

普罗布考对实验型大鼠胱抑素 C、肾功能和肾脏病理学的影响

杨成 兰天飙

【摘要】 目的 观察普罗布考对实验型大鼠血清胱抑素 C (Cys C)、肾功能及肾脏病理学的影响,并探讨 Cys C 对肾小球肾病的诊断价值。方法 雄性 SD 大鼠 40 只,随机分为正常组、模型组、治疗组。尾静脉一次性注射阿霉素 6 mg/kg 制备阿霉素肾病模型。1 周后开始药物干预,持续 4 周。检测大鼠 24 h 尿蛋白、血清 Cys C、尿素氮(BUN)、血清肌酐(Scr)、血清和肾组织中血清超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA),同时取肾组织标本观察病理学改变。结果 治疗组 24 h 尿蛋白排泄量明显低于模型组($P < 0.05$),治疗组 Cys C 明显降低($P < 0.05$),肾功能明显好转,肾指数明显改善($P < 0.05$),血清和肾组织中 SOD 明显上升、MDA 明显下降($P < 0.05$),肾组织病理损伤减轻。结论 普罗布考能减少实验型大鼠蛋白尿,降低 Cys C,减轻肾组织的病理损伤,具有肾保护作用。Cys C 对肾小球肾病的早期诊断有一定的价值,能较 Scr 更早反映肾功能的变化。

【关键词】 普罗布考; 大鼠,裸; 肾病

Effect of Probucol on cystatin C, renal function and renal pathology in experiment rat YANG Cheng, LAN Tian-biao. Department of Nephrology, Wuhan General Hospital of Guangzhou Command, Wuhan 430070, China

Corresponding author: YANG Cheng, Email: xxjyyc@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Probucol on cystatin C (Cys C), renal function and renal pathology in rats with adriamycin-induced nephropathy, and explore the diagnostic value of Cys C in glomerulus nephropathy. **Methods** Forty male SD rats were used. The rats were randomly divided into three groups: normal group, model group and treated group. The models of adriamycin-induced nephropathy were established by injection of 6 mg/kg adriamycin into the tail vein. After 1 week, medicine interventions were used for 4 weeks. The level of 24-hour urinary protein and blood biochemistry indexes were measured, and renal pathologic changes were examined. **Results** In the treated group, 24-hour urinary protein, Cys C levels were significantly decreased ($P < 0.05$), renal function was significantly improved, renal index was significantly improved. The SOD activity were significantly increased and the MDA were significantly decreased ($P < 0.05$), renal pathologic changes were improved. **Conclusions** In rats with adriamycin-induced nephropathy, Probucol can decrease the urinary protein and Cys C, improve the renal pathologic changes. It has protective effects. Serum Cys C may be good biomarkers for early diagnosis of glomerulus nephropathy and they can reflect the change of renal function after contrast injection earlier than serum creatinine.

【Key words】 Probucol; Rats, nude; Nephrosis

普罗布考最早作为降脂药物广泛应用于临床,随着对其药理作用认识的不断深入,普罗布考作为目前可用于临床的抗氧化作用最强的人工合成抗氧化剂,越来越多地应用于肾脏疾病的临床治疗中。通过普罗布考对阿霉素肾病大鼠保护作用的基础研究,为临床用药提供新的基础理论依据。血清胱抑素 C (Cys C)

是早期诊断急性肾损害的较好指标^[1-2], Cys C 几乎完全被肾小球滤过, 然后由肾小管重吸收, 不受炎性、性别、肌肉、饮食、年龄变化的影响。但 Cys C 在肾小球肾病早期诊断中的作用报道甚少, 本研究通过观察阿霉素肾病大鼠血清 Cys C、血清尿素氮(BUN)、血清肌酐(Scr)、肾组织病理学等各项指标的变化, 探讨普罗布考对阿霉素肾病的保护作用, 并探讨 Cys C 对肾小球肾病的诊断价值。

