DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.10.025

文章编号:1000-5404(1999)10-0756-04

大鼠单侧输尿管梗阻致肾间质纤维化与TGF β_1 mRNA表达的关系

郭 虹* 朱妙珍 吕军凤** 周伦和 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所肾内科) 重庆,400042

提 要 **目的**:探讨转化生长因子 β_1(TGF β_1)在单侧输尿管梗阻(UUO)所致肾间质纤维化中的作用。**方法**:应用原位杂交,生化分析及病理形态学观察等技术,研究UUO术后1、3、7、14、21 d不同时相肾皮质中TGF β_1 mRNA表达与小管间质病变、羟脯氨酸代谢的关系。**结果**:UUO肾组织中羟脯氨酸含量逐渐增加及间质面积增宽,伴TGF β_1 mRNA表达增高。**结论**:TGF β_1 mRNA表达增加是UUO致肾间质纤维化的重要原因之一。

关键词 转化生长因子 β_1;输尿管梗阻;肾间质纤维化
中图法分类号 R692 **文献标识码**:A

大量的研究表明,肾小管间质病变的有无和严重程度是不同类型肾炎预后的决定因素。小管间质慢性损伤的最终结局为肾间质纤维化。间质纤维化的发生究竟与哪些因素有关?细胞因子在纤维化中起什么作用?这些问题均未完全阐明。本研究旨在复制肾小管间质损伤模型,通过观察转化生长因子 β_1(Transforming grouth factor β_1,TGF β_1) mRNA表达的变化及间质中纤维增生的定性定量分析,为阐明TGF β_1 在单侧输尿管梗阻(Unilateral ureteral obstruction, UUO)所致肾间质纤维化发生与发展过程中的作用提供部分实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物及分组 雄性Wistar大鼠36只,体重150~200 g,由本校实验动物中心提供。

1.1.2 探针 TGF β_1 cDNA探针(长度1.7 kb)及标记试剂由本校复合伤研究所余争平博士惠赠。探针标记采用随机引物法,标记方法按德国宝灵曼公司的寡核苷酸地高辛标记药盒说明进行。碱性磷酸酶标记的抗地高辛单克隆抗体及其显色系统均为宝灵曼公司产品。

1.1.3 羟脯氨酸含量测定的试剂由本校复合伤研究所生化室提供。

1.2 方法

1.2.1 单侧输尿管梗阻模型的建立 大鼠在戊巴比妥钠(40 mg/kg,ip)麻醉下,切开右侧背部皮肤至腹膜后,游离肾脏及输尿管,在靠近肾下极处结扎并离断输尿管后逐层缝合皮肤。假手术组除不结扎离断输尿管外,其余操作同上。

1.2.2 实验设计及动物分组 30只大鼠行单侧输尿管梗阻术,术后1、3、7、14、21 d分别处死6只,立即取出手术侧肾分成4份,分别固定于10%甲醛、4%多聚甲醛、3%戊二醛中4℃冰箱保存备用,最后1份立即作羟脯氨酸含量测定。4%多聚甲醛固定的标本4℃冰箱放置24 h后弃去固定液,-70℃冰箱保存备用。另取6只假手术大鼠肾脏作正常对照。

1.2.3 肾脏病理检查 大鼠肾组织经10%甲醛固定,石蜡包埋,切片后作HE、PAS染色,在光镜下观察肾间质炎细胞浸润及其它病理变化。并利用计算机真彩色图像分析系统观察大鼠肾间质相对面积的改变。具体方法在每一切片选取5处病变最明显的区域,计算间质的相对面积,取平均数作为此标本的相对间质面积。电镜制片按常规透射电镜制片方法,在电镜下观察肾小管上皮细胞及其基膜形态、厚度的变化。

1.2.4 原位杂交 按文献[1]方法进行。标本从-70℃冰箱取出,再经30%蔗糖液浸泡48 h,作10 μm厚冰冻切片,分别经0.3% TritonX-100及蛋白酶K消化,阻断后,4%多聚甲醛再固定,在含有探针浓度为1 mg/L的杂交液中43℃杂交20 h,经洗片,加入碱性磷酸酶标记的抗地高辛单克隆抗体37℃孵育1 h,显色后脱水,透明,封片。杂交后组织切片在显微镜下观察,用计算机图像分析系统,在20倍下对组织切片上杂交信号进行随机密度扫描,由计算机算出每平方厘米小管或间质内阳性杂交信号像素单位及平均积分光密度。

