DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.22.026
第25卷第22期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 22
2026 2003年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2003

文章编号:1000-5404(2003)14-2026-03

论著

缬沙坦对Thy-1肾炎大鼠肾小球系膜细胞P27表达的影响

余荣杰,杨惠标,赵景宏 (第三军医大学附属新桥医院肾内科,重庆 400037)

提 要:目的 观察Thy-1肾炎大鼠系膜细胞增生及P27表达,以及血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂缬沙坦对其干预作用。方法 设正常组、Thy-1肾炎组及Thy-1肾炎+缬沙坦治疗组。分别于各组疾病诱导后第1、3、5、7 d取肾脏行病理检查,免疫组化检测肾小球内PCNA、P27蛋白的表达,Western blot分析肾小球内P27的表达。结果 在正常大鼠系膜细胞P27存在高表达,而在肾炎大鼠随系膜细胞增生,其P27表达减少。缬沙坦治疗组第3~7d肾小球系膜细胞增生、系膜区扩张程度以及肾小球内PCNA表达低于肾炎组($P<0.05$),而肾小球内P27表达高于肾炎组相应时间点($P<0.05$)。结论 肾小球系膜细胞非增殖状态的维系与其P27的高表达相关,缬沙坦可维持系膜细胞P27的高表达,抑制系膜细胞增殖及系膜扩张。提示缬沙坦对Thy-1肾炎大鼠有一定治疗作用。

关键词:系膜增殖性肾小球肾炎;系膜细胞;缬沙坦;P27
中图法分类号:R692.31;R394.2;R977.4 文献标识码:A

Effect of valsartan on P27 expression in mesangial cells of Thy1 glomerulonephritis rats

YU Rong-jie, YANG Hui-biao, ZHAO Jing-hong (Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe P27 expression and proliferation of mesangial cells of rats with Thy1 glomerulonephritis and to evaluate the interfering effect of valsartan, a specific angiotensin Ⅱ receptor antagonist, on Thy1 glomerulonephritis. Methods Rats were divided into normal control group, Thy1 glomerulonephritis group and valsartan treatment group. Following the onset of glomerulonephritis, renal morphological changes were observed on days 1, 3, 5 and 7, and proliferating cell nuclear antigen(PCNA) and P27 expression in glomerulus were measured by immunohistochemistry and Western blotting. Results High expression of P27 was found in quiescent mesangial cells of normal rats, but decreased expression in mesangial cells of rats with Thy1 glomerulonephritis, accompanying with the proliferation of mesangial cells. In valsartan treatment group, glomerular hypercellularity, mesangial matrix expansion and PCNA expression were significantly reduced as compared with those of the untreated rats with Thy1 glomerulonephritis from day 3 to day 7($P<0.05$), but P27 expression in glomeruli was higher than that in Thy1 glomerulonephritis group. Conclusion The maintenance of non-proliferation of mesangial cells is related with the high expression of P27. Valsartan can inhibit the proliferation of mesangial cells and the mesangial matrix expansion by means of keeping the high expression of P27, suggesting that valsartan has a certain therapeutic effect on Thy1 glomerulonephritis rats.

Key words: mesangial proliferative glomerulonephritis; mesangial cell; valsartan; P27

肾小球系膜细胞增生是多种肾小球疾病如系膜增生性肾炎、IgA肾病、狼疮性肾炎、糖尿病肾病的重要病理改变,也是导致肾小球硬化的重要病理基础。细胞的增生受控于细胞周期调控蛋白。P27是重要的细胞周期负控蛋白,可使细胞周期受阻于G_1和S期。血管紧张素Ⅱ(Ang Ⅱ)在肾脏局部有促增殖的非血流动力学作用[1]。Ang Ⅱ受体拮抗剂可在受体水平阻断Ang Ⅱ的作用,其对肾脏的保护作用目前日益受到关注。本实验旨在观察正常大鼠及Thy1肾炎大鼠系膜增殖及其P27的表达,以及Ang Ⅱ一型受体拮抗剂缬沙坦对其干预效果,从细胞增殖角度进一步探讨缬沙坦的作用机制,为临床上应用Ang Ⅱ受体拮抗剂治疗系膜增殖性肾炎提供实验依据。

作者简介:余荣杰(1968-),男,重庆市江津县人,硕士研究生,主治医师,讲师,主要从事肾移植及增殖性肾病方面的研究。电话:(023)68754330

收稿日期:2002-11-27;修回日期:2003-05-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料与方法

