

蝙蝠蛾拟青霉 Cs-4 对阿霉素肾病大鼠的保护作用

王娜 齐敏 梁素忍 甄军晖 刘春喜 胡昭

摘要 目的 研究蝙蝠蛾拟青霉 Cs-4 对阿霉素肾病大鼠的保护作用。方法 雄性 SD 大鼠 24 只,随机分为正常组、模型组、蝙蝠蛾拟青霉 Cs-4 组、贝那普利组。采用左侧肾脏切除加尾静脉重复注射阿霉素的方法建立阿霉素肾病模型。术后 1 周蝙蝠蛾拟青霉 Cs-4 组给予蝙蝠蛾拟青霉 Cs-4 500 mg/(kg·d)灌胃,贝那普利组予贝那普利 4 mg/(kg·d)灌胃。用药 4、8 周后观察各组大鼠 24 h 尿蛋白定量、血生化(BUN、Scr),8 周后取肾组织于光镜、电镜下观察肾脏病理变化,应用免疫组化方法测定肾组织骨调素(OPN)、纤维连接蛋白(FN)、胶原 IV(COL-IV)的表达。结果 蝙蝠蛾拟青霉 Cs-4 能减少阿霉素肾病大鼠尿蛋白,延缓 BUN、Scr 的上升,纠正脂代谢紊乱,与模型组相比差异显著($P < 0.05$);减轻肾小球系膜基质比($P < 0.05$),减少 OPN、FN、COL-IV 的表达($P < 0.05$)。结论 蝙蝠蛾拟青霉 Cs-4 可减少蛋白尿的排泄,纠正脂代谢紊乱,改善肾功能,抑制 ECM 的过度积聚,从而减轻肾脏病理损害,发挥其肾脏保护作用。

关键词 阿霉素肾病;肾纤维化;蝙蝠蛾拟青霉 Cs-4;贝那普利

Protective Effects of Paecilomyces Hepiali Cs-4 on Rats with Adriamycin-induced Nephropathy WANG Na, QI Min, LIANG Su-ren, et al *Department of Nephrology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan (250012)*

ABSTRACT **Objective** To study the renal protective effect of Paecilomyces hepiali Cs-4 (Abbr. to Cs-4) on rats with adriamycin-induced nephropathy (AIN). **Methods** Twenty-four male SD rats were randomly divided into four groups: the control group (A), the model group (B), the Benazepril group (C), and the Cs-4 group (D). AIN rat model was established by left unilateral nephrectomy and repeated caudal vein injection of adriamycin. Gastric perfusion of Cs-4 [500 mg/(kg·d)] and Benazepril [4 mg/(kg·d)] was given respectively to the groups D and C, starting from 1 week after modeling. Blood biochemical indices including blood urea nitrogen (BUN), serum creatine (Scr) and 24-hour urinary protein excretion (24 h-UP) were assessed 4 and 8 weeks after medication. Rats were sacrificed at the end of 8-week medication, their renal tissue was get for pathological examination with electric microscopy, the expressions of fibronectin (FN), collagen IV (COL-IV) and osteopontin (OPN) in renal tissue were assessed by immunohistochemistry. **Results** Levels of 24h-UP, BUN, Scr, mesangial matrix percentage, as well OPN, FN, COL-IV were significantly lower in group D than in group B ($P < 0.05$); and the fat metabolic disorder was improved in group D ($P < 0.05$). **Conclusion** Cs-4 displays its renal protective action in rats with AIN through reducing the urinary protein excretion, correcting lipid metabolic disturbance, inhibiting the over accumulation of extracellular matrix, improving the pathological damage of kidney, thus restoring the renal function.

