

· 基础研究 ·

罗格列酮对慢性环孢素肾病大鼠肾间质纤维化的保护作用

程根阳 李海剑 刘章锁 唐琳 权松霞

【摘要】 目的 探讨罗格列酮(RGZ)对环孢素 A(CsA)所致慢性环孢素肾病(CCN)大鼠肾间质纤维化的保护作用。方法 28 只健康雄性 SD 大鼠被随机分成 4 组:(1)对照组($n=6$):低盐饮食(LSD);(2)RGZ 组($n=6$):LSD+RGZ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$);(3)CsA 组($n=8$):LSD+CsA($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$);(4)RGZ+CsA 组($n=8$):LSD+CsA($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)+RGZ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。实时荧光定量 PCR 观察骨调素(OPN)及 RANTES 表达量;RT-PCR 法检测 MMP-9 和 TIMP-1 的表达量;常规染色观察肾脏病理改变。结果 RGZ 可改善 CsA 所致大鼠肌酐清除率的降低[(0.253 ± 0.027)比(0.133 ± 0.018) ml/min, $P < 0.05$];降低 CCN 大鼠肾间质单个核细胞浸润[(22.50 ± 2.71)比(30.38 ± 3.11), $P < 0.05$];减轻肾间质纤维化程度[(1.707 ± 0.019)比(2.335 ± 0.022), $P < 0.05$]。与 CsA 组比较, RGZ+CsA 组大鼠肾组织中 OPN 和 RANTES mRNA 表达量和 MMP-9、TIMP-1 mRNA 表达量降低(均 $P < 0.05$)。结论 RGZ 可能通过下调趋化因子 OPN、RANTES 及 MMP-9、TIMP-1 的表达,改善 CCN 大鼠肾间质纤维化。

【关键词】 环孢菌素; 纤维化; 罗格列酮

Rosiglitazone reduces renal interstitial fibrosis in chronic cyclosporine nephropathy rats

CHENG Gen-yang, LI Hai-jian, LIU Zhang-suo, TANG Lin, QUAN Song-xia, Department of Nephrology, the First Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

CHENG Gen-yang and LI Hai-jian are the first authors who contributed equally to the article

Corresponding author: LIU Zhang-suo, Email: zhangsuoliu@sina.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of rosiglitazone on renal interstitial fibrosis in chronic cyclosporine nephropathy (CCN) rats. **Methods** Twenty-eight rats were randomly assigned to control group, rosiglitazone (RGZ, $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) group, cyclosporine A(CsA, $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) group, rosiglitazone ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) +CsA group. Real-time PCR and RT-PCR methods were used to investigate the expressions of OPN, RANTES on the 14th day and MMP-9, TIMP-1 on the 35th day in kidney of CCN respectively. **Results** In comparison with control group, the expressions of OPN, RANTES, MMP-9, TIMP-1 in CsA and RGZ+CsA groups were increased ($P < 0.05$). In comparison with the CsA group, the expressions of OPN, RANTES, MMP-9, TIMP-1 in CsA+RGZ group significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Rosiglitazone may protect renal tissue after CCN by decreasing expressions of OPN, RANTES, MMP-9, TIMP-1.

【Key words】 Cyclosporine; Fibrosis; Rosiglitazone

炎性细胞浸润是肾脏疾病急性期的主要病

理改变,减少甚至去除炎性细胞浸润可大大减轻肾损伤的程度和延缓肾功能减退的进展。骨调素(OPN)及调节激活正常 T 细胞表达和分泌的细胞因子(RANTES)是与肾脏疾病有关的重要的趋化因子^[1]。基质金属蛋白酶(MMP)-组织金属蛋白酶抑制物(TIMP)是细胞外基质代谢的重要酶系,与慢性肾小管间质纤维化的关系密切。罗格列酮

DOI: 10.3760/ema.j.issn.1001-7097.2012.08.006

作者单位:450052 郑州大学第一附属医院肾内科(程根阳、李海剑、刘章锁、唐琳、权松霞);南阳市中心医院肾病风湿科(李海剑)

