

大鼠肾间质纤维化动物模型的实验研究

薛痕, 樊均明*, 陈亮, 苏白海, 李孜, 胡章学, 刘先蓉, 许国章

(四川大学华西医院肾脏内科, 四川成都 610041)

摘要:目的 观察单侧输尿管结扎(UUO)大鼠模型中肾脏病理改变, 肾组织 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和纤维连接蛋白(FN)表达的变化, 证明UUO方法可快速制作理想的肾脏细胞转分化和间质纤维化动物模型。**方法** 大鼠随机分为假手术组(SOR)和UUO组。随机选取各组中的6只大鼠分别于单侧输尿管结扎术后3天、7天、14天、21天和28天处死, 收集血清与肾组织供生化及病理分析。**结果** ①24小时尿蛋白定量, UUO组与假手术组无统计学差异。UUO术后7~14天, 大鼠出现明显血尿素氮、肌酐值升高; 术后21~28天, 血尿素氮、肌酐值反而下降, 但28天时血肌酐值仍然高于假手术组($P < 0.05$)。②UUO组肾小管间质损伤评分(TIS)明显高于假手术组。UUO术后3天, 肾脏组织出现了早期纤维化的病理改变。随着梗阻时间延长, 小管间质纤维化程度和间质细胞增殖、炎细胞浸润逐渐加重, 皮质变薄十分明显。术后28天, Masson染色见皮质区、皮髓交界处纤维化明显, 但肾小球仍无明显病变。③免疫组化结果显示, UUO术后3天肾间质 α -SMA阳性细胞数和FN表达增加, 并随时间递增。UUO术后7天, 可见少许 α -SMA阳性的转分化小管上皮细胞; 术后14天转分化的小管上皮细胞明显增多。 α -SMA表达与FN表达成正相关($r = 0.996, P < 0.01$), α -SMA、FN表达与TIS、间质相对面积均呈正相关。**结论** 单侧输尿管结扎可以快速建立肾脏细胞转分化和间质纤维化动物模型。

关键词: 单侧输尿管结扎; 肾纤维化; 转分化; 动物模型

中图分类号: Q95-33 文献标识码: A 文章编号: 1000-7083(2004)01-0016-05

Investigation of Renal Fibrosis Induced by Unilateral Ureteral Obstruction

XUE Hen, FAN Jun-ming, CHEN Liang, SU Bai-hai, LI Zi,

HU Zhang-xue, LIU Xian-rong, XU Guo-zhang

(Department of Nephrology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan Province, 610041)

Abstract: **Objective** To prove renal tubulointerstitial fibrosis could be rapidly induced in rat by unilateral ureteral obstruction (UUO). **Methods** Rats were sacrificed at 3, 7, 14, 21 and 28 days after UUO or Sham-surgery. The level of serum creatinine and 24-hour urine protein and renal histopathology at each time point were examined. **Results** The level of urine protein were not significantly higher in UUO group than in Sham-operation group. The level of serum creatinine and urea nitrogen increased progressively at day 7 and 14 after UUO, then gradually decreased at day 21 and 28 after UUO. At day 28, the serum creatinine was significantly higher in UUO group than in Sham-operation group ($P < 0.05$). From day 3, the number of α -SMA-positive interstitial cells and tubulointerstitial expression of FN and inflammatory cell increased. TIS, the score of renal interstitial lesion and the expression of α -SMA and FN were significantly higher in UUO group than in Sham-operation group. There were significant correlations between the positive area of α -SMA and FN expression and the relative volume of interstitium and TIS. **Conclusion** Unilateral ureteral obstruction has emerged as an important model for the study of the mechanisms of renal fibrosis and transdifferentiation and also for the evaluation of the impact of potential therapeutic approaches to ameliorate renal disease.