材料与方 法

1. 实验动物: 选择健康雄性 SD 大鼠 40 只, 体重 180 ~ 200 g, 由华中科技大学同济医学院动物实验中心提供。普通饲料喂养 1 周后, 尿蛋白检测均为阴性。

2. 药品与试剂: 普罗布考(畅泰), 由承德颈复康药业集团有限公司生产, 剂量为 0.25 g/片, 国药准字 H10960161, 生产批号 070801。盐酸阿霉素注射液, 剂量为 10 mg/ml, 由意大利法玛西亚普强公司生产。血清超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定, 用 SOD 和 MDA 检测试剂盒(武汉科瑞生物科技公司), 按产品说明书操作步骤进行测定。

3. 分组和模型制备: 将 40 只大鼠随机分为正常组(A组)10只和造模组 30 只。在不麻醉的状态下, 造模组大鼠尾静脉一次性注射阿霉素 6 mg/kg, 制备阿霉素肾病大鼠模型; A 组大鼠尾静脉一次性注射生理盐水 1 ml。1 周后阿霉素肾病大鼠模型制备成功, 将造模组大鼠随机分为模型组(B组)和治疗组(C组), 每组 15 只。B 组每天温开水灌胃, 普罗布考的使用剂量参照相关文献^[3-4]; C 组每天普罗布考灌胃 1 次, 剂量为 500 mg·kg⁻¹·d⁻¹。

4. 标本采集: 在造模前和造模后第 1 周、第 5 周末, 将大鼠单独饲养在代谢笼中, 为排除食物对各项生化指标检测的影响, 大鼠空腹, 禁食不禁水, 共收集 24 h 尿液 3 次。造模第 5 周末, 末次给药 24 h 后将大鼠麻醉后心脏取血, 制备血清待检。处死大鼠后在无菌条件下打开腹腔, 立即取出肾脏, 一部分肾组织用 4 ℃ 生理盐水冲洗后, 称重研磨制成匀浆, 再离心, 取上清液测定 SOD、MDA 的活性和含量。另一部分肾组织光镜下检测组织形态学变化。

5. 观测指标: 肾脏称重, 计算肾指数(肾重量/体重)。动物一般状况: 包括进食、活动、外观、体重、排泄物等。尿液检测: 24 h 尿蛋白定量用磺柳酸-硫酸钠比浊法, 由华中科技大学同济医学院附属同济医院检验科检测。

6. 血液检测: Cys C、BUN、Scr 由广州军区武汉总医院检验科自动生化分析仪检测。血清及肾组织 SOD、MDA 检测: 血清及肾组织 SOD 活性测定采用羟胺法; 血清及肾组织 MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸法; 按产品说明书操作步骤, 测定血清及肾组织匀浆中 SOD 活性及 MDA 含量。

7. 肾脏形态学检查: 光镜检查: 取肾脏组织后, 10% 甲醛液固定, 常规脱水, 石蜡包埋切成 2 ~ 4 μm 薄片, 作 HE、Masson 及银染染色。

8. 统计学分析: 实验结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间差异的显著性以方差分析和 *t* 检验完成, 由 SPSS 11.3 软件完成。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 大鼠一般情况: 与 A 组比较, 注射阿霉素 1 周后大鼠逐渐出现活动减少, 毛色差, 体重减轻, 蜷缩拱背, 进食饮水明显减少, 口唇及四肢水肿, 腹大。C 组大鼠用普罗布考灌胃治疗后第 2 周开始, 进食饮水有所改善, 体重开始增加, 反应好转, 水肿有所减轻, 但仍较 A 组差。B 组则无明显改善。实验结束时, B 组有 2 只大鼠死亡, C 组有 1 只大鼠死亡, A 组无大鼠死亡。

2. 各组大鼠治疗前后尿蛋白定量变化(表 1): 造模后第 1 周末, 造模组大鼠(B组 + C组)24 h 尿蛋白定量与 A 组比较明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 说明大鼠肾病模型造模成功; 造模后第 5 周末, B 组 24 h 尿蛋白继续升高, 与 A 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), C 组 24 h 尿蛋白和 B 组比较有所下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3. 普罗布考对大鼠血生化和肾指数的影响(表 2): 第 5 周末(治疗 4 周后), C 组和 B 组比较, 肾指