程根阳与李海剑对本文有同等贡献,均为第一作者

通信作者:刘章锁,Email:zhangsuoliu@sina.com

可从多种途径发挥调节作用,可显著改善大鼠病理改变,发挥保护效应^[3-4]。我们通过建立大鼠低盐慢性 CsA 肾毒性模型,观察罗格列酮干预治疗对 CsA 慢性肾毒性损伤的保护作用,并探讨 OPN,RANTES,MMP-9 和 TIMP-1 在 CsA 慢性肾毒性损伤发生机制中的作用。

材料和方法

1. 实验分组:健康雄性 SD 大鼠,低盐饮食(LSD,钠质量分数 0.038%)饲养 1 周,体质量 220~250 g,随机分为 4 组:(1)对照组(6 只):LSD 饲养;(2)RGZ 组(6 只):LSD+ RGZ(5 mg·kg⁻¹·d⁻¹)饲养;(3)CsA 组(8 只):LSD+CsA(15 mg·kg⁻¹·d⁻¹)饲养;(4)CsA+RGZ 组(8 只):LSD+CsA(15 mg·kg⁻¹·d⁻¹)+RGZ(5 mg·kg⁻¹·d⁻¹)。于实验第 14 天每组随机收获 3 只大鼠,实验第 35 天收获全部大鼠。

2. 体质量和血生化指标检测:收获动物前,大鼠体质量,血肌酐、尿肌酐和血白蛋白的检测在日立 7600 型全自动生化分析仪上完成。校正肌酐清除率(Ccr,ml·min⁻¹·kg⁻¹)=尿肌酐×[尿量·血肌酐⁻¹·体质量(kg)⁻¹]。

3. 肾组织病理学检查:肾组织经 10%缓冲甲醛固定,石蜡包埋,3 μm 切片,常规 HE、Masson 染色。光镜下观察细胞浸润及纤维化改变。在高倍镜(×400,HE)下计数每个视野间质单个核细胞数,避开肾小球和血管,每例计数 20 个不重复视野并求其均数。Masson 染色结果采用半定量分析,即随机选取 20 个连续不重复的视野(×400),观察肾间质阳性着色范围即为纤维化区域,用 HPIAS-1000 病理图文分析系统根据间质纤维化积分的百分数判定积分:0=无病变;0.5=<5%;1=5%~15%;1.5=16%~25%;2=26%~35%;2.5=36%~45%;3=>45%。以阳性面积与统计场总面积的比值作为肾小管间质纤维化的评分标准。

4. OPN 和 RANTES mRNA 检测:实时荧光定量 PCR 法检测第 14 天大鼠肾组织 OPN 和 RANTES mRNA 的表达量。总 RNA 提取及实时荧光定量 PCR 方法参照文献[5],β-actin 为内参照。扩增后目的基因相对表达量=2^{-Ct(OPN/Ct-β-actin)}×10³,以循环阈值 Ct 为目的基因 cDNA 达到指数扩增时的循环数。引物序列见表 1。以空白对照管的荧光值设为阈值。目的基因 mRNA 相对表达量=

表 1 实时荧光定量 PCR 引物设计

引物	引物序列(5'-3')	片段大小
OPN	上游: TCCTGCGGCAAGCATTCTC	126 bp
	下游:CTGCCAAACTCAGCCACTTTCA	
RANTES	上游:ACCAGCAGCAAGTGCTCCAA	189 bp
	下游:AGCTGGTTAGGACTAGAGCAAGCAA	
β-actin	上游:GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	150 bp
	下游:GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG	

2^{-Ct(cytokine/Ct-β-actin)}×10³,其中 Ct 代表循环阈值(Cycle Threshold,Ct),即目的基因 cDNA 达到指数扩增所需的循环数。目的基因起始拷贝数越多,达到指数扩增所需循环数越少,其 Ct 值越小。用荧光值曲线和 Ct 值表示 OPN 和 RANTES 的扩增量,再进行各组间的比较。

