the 5th and 9th weekend. The expression of TSP-1 was positively correlated with TIL score ( $r = 0.836, P < 0.01$ ). **Conclusion** Plasma TSP-1 expression is positively correlated with renal interstitial fibrosis in protein-overload rats. Plasma TSP-1 may be used for an important biomarker of renal interstitial fibrosis.

**Key words:** thrombospondin-1; proteinuria; renal interstitial fibrosis

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2009, 34(8):0796-07]

蛋白尿是多种肾脏疾病的重要临床特征。在正常生理情况下,肾小球滤过膜具有分子屏障及电荷屏障作用,当这些屏障受损时,肾小球滤过膜对血浆蛋白的通透性增加,致使原尿中蛋白含量增多,当远超过近曲小管回吸收量时,形成大量蛋白尿。而持续大量蛋白尿本身又是引起肾实质细胞不可逆损伤的重要因素之一,使其被纤维组织侵袭替代,最终导致肾小球硬化和肾间质纤维化<sup>[1]</sup>。目前判断肾间质纤维化主要依靠病理形态学指标,尚缺乏特异性强、敏感性高的血清学指标。近年来,有关微血管病变在肾纤维化中的作用成为了研究热点。在残肾大鼠模型中,肾组织凝血酶敏感蛋白-1(TSP-1)高表达促进了肾纤维化的进展<sup>[2]</sup>。但关于血浆 TSP-1 与肾间质纤维化的关系尚无报道。本研究以蛋白超负荷肾病大鼠为实验模型,观察不同时间点血浆 TSP-1 的水平以及它与肾间质纤维化的关系,为临床判断肾脏损伤提供参考指标。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物、主要试剂和仪器

健康成年雄性 SD 大鼠 45 只,体质量 200 ~ 220 g(中南大学湘雅二医院实验动物中心提供);牛血清白蛋白(BSA)为美国 Proliant 公司产品;大鼠 VEGF ELISA 试剂盒购自中国武汉博士德公司;TSP-1 Ab-2 小鼠单克隆抗体为美国 Lab Vision 公司产品;全自动生化分析仪购自日本 Hitachi 公司;切片机为德国 Leica 公司产品;光学显微镜为日本 Olympus 公司产品;日立 H-7500 型透射显微镜购自日本 Hitachi 公司。

### 1.2 动物模型的建立及分组

参照 Eddy 等<sup>[3]</sup>的方法构建蛋白超负荷肾病大鼠模型。步骤如下:SD 大鼠适应性喂养 1 周,然后以 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,背侧切口行右肾切除术。术后 1 周随机分为 BSA 组 30

只,对照组 15 只。BSA 组第 1 周注射方法:予以腹腔注射 BSA(用生理盐水将 BSA 粉末配成 0.33 g/mL 溶液)。首次剂量为 1 mL/d,逐步加大剂量,至第 5 天加至 3.3 mL/d。将第 1 周末所测 24 h 尿蛋白定量大于 8 mg 的大鼠设为阳性,BSA 组第 2 周开始,腹腔注射 BSA 5 g/(kg·d),每周连续 5 天,共 9 周。对照组 15 只,右肾切除术后腹腔注射等量生理盐水,每周连续 5 天,共 9 周。

### 1.3 24 h 尿蛋白定量及肾功能指标

分别于第 1, 5, 9 周末随机取模型组大鼠 10 只和对照组 5 只,取血、检测 24 h 尿及肾功能相关指标。全自动生化分析仪检测 24 h 尿蛋白定量、血尿素氮和肌酐。肌酐清除率( $C_{Cr}$ ) = 尿肌酐/血肌酐 × 尿量。

### 1.4 肾组织光镜检查 and 损伤评分

各组取肾组织,常规切片,过碘酸六胺银-Masson(PASM-Masson)染色,光镜下观察,免疫复合物呈红色。肾小管间质病理损害积分(TIL 积分)根据肾小管(萎缩、管形和肥大)及间质病变(纤维化和炎症)的严重程度分为:0 分,无病变;1 分,病变区域达 25%;2 分,病变区域为 25% ~ 50%;3 分,病变区域为 50% ~ 75%;4 分,病变区域 > 75%。参照 Zhang 等<sup>[4]</sup>的方法评估肾小球硬化指数,以此表示肾小球病变的严重程度。

