维普资讯 http://www.cqvip.com

局解手术学杂志 2004年第13卷第2期
J Regional Anat & Operative Surg, 2004, Vol. 13, No. 2

转化生长因子-β1在大鼠CsA慢性肾毒性中作用的研究

赵 谦，张艮甫，黄赤兵，王平贤，范明齐
（第三军医大学附属新桥医院泌尿外科，重庆 400037）

［摘 要］ **目的** 探讨TGF-β1在CsA慢性肾毒性中的作用。**方法** 低盐饮食的条件下，给SD雄性大鼠腹腔注射CsA（15 mg·kg^{-1}·d^{-1}），持续28 d；另外两组在腹腔注射CsA的同时，于第15、20天分别予以TGF-β1硫代AODN、阳离子脂质体包裹的TGF-β1硫代AODN尾静脉注射，免疫组化法及逆转录聚合酶链式反应（RT-PCR）检测TGF-β1蛋白及其mRNA在组织的表达，检测各组组织形态学的变化。**结果** 建立大鼠CsA慢性肾毒性模型，显示了CsA慢性毒性的病理改变；在CsA慢性肾毒性组织中，TGF-β1的mRNA及蛋白表达显著增加；阳离子脂质体介导的TGF-β1硫代AODN可以显著抑制TGF-β1的表达（$P<0.01$），减轻CsA慢性肾毒性的病理改变。**结论** ①阳离子脂质体介导的TGF-β1硫代AODN可以显著抑制TGF-β1的表达，减轻CsA慢性肾毒性病理改变，改善肾功能；②CsA慢性肾毒性与TGF-β1的表达显著增加有关。

［关键词］环孢素A；TGF-β1；慢性肾毒性；反义寡核苷酸；阳离子脂质体
［中图分类号］R979.5 ［文献标识码］A ［文章编号］1672-5042(2004)02-0078-03

Roles of transforming growth factor-β1 in cyclosporin A-induced chronic nephrotoxicity in rats

ZHAO Qian, ZHANG Gen-fu, HUANG Chi-bing, WANG Ping-xian, FAN Qi-ming
(Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the roles of transforming growth factor-β1 (TGF-β1) in cyclosporin A (CsA)-induced nephrotoxicity and the inhibitory effect of cationic liposome-mediated antisense oligonucleotides (AODN) on TGF-β1. **Methods** CsA (15 mg·kg^{-1}·d^{-1}) was intraperitoneally injected into SD male rats on low salt diet consecutively for 4 weeks. Rats in the other two groups were injected in the caudal veins with additional TGF-β1 AODN and cationic liposome-encapsulated TGF-β1 AODN at 15 and 20 d, respectively. TGF-β1 protein expression and TGF-β1 mRNA expression in tissues were detected by immunohistochemistry and RT-PCR. The morphological changes of tissues in each group were also observed. **Results** Under the condition of low salt diet, a rat model of CsA-induced nephrotoxicity was established. The expressions of TGF-β1 mRNA and protein increased significantly in CsA-treated rats. RT-PCR confirmed that the expression of TGF-β1 mRNA decreased significantly in cationic liposome-mediated AODN rats ($P<0.01$). Immunohistochemistry revealed that the expression of TGF-β1 protein was inhibited significantly ($P<0.01$) in the liposome-mediated AODN rats with a comparable effect on the prevention of CsA-induced chronic nephrotoxicity. **Conclusion** CsA-induced chronic nephrotoxicity is related to the expression of TGF-β1. After inhibition of the expression of TGF-β1, liposome-mediated antisense oligonucleotide can attenuate the structural changes of kidney in CsA-induced chronic nephrotoxicity.

