



DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.12.006

<http://xbyx.xysm.net/xbwk/fileup/PDF/2013121233.pdf>

曲尼斯特延缓糖尿病肾病肾间质纤维化的作用及机制

罗俊辉^{1,2}, 李瑛¹, 杨阳¹, 李军¹, 孙林¹, 段绍斌¹, 刘虹¹, 刘伏友¹, 刘玉平¹, 奚易云¹, 尤燕华¹, 李华¹

(1. 中南大学湘雅二医院肾内科, 长沙 410011; 2. 湖南省第二人民医院肾内科, 长沙 410007)

[摘要]目的: 研究曲尼斯特延缓糖尿病肾病肾间质纤维化的作用及机制。**方法:** 建立糖尿病肾病(DKD)大鼠模型: SD大鼠随机分为正常对照组($n=6$)、DKD模型组($n=8$)、曲尼斯特低剂量($n=8$)和高剂量治疗组($n=8$)。采用高糖高脂饲料喂养联合低剂量STZ注射构建大鼠DKD模型。成模后, 分别予以曲尼斯特200 mg/(kg·d)(曲尼斯特低剂量组)和400 mg/(kg·d)(曲尼斯特高剂量组)分2次灌胃。于第8周末处死大鼠, 收集大鼠24 h尿液测24 h尿白蛋白排泄量, 收集血测肾功能及血白蛋白; 取部分肾组织置于4%中性甲醛溶液中固定, 采用免疫组织化学检测肾组织补体C3a受体(C3aR), E-钙黏附蛋白(epithelial cadherin, E-Cadherin), α -SMA, 纤维连接蛋白(fibronectin, FN), I型胶原蛋白(collagen I, Col I), 干细胞生长因子(stem cell factor, SCF)和干细胞因子受体(c-kit)的表达以及分布; Western印迹检测肾组织E-cadherin, α -SMA, FN, Col I, SCF和c-kit蛋白的表达; RT-PCR检测肾组织FN, Col I, SCF, c-kit mRNA的表达。**结果:** 曲尼斯特能抑制肥大细胞在DKD大鼠肾组织的浸润; DKD模型组肾小管上皮细胞E-cadherin的表达较正常对照组减少, 并可见 α -SMA表达, 曲尼斯特可一定程度逆转这一过程; 与正常对照组比较, DKD模型组肾小管间质区域Col I和FN的表达增加, 曲尼斯特能剂量依赖性抑制Col I和FN的表达; DKD大鼠肾组织SCF, c-kit蛋白及mRNA表达增加; 肾组织SCF, c-kit蛋白表达与肥大细胞浸润程度及肾小管间质FN, Col I蛋白的表达呈显著正相关。曲尼斯特能抑制SCF, c-kit mRNA及蛋白的表达($P<0.05$)。**结论:** 肥大细胞参与了DKD大鼠肾间质纤维化的发生发展, 曲尼斯特可能通过阻断SCF/c-kit信号通路, 抑制肥大细胞的募集而逆转DKD大鼠肾小管上皮细胞的EMT, 抑制肾间质纤维化。

[关键词] 曲尼斯特; 糖尿病肾病; 肾间质纤维化; 肥大细胞; 干细胞生长因子; 干细胞因子受体

Role and mechanism of tranilast preventing the progression of tubulointerstitial fibrosis in diabetic kidney diseases

LUO Junhui^{1,2}, LI Ying¹, YANG Yang¹, LI Jun¹, SUN Lin¹, DUAN Shaobin¹, LIU Hong¹, LIU Fuyou¹, LIU Yuping¹, XI Yiyun¹, YOU Yanhua¹, LI Hua¹

(1. Department of Nephrology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011;

2. Department of Nephrology, Second People's Hospital of Hunan Province, Changsha 410007, China)

收稿日期(Date of reception): 2013-06-04

作者简介(Biography): 罗俊辉, 硕士, 住院医师, 主要从事糖尿病肾病肾间质纤维化方面的研究。

通信作者(Corresponding author): 李瑛, Email: liyingdoctor@163.com

基金项目(Foundation items): 国家自然科学基金(81100486和81370792); 湖南省自然科学基金重点项目(10JJ2011); 湖南省科技计划项目(2013SK3036); 中华医学会临床医学专项资金(13030400425); 中南大学代谢综合症研究中心基金(DY-2008-02-03)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81100486, 81370792), Natural Science Foundation of Hunan Province, P. R. China (10JJ2011), Hunan Provincial Science and Technology Program (2013SK3036) and Scientific Project of Research Center of Metabolic Syndrome in Central South University, China (DY-2008-02-03).

ABSTRACT

Objective: To determine the role and mechanism of tranilast preventing the progression of tubulointerstitial fibrosis in diabetic kidney disease (DKD).

Methods: Sprague-Dawley rats were randomly divided into a control group ($n=6$), DKD model group ($n=8$), low dose tranilast group [200 mg/(kg·d), $n=8$], and high dose tranilast group [400 mg/(kg·d), $n=8$]. Tranilast was administered daily after the model was built. Rats were sacrificed at day 56, 24 hour urine was collected to measure 24-hour urine albumin excretion, and blood was collected to determine the renal function and serum albumin. Then the kidneys were harvested and subjected to studies. The expression of C3aR, E-cadherin, α -SMA, fibronectin(FN), collagen I (Col I), stem cell factor (SCF) and c-kit were detected by immunohistochemical staining respectively. The expression of E-cadherin, α -SMA, FN, Col I, SCF and c-kit protein was analyzed by Western blot, and the expression of FN, Col I, SCF and c-kit mRNA was examined by RT-PCR.

Results: Tranilast can inhibit the infiltration of mast cells in the kidneys of DKD rats. The expression of α -SMA in the kidneys of DKD rats increased significantly ($P<0.05$), while the expression of E-cadherin decreased ($P<0.05$). Tranilast increased the expression of E-cadherin and decreased the expression of α -SMA in the prophase of DKD dose dependently. The expressions of FN and Col I were increased in the tubulointerstitial fields in DKD model rats ($P<0.05$). After the tranilast treatment, these changes were relieved to a certain degree ($P<0.05$). The expression of SCF and c-kit in the tubular and interstitial tissue was slight. The increased expressions of SCF and c-kit protein and mRNA in DKD model rats were downregulated by tranilast ($P<0.05$). The expressions of SCF and c-kit were positively correlated with the infiltration degree of mast cells and the expressions of FN, Col I.

Conclusion: Mast cells participate in and aggravate the renal tubulointerstitial fibrosis in DKD rats. Tranilast can reverse the EMT of renal tubular cells and inhibit the tubulointerstitial fibrosis of DKD by blocking the infiltration of mast cells induced by SCF/c-kit pathway.