### 1.5 免疫荧光检查

各组取肾组织,常规冰冻切片,冷丙酮固定,滴加 FITC 荧光标记抗大鼠 IgG 多抗(1:50),室温孵育 45 min 后镜检并拍照。荧光强度表示:(-)无荧光;(±)高倍镜下似乎可见;(+)低倍镜下似乎可见,高倍镜下明显可见;(++)低倍镜下明显可见,高倍镜下清晰可见;(+++ )低倍镜下清晰可见,高倍镜下耀眼;(++++ )低倍镜下耀眼,高倍镜下刺眼。

### 1.6 电镜检查

每组随机选取 3 例肾组织标本,经 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸固定,脱水,常规包埋、修块、切

片,醋酸铀及硝酸铅双重染色,透射电镜下观察肾组织超微结构并拍照。

### 1.7 Western 印迹法测定血浆 TSP-1 蛋白表达

参照 Volpert 等<sup>[5]</sup>的方法测定血浆 TSP-1 的表达。腹主动脉采血,取全血浆层,加入 Triton 4 ℃ 静置 10 min,离心后取上清。全自动生化分析仪测定蛋白浓度;取总蛋白 40 μg,在 8% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 中电泳后转膜。封闭、洗膜后加入抗 TSP-1 的一抗进行杂交(浓度为 1:100),4 ℃ 过夜。加二抗进行杂交,室温孵育 1 h。加 ECL 显色并压片,利用图像分析系统扫描确定 X 光片上的杂交条带的光密度。

### 1.8 统计学处理

各组数据用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用 SPSS11.5 软件进行统计学处理。组间比较采

用单因素方差分析 (ANOVA),方差不齐时改用近似 *t* 检验。采用 Pearson 检验进行各种变量之间的相关分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 24 h 尿蛋白定量和肾功能

第 1 周末,BSA 组大鼠尿蛋白和尿素氮 (BUN) 较对照组明显增高 ( $P < 0.01$ ),肌酐清除率 ( $C_{Cr}$ ) 下降不明显;第 5 周末,BSA 组大鼠尿蛋白和 BUN 均较对照组增高 ( $P < 0.01$ ),且  $C_{Cr}$  较对照组降低 ( $P < 0.01$ );第 9 周末,BSA 大鼠组尿蛋白、BUN 仍明显高于对照组, $C_{Cr}$  亦低于对照组 ( $P < 0.05$ , 表 1)。

表 1 各组大鼠 24h 尿蛋白、BUN 和  $C_{Cr}$  比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.1 Comparison of 24h proteinuria, BUN and  $C_{Cr}$  in different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	24 h 尿蛋白(mg/24 h)			BUN(mmol/L)			$C_{Cr}$ (mL/min)		
		第 1 周末	第 5 周末	第 9 周末	第 1 周末	第 5 周末	第 9 周末	第 1 周末	第 5 周末	第 9 周末
BSA 组	10	20.62 ± 9.22 **	158.29 ± 36.24 **	104.87 ± 87.27 **	11.66 ± 1.28 **	17.37 ± 3.70 **	13.57 ± 2.52 **	0.59 ± 0.65	0.23 ± 0.18 *	0.34 ± 0.16 *
对照组	5	3.43 ± 1.11	8.45 ± 4.00	14.08 ± 3.86	6.03 ± 1.15	9.99 ± 3.24	9.78 ± 3.06	0.67 ± 0.09	0.69 ± 0.18	0.72 ± 0.12

与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

### 2.2 光镜检查

第 1 周末,BSA 组大鼠光镜下可见肾小球系膜细胞、系膜基质轻-中度增生,系膜区有嗜复红物沉积。第 5 周末,肾小管上皮细胞空泡变性及颗粒变性,部分脱落入管腔;肾间质未见明显病变;肾小球系膜细胞、系膜基质轻-中度增生,系膜区有嗜复红物沉积;肾小管小灶状萎缩和纤维化,间质中可见淋巴、单核细胞浸润及少量纤维化。第 9 周末,BSA 组可见少数肾小球球性及节段性硬化,球囊黏连,细胞纤维性新月体和微血栓形成,部分系膜细胞、系膜基质中-重度增生,系膜区嗜复红物沉积明显;肾小管扩张,可见大量蛋白管型,肾小管上皮细胞空泡变性及颗粒变性,部分刷状缘脱落,小管灶状萎缩和纤维化;间质淋巴、单核细胞浸润明显,伴有灶状纤维化。对照组基本正常。病理半定量分析显示,BSA 组肾小球硬化指数和 TIL 积分均高于对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (图 1)。

