

## · 短篇论著 ·

## Drp-1 在大鼠肾间质纤维化中的表达及红细胞生成素的保护作用

刘艳红 韩子明

肾间质纤维化是多种肾脏疾病发展到终末期肾衰竭的共同途径,而肾小管与间质细胞的凋亡会加重肾间质纤维化<sup>[1]</sup>。在凋亡因素刺激下,Drp-1 表达增加,线粒体持续分裂,相关凋亡因子表达水平改变及转位,从而诱导细胞凋亡<sup>[2]</sup>。红细胞生成素(EPO)对多种器官都有保护作用。本研究观察 Drp-1 在肾间质纤维化的表达及探讨 EPO 在其中的可能保护机制。

## 一、材料与方法

1. 材料: 81 只健康 13 周龄雄性 SD 大鼠由新乡医学院实验动物中心提供。EPO 购自上海克隆公司。人抗大鼠 Drp-1 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz。SABC 免疫组化染色试剂盒购自武汉博士德。

2. 动物分组及 UUO 模型的建立: 将大鼠按随机数字法分为假手术组、模型组和治疗组,每组 27 只。对模型组及治疗组大鼠采取左侧输尿管结扎并剪断;假手术组只游离输尿管而不结扎。治疗组于术后给予 3000 U·kg<sup>-1</sup>·周<sup>-1</sup> EPO 皮下注射;假手术组和模型组给予等量生理盐水注射。于术后第 7、14、21 天每组随机处死 9 只大鼠,检测 Scr 和 BUN,留取肾脏标本,制作石蜡切片用于 HE、Masson 和免疫组化染色。

3. 肾组织病理: HE 和 Masson 染色后在 IDA-2000 图像分析系统下计算肾间质纤维化相对面积<sup>[3]</sup>。用 SABC 法检测肾组织中的 Drp-1,操作步骤按试剂盒说明书进行。

4. 统计学分析: 用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异采用单因素方差分析。相关性判断采用 Pearson 法。 $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 二、结果

1. 肾功能: 各时间点模型组和治疗组 Scr、BUN 显著高于假手术组(均  $P < 0.01$ ),而治疗组显著低于模型组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1,表 2。

2. 肾组织病理: HE 及 Masson 结果显示,假手术组大鼠肾组织未见异常。模型组术后第 7 天肾间质有炎性细胞浸润,肾小管上皮细胞胞质疏松、肿胀和空泡变性,部分肾小管扩张,间质增宽,细胞及细胞外基质成分增多,

表 1 各组大鼠不同时间点 Scr( $\mu\text{mol/L}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	第 7 天	第 14 天	第 21 天
假手术组	9	38.36±3.52	43.05±5.27	44.10±4.68
模型组	9	84.19±4.27 <sup>a</sup>	108.44±5.63 <sup>ac</sup>	157.43±5.73 <sup>ac</sup>
治疗组	9	59.62±2.78 <sup>ab</sup>	74.39±6.80 <sup>abc</sup>	113.32±6.21 <sup>abc</sup>
F 值		146.293	214.086	207.425
P 值		< 0.05	< 0.05	< 0.05

注:与假手术组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与同组前一时间点比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

表 2 各组大鼠不同时间点 BUN 水平( $\text{mmol/L}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	第 7 天	第 14 天	第 21 天
假手术组	9	5.72±0.14	6.03±0.35	6.28±0.09
模型组	9	8.61±0.30 <sup>a</sup>	17.56±0.23 <sup>ac</sup>	24.56±1.42 <sup>ac</sup>
治疗组	9	6.49±1.28 <sup>ab</sup>	11.98±0.64 <sup>abc</sup>	16.84±0.47 <sup>abc</sup>
F 值		79.264	113.489	161.731
P 值		< 0.05	< 0.05	< 0.05

注:与假手术组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与同组前一时间点比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

皮质区和皮髓交界区出现纤维化;第 14 天可见肾间质炎细胞浸润明显,肾小管扩张明显,部分肾小管上皮细胞脱落、萎缩,间质增宽明显,皮质区和皮髓交界区纤维化明显;第 21 天炎细胞弥漫浸润,肾小管结构破坏严重,肾小管扩张变形及萎缩较重,小管间质增宽更加明显,可见大量增生的纤维组织。治疗组各时间点与模型组相比,肾间质炎细胞浸润减轻,肾小管扩张、萎缩明显改善,肾间质纤维化面积减少,肾间质损伤指数明显降低( $P < 0.05$ ),但仍高于假手术组( $P < 0.01$ )。见表 3,表 4。

3. Drp-1 表达: 免疫组化结果显示,假手术组各时间点 Drp-1 微量表达于肾间质和肾小管上皮细胞;模型组 Drp-1 表达于肾间质及肾小管上皮细胞胞质,表达量呈时间依赖性;治疗组与模型组表达部位基本一致,但范围缩小,强度减弱。见表 5。

4. 相关分析: 模型组和治疗组大鼠肾小管间质 Drp-1

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2013.03.013

作者单位: 450000 郑州, 南方医科大学附属郑州人民医院新生儿科(刘艳红); 新乡医学院第一附属医院内二科(韩子明)