KEY WORDS

tranilast; diabetic kidney disease; tubulointerstitial fibrosis; mast cells; stem cell factor; c-kit

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)已成为终末期肾功能衰竭的最重要原因之一。DKD早期可出现肾小管间质纤维化, 且不依赖肾小球病变直接加速肾功能的恶化^[1-2]。研究肾间质纤维化的发病机制、阻断参与纤维化的信号通路, 延缓DKD肾小管间质纤维化, 已成为当前的研究热点。

肥大细胞作为一种重要的炎症细胞逐渐被关注, 研究^[3]报道肥大细胞参与DKD肾间质纤维化的发生。曲尼斯特是一种肥大细胞稳定剂, 临床上常利用其稳定肥大细胞膜, 抑制组胺等释放的作用治疗过敏性疾病和哮喘等。最近有研究显示曲尼斯特可缓解梗阻性肾病大鼠^[4]、阿霉素肾病大鼠^[5]及DKD患者肾间质纤维化^[6]。曲尼斯特延缓肾间质纤维化的作用机制可能与其抗氧化、抑制炎症因子产生和释放、抑制胶原的合成, 从而减少局部炎症有关。另有研究^[6]表明曲尼斯特可通过抑制转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1,

TGF- β 1), 逆转肾小管上皮细胞向间充质细胞转分化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT), 从而减少肾间质ECM的聚集。然而曲尼斯特是否可通过抑制肥大细胞的募集及活化, 逆转DKD肾小管上皮细胞EMT, 从而缓解DKD肾间质纤维化尚不完全清楚。

1 材料与方法**1.1 材料****1.1.1 实验动物**

6周龄健康雄性SD大鼠(二级)30只, 购于中南大学湘雅医学院动物学部, 体质量为(181.65 \pm 5.15)g, 由中南大学动物学部动物房饲养。所有大鼠自由摄食进水, 室温18~25℃。

1.1.2 主要试剂

曲尼斯特由中国药科大学赠送; 链脲佐菌

素(streptozotocin, STZ)为美国Sigma公司产品, 4℃贮存; 反转录试剂盒(RevertAid™ First strand cDNA Synthesis Kit)为美国Ferments公司产品; SYBR GreenER qPCR SuperMix为美国Invitrogen公司产品; DEPC为美国Sigma公司产品; 微量白蛋白试剂盒购自上海太阳生物公司; DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物有限公司; 组织蛋白裂解液和苯甲基磺酰氟(PMSF)购自北京鼎国生物技术责任有限公司; BCA蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术研究所; PVDF膜为美国Millipore公司产品。

兔抗人(大小鼠)C3aR多克隆抗体, 鼠抗人(大小鼠) α -SMA单克隆抗体, 兔抗鼠(大小鼠)E-Cadherin多克隆抗体为美国Santa Cruz公司; 纤维连接蛋白(fibronectin, FN)多克隆抗体, 小鼠抗大鼠 β -actin多克隆抗体, 小鼠二抗, 兔二抗试剂盒购自北京中杉金桥公司; 兔抗人(大小鼠)I型胶原蛋白(collagen I, Col I)多克隆抗体为Meridian Life Science公司产品。

1.2 方法

1.2.1 模型制作及分组

大鼠适应性喂养3 d, 随机分为2组: 正常组(A组)6只; 糖尿病模型组24只。正常组喂食普通饲料, 糖尿病模型组喂食高糖高脂饲料8周后腹腔注射小剂量STZ(30 mg/kg)1次。正常对照组按同等剂量腹腔注射枸橼酸缓冲液。72 h后测血糖和尿糖, 空腹血糖大于13.8 mmol/L, 随机血糖均高于16.7 mol/L, 尿糖++++, 认为糖尿病模型成功。

糖尿病造模成功4周后尿微量白蛋白>30 mg/24 h认为DKD大鼠模型制备成功^[7]。DKD大鼠随机分3组: 模型组(B组)以1.5%羟甲基纤维素钠灌胃; 低剂量曲尼斯特组(C组)以曲尼斯特200 mg/(kg·d)分2次灌胃(曲尼斯特溶于1.5%羟甲基纤维素钠溶液配制成的混悬液); 高剂量曲尼斯特组(D组)曲尼斯特400 mg/(kg·d)分2次灌胃。实验期间每3 d测尾静脉血糖1次, 血糖>26.0 mmol/L的大鼠皮下注射适量(0.4~3.2 U)长效胰岛素, 随机血糖维持在16.7 mmol/L以上。每周测体质量1次。

第8周末一次性处死大鼠。处死前2 d放入代谢笼收集24 h尿标本, 离心后取上清液保存于-70℃冰箱待测尿白蛋白。3%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠, 断头处死动物, 自腹主动脉插管注入4℃预冷的生理盐水至整个肾颜色变苍白后, 小心游离切断肾蒂, 肾置于冰上, 快速去除包膜, 将一侧肾横切切成3 mm厚的组织块, 置于4%中性甲醛溶液中固定用于制作石蜡切片, 行病理学以及免疫组织化学处理, 另一侧肾冻于液氮中用于提取组织蛋白及RNA。

1.2.2 甲苯胺蓝染色检测肥大细胞

由于甲苯胺蓝染液可将肾组织肥大细胞染成蓝紫色, 可用甲苯胺蓝染色检测肥大细胞的存在。具体方法: 改良甲苯胺蓝染色按文献[8]进行。组织切片脱蜡至水后入染液30 s, 蒸馏水洗2次, 每次3~5 min, 放入改良的甲苯胺蓝染液(1%, pH1.0)室温下染色30 s~5 min, 经0.5%冰醋酸分化数秒, 在镜下控制分色时间, 以肥大细胞异染颗粒呈蓝紫色为宜, 二甲苯透明, 中性树脂封固。

1.2.3 免疫组织化学检测大鼠肾组织 C3aR, E-cadherin, α -SMA, FN, Col I, SCF, c-kit 的表达

石蜡切片脱蜡, 经各级乙醇至水, 经二甲苯脱蜡、梯度酒精至水后浸入0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH6.0)中行微波热修复抗原, 室温冷却20 min后, PBS冲洗5 min, 然后置于3% H_2O_2 室温孵育10 min, 以消除内源性过氧化物酶的活性, 滴加正常山羊血清封闭, 免洗, 滴加适当稀释一抗(C3aR 1:200, E-cadherin 1:200, α -SMA 1:100, FN 1:200, Col I 1:100, SCF 1:50, c-kit 1:200)4℃过夜。第2天取出, 分别滴加相对应的HRP标记的羊抗兔IgG二抗工作液及山羊抗小鼠IgG二抗(1:100), DAB显色, 显微镜下控制显色时间。

根据肾组织肥大细胞特异性高表达C3aR的特点, 采用免疫组织化学的方法标记肾组织的肥大细胞。文献[9]证明作为肾组织肥大细胞的标志分子, C3aR对肥大细胞的检出率与抗Tryptase抗体对肥大细胞的检出率敏感性无明显差异, 而特异性更强。

1.2.4 Western 印迹检测大鼠肾组织 E-cadherin, α -SMA, FN, Col I, SCF, c-kit 的表达

取50~100 mg肾组织在液氮中碾磨成粉末状, 加入500 μ L预冷的蛋白裂解液, 4℃, 12000 r/m离心30 min, 留取上清液为总蛋白, 并用Bradford法测定蛋白浓度。蛋白质与loading buffer混合后95℃变性5 min, 行SDS-PAGE, 然后湿转至PVDF膜。2%BSA室温封闭2 h, 加入稀释一定倍数的E-cadherin, α -SMA, FN, Col I, SCF, c-kit一抗, 4℃过夜。加HRP偶联标记的山羊抗兔IgG及山羊抗小鼠IgG二抗, 室温反应1 h, 化学发光剂ECL反应, 置柯达化学发光成像仪中曝光。采用图像分析软件分析, 以测得的各指标的吸光度与内参照 β -actin吸光度的比值代表相对定量值。