数水平明显改善,代表肾功能指标的 Cys C、BUN 水平也明显降低,两组之间差异有统计学意义($P < 0.05$),说明大鼠肾脏损伤减轻,肾功能有所改善,机体营养状况也得到改善。

4. 第5周末普罗布考对各组大鼠血清和肾组织中 SOD、MDA 的影响:见表3。

表1 各组大鼠24 h尿蛋白定量比较(mg/24 h, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	造模前	造模后1周	造模后5周
A组	10	6.32 ± 1.27	6.45 ± 1.08	6.62 ± 1.35
B组	13	6.71 ± 1.85	132.12 ± 17.25 ^{ab}	359.12 ± 23.61 ^{ab}
C组	14	6.62 ± 1.43	125.65 ± 20.36 ^{abc}	227.45 ± 18.05 ^{abd}

注:与造模前比较,^a $P < 0.05$;与A组比较,^b $P < 0.05$;与B组比较,^c $P > 0.05$,^d $P < 0.05$

表2 普罗布考对各组大鼠生化和肾指数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	BUN(mmol/L)	Scr(μ mol/L)	Cys C(mg/L)	肾指数($\times 10^{-2}$)
A组	10	7.82 ± 1.63	57.38 ± 1.72	0.84 ± 0.15	0.81 ± 0.34
B组	13	10.08 ± 1.45 ^a	63.13 ± 2.76 ^b	4.19 ± 1.25 ^a	1.14 ± 0.29 ^a
C组	14	9.14 ± 1.03 ^{ac}	59.06 ± 0.54 ^d	2.73 ± 0.73 ^{ac}	0.92 ± 0.31 ^{ac}

注:与A组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.05$;与B组比较,^c $P < 0.05$,^d $P > 0.05$

表3 普罗布考对各组大鼠血清和肾组织中 SOD、MDA 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	血清 SOD(U/ml)	肾组织 SOD(U/ml)	血清 MDA(nmol/ml)	肾组织 MDA(nmol/ml)
A组	10	60.34 ± 14.63	94.45 ± 20.49	2.29 ± 0.73	2.47 ± 1.05
B组	13	29.16 ± 8.72 ^a	58.72 ± 12.15 ^a	4.43 ± 1.36 ^a	4.83 ± 1.64 ^a
C组	14	48.32 ± 11.47 ^{ab}	82.56 ± 16.43 ^{ab}	3.65 ± 1.18 ^{ab}	3.92 ± 1.26 ^{ab}

注:与A组比较,^a $P < 0.05$;与B组比较,^b $P < 0.05$

5. 肾脏病理形态学观察结果(HE染色,Masson+银染染色):阿霉素诱导的肾小球肾病模型是国内外公认的理想微小病变肾病模型^[5],光镜下A组大鼠肾小球和肾小管及间质结构正常。B组大鼠HE染色可见肾小球系膜基质轻度增生,肾间质增宽,间质内可见炎性细胞浸润,肾小管管腔扩张,可见蛋白管型,部分肾小管萎缩,小管上皮细胞坏死脱落,间质血管淤血;Masson+银染染色可见增宽的间质区内胶原纤维增生,间质纤维化呈灶状分布。C组大鼠病理改变较B组减轻,肾小球系膜基质无明显增生,肾间质增宽较轻,肾小管蛋白管型较轻,管腔轻度扩张、上皮细胞坏死、脱落较少,少量炎性细胞浸润(图1~3)。