5. MMP-9 和 TIMP-1 mRNA 的检测:RT-PCR 法检测实验第 35 天大鼠肾组织 MMP-9 和 TIMP-1 mRNA 表达量。引物序列见表 2。10 μg 肾组织配制总 RNA 反转录反应体系,经 25℃ 10 min,42℃ 60 min,70℃ 10 min 反转录合成 cDNA,以此为模板分别用 MMP-9 引物和 TIMP-1 引物用 PCR 法进行扩增,扩增条件均为 95℃ 5 min,94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 40 s,35 个循环后 72℃ 5 min。应用 SYNGENE 凝胶成像系统分析成像,以目的 MMP-9 片段/β-actin 片段及 TIMP-1 片段/β-actin 片段的条带吸光度比值为相对表达量。

表 2 RT-PCR 引物设计

引物	引物序列(5'-3')	片段大小(bp)
MMP-9	P1:AGCCCGAGCCGACTTATGTGG	286
	P2:TGCCACTTGAGGTGCGCCTTCG	
TIMP-1	P1:GCATCTCTGGCCTCTCGCAT	218
	P2:TTTCCACAGCGTCAATCC	
β-actin	P1:CGACGAGCCCCACAGCAAGAG	525
	P2:CCAGGGAGGAAGAGGATGCCG	

6. 统计学方法:计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间差异性比较在方差齐后进行 LSD 检验。利用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析,检验水准为 0.05。

表3 各组大鼠体质量及血生化指标($\bar{x} \pm s$)

组别	体质量(g)		Ccr(ml/min)		Alb(g/L)	
	第14天	第35天	第14天	第35天	第14天	第35天
对照组(n=6)	325±5	360±10	0.482±0.026	0.479±0.023	32.13±2.11	34.50±2.36
RGZ组(n=6)	353±8	386±11	0.479±0.033	0.492±0.024	31.86±2.33	35.76±2.07
CsA组(n=7)	261±6 ^a	280±11 ^a	0.318±0.024 ^a	0.133±0.018 ^a	25.43±1.96 ^a	24.27±1.64 ^a
RGZ+CsA组(n=8)	286±10 ^a	300±12 ^{ab}	0.353±0.022 ^a	0.253±0.027 ^{ab}	29.19±1.69 ^a	27.96±1.48 ^a

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与CsA组比较,^b $P < 0.05$

表4 各组大鼠肾组织病理($\bar{x} \pm s$,/HP)

组别	单个核细胞数		间质纤维化比例	
	第14天	第35天	第14天	第35天
对照组(n=6)	10.49±1.49	8.28±1.18	0.335±0.056	0.497±0.071
RGZ组(n=6)	10.27±1.18	8.07±1.04	0.326±0.034	0.469±0.053
CsA组(n=7)	45.46±3.70 ^a	30.38±3.11 ^a	0.780±0.099 ^a	2.335±0.022 ^a
RGZ+CsA组(n=8)	38.97±4.41 ^{ab}	22.50±2.71 ^{ab}	0.785±0.079 ^a	1.707±0.019 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与CsA组比较,^b $P < 0.05$

结 果

一、大鼠体质量与血生化指标改变

实验第21天,CsA组1只大鼠死于肺部感染。与对照组及RGZ组比较,CsA组第14天和第35天体质量下降,差异有统计学意义。RGZ+CsA组下降缓慢,第35天时较CsA组体质量有所上升。见表3。

实验第14天,与对照组比较,CsA组血清白蛋白水平和肌酐清除率均下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);RGZ+CsA组的肌酐清除率下降程度低于CsA组,但两组差异无统计学意义($P > 0.05$)。实验第35天,与对照组比较,CsA组血清白蛋白水平和肌酐清除率明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);与CsA组比较,RGZ+CsA组肌酐清除率下降程度减轻,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

二、肾组织病理学改变

CsA组大鼠肾脏的病理改变主要在小管间质,主要表现为局灶性条索状纤维化,间质纤维化区域肾小球纤维化也较显著,小管萎缩同时伴单个核细胞浸润。早期(实验第14天)CsA组肾间质大量炎性细胞浸润,纤维化主要累及髓质,皮质纤维化相对较轻。而晚期(实验第35天)炎性细胞浸润减少,肾小管明显萎缩,肾小球硬化、