1.2.5 RT-PCR 检测大鼠肾组织 FN, Col I, SCF 和 c-kit 的表达

用TRIzol试剂盒(美国Invitrogen公司)提供的方法抽提细胞总RNA, 按反转录试剂盒(RevertAid™ First strand cDNA Synthesis Kit)说明书的步骤进行反转录合成cDNA。运用荧光染料法检测各组大鼠肾

组织中FN, Col I, SCF和c-kit的表达情况。通过测定PCR扩增过程中与双链DNA非特异性结合的SYBR GREEN染料强化反应PCR产物表达量。每次实验设3个复孔, 独立实验重复3次。引物由上海生工生物技术有限公司合成, 引物序列见表1。PCR反应程序: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min后; 95 °C变性10 s, 60 °C退火60 s, 72 °C延伸60 s, 共执行40个循环; 最后72 °C总延伸10 min。

实验同时以双蒸水代替模板为阴性对照。以管家基因 β -actin的转录数量作为内源性RNA参照。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示基因的相对表达量, 其中 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ 样品 - ΔCt 基准 = (样品待测基因Ct值 - 样品 β -actinCt值) - (基准样品待测基因Ct值 - 基准 β -actinCt值)。

1.3 统计学处理

应用SPSS17.0软件系统进行统计分析, 结果用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。计量资料采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 两样本均数的比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 PCR引物

引物名称	引物序列
FN	5'-TGACAACCTGCCGTAGACCTGG-3'
	5'-TACTGGTTGTAGGTGTGGCCG-3'
Col I	5'-TGGCAAGAACGGAGATGA-3'
	5'-AGCTGTTCCAGGCAATCC-3'
SCF	5'-AGGCTCATTCGTCTGCTCTG-3'
	5'-CTACCCATGTCCACCTTTCT-3'
c-kit	5'-GGCCTAGCCAGAGACATCAG-3'
	5'-GAGAGGCTGTGTGGAAGAGG-3'
β -actin	5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3'
	5'-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3'

2 结果

2.1 曲尼斯特对 DKD 大鼠肾组织肥大细胞浸润的影响

甲苯胺蓝染色显示: 正常对照组大鼠肾组织肾间质区域(主要是血管周围和肾小管间隙里)偶可见数个肥大细胞散在分布, 肾小球未见肥大细胞和间质炎症细胞浸润。DKD模型组小血管管周、外膜及肾小管间隙、肾间质炎症区域等可见多个肥大细胞, 肾小管上皮细胞间也可见肥大细胞。8周末时曲尼斯特干预组肥大细胞浸润较DKD模型组明显减少(图1, 2)。

肥大细胞C3aR免疫组织化学结果显示: C3aR标

记的肥大细胞在正常大鼠肾组织中偶尔可见, 主要位于肾小管间隙及血管管周, 肾小球未见; DKD大鼠肾组织可见肥大细胞浸润增多, 主要分布于肾小管间隙、血管管周、血管外膜、肾间质炎症区域、肾小球囊周围, 偶尔可见肥大细胞分布在肾小管上皮细胞之间, 肾小球中未见肥大细胞的浸润; 曲尼斯特能抑制肾组织C3aR的表达, 并与其剂量呈正相关($P < 0.05$), 说明曲尼斯特可减少肥大细胞的浸润(图2, 3)。

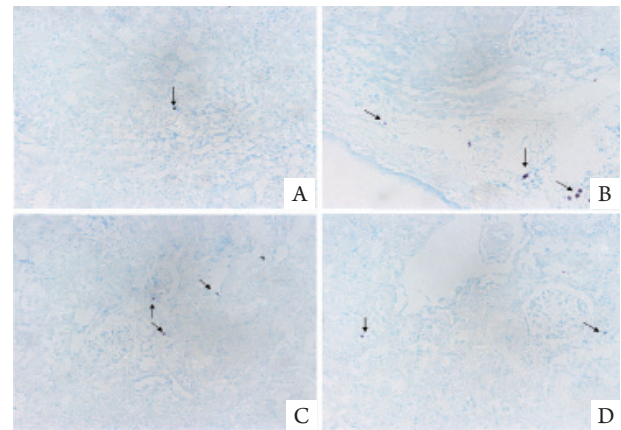


图1 甲苯胺蓝染色示各组大鼠肾组织肥大细胞分布情况($\times 200$)。A: 正常对照组; B: DKD模型组; C: 曲尼斯特低剂量组; D: 曲尼斯特高剂量组。

Figure 1 Toluidin blue staining showing distribution of mast cells in the groups ($\times 200$). A: Control group; B: DKD model group; C: Tranilast 200 mg/(kg·d) group; D: Tranilast 400 mg/(kg·d) group.

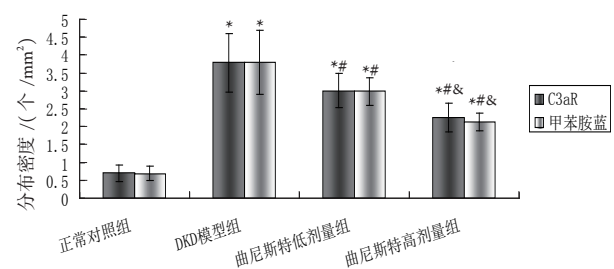


图2 各组肾组织肥大细胞的分布密度比较。与正常对照组比较, $P < 0.05$; 与DKD模型组比较, $^*P < 0.05$; 与曲尼斯特低剂量组比较, $^{\&}P < 0.05$ 。

Figure 2 Distribution density of mast cells in the groups. $^*P < 0.05$ vs Control group; $^{\&}P < 0.05$ vs DKD model group; $^{\&}P < 0.05$ vs Tranilast 200 mg/(kg·d) group.

2.2 曲尼斯特对 DKD 大鼠肾组织 E-cadherin, α -SMA 表达的影响

2.2.1 免疫组织化学结果

正常对照组肾皮质组织上皮细胞标志

E-cadherin主要在肾小管上皮细胞-细胞连接处及细胞-基底膜连接处表达。与正常对照组相比, DKD模型组肾组织E-cadherin表达明显减少($P<0.05$), 曲尼斯特能上调E-cadherin的表达($P<0.05$), 并随剂量的增大效果增强(图4, 5)。

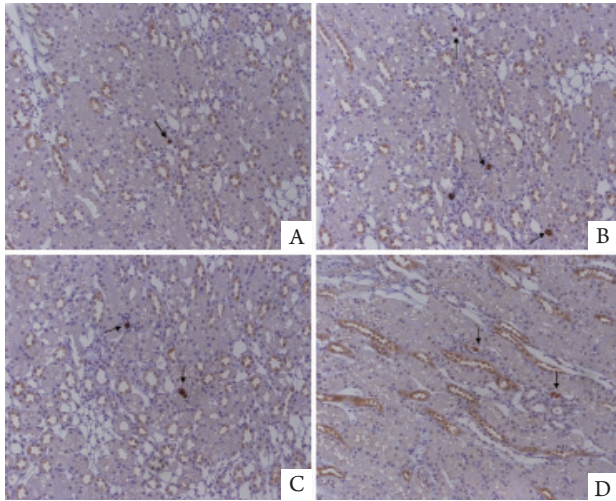


图3 免疫组织化学示各组肾组织 C3aR 阳性肥大细胞分布情况 ($\times 200$)。A: 正常对照组; B: DKD 模型组; C: 曲尼斯特低剂量组; D: 曲尼斯特高剂量组。

Figure 3 Immunohistochemical staining showing C3aR positive expressed cells in groups ($\times 200$). A: Control group; B: DKD model group; C: Tranilast 200 mg/(kg·d) group; D: Tranilast 400 mg/(kg·d) group.

