

一种新型环孢素 A 慢性肾毒性大鼠模型的建立

孙巧玲^{1,2}, 谌贻璞², 芮宏亮²

¹中国医学科学院 北京协和医学院 研究生院, 北京 100730

²中日友好医院肾病中心, 北京 100029

通信作者: 谌贻璞 电话: 010-84206174, 电子邮件: chen_yipu@medmail.com.cn

摘要: **目的** 建立新型环孢素 A 慢性肾毒性大鼠模型并探讨其特点。**方法** 雄性 SD 大鼠 (正常盐饮食) 分为假手术组 (sham-ADX 组)、肾上腺切除组 (ADX 组) 及肾上腺切除及注射环孢素 A 组 (CsA 组)。后两组先行双侧肾上腺切除术, 2 周后分别注射安慰剂或环孢素 A。6 周后检测尿蛋白定量、肌酐清除率、血和尿醛固酮及钠钾水平、肾组织醛固酮及其合成酶 CYP11B2 表达和肾组织病理改变。**结果** ADX 和 CsA 组术后 2d 血和尿未检测到醛固酮, 尿钠增多、血钠减低, 尿钾减少、血钾升高。6 周实验结束时, CsA 组大鼠尿蛋白增加、肌酐清除率下降, 肾组织病理检查呈现明显肾间质纤维化; ADX 和 CsA 组大鼠肾组织 CYP11B2 mRNA 表达和醛固酮均显著上调, 再次出现血和尿醛固酮, 钠钾代谢紊乱改善。**结论** 用肾上腺切除和正常盐饮食制作环孢素 A 慢性肾毒性大鼠模型成功。消除循环醛固酮后, 肾组织醛固酮表达上调并释放入血, 维持钠钾平衡。

关键词: 肾上腺切除术; 醛固酮; 环孢素 A; 药物毒性

中图分类号: R692.6; R595.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-503X(2010)02-0205-05

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2010.02.016

Establishment of A New Rat Model of Chronic Cyclosporine A Nephrotoxicity

SUN Qiao-ling^{1,2}, CHEN Yi-pu², RUI Hong-liang²

¹Graduate School, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China

²Center of Nephrology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

Corresponding author: CHEN Yi-pu Tel: 010-84206174, E-mail: chen_yipu@medmail.com.cn

ABSTRACT: Objective To establish a new rat model of chronic cyclosporine A nephrotoxicity and explore its features. **Methods** Totally 24 male SD rats were equally randomized divided into 3 groups: sham-adrenalectomized (sham-ADX) group, ADX group and ADX plus cyclosporine A (CsA) group. Rats in ADX and CsA group first underwent adrenalectomy, followed by the administration of placebo or dexamethasone, respectively. Rats in sham-ADX group received sham adrenalectomy and distilled water as control. Six weeks later, all rats were sacrificed and the following indicators were evaluated: urine protein excretion, creatinine clearance, aldosterone level in serum and urine, aldosterone level and its synthase CYP11B2 gene expression in kidney, serum sodium and potassium, urine sodium and potassium excretion, and tubulointerstitial fibrosis by masson trichrome stain. **Results** In ADX and CsA group, serum and urine aldosterone were undetectable on the second post-operative day, with other observations including natriuresis, hyponatremia, decreased urine

potassium excretion, and hyperpotassaemia, suggesting that adrenals were removed intactly and the adrenalectomy was successful. Rats in CsA group showed increased urine protein, decreased creatinine clearance and tubulointerstitial fibrosis, suggesting that a model of chronic CsA nephrotoxicity was successfully established. At the endpoint, serum potassium, serum aldosterone, urine potassium and urine aldosterone excretion partially retrieved. Natrium in serum and urine was not significant different between ADX group/CsA group and sham-ADX group. Local renal aldosterone and its gene expression were remarkably upregulated. **Conclusions** We successfully established a new rat model of chronic CsA nephrotoxicity by adrenalectomy without low sodium diet. After adrenalectomy, local renal aldosterone in kidney may compensate for circulatory aldosterone deficit to maintain electrolyte balance.