间质纤维化程度明显。与对照组和RGZ组比较,RGZ+CsA组实验第14天炎性细胞浸润减少,实验第35天纤维化程度减轻($P < 0.05$)。见图1,表4。

三、大鼠肾组织 mRNA 表达改变

1. OPN 和 RANTES mRNA 表达: 定量 PCR

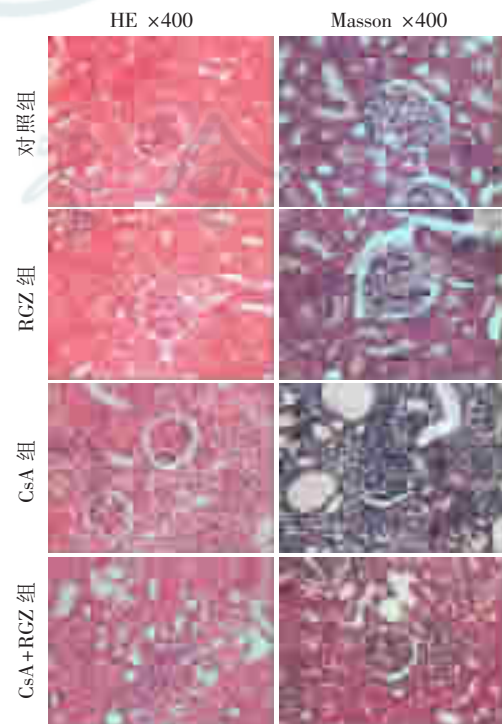


图1 各组大鼠肾间质细胞浸润和纤维化改变

的复孔实时荧光值拟合良好,实验体系稳定。对照组和 RGZ 组 OPN mRNA 均有少量表达;与对照组比较,CsA 组和 CsA+RGZ 组 OPN mRNA 表达量增加;与 CsA 组比较,CsA+RGZ 组 OPN mRNA 表达显著降低。对照组和 RGZ 组 RANTES mRNA 有少量表达;与对照组比较,CsA 组及 CsA+RGZ 组 RANTES mRNA 表达增加;与 CsA 组比较,CsA+RGZ 组 RANTES mRNA 表达显著降低。见表 5。

表 5 第 14 天各组大鼠肾组织 OPN 和 RANTES mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	OPN	RANTES
对照组(n=6)	7.41±1.28	8.38±1.23
RGZ 组(n=6)	6.98±1.30	8.66±1.51
CsA 组(n=7)	28.38±7.36 ^a	26.42±8.25 ^a
CsA+RGZ 组(n=8)	15.39±1.23 ^{ab}	16.37±1.16 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 CsA 组比较,^b $P < 0.05$

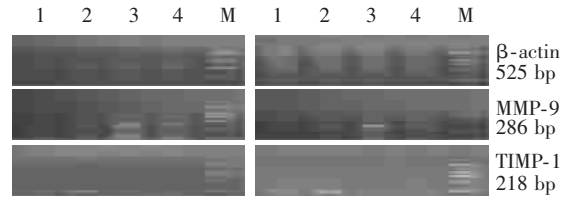
2. MMP-9 和 TIMP-1 mRNA 表达:对照组和 RGZ 组 MMP-9 mRNA 均有少量表达;与对照组比较,CsA 组及 CsA+RGZ 组 MMP-9 mRNA 表达增加,差异有统计学意义,且第 14 天高于第 35 天;与 CsA 组比较,CsA+RGZ 组 MMP-9 mRNA 表达显著降低,差异有统计学意义。对照组 TIMP-1 mRNA 有少量表达;RGZ 组同对照组;与对照组比较,CsA 组及 RGZ+CsA 组 TIMP-1 mRNA 表达增加,差异有统计学意义,且第 35 天高于第 14 天;RGZ+CsA 组第 14 天及第 35 天 TIMP-1 mRNA 表达均显著低于同时限 CsA 组,两组间差异统计学意义。见图 2,表 6。

讨 论

表 6 各组大鼠肾组织 MMP-9 及 TIMP-1 mRNA 表达改变($\bar{x} \pm s$)