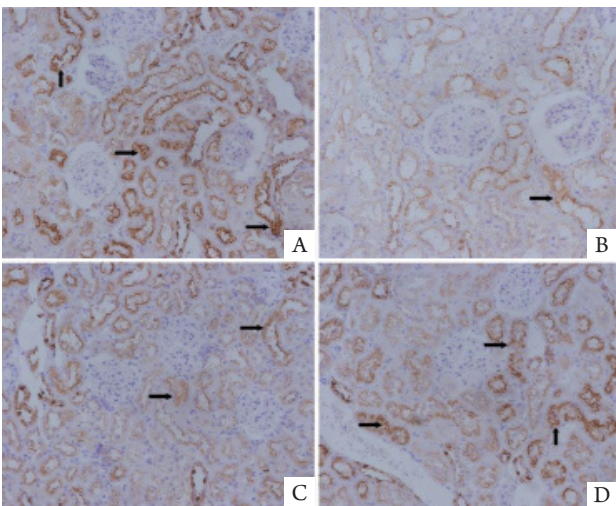


图4 免疫组织化学示各组肾组织 E-cadherin 蛋白表达情况 ($\times 200$)。A: 正常对照组; B: DKD 模型组; C: 曲尼斯特低剂量组; D: 曲尼斯特高剂量组。

Figure 4 Immunohistochemistry showing expression of E-cadherin protein in groups ($\times 200$). A: Control group; B: DKD model group; C: Tranilast 200 mg/(kg·d) group; D: Tranilast 400 mg/(kg·d) group.

正常对照组肾皮质组织间充质细胞标志 α -SMA仅少量表达于肾小血管壁和肾间质细胞。DKD模型组 α -SMA不仅表达于肾小血管管壁及肾间质细胞, 许多肾小管上皮细胞也表达 α -SMA, 并随纤维化程度的加重而表达逐渐增加。与正常对照组相比, DKD模型组肾组织 α -SMA表达明显增加($P<0.05$)。曲尼斯特能下调 α -SMA的表达($P<0.05$), 并随剂量的增加下调作用增强(图5, 6)。

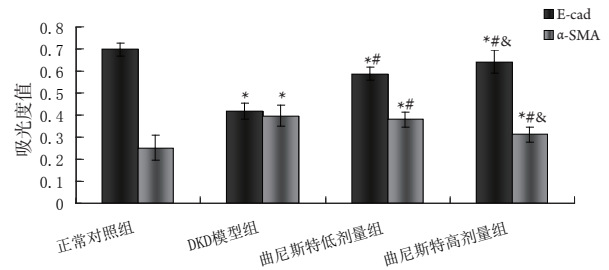


图5 各组肾组织 E-cadherin, α -SMA 吸光度值比较 (免疫组织化学结果)。与正常对照组比较, $^*P<0.05$; 与 DKD 模型组比较, $^{\#}P<0.05$; 与曲尼斯特低剂量组比较, $^{\&}P<0.05$ 。

Figure 5 Optical density value of E-cadherin, α -SMA protein in groups (results of immunohistochemistry). $^*P<0.05$ vs Control group; $^{\#}P<0.05$ vs DKD model group; $^{\&}P<0.05$ vs tranilast 200 mg/(kg·d) group.

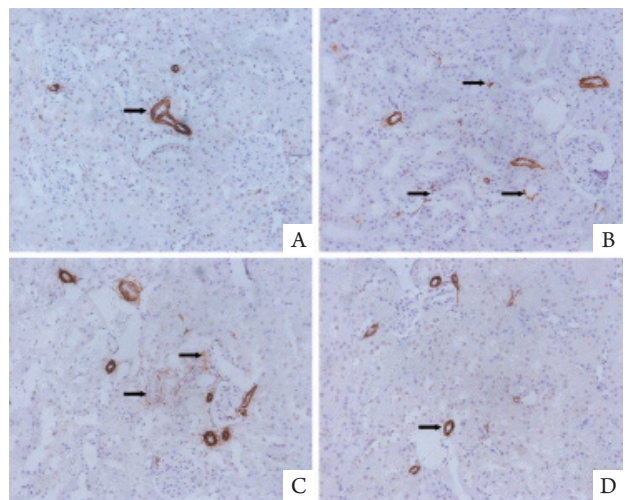


图6 免疫组织化学示各组肾组织 α -SMA 蛋白表达情况 ($\times 200$)。A: 正常对照组; B: DKD 模型组; C: 曲尼斯特低剂量组; D: 曲尼斯特高剂量组。

Figure 6 Immunohistochemistry showing expression of α -SMA protein in groups ($\times 200$). A: Control group; B: DKD model group; C: Tranilast 200 mg/(kg·d) group; D: Tranilast 400 mg/(kg·d) group.

2.2.2 Western 印迹结果

与正常对照组相比, DKD模型组8周末肾组织 E-cadherin蛋白表达减少($P<0.05$), α -SMA蛋白表达增加($P<0.05$), 曲尼斯特能剂量依赖性上调DKD大鼠肾组织E-cadherin蛋白的表达($P<0.05$), 并抑制DKD大鼠肾组织 α -SMA蛋白的表达($P<0.05$, 图7)。

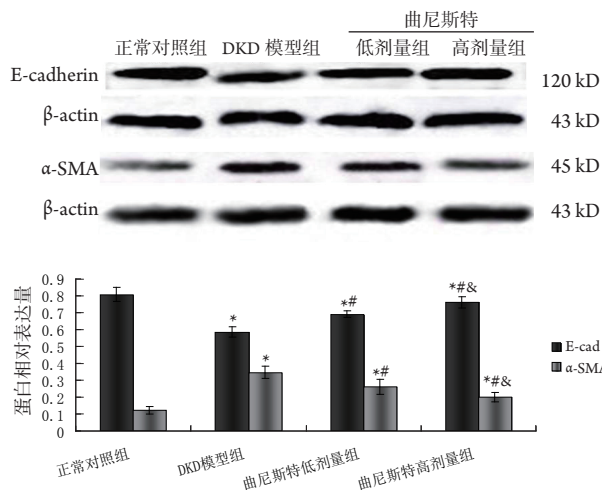


图7 Western 印迹示各组 E-cadherin, α -SMA 蛋白的相对表达量。与正常对照组比较, $^*P<0.05$; 与 DKD 模型组比较, $^{\#}P<0.05$; 与曲尼斯特低剂量组比较, $^{\&}P<0.05$ 。

Figure 7 Western blot showing the expression of E-cadherin, α -SMA protein in groups. $^*P<0.05$ vs Control group; $^{\#}P<0.05$ vs DKD model group; $^{\&}P<0.05$ vs tranilast 200 mg/(kg-d) group.