1.2.5 羟脯氨酸含量测定 取新鲜肾皮质100~120 mg,置20 ml安瓿中,经6 mol/L盐酸消化,135℃高温水解3.5 h,冷却后用6 mol/L NaOH滴定至微黄,经双蒸水稀释至50 ml过滤备用。再取该备用液各1 ml,分别加入柠檬酸缓冲液0.5 ml,氯胺T,高氯酸及D-DNAB 1 ml,在100℃煮沸3 min,冷却后用BECKMAN Du-60紫外可见光分光光度计,在波长为558 nm光波下比色,测定前制备羟脯氨酸标准液及空白对照,相同条件下比色,计算标本的羟脯氨酸含量。

1.2.6 统计学分析 数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,用Student's t 检验作显著性检验。

2 结果

2.1 大鼠单侧输尿管梗阻后肾小管间质病理改变

假手术对照大鼠肾组织光镜显示肾小球、近端、远端小管

* 郭 虹,女,37岁,主治医师
** 成都军区昆明总医院肾内科 昆明,650032

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

的大小、形态正常，未见小管扩张、间质炎细胞浸润及纤维增生等改变。UUO 术后第 1、3、7 天，肾小管进行性扩张，上皮细胞顺序出现胞浆疏松、浊肿及空泡变性，间质水肿伴逐渐增加的淋巴细胞、单核/巨噬细胞为主的炎性浸润，第 14、21 天主要表现为皮质区弥漫性炎细胞浸润，间质面积进一步增宽，其中可见大量纤维增生，见图 1。电镜下 UUO 第 3、7 天，近曲小管上皮细胞微绒毛脱落，胞浆肿胀、线粒体数减少，残留的线粒体高度肿胀，嵴消失，14 d 后小管基底膜不规则增厚，见图 2。

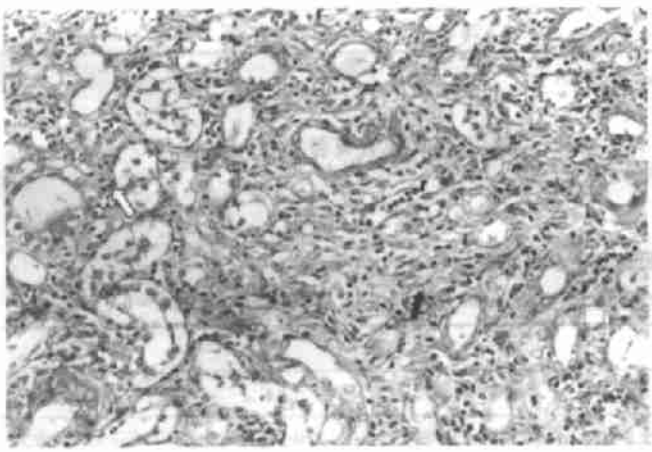


图 1　大鼠 UUO 第 14 天肾间质病变　(HE×200)

➡：纤维组织增生；⇨：大量炎性细胞浸润

Fig 1　Renal interstitial pathological changes on 14th day in rats with UUO　(HE×200)

➡: Fibrosis formation; ⇨: Massive infiltration of inflammatory cells

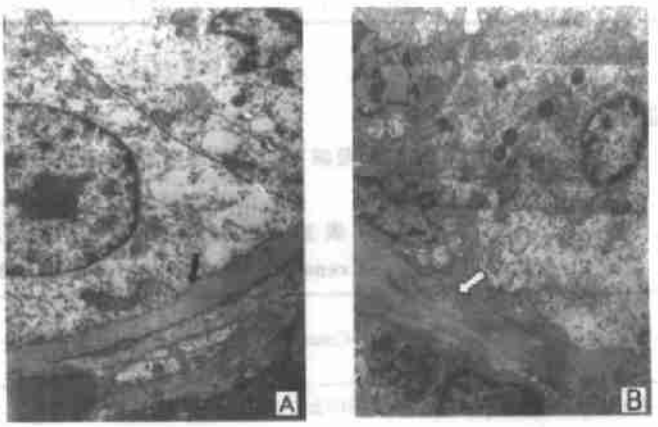


图 2　大鼠 UUO 第 14 天肾小管基底膜超微结构的变化

A：假手术对照大鼠；➡：示基底膜结构正常　(TEM×6 000)

B：UUO 大鼠；⇨：示基底膜增厚、疏松、变形　(TEM×5 000)

