

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.06.016

低氧诱导因子在肾炎大鼠肾小管间质中的表达及氯沙坦的保护作用研究

朱铁锤 刘向东 张连云 杨 军 张 璐

(新乡医学院第一附属医院肾病科 河南 新乡 456400)

摘要 目的: 观察低氧诱导因子在肾炎大鼠肾小管间质中表达的变化以及氯沙坦对肾炎的保护作用。**方法:** 雄性 Wistar 大鼠 32 只,随机分成假手术组、肾炎模型组、氯沙坦小剂量组、氯沙坦大剂量组各 8 只,假手术组不做肾脏切除,其他组在右肾切除后尾静脉注射标记抗体。给药组则按量分别灌胃给药,8 周时处死。**结果:** 大剂量给药组的血肌酐(Scr)、收缩压和 24 h 尿蛋白量较模型组显著降低,且小剂量给药组的血肌酐(Scr)和 24h 尿蛋白量较模型组也显著降低。小剂量组和大剂量组大鼠的肾间质面积较肾炎模型组均显著降低。HIF-1 α mRNA 大量表达于肾小管上皮细胞胞质和间质细胞胞质,且与模型组比较,小剂量给药组的 HIF-1 α mRNA 显著降低;大剂量给药组较肾炎模型组 HIF-1 α mRNA 的含量也显著降低。**结论:** 氯沙坦可能可以通过影响低氧诱导因子(HIF-1 α)的表达发挥对肾脏的保护作用。

关键词: 低氧诱导因子;肾炎;氯沙坦

中图分类号: Q95-3, R692 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)06-1062-03

The Expression of Hypoxia Inducible Factor-1 α in Rat Glomerulonephritis and Protective Effects of Losartan

ZHU Tie-chui, LIU Xiang-dong, ZHANG Lian-yun, YANG Jun, ZHANG Lu

(Department of Nephrology, First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan, 456400, China)

ABSTRACT Objective: To explore and observe the expression of hypoxia inducible factor-1 α and the effect of losartan in model of rat glomerulonephritis. **Method:** 32 male Wistar rats were randomly divided into sham operation group, nephritis model group, low-dose losartan group and high-dose losartan group, with 8 rats in each group. Except the sham operation group, the rest groups were injected with mouse monoclonal antibody after right nephrectomy. Treatment group were given Losartan according to the dosage and the rats were killed at 8th week. **Results:** Compared to the sham operation group, Serum creatinine(Scr), systolic, 24h urine protein and interstitial space in low-dose losartan group and high-dose losartan group were significantly decreased. HIF-1 α mRNA abundantly expressed in the cytoplasm of renal tubular epithelial cells and stromal cells cytoplasm, and compared to the sham operation group, the expression of HIF-1 α in low-dose losartan group and high-dose losartan group was also decreased. **Conclusion:** Losartan may protect renal function through inducing the expression of HIF-1 α in the model of rat glomerulonephritis.

Key words: HIF-1 α ; Glomerulonephritis; Losartan

Chinese Library Classification: Q95-3, R692 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)06-1062-03

前言

近年来研究表明肾小管间质细胞发生慢性低氧可能在肾纤维化的发生发展中起着重要的作用,而肾纤维化是导致肾衰竭的主要病理改变^[1-4]。氯沙坦是一种在临床上常用于延缓肾功能不全,其可能通过作用于降压、延缓一氧化氮合酶降解以及抗纤维化等方面对肾脏起着一定的保护作用^[5-7]。但是氯沙坦用于肾脏的具体机制尚不清楚。

本研究检测了低氧诱导因子(HIF-1 α)在肾炎大鼠肾小管间质中的表达,并对肾炎大鼠进行氯沙坦的治疗干预,初步探讨氯沙坦在低氧环境下对大鼠肾小管间质的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

采用体重约为 130 g 的雄性 Wistar 大鼠 32 只,随机分成假手术组、肾炎模型组、20 mg/(kg·d)氯沙坦给药组(小剂量组)、80 mg/(kg·d)氯沙坦给药组(大剂量组)各 8 只,假手术组大鼠不做肾脏切除,仅进行肾包膜剥离;其他组参照文献进行造模,形成肾炎至肾小管间质纤维化并进行右肾摘除术。在手术后第一周和第二周尾静脉注射 IgG(OX-7)标记的小鼠单克隆抗体 1.2 mg/kg,并于 2 周后采用灌胃的方式给药直至 8 周,处死。

1.2 标本采集

大鼠死前取 24 小时尿标本,麻醉心脏采血后处死,取左肾标本,-70 °C 保存。采用无创血压测定系统于大鼠尾动脉测定收

作者简介:朱铁锤(1976-),男,主治医师,硕士,主要从事肾炎、风湿病的基础与临床方面的研究,E-mail: 287861231@qq.com
(收稿日期:2013-08-19 接受日期:2013-09-11)