2.3 曲尼斯特对 DKD 大鼠肾组织 FN, Col I 表达的影响

2.3.1 免疫组织化学结果

FN主要沉积于正常对照组大鼠肾小球、肾小管基底膜及小血管周围; DKD大鼠肾组织肾间质区域特别是小血管周围及炎症区域FN的表达明显增加($P<0.05$); 曲尼斯特能下调肾小球和肾小管FN表达($P<0.05$), 并且随剂量的增加效果增强(图8, 9)。

Col I主要表达于正常对照组大鼠肾小球及肾小管基底膜、肾间质、血管外膜及血管周围; DKD大鼠肾小球周围、肾小管间质及血管外膜及血管周围Col I表达明显增加, 在空泡样变的肾小管上皮细胞胞膜中也有少量的表达。曲尼斯特能下调Col I的表达($P<0.05$), 并且随剂量的增加下调作用更明显(图9, 10)。

2.3.2 Western 印迹结果

与正常对照组相比, DKD模型组8周末肾组织FN, Col I的蛋白表达上调($P<0.05$), 曲尼斯特可剂量依赖性抑制DKD大鼠肾组织FN, Col I蛋白($P<0.05$, 图11)。

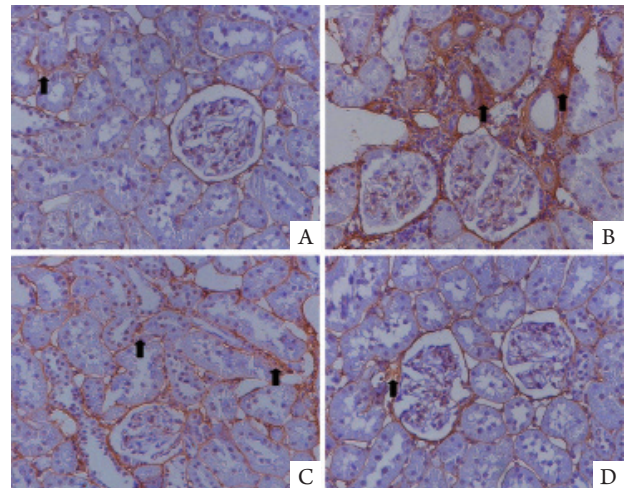


图8 免疫组织化学示各组肾组织 FN 蛋白表达情况 ($\times 200$)。A: 正常对照组; B: DKD 模型组; C: 曲尼斯特低剂量组; D: 曲尼斯特高剂量组。

Figure 8 Immunohistochemistry showing expression of FN protein in groups ($\times 200$). A: Control group; B: DKD model group; C: Tranilast 200 mg/(kg-d) group; D: Tranilast 400 mg/(kg-d) group.

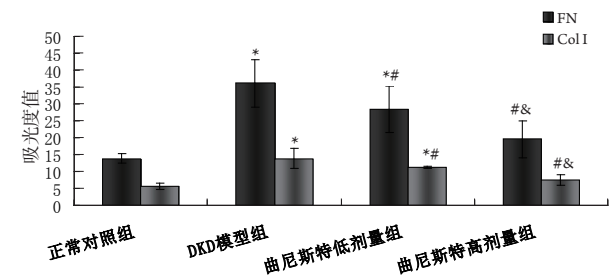


图9 各组肾组织 FN, Col I 吸光度值比较 (免疫组织化学结果)。与正常对照组比较, $^*P<0.05$; 与 DKD 模型组比较, $^{\#}P<0.05$; 与曲尼斯特低剂量组比较, $^{\&}P<0.05$ 。

Figure 9 Optical density value of FN, Col I protein in groups (results of immunohistochemistry). $^*P<0.05$ vs Control group; $^{\#}P<0.05$ vs DKD model group; $^{\&}P<0.05$ vs tranilast 200 mg/(kg-d) group.

2.3.3 PCR 结果

与正常对照组相比, DKD模型组8周末肾组织FN, Col I mRNA的表达上调($P<0.05$), 8周末时肾组织FN, Col I mRNA的表达曲尼斯特低剂量组较DKD模型组开始下降($P<0.05$), 高剂量组表达明显下降, 与DKD组相比差异有统计学意义($P<0.05$), 而与正常对照组相比上调不明显($P>0.05$, 图12)。

2.4 曲尼斯特对 DKD 大鼠肾组织 SCF, c-kit 表达的影响

2.4.1 免疫组织化学结果

SCF在正常肾组织的肾小管、肾间质区域可见少量的表达。DKD模型组大鼠肾小管上皮细胞胞浆、肾小球系膜细胞及上皮细胞、肾间质炎症细胞的胞浆及血管壁可见明显棕色阳性颗粒

表达, 肾小管上皮细胞胞浆及肾小管间隙, 部分肾小管腔表达尤其明显。曲尼斯特可减少SCF的表达($P < 0.05$), 并随剂量的增加抑制作用增强($P < 0.05$; 图13, 14)。

c-kit在正常肾组织的肾小管上皮细胞包膜、胞浆、肾小球内及肾间质区域均未见明显表达。DKD组大鼠肾小管上皮细胞胞浆、胞膜、肾间质炎症细胞的胞膜中表达明显增加, 特别是在空泡样变的肾小管上皮细胞胞膜中连续表达, 但肾小球无表达。曲尼斯特可抑制c-kit的表达($P < 0.05$), 与其剂量呈正相关($P < 0.05$; 图14, 15)。

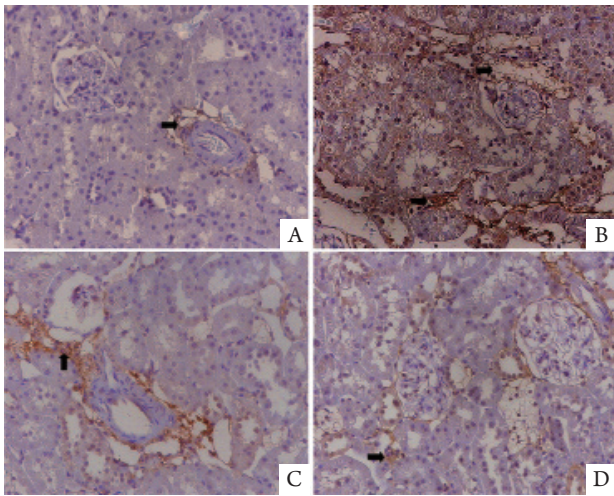


图10 免疫组织化学示各组肾组织Col I蛋白表达情况($\times 200$)。A: 正常对照组; B: DKD模型组; C: 曲尼斯特低剂量组; D: 曲尼斯特高剂量组。

Figure 10 Immunohistochemistry showing expression of Col I protein in groups ($\times 200$). A: Control group; B: DKD model group; C: Tranilast 200 mg/(kg·d) group; D: Tranilast 400 mg/(kg·d) group.

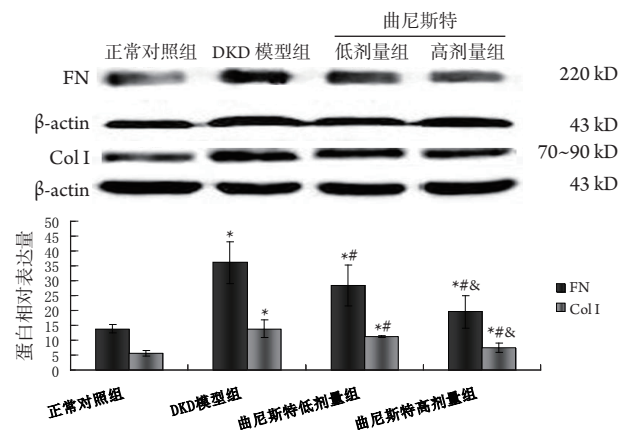


图11 Western印迹示各组FN, Col I蛋白的相对表达量。与正常对照组比较, $P < 0.05$; 与DKD模型组比较, $P < 0.05$; 与曲尼斯特低剂量组比较, $P < 0.05$ 。

Figure 11 Western blot showing the expression of FN, Col I protein in groups. $P < 0.05$ vs Control group; $P < 0.05$ vs DKD model group; $P < 0.05$ vs tranilast 200 mg/(kg·d) group.