Keywords: cyclosporin A; TGF-β1; chronic nephrotoxicity; antisense oligodeoxynucleotide; cationic liposome

环孢素A（CsA）是目前器官移植及治疗其他免疫性疾病广泛使用的免疫抑制剂，其慢性肾毒性限制了临床的应用。CsA的慢性肾毒性临床表现为进行性的肾功能减退和不可逆的间质条状纤维化、肾小管萎缩，最终导致移植肾功能丧失。TGF-β1是引起细胞外基质沉积，与纤维化相关重要因子之一[1-3]。TGF-β1是否在CsA肾纤维化起着重要作用，采用阳离子脂质体介导TGF-β1的反义寡核苷酸，干预CsA慢性肾毒性组织中TGF-β1的表达，是否会对其毒性产生影响，我们对此进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

CsA为华北制药集团生产；DOTAP阳离子脂质体，美国Roche公司产品；TGF-β1全硫代磷酸AODN（5′-NH2-CGAGGGCG-GCATGGG-3′）[1]由上海生工生物工程技术公司合成；大鼠TGF-β1及内参照β-actin引物由上海基康生物技术有限公司合成；兔抗人TGF-β1多克隆抗体为美国Santa Cruz公司产品。

1.2 方法

1.2.1 CsA慢性毒性模型的建立及动物分组给药 将70只

［作者简介］赵 谦（1971-），男，陕西省西安市人，主治医师，硕士，主要从事器官移植方面的研究。电话：(023)68755621
［收稿日期］：2004-01-07 ［修回日期］：2004-02-12

维普资讯 http://www.cqvip.com

健康雄性SD大鼠(220～250)g,自大坪医院动物实验研究所购买)随机分为正常对照组(A组,n=16);CsA慢性毒性组(B组,n=22);TGF-β1硫代磷酸AODN治疗组(C组,n=16);阳离子脂质体介导的TGF-β1硫代磷酸AODN治疗组(D组,n=16)。各组动物均予以低盐饮食1周,然后B、C、D组按CsA 15 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$腹腔注射,持续4周,每周称取体重,调整剂量,A组注射生理盐水作对照,在此期间各组均予以低盐饮食;B组第1、2周后随机抽取3只大鼠,取肾脏标本;C组CsA慢性毒性试验进入第15、20天时每只大鼠予以含10 μg TGF-β1 AODN+100 μl HBS治疗;D组CsA慢性毒性试验进入第15、20天时每只大鼠10 μg TGF-β1 AODN+60 μl DOTAP+240 μl HBS(Lipo-AODN复合物的制备依据脂质体使用说明)治疗,以上均经尾静脉注射。各组于CsA腹腔注射第3、4周后随机抽取8只大鼠,取肾脏标本。

1.2.2 TGF-β1免疫组织化学检测 均采用LAB-SB方法进行。4 μm厚肾组织石蜡切片,常规脱蜡、水化;3% H_2O_2消除内源性过氧化物酶的活性,胰蛋白酶消化液抗原修复,用5%正常山羊血清封闭,滴加1∶100兔抗人TGF-β1多克隆抗体,4 ℃过夜;二抗为生物素标记的羊抗兔抗体,滴加辣根酶标记链霉卵白素作显色反应,DAB为显色剂;苏木素衬染。TGF-β1免疫组化表达采用半定量分析法[2]。

1.2.3 肾组织皮质、髓质TGF-β1 mRNA的表达 按Tripure试剂说明提取组织总RNA,采用RT-PCR(GeneAmp PCR仪9600型、德国)对肾组织皮质、髓质中TGF-β1 mRNA进行定量分析。紫外分光光度计(BeckMan DU-7型美国)检测RNA的量和纯度,所用RNA的A260/A280>1.8,以A260计算RNA浓度。大鼠引物序列[3]:TGF-β1正引物[5′-CGA-GGT-GAC-CTG-GGC-ACC-ATC-CAT-GAC-3′],负引物[5′-CTG-CTC-CAC-CTT-GGG-CTT-GCG-ACC-CAC-3′](405 bp);内参照β-actin引物序列:正引物[5′-AAC-CCT-AAG-GCC-AAC-CGT-GAA-AAG-3′],负引物[5′-TCA-TGA-GGT-AGT-CTG-TCA-GGT-3′](240 bp)。反应条件为:① 94 ℃变性5 min;② 94 ℃变性1 min,58 ℃退火1 min,72 ℃延伸2 min,总共30个循环;③ 72 ℃延伸5 min。PCR扩增产物在2%琼脂糖凝胶上进行电泳,用凝胶图像分析仪SH-100型(Alpha Innotech公司,英国)SxImage软件分析,进行条带亮度扫描,计算TGF-β1 mRNA的相对表达量(TGF-β1亮度/β-actin亮度)。