缩压。

1.3 抗体及仪器

小鼠单克隆抗体抗 Thy1.1,全自动多功能生化仪,放射免疫计数仪,光学显微镜,无创血压测量仪。

1.4 肾脏病理的统计

将肾组织用 10% 的甲醛固定后,石蜡包块,切片厚度为 2 μm ,常规染色,镜下选取 10 个视野,计算 IOD 值。

1.5 原位杂交法测 HIF-1 α

取石蜡块切片,常规脱蜡,热修复抗原,加抗体,DAB 显色、脱水、封片后在镜下观察。按照 HIF-1 α mRNA 探针试剂盒进行操作,阳性产物为深紫色,阴性对照为不加探针。

1.6 统计学分析

采用 SPSS11.0 统计软件,计量资料组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾功能、收缩压、24h 尿蛋白量的变化

通过对假手术组、肾炎模型组、氯沙坦给药组(小剂量组)、

氯沙坦给药组(大剂量组)大鼠的肾功能、收缩压、24h 尿蛋白量进行检测和分析,发现大剂量给药组的血肌酐(Scr)、收缩压和 24h 尿蛋白量较模型组显著降低($t=11.539, P=0.0017$)($t=19.74, P<0.002$)($t=33.182, P<0.0013$),且小剂量给药组的血肌酐(Scr)和 24h 尿蛋白量较模型组也显著降低,($t=23.136, P=0.0008$)($t=53.11, P=0.0003$),而小剂量组和大剂量组大鼠的肾间质面积较肾炎模型组均显著降低,($t=1.371, P=0.0027$)($t=3.58, P=0.0038$)见表 1。

2.2 各组大鼠肾小管间质中低氧诱导因子(HIF-1 α)的表达

通过 PAS 染色我们发现,假手术组大鼠的肾小管间质形态基本正常;而在肾炎模型组大鼠中发现肾小管上皮细胞萎缩且间质水肿,炎性细胞大量浸润;在氯沙坦小剂量给药组大鼠的染色中发现肾小管间质的损伤得到改善,而大剂量给药组大鼠的肾小管间质损伤得到明显的改善和修复。并且 HIF-1 α mRNA 大量表达于肾小管上皮细胞胞质和间质细胞胞质,且与模型组比较,小剂量给药组的 HIF-1 α mRNA 显著降低($t=5.72, P=0.021$);大剂量组较肾炎模型组 HIF-1 α mRNA 的含量也显著降低($t=4.73, P=0.0004$),见表 2。

表 1 各组大鼠肾功能、收缩压、24h 尿蛋白量的变化

Table 1 Changes of Renal function,systolic blood pressure, 24h urine protein in rats among each group

组别 Groups	Scr($\mu\text{mol/L}$)	SBP(mm Hg)	尿蛋白量(mg/24h) Urine protein(mg/24h)	肾间质面积 Interstitial space
假手术组 Sham operation group	48.42 $\pm$ 3.12	92.15 $\pm$ 4.25	19.27 $\pm$ 3.08	0.06 $\pm$ 0.03
肾炎模型组 Nephritis model group	158.59 $\pm$ 9.63	158.68 $\pm$ 3.79	313.32 $\pm$ 30.15	0.23 $\pm$ 0.02
小剂量给药组 Small doses group	85.28 $\pm$ 3.68	118.79 $\pm$ 3.79	172.56 $\pm$ 9.78	0.14 $\pm$ 0.01
大剂量给药组 Large doses group	63.86 $\pm$ 6.02	98.64 $\pm$ 3.86	74.79 $\pm$ 8.89	0.09 $\pm$ 0.01
F	11.27	32.79	14.28	16.36
P	0.002	0.037	0.000	0.000

表 2 各组大鼠肾小管间质中低氧诱导因子(HIF-1 α)mRNA 的表达

Table 2 Expression of hypoxia-inducible factor(HIF-1 α) mRNA of tubulointerstitial in rats among each group

组别 Groups	HIF-1 α mRNA
假手术组 Sham operation group	1.98 $\pm$ 0.31
肾炎模型组 Nephritis model group	29.13 $\pm$ 3.26
小剂量给药组 Small doses group	19.36 $\pm$ 3.14
大剂量给药组 Large doses group	8.32 $\pm$ 2.13
F	9.283
P	0.000

3 讨论

最近研究发现,慢性缺氧在肾纤维化的发生发展中起着关键的作用,可能会导致肾小管间质纤维化^[8,9]。由于缺氧的刺激使得机体产生带大量的蛋白分子,与肾纤维化密切相关^[10],例如低氧可以诱导成纤维细胞 TGF- β mRNA 的表达增加、促进细胞外基质的合成、抑制细胞外基质发生降解^[11,12]。