Key words: unilateral ureteral obstruction (UUO); renal fibrosis; transdifferentiation; animal model

肾间质纤维化是多种肾脏疾病发展至终末期肾功能衰竭的共同通路。肾间质纤维化发病机制尚不

收稿日期: 2003-10-29 作者电子信箱: guomengz@sina.com

基金项目: 国家教委留学回国人员启动基金(C299005); 国家自然科学基金(30170437)

* 通讯作者

清楚,慢性肾脏疾病发生后,进行性纤维化和慢性肾衰的发生几乎不可避免,目前临床缺乏治疗良策。建立一种理想的肾间质纤维化动物模型,对于研究肾间质纤维化发生机制以及探寻各种延缓和阻断肾纤维化进展的新方法,具有十分重要意义。本研究采用单侧输尿管结扎(unilateral ureteral obstruction, UUO)的方法快速建立了研究肾脏细胞转分化和肾间质纤维化的理想动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

60 只清洁级雄性 SD 大鼠,体重 150~200g,由本校实验动物中心提供。将大鼠随机分为 2 组, SOR 组 30 只和 UUO 组 30 只。

1.2 动物模型的建立

单侧输尿管结扎:5%的水合氯醛腹腔注射将大鼠麻醉后局部剃毛,常规消毒铺孔巾,选择腹正中线切口,依次切开皮肤至腹腔,游离肾脏及输尿管,将左侧输尿管用组织钳托起中段部位,止血钳夹住,在两端用 4-0 丝线两次结扎左侧输尿管近肾盂段,剪断输尿管,然后连续缝合皮肤。假手术组(SOR)手术入路方式同 UUO 组,进腹腔后分离左输尿管但不结扎输尿管。随机选取每组中的 6 只大鼠分别于术后 3 天、7 天、14 天、21 天和 28 天处死,处死前一天将大鼠置于代谢笼中(禁食,不禁水),收集 24h 尿液测尿量,大鼠 24h 尿经离心(2000 r/min, 10min),去除沉渣。水合氯醛麻醉后,右股动脉采血,血液收集后经离心分离出血清。尿液和血清均保存于 -20℃ 冰箱;取左肾组织用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋。

1.3 检测方法

1.3.1 生化指标的测定 全自动生化分析仪(OLYMPUS AU5400)检测尿蛋白、血清肌酐及尿素氮。

1.3.2 肾脏常规病理检查 肾组织经固定,包埋,切成 3 μ m 厚石蜡切片,经苏木素-伊红(HE)、过碘酸希夫反应染色(PAS)及马松三色染色(Masson),光镜下观察肾小管间质病变。由两个观察者对每个样本肾组织的 HE 染色进行盲法评分,取两观察者评分的平均值。

(1) 小管间质损伤评分 按文献描述的方法^[1],半定量肾小管间质的病变。200 倍光镜下,每张切片随机选择 10 个不含肾小球的视野。肾小

管间质病变由 3 个参数判定(蛋白管型和肾小管的扩张;间质炎细胞的浸润;间质纤维化的程度)。每个参数按 0~3 分评定(0=正常,1=轻度受损,2=中度受损,3=重度受损)。每个样本小管间质的评分为 0~9 分。

(2) 肾间质浸润的炎细胞计数 按文献描述的方法^[2],400 倍光镜下,每张切片随机选择 10 个不含肾小球的视野,计数肾间质内浸润的炎细胞(单核巨噬细胞、淋巴细胞、中性粒细胞)。结果以(炎细胞数/HP \times 400)表示。

1.3.3 免疫组织化学 采用 SP 法。3 μ m 厚石蜡切片脱蜡水化后经 3% H₂O₂ 孵育灭活内源性过氧化物酶,高压锅抗原修复,山羊血清封闭后,分别滴加兔抗大鼠 FN 抗体(武汉博士德公司 1:200), α -SMA 抗体(武汉博士德公司 1:150)孵育,再依次加入生物素标记的羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素工作液孵育。DAB 显色,苏木素复染,常规脱水、透明、封片镜检。每次染色均以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3.4 图像分析 Nikon spot cool CCD 采集图像,采用 Image Pro plus 4.02 多媒体彩色病理图象分析软件进行分析。经灰度变换将阳性染色与背景分开进行自动测量。