1.1　实验动物及分组

成年雄性 Wistar 大鼠 54 只, 第三军医大学实验动物中心提供, 体质量 150～200 g, 分为 3 大组: ① 正常对照组(C 组, n=6); ②Thy1 肾炎组(A 组, n=24): 尾静脉注射兔抗大鼠胸腺细胞血清(ATS)0.5 ml/kg[2]; ③Thy1 肾炎＋缬沙坦组(AV 组, n=24): 尾静脉注射抗血清后即刻予缬沙坦溶液(缬沙坦＋大鼠饮用水, 500 mg/L[3], 缬沙坦由北京诺华制药有限公司提供)自由饮用。其中 A 组及 AV 组分别设第 1、3、5、7 d 四个时相点, 各 6 只。分别取肾脏供病理学改变、免疫组化及 Western blot 分析。

1.2　观察指标

① 肾脏病理学观察: 分别行 HE、PAS、PASM 染色光镜及透射电镜观察; 对 PAS 染色切片进行肾小球有核细胞计数, 对 PASM 染色切片采用点计数法计算系膜区占肾小球面积百分比, 均随机取位于皮质区的 20 个肾小球计数并取其均值。② 免疫组化: PCNA 单克隆抗体(Calbiochem 公司); p27 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)。肾组织标本经升汞-苦味酸混合固定液固定, 石蜡包埋, 切片厚 4 μm, 采用 SABC 法, 以 PBS 替代一抗作阴性对照染色, 检测肾小球 PCNA 及 P27 的表达。结果采用 CMIAS 医学图像分析系统进行半定量分析。③Western blot 分析肾小球 P27 的表达: 分离肾小球后, 提取肾小球总蛋白, 考马斯亮蓝法测定各样品蛋白质含量, Western blot 分析 P27 的表达, 结果采用 Gel 2000 凝胶成像系统分析, 蛋白含量以平均吸光度 A 值× 面积表示。

1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间数据比较采用 t 检验。

2　结果

2.1　肾脏病理学观察

光镜及透射电镜显示注射 ATS 后 1 d, 肾小球内出现系膜溶解及炎细胞浸润, 系膜细胞数减少, 少数肾小球内毛细血管扩张形成微动脉瘤, 其中充满血浆成分、红细胞及白细胞。注射 ATS 后 3～7 d 系膜溶解征渐消退代之以系膜细胞增生, 肾小球内有核细胞数渐增多, 系膜基质积聚。缬沙坦治疗组第 3～7 天系膜细胞增生及系膜扩张程度较 A 组轻, 系膜修复时间缩短。见表 1。

2.2　免疫组化结果

C 组肾小球 PCNA 表达量极少, 偶见 1～2 个阳性核, 相反 P27 在肾小球内却存在较高水平表达; 在 A 组及 AV 组肾小球内 PCNA 表达均逐渐增高, 以第 5～7 天最高, 而 P27 的表达却逐渐减少, 于第 3～5 天最低, 于第 7 天又渐恢复表达; A 组及 AV 组比较, AV 组第 3、5、7 天时相点 PCNA 表达低于 A 组(P<0.05), 而 P27 的表达高于 A 组(P<0.05), 见表 2。

2.3　Western blot 分析

P27 于 C 组表达最高, 随肾小球内系膜细胞的增生而表达减少, 于第 5 天最低。同 A 组比较, AV 组 P27 的表达量高于 A 组(P<0.05), 见表 2。

表 1　肾小球系膜细胞计数及系膜区面积/肾小球面积百分比(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Mesangial cell count and the ratio of mesangial area to glomerular area(%, $\bar{x}\pm s$)

	Total cells per glomerular cross section	(Mesangium area/Glomerulus area)×100%
Control	55.8±10.7	11.52±1.74
Group A		
Day 1	44.5±7.1	9.47±1.79
Day 3	62.2±9.2	18.98±4.62 **
Day 5	82.0±5.9 **	23.64±2.34 **
Day 7	79.7±7.2 **	26.76±3.72 **
Group AV		
Day 1	46.8±7.8	9.73±2.21
Day 3	50.3±7.7△	14.06±1.59 *△
Day 5	70.2±6.8 *△△	17.84±2.31 **△
Day 7	69.2±8.9 *△	19.64±5.95 **△△