HIF-1 α 是一种转录因子,在体内受氧浓度的调节,当体内发生低氧时,HIF-1 α 会在细胞内积聚,当体内的氧浓度恢复正常时,HIF-1 α 可以被泛素降解。由于 HIF-1 α 对低氧不敏感,所以很多研究选择其作为低氧的一个指标^[13,14]。本研究发现,低氧诱导因子 HIF-1 α 在肾炎模型组中呈持续性的高表达,并且较假手术组显著增高。国外研究也证实,在进展性肾炎大鼠模型中,肾小管发生缺氧先于肾小管发生纤维化^[15,16]。提示低氧诱导因子 HIF-1 α 可能可以作用于 TGF- β 等细胞因子,影响其表

达,使得肾小管间质的损伤加重。如果将 HIF-1 α 的持续高表达阻断,或者干扰降低其表达可能可以成为治疗肾小管间质损伤的一个治疗靶点。

肾炎大鼠是观察慢性肾脏病进展的理想动物模型,在肾小管间质的有效循环血量下降后,会出现肾小管间质的持续缺血缺氧,一直持续到 11 周,有利于观察低氧状态下肾脏发生的病理变化^[17,18]。在本研究中,我们发现假手术组的血肌酐、血压和 24h 尿蛋白较对照组明显升高,说明在本研究中造模成功。并且,我们发现而小剂量组和大剂量组大鼠的肾间质面积较肾炎模型组均显著降低,且小剂量给药组的血肌酐(Scr)和 24h 尿蛋白量较模型组也显著降低,大剂量给药组的血肌酐(Scr)、收缩压和 24h 尿蛋白量较模型组显著降低,说明慢性缺氧可能引起肾炎大鼠肾脏功能持续性的损害,而药物氯沙坦则能在一定程度上修复这种肾脏损害^[19,20]。

综上,本研究通过建立大鼠肾炎模型,检测了肾炎模型以及氯沙坦治疗后大鼠的低氧诱导因子的表达,探讨了低氧诱导因子在肾炎中可能发挥的作用和氯沙坦治疗肾炎的效果,以期对肾炎的临床治疗提供理论依据。

参考文献(References)