(1) 肾间质相对面积测定 取 Masson 染色切片,每例切片选取 20 个不重叠的 200 倍视野,计算肾间质面积与肾小管间质总面积(去除肾小管管腔)比值,取其平均值为每例切片的肾间质相对面积^[3]。

(2) 肾小管间质 α -SMA、FN 免疫组化染色阳性面积测定 在每张不包含肾小球和血管的肾小管间质区域随机选取 15 个不重叠的 200 倍视野,计算每个视野内阳性染色区域的面积密度平均值。

1.4 统计学处理 数据资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 统计软件处理。组间差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。组间两两比较用 SNK 检验法。 α -SMA、FN 表达与肾小管间质损伤评分(TIS)、肾间质相对面积之间的关系判断采用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 生化变化

尿蛋白的浓度各个体之间差异较大,但每日排出总量差异较小。24 小时尿蛋白定量 UUO 组与假

手术组比较无统计学差异。UUO 术后 7~14 天，大鼠出现明显血尿素氮、肌酐值升高。术后 21~28 天通过对侧肾脏的代偿，血尿素氮、肌酐值反

而下降，但 28 天时血肌酐值仍然比 SOR 组高（见表 1）。

表 1 SOR、UUO 组大鼠 24 小时尿蛋白定量、尿素氮 (mmol/L)、肌酐 (μmol/L) 检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

	时间 (天)	鼠数 (只)	尿素氮 (mmol/L)	肌酐 (μmol/L)	尿蛋白 (mg/24h)
SOR 组	7	6	4.50 ± 1.07	36.68 ± 3.78	10.90 ± 1.67
	14	6	4.23 ± 1.01	37.16 ± 4.11	8.25 ± 1.71
	21	6	4.30 ± 1.05	34.37 ± 3.29	11.34 ± 3.57
	28	6	4.48 ± 1.06	35.82 ± 3.69	10.50 ± 2.06
UUO 组	7	6	15.70 ± 3.19△	171.22 ± 14.49△	11.75 ± 2.50
	14	6	10.35 ± 3.24△	69.15 ± 11.19△	16.50 ± 1.39
	21	6	6.30 ± 1.33	43.95 ± 6.59	14.75 ± 3.13
	28	6	6.83 ± 0.46	62.40 ± 6.60△	22.00 ± 8.60

注：△与 SOR 组比较 P<0.05

2.2 肾脏组织学改变 SOR 组各时间点肾脏病理未见改变。UUO 术后 3 天可见肾间质水肿，远端小管扩张，而近端小管扩张不明显，远端小管上皮细胞扁平、间质增宽，失去“背靠背”特征，小管间质内有散在炎细胞浸润，但小球结构正常；Masson 染色见皮髓交界处出现轻微纤维化。UUO 术后 7 天，大量炎症细胞浸润，部分近端小管空泡变性，管腔内可见脱落上皮细胞，外髓、皮髓交界处小管扩张更加明显。术后 14 天，炎症细胞浸润及细胞增殖明显，部分小管消失，集合管、远端小

管扩张呈囊状，部分近端小管保存尚好，皮质变薄。术后 21 天，髓质小管更加减少，皮髓质变薄，小管空泡变性明显，大量炎症细胞浸润及细胞增殖。术后 28 天，炎症细胞浸润有所减少，近端小管空泡变性显著，皮质极薄，扩张小管数量减少，部分小管萎缩消失，纤维化明显；PAS 染色见弥漫的肾小管基底膜增厚皱缩；Masson 染色见皮质区、皮髓交界处纤维化明显，而肾小球仍无明显病变。UUO 组肾小管间质损害评分 (TIS) 及肾间质炎细胞浸润变化见图 1、2。