Key words: adrenalectomy; aldosterone; cyclosporine A; drug toxicity

Acta Acad Med Sin, 2010, 32(2):205-209

环孢素 A (cyclosporine A, CsA) 做为免疫抑制剂用于器官移植和自身免疫性疾病患者, 明显改善患者生存率, 但是其慢性肾毒性限制了其临床应用。用醛固酮受体拮抗剂干预 CsA 慢性肾毒性大鼠模型, 可观察到肾小管间质纤维化和肾功能的改善, 提示醛固酮在 CsA 慢性肾毒性中发挥重要作用^[1-2]。但是, 这些实验不能区分是肾上腺来源的循环醛固酮 (以下简称循环醛固酮) 还是肾脏或其他器官产生的组织醛固酮 (以下简称组织醛固酮) 发挥作用。本研究拟建立一个肾上腺全切的 CsA 慢性肾毒性大鼠模型, 以消除循环醛固酮干扰, 探讨肾组织醛固酮在 CsA 慢性肾毒性大鼠模型中的致病作用。

材料和方法

手术和给药方案 24 只雄性 SD 大鼠随机分为 3 组, 每组 8 只, 分别为假手术 (sham-adrenalectomized, sham-ADX) 组、肾上腺切除组 (ADX 组) 和肾上腺切除及注射 CsA 组 (CsA 组)。ADX 组和 CsA 组先行双侧肾上腺切除术, 手术方法参考文献 [3]。肉眼检查摘除的肾上腺包膜完整。大鼠进正常盐饮食, 饮食制作后随机取样测定钠含量为 0.284% (原子吸收法)。

肾上腺切除的两组大鼠每天腹腔注射地塞米松 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 以保证大鼠正常糖皮质激素生理量^[4]。术后第 3 周起, 各组大鼠分别给药 4 周。给药方案为: sham-ADX 组予无菌蒸馏水及橄榄油注射; ADX 组予地塞米松及橄榄油注射; CsA 组予地塞米松及 CsA 注射。给药剂量及途径为: 无菌蒸馏水 1 ml/ (kg·d) 腹腔注射; 橄榄油 1 ml/ (kg·d) 皮下注

射; 环孢素 A 25 mg/ (kg·d) 溶解于橄榄油皮下注射。

尿蛋白排泄量检测 按 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天生物技术公司) 说明书操作。24 h 尿蛋白排泄量 (mg) = 尿蛋白浓度 (mg/ml) \times 尿量 (ml) \times 20 (稀释倍数)。

肌酐清除率检测 血清和尿肌酐浓度均用日立 7170A 自动生化仪测定 (苦味酸法)。肌酐清除率 (ml/min) = [尿肌酐浓度 ($\mu\text{mol}/\text{L}$) \times 尿量 (ml)] / [血肌酐浓度 ($\mu\text{mol}/\text{L}$) \times 1 440 (min)]

血和尿电解质检测 血清和尿液钾钠均用 A&T 公司 EA07 自动电解质仪检测 (离子选择电极法)。24 h 尿钠或钾排泄量 (mmol) = 尿钠或钾浓度 (mmol/L) \times 尿量 (ml) \div 1 000

肾组织病理检查 具体操作参考文献 [5]。

血、尿和肾组织醛固酮检测 单克隆醛固酮酶免疫试剂盒购自美国 Cayman Chemical 公司, 具体操作严格按照试剂盒说明书进行。

肾脏醛固酮合成酶 CYP11B2 mRNA 的表达 处死大鼠时用套管针逆行穿刺腹主动脉, 夹闭肾动脉分支以上腹主动脉近心段, 并在左侧肾静脉上剪一小口, 然后经套管针灌注预冷无菌生理盐水, 冲出肾组织中血液, 直至肾脏变白。迅速剪下一侧肾脏用无 RNA 酶的铝箔包好, 迅速置于液氮冻存用于 RNA 检测。RNA 检测由 ABI7500 实时荧光定量 PCR 扩增仪完成。实时荧光定量 PCR 母液 (SYBR® Green I Real-time PCR Master Mix) 购自东洋纺, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。大鼠 CYP11B2 和内参照 GAPDH 的引物序列及反应条件为: CYP11B2 上游引物 5'-ACGCCATCAAAGCCAAC-3', 下游引物 5'-GCCACCAACAGGGTAGAG-3', 扩增