Fig 2　Utrastructural alteration of basement membrane of renal tubule with UUO on 14th day in rats

A: Control; ➡: Normal structure of basement membrane (TEM×6 000); B: UUO rats; ⇨: Basement membrane thickened, loosened and distorted　(TEM×5 000)

2.2　肾小管间质 TGF β1 mRNA 表达

阴性对照实验未见杂交信号，见图 3 A。假手术对照大鼠肾组织中小管间质内几乎未见 TGF β1 mRNA 表达，部分肾小球系膜区少量表达；UUO 术后 TGF β1 mRNA 表达增高，阳性杂交信号出现在肾小管上皮细胞、炎细胞的胞浆内，围绕细胞核呈紫蓝色颗粒状或团块状分布，于 UUO 术后第 1 天开始表达，第 3 天表达增多，第 7 天时达高峰，见图 3 B，以后持续在较高水平，见表 1。

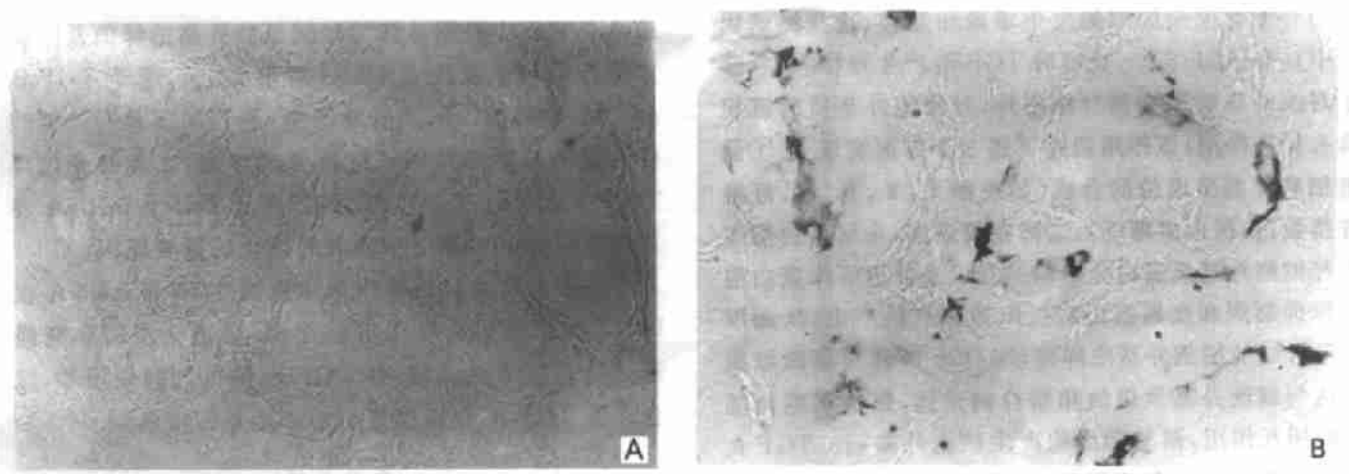


图 3　大鼠 UUO 第 7 天肾间质 TGF β1 mRNA 表达　(ISH×200)

A：阴性对照未见杂交信号；B：肾间质 TGF β1 mRNA 斑块状表达

Fig 3　TGF β1 mRNA expression on 7th day in rats with UUO(ISH×200)

A: Negative control without TGF β1 mRNA signal; B: Interstitial TGF β1 mRNA expression stained as a large patch

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

表 1 UUO 大鼠肾小管间质 TGF β_1 mRNA 表达的图象分析结果($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab 1 Results of image analysis of TGF β_1 mRNA expression in renal interstitial of UUO rat($\bar{x}\pm s, n=6$)

	Control	Time after UUO (d)				
		1	3	7	14	21
Area density	0.80±0.03	0.81±0.08	2.27±0.23*	4.46±0.41*	4.13±0.26*	3.62±0.49*
ALOD	661±44.1	708±58.2	1428±152.3*	2708±247.4*	2553±287.3*	2542±230.7*

*: $P<0.01$ *vs* control

2.3 羟脯氨酸含量变化

大鼠 UUO 术后，肾组织羟脯氨酸含量逐渐升高，于第 14 天达高峰。与对照组比较有显著差异($P<0.05$)，见表 2。

表 2 UUO 大鼠肾间质相对面积及羟脯氨酸含量的变化($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab 2 Changes of renal interstitial relative area and the content of hydroxyproline in UUO rat($\bar{x}\pm s, n=6$)