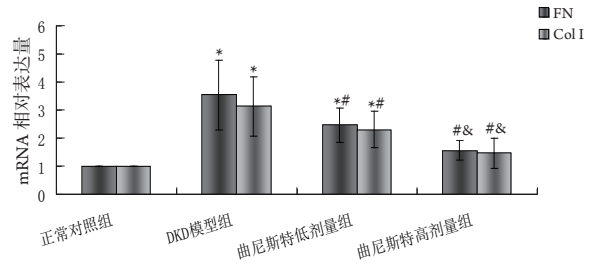


图12 各组根据Ct值得到的FN, Col I mRNA的相对表达量。与正常对照组比较, $P < 0.05$; 与DKD模型组比较, $P < 0.05$; 与曲尼斯特低剂量组比较, $P < 0.05$ 。

Figure 12 mRNA expression of FN, Col I in the groups according to Ct values. $P < 0.05$ vs Control group; $P < 0.05$ vs DKD model group; $P < 0.05$ vs tranilast 200 mg/(kg·d) group.

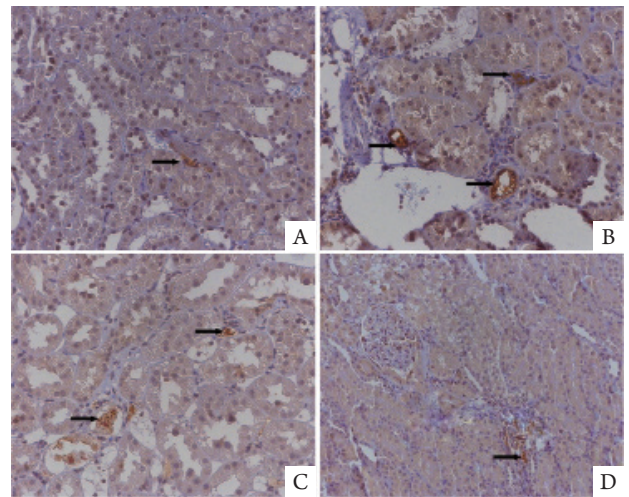


图13 免疫组织化学示各组肾组织SCF蛋白表达情况($\times 200$)。A: 正常对照组; B: DKD模型组; C: 曲尼斯特低剂量组; D: 曲尼斯特高剂量组。

Figure 13 Immunohistochemistry showing expression of SCF protein in groups ($\times 200$). A: Control group; B: DKD model group; C: Tranilast 200 mg/(kg·d) group; D: Tranilast 400 mg/(kg·d) group.

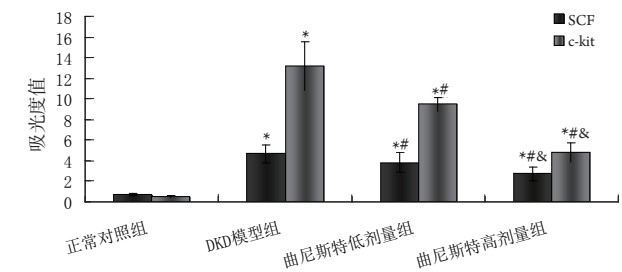


图14 各组肾组织SCF, c-kit吸光度值比较(免疫组织化学结果)。与正常对照组比较, $P < 0.05$; 与DKD模型组比较, $P < 0.05$; 与曲尼斯特低剂量组比较, $P < 0.05$ 。

Figure 14 Optical density value of SCF, c-kit protein in groups (results of immunohistochemistry). $P < 0.05$ vs Control group; $P < 0.05$ vs DKD model group; $P < 0.05$ vs tranilast 200 mg/(kg·d) group.

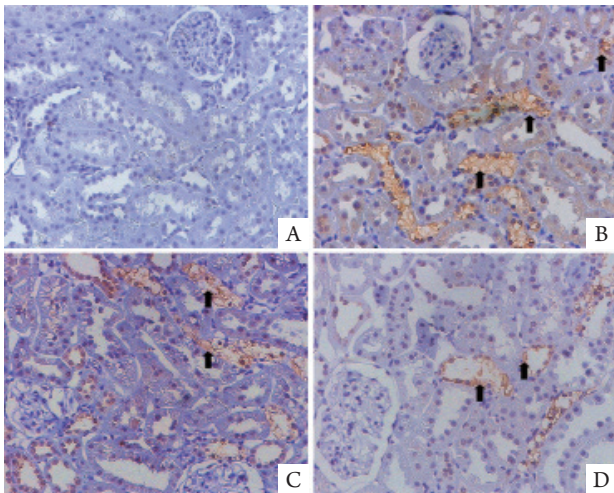


图 15 免疫组织化学示各组肾组织 c-kit 蛋白表达情况 (×200)。A: 正常对照组; B: DKD 模型组; C: 曲尼斯特低剂量组; D: 曲尼斯特高剂量组。

Figure 15 Immunohistochemistry showing expression of c-kit protein in groups (×200). A: Control group; B: DKD model group; C: Tranilast 200 mg/(kg·d) group; D: Tranilast 400 mg/(kg·d) group.

2.4.2 Western 印迹结果

与正常对照组相比, DKD 模型组 8 周末肾组织 SCF, c-kit 的蛋白表达明显上调 ($P < 0.05$), 曲尼斯特可下调 DKD 大鼠肾组织 SCF、c-kit 蛋白的表达 ($P < 0.05$), 并呈剂量依赖性 ($P < 0.05$, 图 16)。

2.4.3 RT-PCR 结果

与正常对照组相比, 8 周末 DKD 模型组肾组织 SCF, c-kit mRNA 表达均明显上调 ($P < 0.05$), 曲尼斯特可下调 DKD 大鼠肾组织 SCF, c-kit mRNA 的表达 ($P < 0.05$), 并与其剂量呈正相关 ($P < 0.05$, 图 17)。

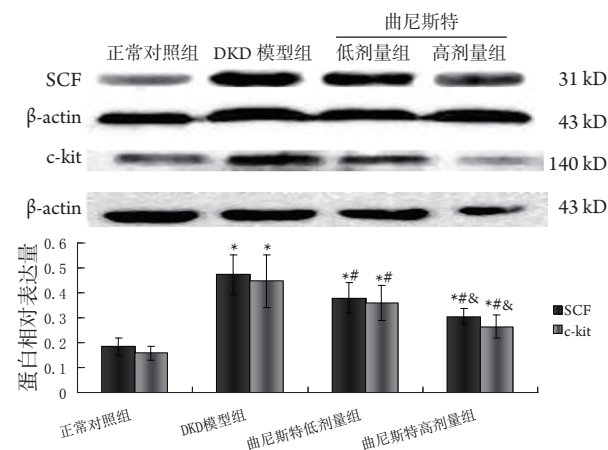


图 16 Western 印迹示各组 SCF, c-kit 蛋白的相对表达量。与正常对照组比较, $^*P < 0.05$; 与 DKD 模型组比较, $^{\#}P < 0.05$; 与曲尼斯特低剂量组比较, $^{\&}P < 0.05$ 。

Figure 16 Western blot showing the expression of SCF, c-kit protein in groups. $^*P < 0.05$ vs Control group; $^{\#}P < 0.05$ vs DKD model group; $^{\&}P < 0.05$ vs tranilast 200 mg/(kg·d) group.