组别	MMP-9		TIMP-1	
	第 14 天	第 35 天	第 14 天	第 35 天
对照组(n=6)	0.046±0.031	0.048±0.030	0.038±0.023	0.033±0.019
RGZ 组(n=6)	0.043±0.030	0.045±0.034	0.036±0.021	0.040±0.025
CsA 组(n=7)	0.382±0.036 ^a	0.324±0.029 ^{abc}	0.412±0.025 ^a	0.455±0.034 ^{abc}
RGZ+CsA 组(n=8)	0.319±0.023 ^{ab}	0.198±0.020 ^{abc}	0.337±0.026 ^{ab}	0.410±0.024 ^{abc}

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 CsA 组比较,^b $P < 0.05$;与同组第 2 周比较,^c $P < 0.05$



注:1:对照组;2:RGZ 组;3:CsA 组;4:CsA+RGZ 组
图 2 第 35 天各组大鼠肾组织 MMP-9 和 TIMP-1 mRNA 的表达(RT-PCR)

骨调素广泛分布于包括肾脏在内的人体各组织,在细胞的趋化、聚集、黏附、增殖和迁移中起重要作用。炎症反应与许多肾脏病的发生发展及转归密切相关,炎症反应灶中固有上皮细胞、内皮细胞、平滑肌细胞及浸润的巨噬细胞和 T 细胞均能表达 OPN^[6]。在慢性环孢素肾病(CCN)早期大鼠肾脏 OPN 表达上调,与急性 CsA 肾毒性肾病时肾间质巨噬细胞浸润有关^[7]。OPN 不仅与巨噬细胞的趋化聚集相关,在病理状态下上调的 OPN 表达部位还与随后或同步进行的单核巨噬细胞聚集部位相关,OPN 表达较强的部位也是巨噬细胞浸润严重的部位。OPN 一方面趋化和激活单核巨噬细胞释放各种炎症介质,另一方面可通过刺激成纤维细胞的黏附导致肾脏间质纤维化的发生发展,本研究结果亦证实了这一点。

RANTES 是一种对单核-巨噬细胞具有强烈趋化作用的细胞因子,它可趋化并激活肾组织中的单核巨噬细胞,导致 ECM 沉积。RANTES 的表达与肾间质炎细胞浸润程度及小管间质病变轻重程度相关,RANTES 表达的增加是导致肾间质炎细胞浸润、肾小管间质损伤的一个重要因素。RANTES 不但介导白细胞的游走、浸润和激活,参与调节炎症反应的进程,而且还参与调节细胞的生长和分化,调节新生血管的生成,是促进慢性肾脏病病情进展的重要因子之一^[8-10]。本研究结

果提示,CCN 早期大鼠肾组织 RANTES mRNA 表达进行性增加,RANTES 可能参与 CCN 早期肾组织损伤。

急性 CsA 肾毒性的分子机制中,趋化因子过度表达与炎细胞浸润起了重要的作用。罗格列酮是一种噻唑二酮类胰岛素增敏剂,除了具有改善机体胰岛素抵抗等代谢调节作用外,还具有抗炎、影响细胞增殖和转型、抗脏器纤维化等作用。本研究结果证实罗格列酮可减轻急性 CsA 间质性肾炎损害程度,降低 CCN 早期大鼠 OPN mRNA 和 RANTES mRNA 的表达,发挥着抗炎的作用。

MMP-9/TIMP-1 表达上调及 MMP-9/TIMP-1 的失衡可能参与慢性肾小管间质纤维化的发生、发展过程。MMP 是降解 ECM 的关键酶,其中 MMP-9 又称明胶酶 B,主要降解明胶、IV、V、VII 型胶原及层粘连蛋白、蛋白聚糖及弹性蛋白等,能降解完整的基底膜^[11]。MMP-9 的过度表达可导致组织损伤,基底膜破坏^[12]。TIMP-1 是 MMP-9 的主要抑制剂,能特异性地与相应 MMP 催化活性中心的锌离子结合而封闭其催化活性。TIMP-1 在表现为 ECM 沉积的肾脏疾病中发挥作用^[13]。本研究结果提示,环孢素肾病大鼠肾小管 TIMP-1 的表达与 IV 型胶原沉积呈正相关,MMP-9/TIMP-1 与肾组织 IV 型胶原沉积呈负相关。随着病程进展,TIMP-1 的表达进行性上调。TIMP-1 表达上调晚于 MMP-9 表达的上调,推测肾小管上皮细胞 MMP-9 的释放可能促使 TIMP-1 释放,TIMP-1 可能受到反馈调节而合成分泌增强。MMP-9 的表达第 14 天高于第 35 天,TIMP-1 的表达却持续上调,说明存在 MMP-9-TIMP-1 表达失衡。因此,我们认为 MMP-9、TIMP-1 可能参与了慢性肾小管间质纤维化的整个过程。