### 2.3 免疫荧光检查

第 1 和第 5 周末,BSA 组 IgG 沉积部位相似,

呈颗粒样散在分布,强度为 (+ ~ ++);第 9 周末,BSA 组 IgG 沉积于肾小球系膜区和少数毛细血管袢,部分呈团块状,荧光强度多为 (+++ ~ ++++),对照组为阴性(图 2)。

### 2.4 电镜检查

第 1 周末,BSA 组系膜区轻度扩大,内有少量散在电子致密物,足突水肿,节段性融合;肾小管上皮细胞结构基本正常,肾间质未见明显纤维增生。第 5 周末,BSA 组系膜区散在电子致密物,部分足突融合;肾小管上皮细胞结构大致正常,偶见近曲小管刷状缘绒毛减少、脱失,肾间质成分轻度增多,纤维组织轻度增生,炎性细胞浸润。第 9 周末,BSA 组系膜区扩大,系膜区及肾小球基膜均可见明显电子致密物,足突细胞肿胀,粗面内质网扩张,线粒体空泡化,足突融合;肾小管上皮细胞萎缩,肾间质明显增宽,纤维显著增生,间质细胞增生,大量炎性细胞浸润;对照组结构基本正常(图 3)。

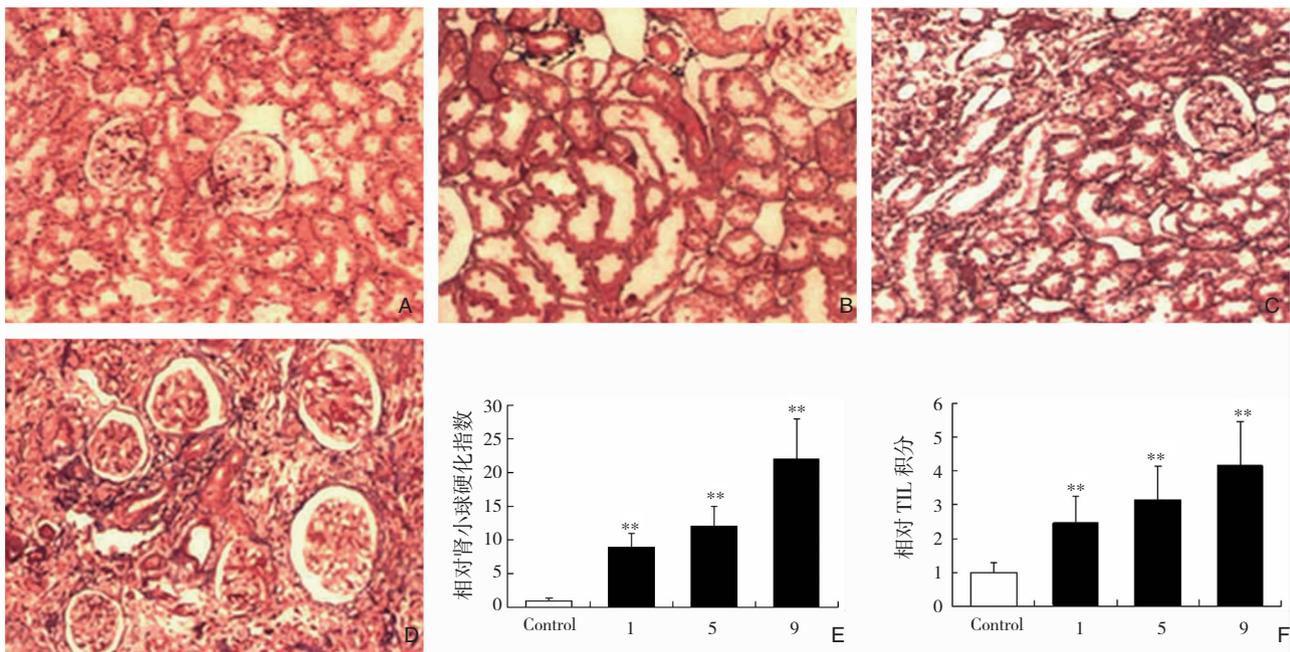


图1 各组大鼠肾脏组织病理学改变 (PASM-Masson 染色,  $\times 100$ )。A:对照组;B:BSA 组第1周末;C:BSA 组第5周末;D:BSA 组第9周末;E:相对肾小球硬化指数,与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; F:相对肾小管间质病理损害积分,与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ 。

Fig.1 Pathological change of kidney of rats in different groups (PASM-Masson staining,  $\times 100$ ). A: Control group; B:BSA group at the 1st weekend; C:BSA group at the 5th weekend; D:BSA group at the 9th weekend; E:Relative glomerulosclerosis index, \*\*  $P < 0.01$  vs. control; F:Relative TIL score, \*\*  $P < 0.01$  vs. control.