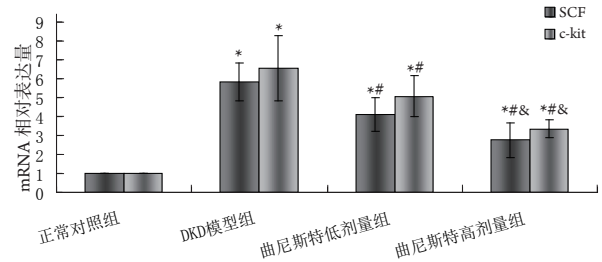


图 17 各组根据 Ct 值得到的 SCF, c-kit mRNA 的相对表达量。与正常对照组比较, $^*P < 0.05$; 与 DKD 模型组比较, $^{\#}P < 0.05$; 与曲尼斯特低剂量组比较, $^{\&}P < 0.05$ 。

Figure 17 mRNA expression of SCF, c-kit in the groups according to Ct values. $^*P < 0.05$ vs Control group; $^{\#}P < 0.05$ vs DKD model group; $^{\&}P < 0.05$ vs tranilast 200 mg/(kg·d) group.

2.5 SCF, c-kit 与肾组织肥大细胞浸润程度及肾小管间质 FN, Col I 表达的相关性

肾组织 SCF, c-kit 蛋白的表达与肾组织肥大细胞浸润程度及肾小管间质 FN, Col I 蛋白的表达呈显著正相关 ($P < 0.01$, 表 2)。

表 2 肾组织 SCF, c-kit 的表达与肥大细胞浸润程度及 FN, Col I 表达的相关性

Table 2 Correlation of SCF, c-kit with the infiltration of mast cells and renal fibrosis

指标	SCF		c-kit	
	r	P	r	P
C3aR 阳性肥大细胞	0.86	<0.01	0.91	<0.01
FN	0.818	<0.01	0.855	<0.01
Col I	0.794	<0.01	0.872	<0.01

3 讨论

肾间质纤维化是包括 DKD 在内的各种肾脏疾病进展到终末期肾衰竭的共同途径和主要病理基础。目前认为肾间质纤维化是一个动态过程, 涉及多种炎症细胞及细胞因子、血管活性物质以及细胞外基质的生成失衡等诸多因素。肾小管上皮细胞在尿糖、尿蛋白、氧化应激等病理性刺激下极易发生结构及功能的损伤, 出现上皮细胞空泡样变、脱落及凋亡, 部分肾小管上皮细胞为了对抗环境的损伤, 逃脱潜在的凋亡, 可通过表型转化为肌成纤维细胞, 进入间质、异常合成 ECM (细胞外基质), 这一过程即为肾小管上皮向间充质上皮细胞转分化 (EMT)。正常情况下, 肾小管上皮细胞通过不同的细胞黏附机制紧密连接在一起, E-cadherin 是一种特异性的黏附分子蛋白, 它对维持肾小管上皮细胞结构和功能的完整性起到关键

作用^[10]。E-cadherin是正常肾小管上皮细胞的标志分子,其表达的下调将可能导致肾小管上皮细胞结构完整性破坏^[11]。 α -SMA是一种有收缩功能的细胞骨架微丝结构,是肾小管上皮细胞转分化形成肌成纤维细胞的标志。DKD肾小管上皮细胞E-cadherin表达减少、 α -SMA表达上调,肾小管上皮细胞转分化成肌成纤维细胞,导致ECM合成增加、降解减少,大量ECM积聚并沉积于肾小球、肾间质内,导致肾小球硬化及肾间质纤维化。FN及Col I是目前公认的主要细胞外基质成分。因此,早期逆转或抑制肾小管上皮细胞EMT,减少FN,Col I在肾组织的异常合成及过度沉积对治疗DKD肾间质纤维化、缓解DKD患者肾功能进展具有重要作用。

肥大细胞起源于骨髓CD34⁺多能祖细胞,胞浆颗粒中富含炎症介质。肥大细胞作为一种重要的炎症细胞,近年来其在肾间质纤维化中的作用越来越受到重视。笔者既往的研究^[12]发现:肥大细胞在蛋白负荷肾病大鼠肾间质明显增多,推测其在蛋白尿所致肾间质纤维化过程中起重要作用。目前已经有很多临床及动物研究^[3,13-15]表明:IgA肾病、膜性肾病、狼疮性肾炎、过敏性紫癜、马兜铃酸肾病和DKD等多种肾病的肾间质中均有肥大细胞浸润,且与肾间质纤维化和肾功能损伤的严重程度呈明显正相关。肥大细胞可通过脱颗粒释放大量的炎症介质,如糜蛋白酶、肾素、组胺及TGF- β 等,激活肾素-血管紧张素-醛固酮系统,上调TGF- β 的表达,激活肾组织局部炎症,参与肾小管上皮细胞EMT的发生等,从而参与肾间质纤维化的进程^[16];肥大细胞活化后也可分泌类胰蛋白酶,能促进VEGF的产生,促进炎症反应及细胞外基质的产生,从而促进肾间质纤维化。Soma等^[6]通过将曲尼斯特制剂用于早期及进展期DKD患者,发现曲尼斯特能延缓早期及进展期DKD患者肾间质纤维化。最新发现曲尼斯特在单侧输尿管梗阻性肾病中具有明显的抗纤维化作用^[4]。曲尼斯特可通过抑制TGF- β 的表达从而减少肾小管EMT、保护肾小管基底膜、缓解肾小管的损伤,从而缓解肾间质纤维化。

本研究通过构建STZ诱导的DKD大鼠模型,发现DKD模型组大鼠肾组织肥大细胞的浸润较正常对照组增多,并与肾间质纤维化呈显著正相关,曲尼斯特干预组肾间质肥大细胞浸润减少。同时本研究发现作为间充质细胞表型标志的 α -SMA只表达于正常肾组织的小血管管壁以及很少的间质细胞中,肾小管上皮细胞未见表达,上皮细胞标记蛋白E-cadherin在正常肾小管上皮细胞均表达明显。而DKD模型组中肾小管上皮细胞有一定量的

α -SMA的表达,E-cadherin在肾小管上皮细胞中表达明显下降;应用曲尼斯特干预后, α -SMA的表达有所下降而E-cadherin的表达增加。曲尼斯特呈剂量依赖性的下调 α -SMA的表达和上调E-cadherin的表达,具有逆转DKD肾小管EMT的作用。同时DKD大鼠肾组织FN,Col I蛋白及mRNA的表达上调,曲尼斯特可呈剂量依赖性地减少DKD大鼠肾组织FN,Col I蛋白的表达,并与肥大细胞的浸润程度密切相关,所以曲尼斯特可能通过抑制肥大细胞,逆转DKD肾小管EMT,从而缓解DKD大鼠肾间质纤维化,但具体机制尚不清楚。