	Control	Time after UUO (d)				
		1	3	7	14	21
Relative area(%)	0.510±0.001	0.697±0.055	0.720±0.55*	0.803±0.005*	1.370±0.002*	1.057±0.029*
Hydroxyproline(mg/g)	5.11±1.20	5.79±1.55	7.33±2.23△	16.67±3.83△	45.48±12.23△	39.99±10.00△

*: $P<0.01$ *vs* control; △: $P<0.05$ *vs* control

3 讨论

单侧输尿管梗阻模型是目前常用的肾小管间质损伤模型之一。持续输尿管梗阻首先出现肾小管上皮细胞及血管内皮细胞损伤，继而单核、淋巴细胞为主的炎细胞浸润，最终发展为间质纤维化[2,3]。肾间质纤维化的发生机制类似来自其它系统的实验资料，尤其是鼠肝脏纤维化的发生机制有一定的参考价值。循环细胞生长的许多细胞因子聚集到炎症部位，刺激炎症部位参与纤维化反应的细胞发生增殖和迁移，这些细胞因子中首推 TGF β_1[4]。炎症时 TGF β_1 产生量很大，它除了对成纤维细胞有调节作用外，对细胞外基质的沉积具有促进作用，该作用通过下述 3 个方面实现[5]：①促进细胞外基质成份的合成(如胶原Ⅰ，Ⅲ，Ⅳ，Ⅴ，纤维连接蛋白，蛋白多糖等)；②抑制胶原酶，金属蛋白酶等多种细胞外基质蛋白分解酶的合成及促进纤维蛋白溶酶原抑制剂和金属蛋白酶组织抑制剂的产生，从而阻止已合成的细胞外基质降解；③TGF β_1 还可刺激细胞表达与细胞外基质组份相结合的受体，影响细胞与基质的相互作用，调节靶细胞产生细胞外基质。TGF β_1 的上述作用可以在基因和/或蛋白水平影响小管间质细胞外基质成份的聚积。TGF β_1 的这些作用可否解释 UUO 术后的肾间质纤维化的发生？实验研究表明：除炎细胞外，TGF β_1 mRNA 在肾小管上皮细胞中也有大量表达，表达量随 UUO 梗阻时间的延长而增加。第 7 天达高峰，14 d 以后维持在较高水平。小管间质病理改变早期为单核，淋巴细胞浸润，间质水肿，小管上皮细胞变性，UUO 14 d 后出现肾间质纤维增生，间质面积增宽，小管萎缩、小管基膜增厚，同时伴有组织中羟脯氨酸含量增加。与国外学者报道的兔 UUO 术后 7 d 间质增宽，胶原纤维增生，16 d 增多的胶原呈束状排列一致。有研究表明在争光霉素诱导的肺纤维化鼠模型中，TGF β_1 升高的峰值发生在药物诱导的第 7 天，先于 7 d 后出现的大量胶原蛋白的合成[6]。本实验结果也表明反应胶原总量的羟脯氨酸升高的峰值及间质大量纤维增生发生在 UUO 后第 14 天，晚于 TGF β_1 mRNA 的峰值。间质纤维增生，面积增宽及羟脯氨酸的含量升高显然是间质纤维化的标志，二者的变化与 TGF β_1 mRNA 表达伴随出现，提示 TGF β_1 mRNA 表达增高可能是本模型中间质纤维化的重要原因。

本实验仅能从一些现象中推测 TGF β_1 mRNA 在 UUO 所致间质纤维化中起作用，更进一步的研究尚需结合其它干扰措施，如 TGF β_1 拮抗剂的使用等，综合评价 TGF β_1 在该模型中的作用及作用机制。

参考文献

1 蔡文琴，王伯沅 主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术. 成都：四川科技出版社，1994. 408～413

2 Diamond J R, Kees-Folts D, Ding G. Macrophages monocyte chemoattactant peptide-1 and TGFβ_1 in experimental

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

hydronephrosis. Am J Physiol，1994，266(6)：926
3 Shimizu T，Kuroda T，Hata S. Pirfenidone improves renal function and fibrosis in the postobstructed kidney. Kidney Int，1998，54(1)：99
4 Border W A，Noble N A，Ketteler M. TGF-β_1 a cytokine mediator of glomerulosclerosis and a target for therapeutic intervention. Kidney Int，1995，47(Suppl 49)：59
5 Vijay K，Sharma A，Roxana M，*et al*. Intragraft TGF-β_1 mRNA：A correlate of interstital fibrosis and chronic allograft nephropathy. Kidney Int，1996，48(49)：1279
6 Khalil N，Bereznay O，Sporn M. Macrophage production on transforming growth factor-β and fibroblast collagen synthes in chronic pulmonary inflammation. J Exp Med，1989，170(3)：727