通信作者: 韩子明, Email: hanziming1964@126.com

表 3 各组大鼠不同时间点肾小管间质损伤评分(%,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	第 7 天	第 14 天	第 21 天
假手术组	9	0.49±0.03	0.51±0.07	0.52±0.04
模型组	9	3.41±0.18 <sup>a</sup>	5.07±0.26 <sup>ac</sup>	6.38±0.25 <sup>ac</sup>
治疗组	9	2.32±0.21 <sup>ab</sup>	3.94±0.15 <sup>abc</sup>	5.03±0.28 <sup>abc</sup>
F 值		46.274	103.655	116.937
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

注:与假手术组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与同组前一时间点比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

表 4 各组大鼠不同时间肾间质纤维化相对面积(%,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	第 7 天	第 14 天	第 21 天
假手术组	9	1.63±0.09	1.72±0.11	1.86±0.15
模型组	9	14.43±0.57 <sup>a</sup>	27.85±1.39 <sup>ac</sup>	53.16±2.45 <sup>ac</sup>
治疗组	9	9.77±0.62 <sup>ab</sup>	17.36±0.82 <sup>abc</sup>	31.29±1.94 <sup>abc</sup>
F 值		85.033	126.572	187.836
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

注:与假手术组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与同组前一时间点比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

表 5 各组大鼠不同时间点 Drp-1 相对表达面积(%,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	第 7 天	第 14 天	第 21 天
假手术组	9	0.88±0.09	1.05±0.14	1.06±0.17
模型组	9	9.92±0.37 <sup>a</sup>	16.42±0.58 <sup>ac</sup>	25.74±0.19 <sup>ac</sup>
治疗组	9	6.05±0.21 <sup>ab</sup>	11.28±0.13 <sup>abc</sup>	18.63±0.22 <sup>abc</sup>
F 值		153.628	428.371	507.845
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

注:与假手术组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与同组前一时间点比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

阳性染色面积与肾小管间质损伤、肾间质纤维化相对面积呈正相关( $r = 0.923, r = 0.895$ , 均  $P < 0.05$ )。

### 三、讨论

间质纤维化愈重的地方,细胞凋亡数量愈多,间质纤维化程度与细胞凋亡数量呈正相关<sup>[1]</sup>。细胞凋亡的一个主要过程是线粒体断裂。Drp-1 主要位于细胞质,以多聚体的形式存在,当受到线粒体外膜分子的招募后,转位至线粒体外膜,并且集中于线粒体潜在的分裂位点。多个

Drp-1 分子包围线粒体最终至线粒体断裂,诱导细胞凋亡。高表达 Drp-1 可以加速线粒体分裂,产生大量线粒体片段。在 ATP 耗竭致肾小管上皮细胞凋亡的研究中发现,活化后的 Drp-1 可使线粒体片段化,进而释放膜间隙促凋亡蛋白,促进细胞凋亡<sup>[4]</sup>。EPO 可抑制肾小管细胞凋亡,从而减轻肾间质纤维化的程度,延缓慢性肾病的进展<sup>[5]</sup>。

本实验结果显示,治疗组各时间点与模型组比较,肾功能明显改善,肾间质炎细胞浸润减少,肾小管扩张及萎缩改善,纤维化面积减少,肾间质损伤指数及肾间质纤维化面积均明显降低。免疫组化结果显示模型组和治疗组各时间点 Drp-1 表达量均显著高于假手术组,而治疗组则显著低于同时点模型组。相关分析结果显示,肾组织 Drp-1 的表达量与肾间质损伤评分、肾间质纤维化相对面积呈正相关。结果说明 EPO 可能通过抑制 Drp-1 在肾组织的表达,使凋亡减轻,发挥其减轻肾间质纤维化的作用。

综上所述,Drp-1 过度表达可能是导致肾间质纤维化的机制之一,而 EPO 可能通过抑制 UUO 大鼠肾组织中 Drp-1 的表达,延缓肾间质纤维化的进程,对肾脏起保护作用,但 EPO 通过何种机制抑制 UUO 大鼠肾组织 Drp-1 的表达,尚待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Hewitson TD, Ho WY, Samuel CS. Antifibrotic properties of relaxin: in vivo mechanism of action in experimental renal tubulointerstitial fibrosis. *Endocrinology*, 2010, 151: 4938 - 4948.
- [2] Hidenori O, Katsuyoshi M. Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics. *J Biochem*, 2011, 149: 241-251.
- [3] 方展, 朱忠华, 张春, 等. 螺内酯对梗阻性肾病大鼠肾间质纤维化的防治作用. *中华肾脏病杂志*, 2006, 22: 50-52.
- [4] Izquierdo MC, Sanz AB, Mezzano S, et al. TWEAK (tumor necrosis factor - like weak inducer of apoptosis) activates CXCL16 expression during renal tubulointerstitial inflammation. *Kidney Int*, 2012, 81: 1098-1107.
- [5] Nakazawa Y, Nishino T, Obata K, et al. Recombinant human erythropoietin attenuates frenal tubulointerstitial injury in murine adriamycin - induced nephropathy. *Nephrology*, 2012, 8: 5301 - 5303.

(收稿日期:2012-08-14)

(本文编辑:李耀荣)