1.2.4 肾小管间质病理改变的评定 肾组织石蜡包埋、切片厚4 μm,HE、Masson染色,每例取3张切片,随机取10个视野,参照Young[4]计分标准,按照肾小管间质纤维化程度,进行半定量计分。

1.3 统计学处理

所有实验数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组资料比较采用t检验,SPSS10.0软件包统计分析,以$P<0.05$为差异显著,$P<0.01$为差异极显著。

2 结果

2.1 免疫组化检测组间TGF-β1表达的变化

CsA引起肾小球、肾小管上皮细胞、肾间质细胞TGF-β1的表达明显增加($P<0.001$),与B组相比,C组TGF-β1的表达有不同程度的减少($P<0.05$),D组肾组织TGF-β1的表达有明显的降低($P<0.01$),见表1。

表1 各组肾组织免疫组化TGF-β1表达评分($\bar{x} \pm s$)

	A组	B组	C组	D组
3 week	0.59±0.08	2.99±0.11*	2.85±0.09*#	2.19.±0.14*#
4 week	0.61±0.12	3.18±0.10*	3.01±0.15*#	2.35±0.12*#

注:与A组比较,* $P<0.001$;与B组比较,# $P<0.05$;与B组比较,# # $P<0.01$

2.2 RT-PCR检测肾组织TGF-β1mRNA的表达

低盐饮食条件下肾组织TGF-β1mRNA的表达不高,B组肾脏皮质、髓质TGF-β1 mRNA的表达有明显升高趋势,并随时间延长呈进行性升高,至第三周TGF-β1 mRNA的表达显著增高($P<0.01$)。C组较B组肾脏皮质、髓质TGF-β1 mRNA的表达有一定程度的下降,但$P>0.05$,不具有显著意义,D组较B组,肾脏皮质、髓质TGF-β1 mRNA的表达显著下降($P<0.01$),见表2。

表2 各组TGF-β1 mRNA/β-actin mRNA的表达($\bar{x} \pm s$)

		A组	B组	C组	D组
3周	皮质	0.20±0.07	0.46±0.08*	0.40±0.06	0.30±0.07#
	髓质	0.54±0.11	0.85±0.14*	0.73±0.11	0.67±0.10#
4周	皮质	0.22±0.05	0.55±0.09*	0.48±0.08	0.40±0.05#
	髓质	0.58±0.10	1.06±0.17*	0.90±0.13	0.81±0.12#

注:与A组比较,* $P<0.001$;与B组比较,# $P<0.01$

2.3 肾小管病理改变

在B组大鼠4周后肾切片中,发现有部分肾小球毛细血管袢塌陷并有慢性改变,肾小管细胞萎缩,局灶性肾间质明显的纤维母细胞增生及部分纤维化;Masson染色见肾小管基底膜广泛增厚,肾小球透明变性明显。与B组相比,C组肾间质的病理改变无明显变化,D组肾间质的病理改变明显减轻($P<0.01$),表现为肾间质局灶性纤维母细胞增生密度下降,局灶性的肾组织纤维化面积减小,Masson染色见肾小管基底膜增厚下降,透明变性肾小球密度降低,见表3。

表3 各组肾间质纤维化评分情况($\bar{x} \pm s$)

	A组	B组	C组	D组
3周	0±0	1.41±0.16*	1.31±0.15	1.21.±0.08#
4周	0±0	1.60±0.20*	1.50±0.16	1.31±0.11#

注:与A组比较,* $P<0.001$;与B组比较,# $P<0.01$

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨论

CsA的慢性肾毒性临床表现为进行性肾功能减退和不可逆的间质条状纤维化、肾小管萎缩，最终导致移植肾功能丧失。为了研究TGF-β1在CsA慢性肾毒性中的作用，参考Young[4]的方法，在大鼠低盐饮食条件下采用CsA腹腔注射，成功地建立了CsA慢性肾毒性模型。在大鼠慢性肾毒性模型组中，血清肌酐清除率显著下降，病理切片发现有部分肾小球毛细血管袢塌陷并有慢性改变，肾小管细胞萎缩，局灶性肾间质明显的纤维母细胞增生及部分纤维化，模拟了CsA慢性肾毒性病理改变。