本研究结果为临床防治肾小管间质纤维化尤其是 CsA 肾病提出了一条新思路,即早期应用 RGZ 可抑制 RANTES 和 OPN 表达,减轻炎性细胞的浸润;并可通过抑制 TIMP-1 加强 MMP-9 对 ECM 的降解。

参 考 文 献

- [1] Zhou C, Wu J, Torres L, et al. Blockade of osteopontin inhibits glomerular fibrosis in a model of anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Am J Nephrol*, 2010, 32: 324-331.
- [2] 张亚杰, 阳晓, 张云芳, 等. 15d-PGJ2 对肾小管上皮细胞 CD40 及 RANTES 表达的影响. *中国免疫学杂志*, 2006, 22: 889-894.
- [3] 刘章锁, 程根阳, 李海剑, 等. 罗格列酮对环孢素 A 所致大鼠成纤维细胞肾毒性的保护作用. *中华肾脏病杂志*, 2005, 21: 282-285.
- [4] 刘章锁, 程根阳, 宋洁, 等. 罗格列酮对单侧输尿管梗阻大鼠的肾脏保护作用. *中华肾脏病杂志*, 2004, 20: 268-272.
- [5] 高艳丽, 谌贻璞, 董鸿瑞, 等. 慢性马兜铃酸肾病肾间质纤维化发病机制的初步探讨. *中华肾脏病杂志*, 2005, 21: 31-35.
- [6] Sabo-Attwood T, Ramos-Nino ME, Eugenia-Ariza M, et al. Osteopontin modulates inflammation, mucin production, and gene expression signatures after inhalation of asbestos in a murine model of fibrosis. *Am J Pathol*, 2011, 178: 1975-1985.
- [7] 白亚君, 景宇, 陶冶, 等. 安博维对慢性环孢素 A 肾毒性大鼠肾间质骨桥蛋白表达及巨噬细胞浸润的影响. *国际泌尿系统杂志*, 2006, 26: 721-724.
- [8] Dai C, Wen X, He W, et al. Inhibition of proinflammatory RANTES expression by TGF- β 1 is mediated by glycogen synthase kinase-3 β -dependent β -catenin signaling. *Biol Chem*, 2011, 286: 7052-7059.
- [9] Bäck M, Dahlén SE, Drazen JM, et al. International union of basic and clinical pharmacology. LXXXIV: leukotriene receptor nomenclature, distribution, and pathophysiological Functions. *Pharmacol*, 2011, 63: 539-584.
- [10] Shin N, Solomon K, Zhou N, et al. Identification and characterization of INCB9471, an allosteric noncompetitive small-molecule antagonist of C-C chemokine receptor 5 with Potent Inhibitory activity against monocyte migration and HIV-1 Infection. *J Pharmacol*, 2011, 338: 228-239.
- [11] Lee SY, Hörbelt M, Mang HE, et al. MMP-9 gene deletion mitigates microvascular loss in a model of ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011 301: F101-F109.
- [12] Givvimani S, Jala R, Mishra PK, et al. Functional heterogeneity in vascular remodeling (MMP-9/ and PAR-1/+) in hyperhomocysteinemic (CBS-/+) and diabetic (Akita, Ins2/+) mice. *FASEB J*, 2010, 24: 599-600.
- [13] Gargoum RR, Rosenberger D, Abe O, et al. Activation of renal NMDA by Hcy causes ECM remodeling by modulating MMP/TIMP axis. *FASEB J*, 2010, 24: 704.

(收稿日期:2011-09-10)

(本文编辑:孙玉玲)