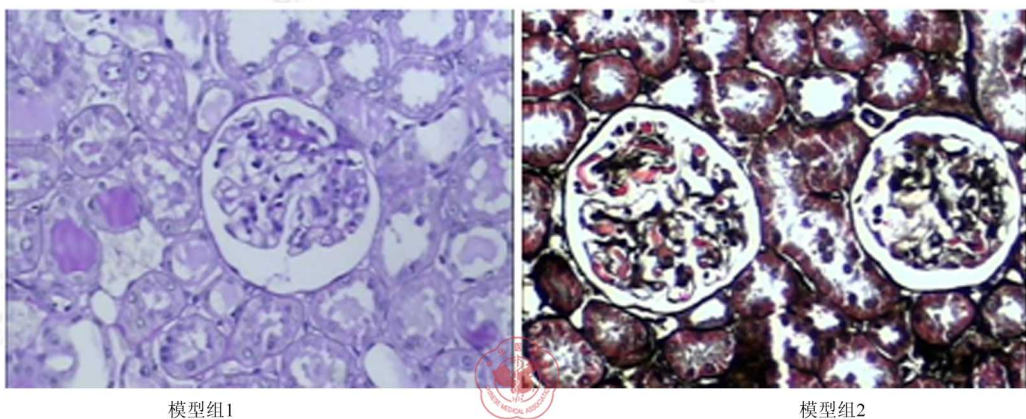


图1 模型组:肾小球系膜基质增生,肾间质增宽,炎性细胞浸润,肾小管管腔扩张,可见蛋白管型,小管上皮细胞坏死脱落,间质血管淤血,间质区内胶原纤维增生(模型组1:HE $\times 400$;模型组2:Masson+银染 $\times 400$)

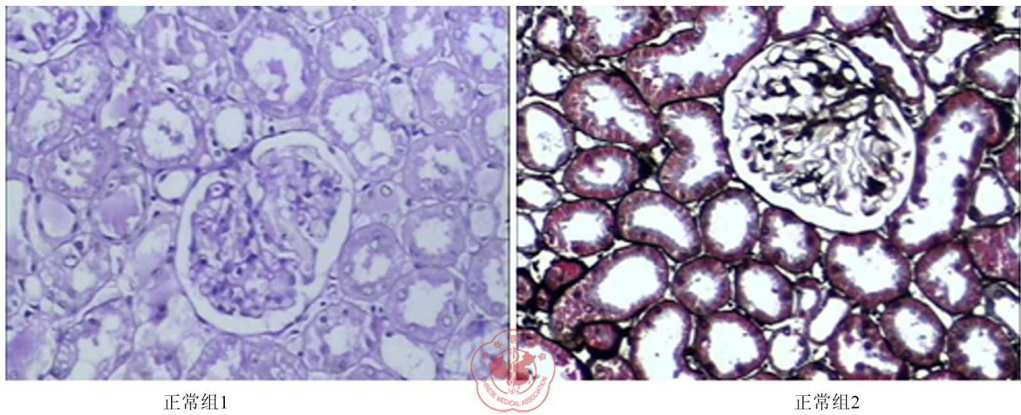


图2 正常组: 肾小球和肾小管及间质结构正常(正常组1: HE $\times 400$; 正常组2: Masson+银染 $\times 400$)