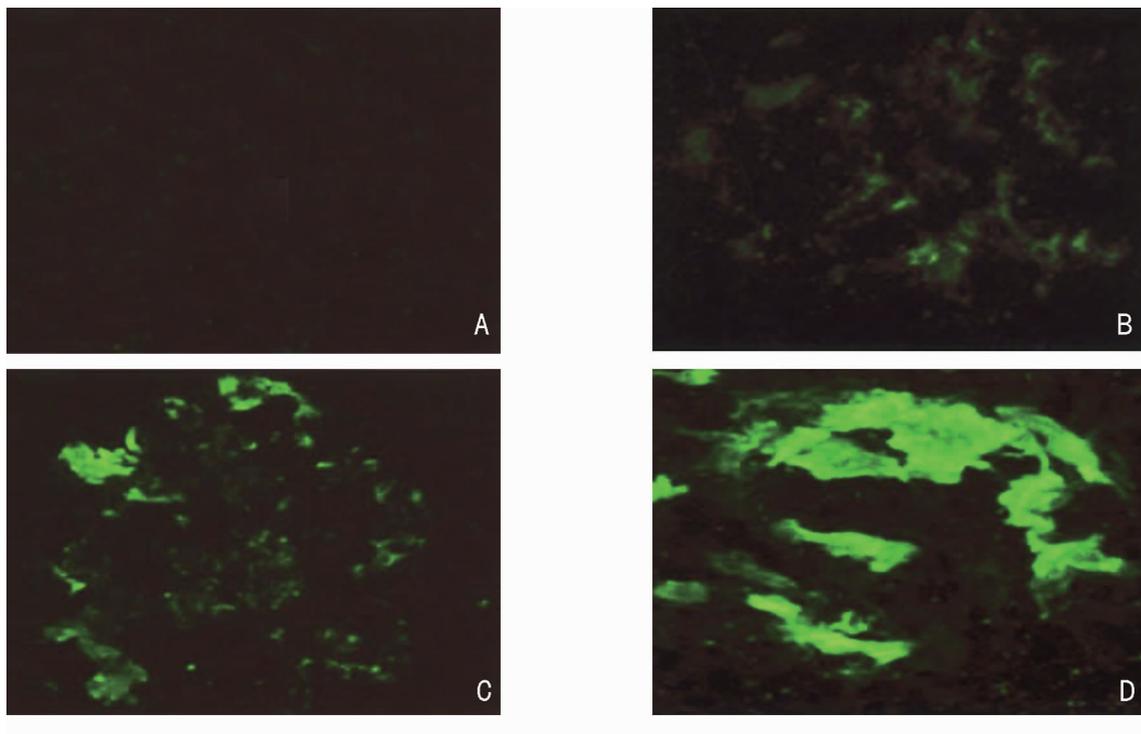


图2 各组大鼠肾脏组织 IgG 荧光染色 ( $\times 400$ )。A:对照组;B:BSA 组第1周末;C:BSA 组第5周末;D:BSA 组第9周末。

Fig.2 Fluorescent staining of IgG in kidney of rats in different groups ( $\times 400$ ). A: Control group; B:BSA group at the 1st weekend; C:BSA group at the 5th weekend; D:BSA group at the 9th weekend.