- [1] Kojima H, Kosugi T, Sato W, et al. Deficiency of growth factor mid-kine exacerbates necrotizing glomerular injuries in progressive glomerulonephritis[J]. *Am j pathol*, 2013, 182(2): 410-419
- [2] 吴金玉, 王圳, 姜芳, 等. 田七注射液对阿霉素肾病大鼠肾组织 TGF- β /Smads 信号通路的影响[J]. *广西医学*, 2010, (7): 763-765
Wu Jin-yu, Wang Zhen, Jiang Fang, et al. Effect of Tianqi Injection on the Expression of TGF- β 1 and Smads Signal Transmission Path in Rats with Adriamycin-induced Nephropathy [J]. *Guangxi Medical Journal*, 2010, (7): 763-765
- [3] Li Y, Sun Y, Liu F, Sun L, et al. Norcantharidin inhibits renal interstitial fibrosis by blocking the tubular epithelial-mesenchymal transition [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66356
- [4] Li X, Yamagata K, Nishita M, et al. Activation of Wnt5a-Ror2 signaling associated with epithelial-to-mesenchymal transition of tubular epithelial cells during renal fibrosis [J]. *Genes Cells*, 2013, 18 (7): 608-619
- [5] Fu W, Wang Y, Jin Z, et al. Losartan alleviates renal fibrosis by down-regulating HIF-1 α and up-regulating MMP-9/TIMP-1 in rats with 5/6 nephrectomy[J]. *Ren fail*, 2012, 34(10): 1297-1304
- [6] Abdulla MH, Sattar MA, Abdullah NA, et al. The effect of losartan and carvedilol on renal haemodynamics and altered metabolism in fructose-fed Sprague-Dawley rats[J]. *J physiol biochem*, 2012, 68(3): 353-363
- [7] 胡宏俊, 祝伟宏, 樊桂春, 等. 氯沙坦对糖尿病肾病 UALB、TGF- β 1 和 CTGF 影响[J]. *现代生物医学进展*, 2010, 10(2): 295-297, 262
Hu Hong-jun, Zhu Wei-hong, Fan Gui-chun, et al. Effect of Losartan on TGF- β 1 and CTGF in patients with diabetic nephropathy [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2010, 10(2): 295-297, 262
- [8] 岳凌菊. bFGF 对在大鼠系膜细胞和抗 Thy-1 肾炎 SDH 表达的影响 [J]. *辽宁医学院学报*, 2013, 34(3): 10-11, 15, 后插 2- 后插 3
Yue Ling-jv. Influence of bFGF on Sorbitol Dehydrogenase Expression in Rat Mesangial Cell and Rat Thy-1 Nephritis [J]. *Journal of Liaoning Medical University*, 2013, 34(3): 10-11, 15, Inserted after 2-3
- [9] Marshall CS, Cheng AC, Markey PG, et al. Acute post-streptococcal glomerulonephritis in the Northern Territory of Australia: a review of 16 years data and comparison with the literature [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2011, 85(4): 703-710
- [10] Jackson SJ, Steer AC, Campbell H. Systematic Review: Estimation of global burden of non-suppurative sequelae of upper respiratory tract infection: rheumatic fever and post-streptococcal glomerulonephritis [J]. *Trop Med Int Health*, 2011, 16(1): 2-11
- [11] 杨洋, 张中文, 姚华, 等. 去乙酰化蛋白酶 1 在马兜铃酸肾纤维化模型中对 TGF- β 1/Smad7 信号通路的作用[J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(3): 459-468
Yang Yang, Zhang Zhong-wen, Yao Hua, et al. The Role of HDAC1 in the Signal Pathway of TGF- β 1/Smad7 in AAN Model[J]. *Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica*, 2012, 43(3): 459-468
- [12] 夏雨果, 曾文彤, 李广森, 等. RNA 干扰沉默转化生长因子 β 1 基因对大鼠移植肾 Smads 信号通路的影响 [J]. *中华器官移植杂志*, 2011, 32(6): 358-362
Xia Yu-guo, Zeng Wen-tong, Li Guang-sen, et al. Effects of silencing TGF- β 1 by RNAi on Smads signal transduction of rat renal allograft [J]. *Chinese Journal of Organ Transplantation*, 2011, 32(6): 358-362
- [13] Befani CD, Vlachostergios PJ, Hatzidaki E, et al. Bortezomib represses HIF-1 α protein expression and nuclear accumulation by inhibiting both PI3K/Akt/TOR and MAPK pathways in prostate cancer cells[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2012, 90(1): 45-54
- [14] Du J, Xu R, Hu Z, et al. PI3K and ERK-induced Rac1 activation mediates hypoxia-induced HIF-1 α expression in MCF-7 breast cancer cells[J]. *PloS one*, 2011, 6(9): e25213
- [15] Xu X, Chen P, Zheng Q, et al. Effect of pioglitazone on diabetic nephropathy and expression of HIF-1 α and VEGF in the renal tissues of type 2 diabetic rats [J]. *Diabetes res clin pract*, 2011, 93(1): 63-69
- [16] Khan MN, Bhattacharyya T, Andrikopoulos P, et al. Factor inhibiting HIF (FIH-1) promotes renal cancer cell survival by protecting cells from HIF-1 α -mediated apoptosis [J]. *Br J Cancer*, 2011, 104(7): 1151-1159
- [17] 王晓天, 李向阳, 秦苏萍, 等. p38MAPK 介导的 Fas/FasL 凋亡信号通路在大鼠抗 GBM 肾炎中的作用 [J]. *中国免疫学杂志*, 2012, 28 (11): 979-985
WANG Xiao-Tian, LI Xiang-Yang, QIN Su-Ping, et al. Effects of apoptosis induced by p38MAPK through Fas/FasL pathway on anti-glomerular basement membrane nephritis in rats [J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2012, 28(11): 979-985
- [18] 张丽春. 雷公藤多苷对慢性肾炎的作用机制研究 [J]. *南京中医药大学学报*, 2012, 28(6): 594-596
Zhang Li-chun. Study of the mechanism of Radix Tripterygii Wilfordii glycosides on chronic nephritis [J]. *Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine*, 2012, 28(6): 594-596
- [19] 刘晓丹, 范秋灵, 王力宁, 等. 氯沙坦对自发性 2 型糖尿病 KKAY 小鼠肾脏损害的保护作用[J]. *山东医药*, 2011, 51(20): 20-22
Liu Xiao-dan, Fan Qiu-ling, Wang Li-ning, et al. Effects of losartan on renal impairment in spontaneous type 2 diabetic KKAY mice[J]. *Shandong Medical Journal*, 2011, 51(20): 20-22
- [20] 陈水华. 糖尿病肾病血浆 ET 和 CGRP 水平的变化及氯沙坦的干预作用[J]. *医学研究杂志*, 2011, 40(5): 125-127
Chen Shui-hua. The Change of Plasma ET and CGRP Level in Patients with Diabetic Nephropathy Syndrome and the Effect of Intervention with Losartan [J]. *Journal of Medical Research*, 2011, 40(5): 125-127