（收稿：1999-04-19；修回：1999-09-10）
（编辑　刘　鹏）

The relationship of unilateral ureteral obstruction-induced renal tubular interstitial fibrosis with TGF β_1 mRNA expression in rats

Guo Hong，Zhu Miaozheng，Lu Junfeng，Zhou Lunhe（Department of Nephrology，Daping Hospital，Third Military Medical University，Chongqing，400042）

Abstract　**Objective**：To study the possible role of transforming growth factor β_1（TGF β_1）in the formation of unilateral ureteral obstruction-induced interstitial fibrosis of renal tubules in rats. **Methods**：Rat model of unilateral ureteral obstruction was established. *In situ* hybridization，biochemical analysis were used to determine the relationship of TGF β_1 mRNA expression with the changes of hydroxyproline content and the morphological changes of the renal tubules，on the 1st，3rd，7th，14th adn 21st day after unilateral ureteral obstruction. **Results**：After unilateral ureteral obstruction，the content of hydroxyproline was significantly increased in the renal tissues and in the interstitial area of the renal tubules. Meanwhile，there was an increase of the expression of TGF β_1 mRNA. **Conclusion**：In the formation of interstitial fibrosis of the renal tubules induced by unilateral ureteral obstruction，the increase of TGF β_1 mRNA expression may be one of the factors.

Key words　transforming growth factor β_1；ureteral obstruction；interstitial fibrosis；renal tubule；rat

（上接 755 页）

色溃疡，表面粗糙干燥呈“苔垢”样。实验室检查：涂片镜检左眼结膜囊分泌物可见霉菌菌丝及孢子。患者入院后用静脉注射的 0.2%氟康唑液点眼，1 次/2 h，效果不明显。患儿疼痛明显，哭闹不止，夜间不能入睡，依赖 0.5%表麻滴瞳止痛及全身使用镇静药。第 3 天加 5% Natacyn 眼液点左眼，1 次/2 h。3 d 后患儿觉疼痛明显减轻，夜间能安睡。9 d 后溃疡表面干净，面积缩小为 4 mm×3 mm。30 d 后视力 0.02，溃疡面痊愈。

2　讨论

由于真菌性角膜溃疡无理想的抗真菌药物，故预后往往很差[2]，易出现角膜穿孔、丧失视力[3]。

Natacyn 在国外被誉为治疗真菌性角膜溃疡最有效的药物[4]，以前国内一直未引进，近来美国 ALCON 公司生产的 5%的 Natacyn 眼液开始进入国内，并在临床少量试用。Natacyn 眼液每毫升含有纳他霉素 50 mg。纳他霉素是 Struyk 等 1955 年从 NATALENSIS 链霉素菌中提取的四烯烃类抗菌素，在体外具有抗多种酵母菌和丝状真菌，包括念珠菌，曲霉菌，头孢子菌，镰刀霉菌和青霉菌的作用[4]。临床上 Forster 等[5]报道 53 例，有效 46 例(86.79%)；三井幸严等报道 188 例，有效 155 例(82.44%)。本文 9 例，有效 8 例。疗效和国产金羯霉素相近，而优于二性霉素 B 和克霉唑。

关键词　真菌性角膜溃疡；药物治疗
中图法分类号　R772.21　　**文献标识码**：B

参考文献

1 张文华. 感染性角膜疾病. 中华眼科杂志，1995，31(2)：135
2 范德彰. 真菌性角膜溃疡. 见：李凤鸣 主编. 眼科全书. 北京：人民卫生出版社，1996. 1376～1379
3 黄　挺，陈家祺. 真菌性角膜炎药物及手术治疗比较. 中国实用眼科杂志，1997，15(11)：651
4 Dan B，Jones M D，Richard K，*et al*. Fusarium solani keratitis treated with natamycin eighteen consecutive cases. Arch Ophthal，1972，88(8)：147
5 Forster R K，Rebell G. The diagnosis and management of keratomycoses：Ⅱ medical and surgical management. Arch Ophthalmol，1975，93(5)：1134

（收稿：1999-03-30；修回：1999-07-15）
（编辑　汪勤俭）

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