片断 236bp, 退火温度 59℃; GAPDH 上游引物 5'-TGGGTGTGAACCACGAGAA-3', 下游引物 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3', 扩增片断 145 bp, 退火温度 58℃。CYP11B2 和 GAPDH 变性温度均为 95℃, 延伸温度均为 72℃, 40 个循环。目的基因 mRNA 相对表达量 = $2^{-(CYP11B2的Ct - GAPDH的Ct)} \times 10^3$ (Ct 代表循环阈值)。

统计学处理 采用 SPSS12.0 统计软件, 全部计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组计量资料比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

结 果

大鼠死亡率 至第 2 周末给药前, 两个肾上腺切除组大鼠各有 2 只 (25%) 死亡, 而后再无大鼠死亡。

尿蛋白排泄量 实验前 ADX 组及 CsA 组尿蛋白排泄量分别为 (3.13 ± 0.69) 和 (3.15 ± 1.14) mg/d, 与 sham-ADX 组 (2.69 ± 0.41) mg/d 比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$); 6 周后 ADX 组及 CsA 组尿蛋白排泄量分别为 (2.52 ± 0.77) 和 (11.80 ± 2.12) mg/d, 与 sham-ADX 组 (2.38 ± 0.52) mg/d 比较, ADX 组差异无显著性 ($P > 0.05$), CsA 组显著升高 ($P < 0.01$)。

肌酐清除率 实验前 ADX 组及 CsA 组肌酐清除率分别为 (1.47 ± 0.27) 和 (1.43 ± 0.25) ml/min, 与 sham-ADX 组 (1.38 ± 0.24) ml/min 比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$); 6 周实验结束时 ADX 组及 CsA 组肌酐清除率分别为 (1.26 ± 0.07) 和 (0.56 ± 0.07) ml/min, 与 sham-ADX 组 (1.47 ± 0.24) ml/min 比较, ADX 组差异无显著性 ($P > 0.05$), CsA 组显著升高 ($P < 0.01$)。

肾组织病理 光镜检查显示 ADX 组大鼠未出现明显病理改变。给予 CsA 后, 大鼠肾皮质区出现灶状和带状间质纤维化及肾小管萎缩 (图 1)。

血和尿醛固酮水平 术后第 2 天时, 两个肾上腺切除组大鼠血和尿中均未检测到醛固酮。6 周时两个肾上腺切除组大鼠血和尿中再次出现醛固酮 (表 1)。

血及尿钠钾浓度 肾上腺切除第 2 天, 两个肾上腺切除组大鼠尿钠排泄均增多、血钠降低, 尿钾排泄减少, 血钾升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。6 周时 ADX 及 CsA 组大鼠的尿钠排泄和血钠水平均已完全正常 ($P > 0.05$), 尿钾排泄略有增加, 血钾略有下降, 但均未达到正常水平 (与 sham-ADX 组比较, $P < 0.05$) (表 2)。

肾脏醛固酮合成酶表达和组织醛固酮水平 6 周时 sham-ADX、ADX 及 CsA 组大鼠肾脏组织醛固酮合成酶 CYP11B2 mRNA 的相对表达量分别为 1.02 ± 0.38、1.99 ± 0.12 及 2.25 ± 0.22, 两个肾上腺切除组的表达较 sham-ADX 组均显著上调 ($P < 0.05$)。sham-ADX、ADX 及 CsA 组大鼠肾脏组织醛固酮水平分别为 (1.75 ± 0.28)、(3.41 ± 0.19) 及 (8.68 ± 0.77) pg/mg, 两个肾上腺切除组大鼠肾脏组织醛固酮水平较 sham-ADX 组均显著增高 ($P < 0.01$)。

讨 论

本研究通过肾上腺切除和正常盐饮食成功制作 CsA 慢性肾毒性大鼠模型。其肾脏病理检查呈现灶状和条带状肾间质纤维化及肾小管萎缩, 化验结果显示轻度蛋白尿、肌酐清除率下降, 这些改变与经典的低盐饮食所致 CsA 慢性肾毒性大鼠模型一致, 提示本研究所造模型成功^[6]。本研究单纯肾上腺切除组未出现上述改变, 表明肾上腺切除本身对肾脏结构和功能无明显影响。