*: P<0.05, **: P<0.01 *vs* control;
△: P<0.05, △△: P<0.01 *vs* Group A

表 2　系膜细胞 PCNA、P27 表达及 P27 的 Western blot 分析($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Expressions of PCNA and P27 in mesangial cells Western blot analysis of P27($\bar{x}\pm s$)

	PCNA+ cells per glomerular cross section	P27+ cells per glomerular cross section	Western Blot of P27(A×mm²)
Control	0.48±0.22	8.67±1.19	2.37±0.10
Group A			
Day 1	1.14±0.20 **	4.32±0.72 **	1.73±0.08 **
Day 3	5.06±1.26 **	3.83±0.42 **	1.26±0.02 **
Day 5	11.19±2.96 **	3.75±0.66 **	0.84±0.10 **
Day 7	9.79±1.75 **	6.63±1.05 **	1.59±0.17 **
Group AV			
Day 1	1.06±0.22 **	4.76±0.70 **	2.05±0.05 **△△
Day 3	3.61±0.66 **△	5.10±0.56 **△△	1.80±0.09 **△△
Day 5	8.32±1.00 **△	4.88±0.72 **△	1.18±0.07 **△△
Day 7	7.69±1.29 **△	7.78±0.45△	2.07±0.14 *△

*: P<0.05, **: P<0.01 *vs* control;
△: P<0.05, △△: P<0.01 *vs* Group A

3　讨论

肾小球系膜细胞增殖是很多肾小球疾病的共同病理改变[4], 故研究其增生机制并对其进行有效的阻抑, 在增殖性肾小球疾病的防治中有重要意义。细胞周期是细胞增殖的基础, 各种促增殖因子对细胞的作用最终必然反映于细胞周期。而细胞周期的正常进行受控于细胞周期调控蛋白, P27 就是其中一个重要的细胞周期调控蛋白[5]。从细胞周期角度研究肾小球系膜细胞增生机制, 目前少见报道。

本实验显示, 在正常大鼠肾小球静止期系膜细胞 P27 存在高水平表达。而在大鼠抗 Thy1 系膜增殖性肾炎模型中, 当肾小球系膜细胞增殖时, 存在 P27 的表达下调。系膜细胞增生程度越高, P27 表达越低。而当系膜细胞增生停止时, P27 又渐恢复高表达。实验结果说明, P27 的高表达对于维持肾小球系膜细胞于

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

非增殖状态有重要作用。P27是一个重要的细胞周期负控蛋白，它以其N端与周期素依赖激酶CDK_2结合，抑制CDK_2的磷酸激酶活性，阻抑细胞周期的进程而抑制细胞增殖。而当P27表达下调时，CDK_2活性增高，细胞周期脱抑制而出现细胞增殖[5,6]。所以维持P27的高表达，从而抑制系膜细胞的增殖，对于系膜增殖性肾炎的防治有着重要意义[6]。

本实验进一步予以肾炎大鼠血管紧张素Ⅰ型受体拮抗剂缬沙坦，肾炎大鼠系膜细胞增生及系膜扩张程度明显减轻。同时检测肾炎大鼠肾小球系膜细胞P27表达，说明缬沙坦一定程度内抑制了肾小球系膜细胞P27的表达下降。

AngⅡ是肾素-血管紧张素系统(RAS)中导致肾脏疾病持续发展的主要效应物质，在病理状态下肾组织局部AngⅡ的浓度是血浆中的1 000倍，它在肾小球疾病的发生发展中有促增殖效应[1]。因此阻断RAS对肾脏疾病的防治具有肯定作用[7]。AngⅡ是通过其靶器官上相应的受体而发挥生物学效应的，主要有Ⅰ型(AT_1)及Ⅱ型(AT_2)受体。AngⅡ的多数损伤效应都是由AT_1受体介导的。人类及大鼠肾小球系膜细胞膜上存在大量AT_1受体。AT_1受体是G蛋白结合受体，至少与两种G蛋白(Gq和Gi)偶联，AT_1受体与Gq结合后激活磷脂酶C，促进三磷酸肌醇和甘油二酯生成，导致细胞内Ca^{2+}浓度增加和蛋白激酶C激活，从而发挥其受体后效应。既往阻断RAS的制剂主要为血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)，而近年出现了AngⅡ一型受体拮抗剂(AT_1RA)，它可在受体水平更有效地阻断RAS。有实验结果显示AT_1RA对糖尿病大鼠肾脏具有保护作用，可降低糖尿病大鼠尿白蛋白、β_2-微球蛋白排泄率，并阻遏早期肾小球肥大[8,9]。但有关AT_1RA对系膜增殖性肾炎是否具有抗增殖的肾脏保护作用，以及其对细胞周期方面的干预机制报道甚少。本实验利用大鼠系膜增殖性肾炎模型提示，AT_1RA缬沙坦可减轻Thy1系膜增殖性肾炎大鼠系膜细胞增生程度，减轻系膜扩张程度，而且其作用机制与其维持系膜细胞P27的高表达相关。本研究为AT_1RA在系膜增殖性肾炎中的应用找到了一定的理论依据。