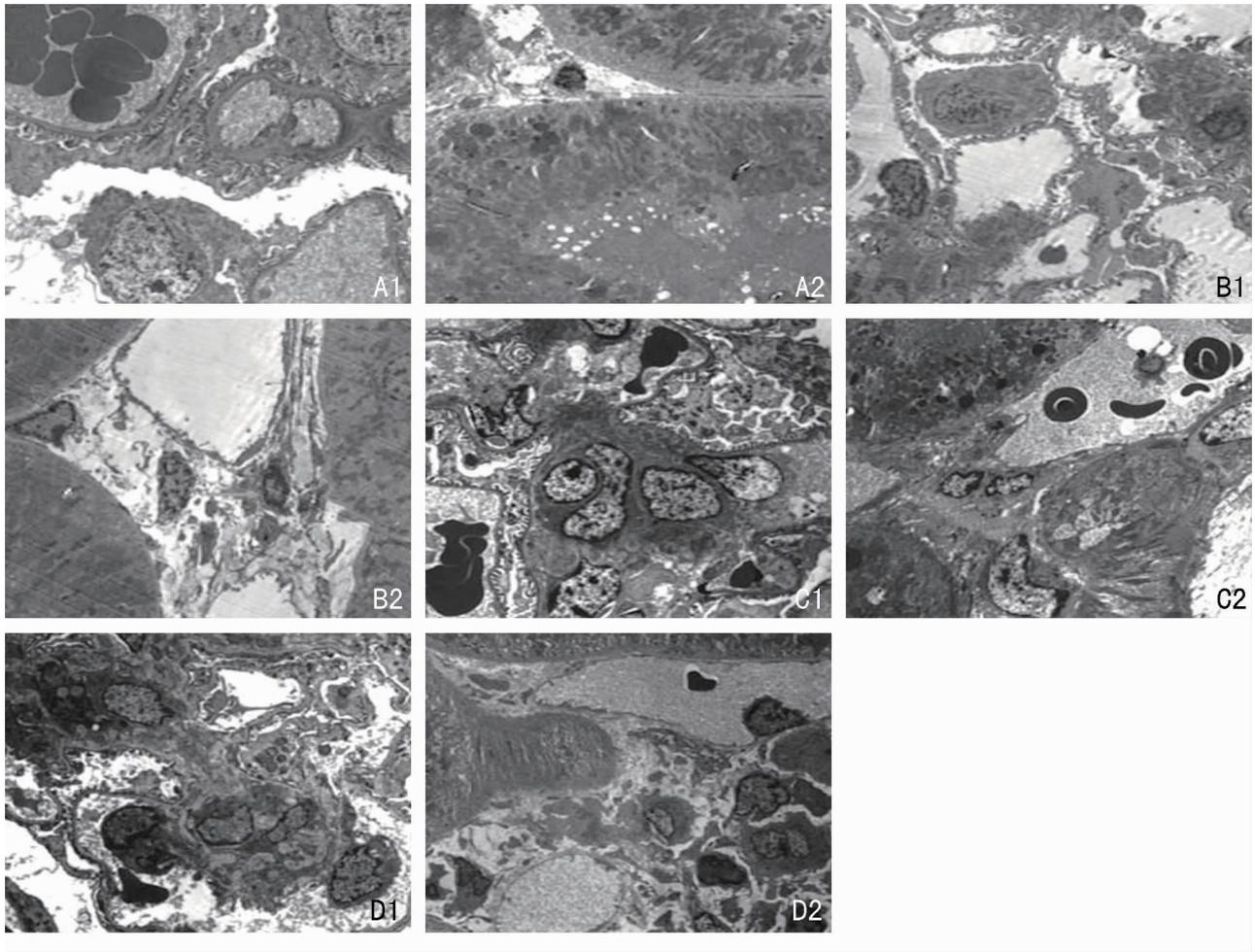


图3 各组大鼠肾脏组织电镜改变( $\times 5\ 000$ )。A1和A2:对照组;B1和B2:BSA组第1周末;C1和C2:BSA组第5周末;D1和D2:BSA组第9周末。

**Fig. 3 Ultrastructure of kidney of rats in different groups by transmission electron microscopy ( $\times 5\ 000$ ).** A1 and A2: Control group; B1 and B2:BSA group at the 1st weekend; C1 and C2:BSA group at the 5th weekend; D1 and D2:BSA group at the 9th weekend.

### 2.5 血浆 TSP-1 蛋白表达水平

BSA 组血浆 TSP-1 蛋白表达在第 1 周末仅见轻度上升,与对照组比较无明显差别;随实验时间延长,TSP-1 表达逐渐增多,第 5 周末和第 9 周末均明显高于对照组,差异有统计学意义