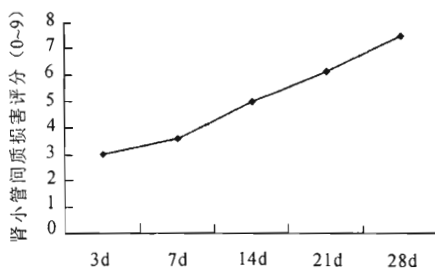


图 1 UUO 组肾小管间质损害评分变化

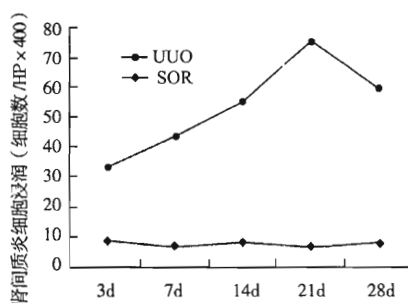


图 2 肾间质炎细胞浸润变化

2.3 肾脏组织 α-SMA 和 FN 的表达 假手术组中以血管作为自身阳性内参照，肾小球、肾小管和间质细胞均无 α-SMA 表达。UUO 术后 3 天，肾间质中 α-SMA 阳性细胞数增多；术后 7 天，见少许肾小管上皮细胞也有 α-SMA 表达，术后 14 天，可见较多的肾小管上皮细胞表达 α-SMA。假手术组的 FN 在各个时间点肾间质中只有少量表达，UUO 术后 3 天，肾间质中纤维连接蛋白 (FN) 表达明显增加。α-SMA 和 FN 表达均随着肾小管间质损害

加重进一步增加。两者在 UUO 术后肾小管间质的表达变化见图 3、4。

2.4 α-SMA 的表达与肾脏病理学和肾功能指标的相关分析 对肾小管间质中 α-SMA、FN 表达与 TIS、间质相对面积进行相关分析发现，α-SMA 阳性染色面积与 FN 阳性染色面积成正相关 ($r = 0.996, P < 0.01$)，α-SMA 阳性染色面积与间质相对面积、TIS 成正相关 (r 分别为 0.985、0.972, $P < 0.01$)，FN 阳性染色面积与间质相对面积、

TIS 成正相关 (r 分别为 0.969、0.953, $P < 0.05$)。

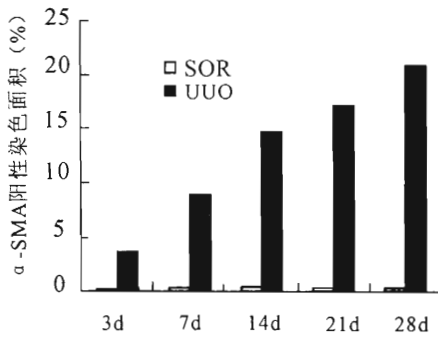


图 3 肾小管间质 α -SMA 表达

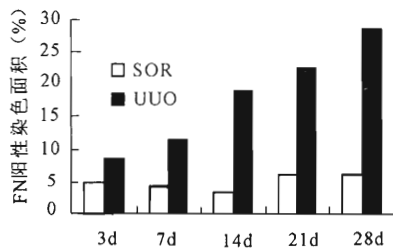


图 4 肾小管间质 FN 表达

3 讨论

目前的研究证实,肾脏间质纤维化程度与肾功能减退的相关性,比肾小球硬化与肾功能减退的相关性更为密切^[4]。临床上,输尿管梗阻是导致肾纤维化的常见原因。为此,我们采用 UUO 的方法建立肾间质纤维化模型,观察了梗阻过程中大鼠肾功能变化及肾脏组织的病理改变。结果发现,单侧输尿管结扎后,短期内(术后 7~14 天)大鼠出现明显血尿素氮、肌酐值升高。术后 21~28 天,血尿素氮、肌酐值反而下降,但术后 28 天时血肌酐值仍然比假手术组高。提示单侧输尿管梗阻后肾功能有一个急性失代偿到逐渐通过对侧肾脏代偿,最后对侧肾脏亦失代偿的变化过程,此与梗阻后引起肾内压、肾脏血流动力学和肾小球滤过压改变有关。UUO 术后 28 天内,24 小时尿蛋白排泄量无明显增加,估计与 UUO 模型病变特点为肾实质被纤维组织取代,而肾小球相对不受影响有关。