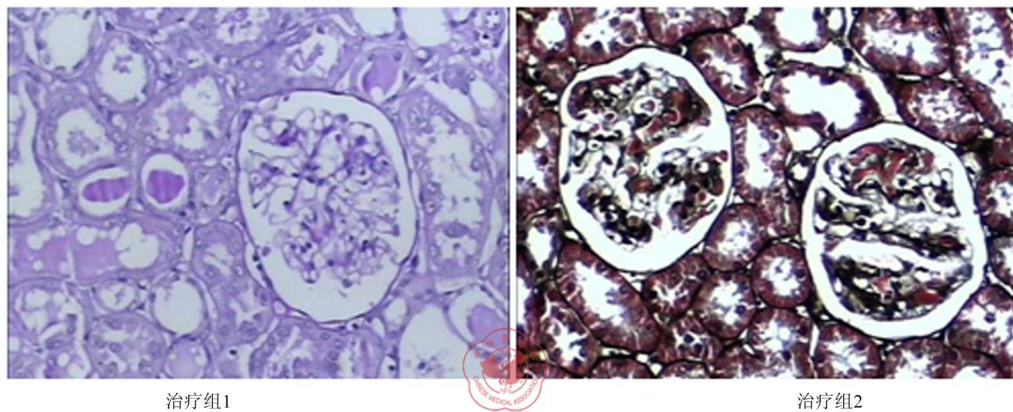


图3 治疗组: 肾小球系膜基质轻度增生, 肾间质增宽较轻, 肾小管蛋白管型较轻, 管腔轻度扩张、少量炎性细胞浸润, 肾间质区内胶原纤维增生不明显(治疗组1: HE $\times 400$; 治疗组2: Masson+银染 $\times 400$)

讨 论

氧自由基是影响肾脏疾病发生发展的重要因素,具有清除氧自由基的SOD活性和脂质过氧化代谢产物MDA含量的作用,是反映机体氧自由基代谢的重要指标;当肾病时机体氧自由基代谢紊乱,表现为SOD活性降低,MDA明显升高。因此减轻氧化应激损伤在肾小球肾病的治疗中占有重要地位。普罗布考,又名丙丁酚,是目前可用于临床的抗氧化作用最强的人工合成抗氧化剂,安全性及耐受性良好,未发现致癌、致突变作用^[3]。普罗布考的药理作用有:(1)降低血脂作用:普罗布考可增加 7α -羟化酶的表达,增加胆固醇的清除^[6]。(2)抗氧化作用:普罗布考能有效抑制低密度脂蛋白(LDL)氧化形成氧化LDL(ox-LDL),抑制烟酰胺辅酶氧化酶的活性、清除自由基^[7]。(3)抗氧化应激作用:普罗布考可抑制巨噬细胞摄取ox-LDL,延缓ox-LDL诱导的细胞核脂化过程;同时普罗布考可抑制各种氧化脂质对血管内皮组织、平滑肌细胞的毒性作用。(4)抗炎症作用:普罗布考可抑制多种炎性因子表达,阻断C反应蛋白(CRP)形成的部分途径。普罗布考还通过抑制基质金属蛋白酶(MMPs)的分泌与表达,延缓动脉粥样硬化斑块的形成发展,起到稳定粥样斑块的作用^[8]。(5)改善内皮功能作用:普罗布考能抑制黏附分子表达,抑制内皮细胞增生、移行。

阿霉素诱导的肾小球肾病模型属于氧化应激模型,已广泛应用于肾脏病的基础研究中^[9]。阿霉素是一种蒽环类抗肿瘤药物,含有醌式结构,具有细胞毒性作用;在黄嘌呤氧化酶、NADH脱氢酶等酶系统下生成半醌自由基,再产生氧自由基,诱发肾小球脂质过氧化反应,导致肾小球滤过膜的结构和功能的破坏。本实验中,给予阿霉素诱导后,大鼠血清和肾组织中SOD活性较A组明显降低,MDA含量明显升高,提示应激刺激产生了过氧化应激损伤。给予普罗布考治疗后,C组大鼠血清和肾组织中SOD活性较B组明显增高,MDA

含量较B组明显降低;24 h尿蛋白排泄量明显减少,肾指数得到明显改善,肾脏病理损伤较B组也明显减轻。说明普罗布考通过强大的抗氧化作用,提高血清及肾组织中SOD活性,降低MDA含量,对抗毒性氧自由基,减轻氧化应激损伤,从而发挥肾脏的保护作用。