( $P < 0.01$ , 图 4)。

### 2.6 相关分析

在 BSA 组中,血浆 TSP-1 蛋白表达与肾小管间质病理积分均呈正相关( $r = 0.836, P < 0.01$ , 图 5)。

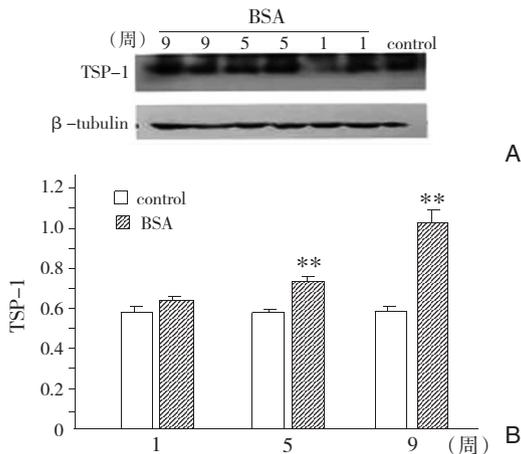


图4 各组大鼠血浆 TSP-1 的蛋白表达。A: Western 印迹分析血浆 TSP-1 的表达; B: 各时间点 BSA 组血浆 TSP-1 与对照组的比较。与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ 。

Fig. 4 Plasma TSP-1 expression of rats in different groups. A: Plasma TSP-1 expression by Western blot; B: Densitometric quantification of plasma TSP-1. Compared with the control group, \*\*  $P < 0.01$ .

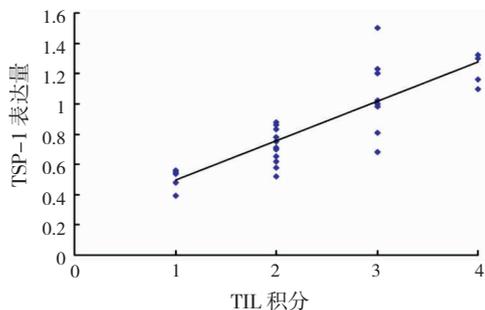


图5 血浆 TSP-1 的蛋白表达和 TIL 积分相关分析散点图。

Fig. 5 Scattergram of relationship between plasma TSP-1 expression and TIL score.

### 3 讨论

目前认为,肾小球疾病时,尿蛋白量和持续时间与肾间质病变程度与肾功能恶化程度相关<sup>[6]</sup>。蛋白尿不仅是肾小球损伤严重程度的指标,而且可能通过介导多种致肾损伤因子表达,导致慢性肾脏病变持续进展<sup>[7]</sup>。本实验发现,SD 大鼠蛋白超负荷动物模型出现严重的肾小球硬化和间质纤维化,肾功能明显降低,IgG 部分呈团

块状沉积于肾小球系膜区和少数毛细血管祥,电镜下可见明显电子致密物沉积于系膜区及肾小球基膜,足突细胞肿胀,粗面内质网扩张,线粒体空泡化,足突融合;肾小管上皮细胞萎缩,肾间质明显增宽,纤维显著增生,间质细胞增生,大量炎性细胞浸润。该结果与文献报道一致<sup>[3,8]</sup>,证明蛋白超负荷可导致进行性肾小球硬化和间质纤维化。

TSP-1 是一个分子质量为 450 kD 的同源三聚体基质糖蛋白,最初出现于血小板小颗粒内,随后被证明可由成纤维细胞、内皮细胞、血管平滑肌细胞和单核细胞等各种细胞分泌<sup>[9]</sup>,具有促进内皮细胞凋亡、抑制血管生成等作用。肾脏发生间质纤维化时,肾小管周围毛细血管显著减少,使得向肾小管和间质细胞运输氧和营养物质受阻,造成慢性缺氧,从而促进肾间质纤维化发生、发展。无论是在老龄鼠<sup>[2]</sup>还是在残肾大鼠模型<sup>[10]</sup>中均发现,TSP-1 在肾间质的表达水平增加与微血管丢失及肾间质纤维化程度基本一致。另外,已知 TGF- $\beta$ 1 是在体外最有效的引起肾小管上皮细胞向间充质细胞转分化的细胞因子,同时 TGF- $\beta$ 1 促进细胞外基质的沉积,目前认为在促进肾间质纤维化形成过程中,此途径为一重要原因。研究表明<sup>[11]</sup>,TSP-1 是 TGF- $\beta$ 1 的内源性激活物,TSP-1 可通过一种非蛋白水解机制激活 TGF- $\beta$ 1,在肾间质纤维化中具有明显致病作用。本研究发现,SD 蛋白超负荷肾病大鼠血浆 TSP-1 持续高水平表达,其表达变化与肾间质病理损伤程度及趋势一致。因此,血浆 TSP-1 有可能成为临床判断肾间质纤维化的重要指标之一。

### 参考文献:

[1] Eddy A. Role of cellular infiltrates in response to proteinuria [J]. Am J Kidney Dis, 2001, 37 ( Suppl 2 ): S25-29.