肾间质纤维化以肾间质中细胞及胶原成分聚积增多,伴有肾小管萎缩或扩张变形为特征^[5]。我们观察到, UUO 术后 3 天,肾组织已出现炎细胞浸润、细胞增殖、小管扩张等病理改变,此后呈进

行性小管萎缩及间质纤维化。但整个 UUO 术后观察期内,即使术后 28 天小管间质病变已十分严重,肾小球仍无明显病变,与文献报导相符合^[5],也表明了该模型肾脏病理改变的特点。UUO 术后 3 天,已可见梗阻侧肾脏发生早期间质纤维化损害,表现为成肌纤维细胞激活(肾间质中 α -SMA 阳性细胞数增多),FN 过表达,间质相对面积增加,一直持续到术后 28 天。而且术后 7 天,可见少许肾小管上皮细胞表达 α -SMA,术后 14 天, α -SMA 阳性的肾小管上皮细胞数明显增多,与国外文献报道基本一致^[5]。 α -SMA 是平滑肌和肌成纤维细胞的标志蛋白。肾小管上皮细胞 α -SMA 染色阳性说明这些肾小管上皮细胞可能发生了上皮-间质转分化。近年研究表明,肾小管上皮细胞-肌成纤维细胞转分化是肾间质纤维化发生发展的重要机制。“表型转化”理论认为,病理状态下肾小管上皮细胞可转分化为肌成纤维细胞,获得 α -SMA 表达的转分化肾小管上皮细胞及间质细胞可具备肌成纤维细胞的特征如收缩功能及分泌胶原,产生细胞外基质(ECM),导致肾间质纤维化发生发展^[5,6]。其中, FN 也是由活化的成纤维细胞分泌的性质尚未明确的蛋白质,它除了作为 ECM 成分之一,还可进一步激活炎症细胞,最终促使肾间质的纤维化^[5]。而相关性分析显示 α -SMA 表达与 FN 表达呈正相关,提示 FN 增加与肌成纤维细胞数量增多有关。 α -SMA 表达与 TIS、间质相对面积的相关性也提示肌成纤维细胞数量在肾纤维化及肾功能损害中起着重要的作用。由此可见, UUO 模型是研究肾脏细胞表型转化的理想模型。

在此种动物模型中,另一突出的病理改变是间质区的细胞增殖和炎症细胞浸润。我们发现,假手术组肾脏有极少巨噬细胞主要位于肾小球,髓质中完全没有白细胞,与文献报道一致^[7]。而 UUO 组中,肾脏皮质和髓质均可见单核细胞。UUO 术后 3 天,小管间质内为散在炎细胞浸润。术后 21 天,炎症细胞浸润及细胞增殖最明显。术后 28 天,炎症细胞浸润反而有所减少。许多研究已证实,肾间质纤维化过程中涉及多种肾脏细胞,包括成纤维细胞、小管上皮细胞、巨噬细胞以及淋巴细胞等^[4]。因此, UUO 术后 21 天是研究肾间质纤维化发病机制,尤其是增殖细胞和炎症细胞功能的最佳时期。