Waiser等[5]研究发现CsA可以时间及剂量依赖性上调肾小球系膜细胞(MCs)TGF-β1的表达。在体内实验中，Shihab[2]用Salt depletion模型，观察到用CsA 15 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$皮下注射28 d，病理检查发现CsA有关特征性的慢性肾脏纤维化，Northern杂交证实，大鼠肾内TGF-β1进行性升高。本实验证明：CsA肾毒性模型组，TGF-β1蛋白及其mRNA表达显著增加，TGF-β1可能是CsA慢性肾毒性关键细胞因子之一。

本实验发现D组大鼠肾组织中TGF-1mRNA的表达较B组显著下降，说明阳离子脂质体介导TGF-β1硫代磷酸修饰的AODN在转录、翻译水平显著抑制了TGF-β1的表达；D组较B组肾间质慢性纤维化的病理改变显著减轻，AODN与传统药物如丹参、血管紧张素转换酶抑制剂相比，对TGF-β1表达的抑制更具有选择性和高效性[6,7]，说明TGF-β1在慢性肾毒性中起着重要的作用。D组肾组织的纤维化较A组仍有显著性差异，一方面与TGF-β1反义寡核苷酸的在组织的分布及作用机制有关，有待进一步研究；另一方面也可能说明CsA引起肾纤维化不仅仅与TGF-β1相关[6,7]。事实上，许多实验也证明结缔组织生长因子、纤容蛋白容酶原抑制因子-I在CsA的慢性肾纤维化中起着重要的作用，但这些因子是通过TGF-β1介导起作用[5,8,9]，进一步说明TGF-β1在CsA慢性肾毒性中起着重要的作用，因此，阻止其表达可以减轻CsA致肾慢性纤维化作用；另外也说明CsA可能通过其它途径对肾有毒性作用。

[参考文献]

[1] Akagi Y, Isaka Y, Arai M, et al. Inhibition of TGF-1 expression by oligonucleotides suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis[J]. Kidney Int, 1996, 50(1): 148 - 155.

[2] Shihab FS, Andoh TF, Tanner AM, et al. Role of transforming growth factor β1 in experimental chronic cyclosporine nephropathy [J]. Kidney Int, 1996, 49(4): 1141 - 1151.

[3] Shankland SJ, Scholey JW, Ly H, et al. Expression of transforming growth factor-beta 1 during diabetic renal hypertrophy[J]. Kidney Int, 1994, 46(2): 430 - 442.

[4] Young BA, Burdmann EA, Johnson RJ, et. al. Cellular proliferation and macrophage influx precede interstitial fibrosis in cyclosporine nephrotoxicity[J]. Kidney Int, 1995, 48(2): 439 - 448.

[5] Waiser J, Dell K, Böhler T, et al. Cyclosporine A up-regulates the expression of TGF-β1 and its receptor type Ⅰ and type Ⅱ in rat mesangial cells[J]. Nephrol Dial Transplant, 2002, 17(9): 1568 - 1577.

[6] 王军志. 生物技术药物研究开发和质量控制[M]. 北京：科学出版社，2002. 618 - 630.

[7] 乔保平，唐孝达，李道明，等. 贝那普利对大鼠环孢素A慢性肾毒性模型转化生长因子-β1的影响[J]. 中华器官移植杂志，2003，24(5): 307 - 309.

[8] Okado T, Terada Y, Tanaka H, et al. Smad 7 mediates transforming growth factor-β-induced apoptosis in mesangial cells[J]. Kidney Int, 2002, 62(4): 1178 - 1186.

[9] Chen Y, Blom IE, Sa S, et al. CTGF expression in mesangial cells: Involvement of SMADs, MAP kinase, and PKC[J]. Kidney Int, 2002, 62(4): 1149 - 1159.

(编辑：兰阳军)

关于化学元素及核素的使用

化学元素及核素在医学写作时一般多采用符号，都是拉丁字母正体大写。离子态是在右上角用数字加“-”或“+”表示。例如Na^+、Ca^{2+}、P^{3-}等等，不采用Ca^{++}、P^{---}、Al^{+3}、O^{-2}表示。核素的核子素(质量数)应写在元素符号的左上角，例如：^{131}I、^{32}P。表示激发状态的m写在右上角，例如：$^{99}Tc^{m}$、$^{133}In^{m}$。在科技论文和专著中不应写核素的中文名称，即不能写成^{131}碘、铟^{133m}、P^{32}、Tc^{99m}。

(本刊编辑部)