表 1 大鼠的血和尿醛固酮水平

Table 1 Aldosterone levels in the serum and urine of rats

醛固酮水平 Aldosterone level	时间 Time	假手术组 Sham-ADX group	ADX 组 ADX group	CsA 组 CsA group
血醛固酮 Serum aldosterone (pg/ml)	0 天 Day 0	1 309 ± 231	1 130 ± 185	1 372 ± 309
	2 天 Day 2	1 236 ± 250	0	0
	6 周 Week 6	1 532 ± 350	662 ± 209 ^a	852 ± 87 ^a
尿醛固酮 Urine aldosterone (pg/ml)	0 天 Day 0	2 248 ± 515	2 698 ± 358	2 335 ± 159
	2 天 Day 2	2 465 ± 206	0	0
	6 周 Week 6	2 563 ± 229	1 315 ± 135 ^a	3 644 ± 98 ^a

与假手术组比较, ^a $P < 0.05$

^a $P < 0.05$ compared with sham-ADX group

表2 大鼠血及尿钠钾水平

Table 2 Sodium and potassium levels in the serum and urine of rats

电解质 Electrolytes	时间 Time	假手术组 Sham-ADX group	ADX 组 ADX group	CsA 组 CsA group
血钠 Serum Na ⁺ (mmol/L)	0 天 Day 0	148.51 ± 2.47	150.09 ± 1.53	149.62 ± 2.24
	2 天 Day 2	148.25 ± 2.84	136.67 ± 1.78 ^b	137.53 ± 2.39 ^b
	6 周 Week 6	143.51 ± 1.53	142.67 ± 1.77	143.12 ± 1.26
尿钠 Urine Na ⁺ (mmol/d)	0 天 Day 0	1.91 ± 0.35	1.82 ± 0.27	2.37 ± 0.43
	2 天 Day 2	2.26 ± 0.59	4.31 ± 0.73 ^a	3.94 ± 0.62 ^a
	6 周 Week 6	2.09 ± 0.51	1.94 ± 0.65	2.18 ± 0.3
血钾 Serum K ⁺ (mmol/L)	0 天 Day 0	4.69 ± 0.35	4.73 ± 0.13	4.76 ± 0.31
	2 天 Day 2	4.81 ± 0.29	6.88 ± 0.39 ^a	6.84 ± 0.37 ^a
	6 周 Week 6	4.56 ± 0.35	5.85 ± 0.15 ^a	6.50 ± 0.33 ^a
尿钾 Urine K ⁺ (mmol/d)	0 天 Day 0	2.58 ± 0.46	2.52 ± 0.48	2.47 ± 0.51
	2 天 Day 2	2.39 ± 0.39	1.02 ± 0.26 ^a	0.95 ± 0.21 ^a
	6 周 Week 6	2.41 ± 0.31	1.37 ± 0.49 ^a	1.28 ± 0.16 ^a

与假手术组比较, ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 compared with sham-ADX group

Rosen 等^[6]用低盐饮食造成“钠耗竭”,制作CsA慢性肾毒性的大鼠模型。本研究肾上腺切除大鼠术后2d血及尿中未检测出醛固酮,尿钠排泄增多,血钠显著减低,存在类似于低盐饮食造成的一过性“钠耗竭”状态。有研究者认为“钠耗竭”是造模成功的关键,低钠可以激活肾素-血管紧张素-醛固酮系统,使肾血管收缩导致肾髓质缺血,并上调多种促纤维化因子(转化生长因子-β1、骨桥蛋白、纤溶酶原激活剂抑制物-1等)表达^[1,7-8],而促进模型大鼠肾小管间质纤维化发生。

肾上腺以外组织产生的醛固酮现被称为组织醛固酮,肺动脉和肠系膜上动脉、脑组织、肝脏、肺和甲状腺囊泡均能产生组织醛固酮^[9-12]。肾脏是产生醛固酮的重要器官,大鼠系膜细胞和人近端肾小管上皮细胞能产生醛固酮^[13-14],正常和糖尿病大鼠肾脏有醛固酮合成酶表达^[15]。