UUO 模型与其他多种慢性肾疾病模型不同,例如 5/6 肾切除模型、糖尿病肾病模型,通常需要

花费数月才会建立起纤维化模型^[8,9]。而我们发现, UUO 模型术后 3 天就已出现早期肾纤维化改变, 许多可定量的病理改变约在 UUO 术后一周发生, 说明肾间质纤维化研究模型已成功建立。而且多种证据表明, 此种模型的一些研究结果与梗阻后肾病人体的观察结果相似, 啮齿类动物的 UUO 模型可反映人类梗阻性肾病和纤维化肾脏疾病过程^[10]。UUO 模型制作相对简单, 有较好的重复性, 肾间质纤维化发生迅速, 可观察到肾脏细胞转分化过程。因此, UUO 模型是一种研究肾纤维化发生机制、肾脏细胞转分化和评价肾纤维化治疗方法的理想模型。

4 参考文献

- [1] Maarten W, Kambiz Z, *et al.* Proinflammatory gene expression and macrophage recruitment in the rat remnant kidney [J]. *Kidney Int*, 2000, 58: 164~167.
- [2] 田少江, 贾汝汉, 丁国华, 等. 阿托伐他汀对肾间质纤维化大鼠巨噬细胞增殖的影响[J]. *中华肾脏病杂志*, 2003, 5 (4): 460~462.
- [3] 董健平, 陈香美, 师锁柱, 等. 金属蛋白酶组织抑制剂 1 在大鼠肾小管间质损害中的表达及其意义[J]. *中华肾脏病杂志*, 2002, 18 (4): 275~279.
- [4] Eitner, Frank. Floege, Jurgen. Novel insights into renal fibrosis [J]. *Current Opinion in Nephrology & Hypertension*, 2003, 12 (3): 227~232.
- [5] Yang, Jun Wei, Liu YouHua. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13 (1): 96~107.
- [6] Fan JM, Huang XR, Ng YY, *et al.* Interleukin-1 induces tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation through a transforming growth factor-beta1-dependent mechanism *in vitro* [J]. *Am J Kidney Dis*, 2001, 37 (4): 820~831.
- [7] Truong. Cell apoptosis and proliferation in experimental chronic obstructive uropathy [J]. *Kidney Int*, 1996, 50: 200~207.
- [8] Mehl G, Jean L, *et al.* Contribution of tubular injury to loss of remnant kidney function [J]. *Kidney Int*, 1998, 54: 1157~1165.
- [9] Wang S, Chen Q, Morrissey J, *et al.* Bone morphogenetic protein-7(BMP-7): an effective therapy in diabetic nephropathy [Abstract] [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2001, 12: A44~48.
- [10] Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, 283 (5): 861~875.

(上接第 11 页) 同的影响因素之一, 还有待于深入研究。

圈养条件下, 对排粘频繁和每次排粘量多的大熊猫而言, 必须补充各种 AA 尤其是 EAA 含量丰富的食物, 否则就会导致大熊猫发生蛋白质的营养不良。同时还有必要就大熊猫的排粘现象及其粘液

的成分进行更进一步的研究。

4 参考文献

- [1] 胡锦焘. 大熊猫研究 [M]. 上海: 上海科技出版社, 2001: 89.
- [2] 朱本仁, 郭伟. 圈养大熊猫排粘与食竹量的关系的初步研究 [J]. *动物学杂志*, 1999, 34 (4): 35~36.

四川省野生动物保护协会成立 20 周年开展纪念活动

今年是四川省野生动物保护协会成立 20 周年。根据常务理事会扩大会议决定, 协会今年将以 20 周年纪念活动为契机, 大力宣传野生动物保护协会的职能和业绩, 提高社会公众对野生动物保护协会的认知程度; 大力宣传保护野生动物的深远意义, 不断提高公众建设生态文明的意识。今年保护协会工作要面向基层、充分体现社会性, 要进一步加强组织建设, 要依靠广大会员把“爱鸟周”、“野生动物保护宣传月”等活动搞得绘声绘色、丰富多彩。最近, 省野生动物保护协会发出通知, 要求各级保护协会组织、理事会成员、协会会员和热心野生动保护事业的社会人士积极参与纪念活动, 撰写纪念文章。省保护协会还准备年内编印一本四川省野生动物保护协会成立 20 周年纪念文集。