SCF又名肥大细胞生长因子,是肥大细胞局部募集最主要的趋化因子,主要来源骨髓基质细胞、肌成纤维细胞、单核-巨噬细胞等炎症及促纤维化细胞。然而在成纤维细胞、上皮细胞、内皮细胞等结构细胞也可表达和分泌^[17]。SCF/c-kit通路被认为是肥大细胞活化的主要信号途径,SCF与肥大细胞上c-kit受体结合激活c-kit,诱导肥大细胞的分化、增殖和重要基因的转录^[18-19];c-kit受体又称CD117蛋白,是由c-kit原癌基因编码的具有酪氨酸激酶活性的跨膜糖蛋白受体。有人在新月体型肾小球肾炎发现SCF,c-kit表达明显增加,通过促进肾脏的单核-巨噬细胞等炎症细胞分化为成熟的细胞并迁徙到组织损伤及炎症部位,与肥大细胞相互作用促进肾间质纤维化,同时提示肥大细胞及SCF可能与新月体的形成有关^[20]。

本研究发现早期DKD大鼠肾组织SCF,c-kit表达也明显增加,而曲尼斯特干预组SCF,c-kit呈剂量依赖性地表达减少,与肥大细胞及肾间质纤维化呈显著正相关。笔者推测DKD肾组织高表达SCF及c-kit,SCF/c-kit促进肥大细胞在DKD肾间质中募集及活化,从而促进DKD肾间质纤维化,并与肥大细胞的分布密度及肾间质纤维化呈显著正相关;曲尼斯特可剂量依赖性地抑制SCF,c-kit,同时减少肥大细胞在肾间质的浸润,表明曲尼斯特可能通过降低SCF,c-kit的表达,减少肥大细胞的浸润及活化,稳定肥大细胞膜,从而起到缓解DKD大鼠肾间质纤维化的作用。曲尼斯特延缓DKD肾间质纤维化的作用有待进一步研究。

参考文献

1. Najafian B, Kim Y, Crosson JT, et al. Atubular glomeruli and glomerulotubular junction abnormalities in diabetic nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(4): 908-917.
2. Bagby SP. Diabetic nephropathy and proximal tubule ROS: challenging

- our glomerulocentricity[J]. *Kidney Int*, 2007, 71(12): 1199-1202.
3. Okon K, Stachura J. Increased mast cell density in renal interstitium is correlated with relative interstitial volume, serum creatinine and urea especially in diabetic nephropathy but also in primary glomerulonephritis[J]. *Pol J Pathol*, 2007, 58(3): 193-197.
 4. Kaneyama T, Kobayashi S, Aoyagi D, et al. Tranilast modulates fibrosis, epithelial-mesenchymal transition and peritubular capillary injury in unilateral ureteral obstruction rats[J]. *Pathology*, 2010, 42(6): 564-573.
 5. Tao Y, Wu X, Li D D, et al. Experimental study in renal protective effect of tranilast on rats with adriamycin nephropathy[J]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2008, 39(1): 76-79.
 6. Soma J, Sato K, Saito H, et al. Effect of tranilast in early-stage diabetic nephropathy[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2006, 21(10): 2795-2799.
 7. 陈立平, 周巧玲, 刘抗寒, 等. 洛沙坦对糖尿病肾病大鼠足细胞 nephrin 及 podocin 表达的影响[J]. *中国全科医学*, 2008, 11(17): 1544-1546, 1549.
CHEN Liping, ZHOU Qiaoling, LIU Kanghan, et al. Effects of losartan to podocyte expression of nephrin and podocin in diabetic nephropathy rats[J]. *Chinese General Practice*, 2008, 11(17): 1544-1546, 1549.
 8. Welle MM, Proske SM, Harvima IT, et al. Demonstration of tryptase in bovine cutaneous and tumor mast cells[J]. *J Histochem Cytochem*, 1995, 43(11): 1139-1144.
 9. 郑敬民, 朱小东, 张明超, 等. C3aR——检测肾组织肥大细胞的敏感标志[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2011, 20(4): 319-324.
ZHENG Jingmin, ZHU Xiaodong, ZHANG Mingchao, et al. C3aR: a sensitive marker for renal mast cell[J]. *Chinese Journal Of Nephrology, Dialysis & Transplantation*, 2011, 20(4): 319-324.
 10. Zheng G, Lyons JG, Tan TK, et al. Disruption of E-cadherin by matrix metalloproteinase directly mediates epithelial-mesenchymal transition downstream of transforming growth factor-beta1 in renal tubular epithelial cells[J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(2): 580-591.
 11. Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis[J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(4): 1465-1475.
 12. Li Y, Zhou LT, Liu FY, et al. Mast cells infiltration is involved in renal interstitial fibrosis of a rat model with protein-overload nephropathy[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2010, 25; 33(3): 240-248.
 13. Silva GE, Costa RS, Ravinal RC, et al. Mast cells, TGF-beta1 and alpha-SMA expression in IgA nephropathy[J]. *Dis Markers*, 2008, 24(3): 181-190.
 14. 谭昭, 田雪飞, 谌贻璞, 等. 肥大细胞与狼疮肾炎肾间质纤维化关系的初步探讨[J]. *中华风湿病学杂志*, 2006, 10(3): 145-148.
TAN Zhao, TIAN Xuefei, CHEN Yipu, et al. Preliminary studies on the potential relationship between mast cells and renal interstitial fibrosis in lupus nephritis[J]. *Chinese Journal of Rheumatology*, 2006, 10(3): 145-148.
 15. 章高平, 党西强, 易著文, 等. 肥大细胞在过敏性紫癜肾炎患儿肾间质纤维化中的作用[J]. *中国当代儿科杂志*, 2007, 9(2): 125-128.
ZHANG Gaoping, DANG Xiqiang, YI Zhuwen, et al. Role of mast cells in the development of renal interstitial fibrosis in children with Henoch-Schonlein purpura nephritis[J]. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*, 2007, 9(2): 125-128.
 16. Zheng JM, Yao GH, Cheng Z, et al. Pathogenic role of mast cells in the development of diabetic nephropathy: a study of patients at different stages of the disease[J]. *Diabetologia*, 2012, 55(3): 801-811.
 17. Da Silva CA, Reber L, Frossard N. Stem cell factor expression, mast cells and inflammation in asthma[J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2006, 20(1): 21-39.
 18. Okayama Y, Kawakami T. Development, migration, and survival of mast cells[J]. *Immunol Res*, 2006, 34(2): 97-115.
 19. Reber L, Da Silva CA, Frossard N. Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases[J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 533(1/3): 327-340.
 20. El KM, El NA. Stem cell factor and crescentic glomerulonephritis[J]. *Am J Kidney Dis*, 2003, 41(4): 785-795.

(本文编辑 郭征)

本文引用: 罗俊辉, 李瑛, 杨阳, 李军, 孙林, 段绍斌, 刘虹, 刘伏友, 刘玉平, 奚易云, 尤燕华, 李华. 曲尼斯特延缓糖尿病肾病肾间质纤维化的作用及机制[J]. *中南大学学报:医学版*, 2013, 38(12): 1233-1242. DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.12.006

Cite this article as: LUO Junhui, LI Ying, YANG Yang, LI Jun, SUN Lin, DUAN Shaobing, LIU Hong, LIU Fuyou, LIU Yuping, XI Yiyun, YOU Yanhua, LI Hua. Role and mechanism of tranilast preventing the progression of tubulointerstitial fibrosis in diabetic kidney diseases[J]. *Journal of Central South University. Medical Science*, 2013, 38(12): 1233-1242. DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.12.006