本研究造模时切除肾上腺完整,在实验结束处死大鼠时也未发现肾上腺再生;而且术后2d血和尿中检测不到醛固酮,尿钠排泄增加、血钠减低,尿钾排泄减少、血钾上升,表明肾上腺全切手术成功。但是,6周实验结束时,发现大鼠血及尿中醛固酮已部分恢复,尿钠排泄和血钠水平已正常,尿钾排泄和血钾水平较术后2d时有所改善;同时肾组织中醛固酮合成酶CYP11B2 mRNA表达上调,肾组织醛固酮水平显著增高。提示在切除肾上腺后,肾组织醛固酮合成代偿性增加,而且释放入血部分代偿循环醛固酮,发挥维持机体电解质平衡作用。由于本研究设计的局限性,本研究未探讨肾上腺切除后,肾脏以外器官的组织醛固酮是否会代偿性合成增加并

释放入血。

本研究建立的新型CsA慢性肾毒性大鼠模型的意义和优点是:能研究无循环醛固酮存在时,组织醛固酮在此模型中的致病作用。

(本文图1见插图第2页)

(志谢:感谢董鸿瑞副主任技师的热情帮助)

参 考 文 献

- [1] Feria I, Pichardo I, Juárez P, *et al.* Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity [J]. *Kidney Int*, 2003, 63(1):43-52.
- [2] Perez-Rojas JM, Derive S, Blanco JA, *et al.* Renocortical mRNA expression of vasoactive factors during spironolactone protective effect in chronic cyclosporine nephrotoxicity [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 289(5):F1020-F1030.
- [3] 徐平西, 刘惠玲. 去肾上腺大鼠垂体内IL-6水平的变化:PCR定量技术的辅助分析[J]. *解剖学报*, 2000, 31(3):207-211.
- [4] Stanton B, Giebisch G, Klein-Robbenhaar G, *et al.* Effects of adrenalectomy and chronic adrenal corticosteroid replacement on potassium transport in rat kidney [J]. *J Clin Invest*, 1985, 75(4):1317-1326.
- [5] 朱运锋, 谌贻璞, 芮宏亮, 等. 虫草菌粉对慢性马兜铃酸肾病大鼠模型肾间质纤维化的保护作用[J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(38):2667-2671.
- [6] Rosen S, Greenfeld Z, Brezis M. Chronic cyclosporine-induced nephropathy in the rat. A medullary ray and inner stripe injury [J]. *Transplantation*, 1990, 49(2):445-452.
- [7] Pichler RH, Franceschini N, Young BA, *et al.* Pathogenesis of cyclosporine nephropathy: roles of angiotensin II and

- osteopontin [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1995, 6(4):1186-1196.
- [8] Shihab FS, Bennett WM, Tanner AM, *et al.* Angiotensin II blockade decreases TGF-beta1 and matrix proteins in cyclosporine nephropathy [J]. *Kidney Int*, 1997, 52(3):660-673.
- [9] Wu P, Guo Z, Zhang Y, *et al.* Aldosterone overproduction and CYP11B2 mRNA overexpression in vessels of spontaneously hypertensive rats [J]. *Horm Res*, 1998, 50(1):28-33.
- [10] Gomez-Sanchez EP, Ahmad N, Romero DG, *et al.* Is aldosterone synthesized within the rat brain [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 288(2):E342-E346.
- [11] Wu P, Liang X, Dai Y, *et al.* Aldosterone biosynthesis in extraadrenal tissues [J]. *Chin Med J (Engl)*, 1999, 112(5):414-418.
- [12] Greenman Y, Trostanetsky Y, Ben-Shemen S, *et al.* Thyroid cysts; a new extra-adrenal site of aldosterone synthase expression and increased aldosterone content [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2007, 66(6):886-889.
- [13] 赖凌云, 顾勇, 陈靖, 等. 大鼠系膜细胞醛固酮的合成及其对细胞外基质的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2003, 83(21):1900-1905.
- [14] 罗洋, 谌贻璞. 内皮素对人近端肾小管上皮细胞合成组织醛固酮的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2005, 85(1):2070-2075.
- [15] Xue C, Siragy HM. Local renal aldosterone system and its regulation by salt, diabetes, and angiotensin II type 1 receptor [J]. *Hypertension*, 2005, 46(3):584-590.

(收稿日期: 2009-04-24)