[2] Kang D H, Anderson S, Kim Y G, et al. Impaired angiogenesis in the aging kidney: vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in renal disease [J]. Am J Kidney Dis, 2001, 37 (3): 601-611.

[3] Eddy A, Kim H, López-Guisa J, et al. Interstitial fibrosis in mice with overload proteinuria: deficiency of TIMP-1 is not protective [J]. Kidney Int, 2000, 58 (2): 618-628.

[4] Zhang Z, Sun L, Wang Y, et al. Renoprotective role of the vitamin D receptor in diabetic nephropathy [J]. Kidney Int,

- 2008, 73(2): 163-171.
- [5] Volpert O V, Lawler J, Bouck N P. A human fibrosarcoma inhibits systemic angiogenesis and the growth of experimental metastases via thrombospondin-1 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(11): 6343-6348.
- [6] Strutz F M. EMT and proteinuria as progression factors [J]. Kidney Int, 2009, 75(5): 475-481.
- [7] Abbate M, Zoja C, Remuzzi G. How does proteinuria cause progressive renal damage [J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(11): 2974-2984.
- [8] Tapia E, Sánchez-González D J, Medina-Campos O N. Treatment with pyrrolidine dithiocarbamate improves proteinuria, oxidative stress, and glomerular hypertension in overload proteinuria [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 295(5): F1431-1439.
- [9] Chen H, Herndon M E, Lawler J. The cell biology of thrombospondin-1 [J]. Matrix Biol, 2000, 19(7): 597-614.
- [10] Hugo C, Kang D H, Johnson R J. Sustained expression of thrombospondin-1 is associated with the development of glomerular and tubulointerstitial fibrosis in the remnant kidney model [J]. Nephron, 2002, 90(4): 460-470.
- [11] Daniel C, Wiede J, Krutzsch H C, et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta in fibrotic renal disease in the rat in vivo [J]. Am J Pathol, 2003, 163(3): 1185-1189.

(本文编辑 彭敏宁)

## 中国中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊

# 《中国组织工程研究与临床康复》(CRTER)杂志征稿启事

CRTER 杂志是一本传播组织工程领域一流学术研究成果的专业期刊,系卫生部主管,中国康复医学会、《中国组织工程研究与临床康复》杂志主办的国家级学术期刊。ISSN 1673-8225, CN 21-1539/R, 国内外公开发行, 发行代号 8-584, 周刊, 200 页/期, A4 开本, 插图随文, 印刷精致。

CRTER 被美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘》(EM)、SCOPUS 数据库、EMCare 数据库、EMBiology 数据库、美国《剑桥科学文摘》(CSA)、波兰《哥伯尼索引》(IC)、俄罗斯全俄科学技术信息研究所数据库(VINITI)、中国科技论文统计源期刊、中国中文核心期刊(临床医学类)第 5 版、中国科学引文数据库等收录。

○ 2008 年版中国科技期刊引证报告(核心版), 中国科技论文统计源期刊最新数据显示: CRTER 总被引频次为 5343, 在 1 765 种科技期刊中排位第 8 名, 影响因子 0.593, 他引率 0.77, 基金论文比 0.44。

○ 2008 年北大图书馆《中文核心期刊要目总览》(第 5 版): CRTER 为其核心期刊。

○ 2010 年 CRTER 杂志重点关注反映组织工程内容的临床研究类文章: ①突出具有中国特色的荟萃分析类文章。②具有典型意义的临床循证病例文章。③与遗传关联性疾病相关的病例-对照文章。④涉及新技术及新疗法的升级系统综述类文章。⑤多中心、大样本的随机对照及调查报告类文章。

关注来自生物材料研究, 干细胞研究, 组织工程研究, 医学植入物与数字化医学研究, 器官移植研究方面的研究原著、系统综述、病例报告、调查分析及学术探讨类文章, 进一步提高出版质量, 加快出版时效将是 CRTER 杂志 2010 年最重点的两大任务。

○ 订阅汇款: 沈阳 1200 邮政信箱 邮编: 110004

○ 网站: www.crter.org

○ 电话: 024-23384352; 024-23380579