参考文献：

[1] Wolf G. Angiotensin Ⅱ as a renal growth factor[J]. Contrib Nephrol, 2001,(135):92-110.

[2] Ishizaki M, Masuda Y, Fukuda Y, *et al*. Experimental mesangioproliferative glomerulonephritis in rats induced by intravenous administration of anti-thymocyte serum[J]. Acta Pathol Jpn. 1986, 36(8):1191-1203.

[3] Peters H, Border W A, Noble N A, *et al*. Targeting TGF-β overexpression in renal disease: maximizing antifibrotic action of angiotensin Ⅱ blockade [J]. Kidney Int, 1998, 54(5): 1570-1580.

[4] 肖兵民，朱妙珍. 蛋白激酶亚型在肾小球肾炎中的表达意义[J]. 第三军医大学学报，2001，23(4)：454-456.

[5] Hengst L, Reed S I. Translational control of P27Kipl accumulation during the cell cycle[J]. Science, 1996, 271(5257):1861-1864.

[6] Shankland S J, Al' Douahji M. Cell cycle regulatory proteins in glomerular disease[J]. Exp Nephrol, 1999, 7(3): 207-211.

[7] Taal M W, Brenner B M. Renoprotective benefits of RAS inhibition: from ACEI to angiotensin Ⅱ antagonists[J]. Kidney Int, 2000, 57(5): 1803-1817.

[8] Leehey D J, Singh A K, Alavi N, *et al*. Role of angiotensin Ⅱ in diabetic nephropathy[J]. Kidney Int Supple, 2000, 77: 93-98.

[9] Lewis E J, Hunsicker L G, Clarke W R, *et al*. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes[J]. N Engl J Med, 2001, 345(12): 870-878.

(编辑 张大春)

(上接2025页)

大鼠和人的肝小叶和汇管区未见阳性颗粒存在。

肝脏内神经末梢分布的电镜观察：透射电镜观察可见在人的肝实质内神经末梢与肝细胞接触紧密，末梢呈一膨大，内有小囊泡和部分细胞器如微管，线粒体等，但未见明确的突触结构。

3 讨论

本研究表明肝脏内存在明显的神经纤维分布。汇管区的神经纤维分布相对较多，而肝小叶内的神经分布较少。但在人的肝小叶内的神经分布较大鼠稍多。

突触素是突触小泡膜上的一种含糖的膜结构蛋白。本实验结果显示人的肝脏内无突触素存在，这意味着人肝脏内神经终末的结构具有特殊性，不同于其他组织中的常见末梢结构。透射电镜的观察亦表明人肝实质细胞间存在神经纤维终末膨大，其内可见小泡及少量细胞器，但未见有典型的突触结构。这说明肝脏内可能没有正常的特化的突触结构。也就意味着肝脏内的神经信号的传递与正常方式有些差异，所以不能以一般的突触概念来理解肝脏神经调控的方式。Bioulac-Sage等[1]发现动物肝脏内的神经纤维和肝窦细胞或肝实质细胞有密切的接触。接触的部位常可见有囊泡，囊泡内有致密的小囊。但未发现有特化的突触样结构在肝星状细胞和肝实质细胞中，但又认为肝星状细胞或肝实质细胞的这些切迹部位可能是突触凹陷[2]。

关键词：肝脏；神经纤维；突触素；突触

中图法分类号：R329.4 文献标识码：B

参考文献：

[1] Boulac-Sage P, Lafon M E, Saric J, *et al*. Nerves and perisinusoidal cells in human liver[J]. J Hepatol, 1990, 10(1): 105-112.

[2] Coker R H, Krishna M G, Zinker B A, *et al*. Sympathetic drive to liver and nonhepatic splanchnic tissue during prolonged exercise is increased in diabetes[J]. Metabolism, 1997, 46(11): 1327-1332.

(编辑 张 宁)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net