Cys C是一种分泌性蛋白质,其广泛存在于各种体液中,其中在尿液中含量最低,Cys C是半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族中的一员,为低分子量的非糖基化的碱性蛋白质。Cys C基因和启动子的结构分析显示其基因型为“看家基因”,所有有核细胞都能稳定产生,其浓度不受年龄、性别、饮食、炎症、血脂、肝脏疾病的干扰。Cys C几乎全部由肾小球滤过,它能够自由通过肾小球,肾小管不分泌排泄。虽然它能被肾小管上皮细胞重吸收,但随后便会被分解代谢,不会返回到血液系统中而造成血清中的浓度升高^[10]。因此,Cys C是一种理想的反映肾小球滤过率(GFR)变化的内源性标记物。当肾小球有轻微的损伤时,Cys C浓度就会迅速地升高,为肾功能早期病变中GFR的变化提供了快速、精确、简便的方法。研究显示,肾病患者在肾功能正常期和肾功能储备下降期Cys C与健康对照者差异有统计学意义($P < 0.05$),在肾功能损害早期,血清Cys C的阳性检出率和准确度比Scr高。而对于诊断GFR的下降,血清Cys C比Scr表现出更高的敏感度和准确性。Cys C分子量大于Scr,所以它更容易反映GFR膜通透性的早期变化,可以在GFR轻微降低时升高,较Scr更敏感^[11]。研究显示,对于肾移植术后患者GFR的监测,血清Cys C能比Scr更敏感、更早地发现肾功能早期损害,能更早判断肾功能恢复延迟^[12]。脓毒血症并发急性肾损伤患者,血清Cys C较Scr更能及时发现GFR的改变,从而更早地诊断急性肾损伤^[13]。

本研究结果显示,阿霉素肾病大鼠血清Cys C水平较A组大鼠明显升高;给予普罗布考灌胃治疗4周后,肾脏病理损伤较B组明显减轻,24 h尿蛋白定量明显减少,其血清Cys C水平较B组也明显降低,组间两两比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。但同期检测Scr值无明显变化,组间两两比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。因此,对早期诊断肾小球肾病时肾功能的损害,Cys C是一个敏感指标,较Scr更敏感,具有重要的早期诊断价值。

参 考 文 献

- [1] Gami AS, Garovic VD. Contrast nephropathy after coronary angiography. *Mayo Clin Proc*, 2004, 79: 211-219.
- [2] Herget-Rosenthal S, Marggraf G, Hüsing J, et al. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int*, 2004, 66: 1115-1122.
- [3] 杨世杰. 药理学. 北京:人民卫生出版社, 2005: 343.
- [4] 杜九中, 李双杰, 周京敏. 普罗布考对小鼠柯萨奇B3病毒性心肌炎的治疗作用. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2009, 23: 232-233.
- [5] 张悦, 魏民, 王谦, 等. 阿霉素复制大鼠微小病变肾病模型的研究. *北京中医药大学学报*, 2002, 25: 16-18.
- [6] Hirano K, Ikegami C, Tsujii K, et al. Probucol enhances the expression of human hepatic scavenger receptor class B type I, possibly through a species-specific mechanism. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25: 2422-2427.
- [7] Bassenge E, Schneider HT, Daiber A. Oxidative stress and cardiovascular diseases. *Dtsch Med Wochenschr*, 2005, 130: 2904-2909.
- [8] Wu TC, Chen YH, Leu HB, et al. Carvedilol, a pharmacological antioxidant, inhibits neointimal matrix metalloproteinase-2 and -9 in experimental atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43: 1508-1522.
- [9] 陈重义, 姜新猷, 郭梅, 等. 阿霉素肾病大鼠生物膜电荷的变化与蛋白尿的关系. *中华医学杂志*, 1990, 70: 91-94.
- [10] Laterza OF, Price CP, Scott MG. Cystatin C: an improved estimator of glomerular filtration rate? *Clin Chem*, 2002, 48: 699-707.
- [11] Hoek FJ, Kemperman FA, Krediet RT. A comparison between cystatin C, plasma creatinine and the Cockcroft and Gault formula for the estimation of glomerular filtration rate. *Nephrol Dial Transplant*, 2003, 18: 2024-2031.
- [12] 王凤清, 徐美华, 刘奇才, 等. 血清胱抑素C在动态监测移植肾功能中的价值[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2008, 2: 652-657.
- [13] 万小健, 于光, 李金宝, 等. 胱抑素C在脓毒症相关的急性肾损伤中的诊断价值[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2010, 4: 568-572.

(收稿日期: 2011-03-07)

(本文编辑: 巨娟梅)