KEYWORDS adriamycin-induced nephropathy; kidney fibrosis; Paecilomyces hepiali Cs-4; Benazepril

慢性肾脏病已成为威胁人类健康的重要疾病,在成年人中患病率 11% 左右,其预后差、医疗费用高,已成为全球性的重要公共卫生问题^[1]。蝙蝠蛾拟青霉 Cs-4 由新鲜冬虫夏草经人工发酵培养,获得发酵虫草菌丝体,是金水宝胶囊的主要成分,本实验通过改良的阿霉素(ADR)肾病大鼠模型^[2],探讨蝙蝠蛾拟

青霉 Cs-4 对慢性肾脏病的肾脏保护作用,为临床治疗提供实验依据。

材料与方法

1 材料

1.1 实验动物 成年雄性 SD 大鼠 24 只,280 ~ 300 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养于山东大学实验动物中心。

1.2 药物与试剂 蝙蝠蛾拟青霉 Cs-4 购自江西济民可信金水宝制药有限公司,批号:060134;贝那普

基金项目:国家科技支撑计划课题(No. 2007BAI04B10)

作者单位:山东大学齐鲁医院肾内科(济南 250012)

通讯作者:胡昭, Tel:13791122685, E-mail:sdhuzhao@163.com

利购自北京诺华制药有限公司,批号:X0256;阿霉素(ADR)由意大利法玛西亚普强公司生产,批号:20060101。骨调素(OPN)、纤维连接蛋白(FN)、胶原IV(COL-IV)兔抗大鼠一抗和即用型链霉素亲和素-生物素-过氧化酶复合物(streptavidin-biotinperoxidase complex, SABC)、免疫组化试剂盒(SA1022)购于武汉博士德生物工程有限公司,其余试剂为进口分装。

1.3 仪器 离心机,日本日立公司产品;自动生化分析仪,日本日立公司 7170A 型产品;光学显微镜,日本 OLYMPUS 公司产品;恒温水浴箱,美国 FORMA 驻上海雷勃分析仪器有限公司产品;切片机,上海倍曼生物科技有限公司产品;照相显微镜,日本 OLYMPUS 公司产品;TGL-168 台式离心机,上海安亨科学仪器厂产品;日立 H600 型透射电镜, HITACH, Japan。

2 方法

2.1 动物模型制作 实验动物自由饮水进食,适应环境 1 周,将其随机分为正常对照组(N组)、模型组(M组)、蝙蝠蛾拟青霉 Cs-4 组(J组)和贝那普利组(B组),每组 6 只。治疗组与 M 组以 10% 水合氯醛 3 mL/kg 腹腔注射麻醉大鼠,置于无菌手术台,腹部右旁正中切口,暴露左侧肾脏,行左肾切除。术后第 7 天尾静脉注射阿霉素(ADR)5 mg/kg,术后每只大鼠予青霉素 G 注射液 2 万 U/d 腹腔注射,第 4 周后尾静脉注射 ADR 3 mg/kg;N 组和 M 组分别尾静脉注射等量生理盐水。首次尾静脉注射 ADR 后 J 组每天给予蝙蝠蛾拟青霉 Cs-4 500 mg/kg 灌胃, B 组每天给予贝那普利 4 mg/kg 灌胃, N 组和 M 组每天给予等量自来水灌胃。灌胃时间为 8 周。实验过程中 M 组大鼠死亡 1 只。

2.2 标本收集 实验第 4、8 周末在代谢笼中收集各组大鼠 24 h 尿液,测定 24 h 尿蛋白定量;第 4 周末尾静脉取血、第 8 周末腹主动脉取血分离血清检测尿素(BUN)、肌酐(Scr)、血浆总蛋白(TP)、血浆白蛋白(ALB)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG);第 8 周末于 10% 水合氯醛 3 mL/kg 腹腔麻醉下取右侧肾脏,用生理盐水冲洗组织后取部分肾皮质用于电镜检查,剩余部分置于 10% 福尔马林固定液用于常规病理、免疫组化检查。

2.3 肾组织病理检查 肾组织经 10% 中性福尔马林缓冲液固定,石蜡包埋,切片厚约 3 μ m,行 HE 及 PAS 染色,运用 Image-Pro Plus 5.1 图像分析软件测定肾小球面积(GA)、肾小球细胞外基质面积(ECM),计算 ECM/GA 比值^[3]。采取约 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm 大小肾皮质,用含 15% 戊二醇的二甲

盐缓冲液固定 4 h 后,再固定于 1% 锇酸, Epon812 包埋,切片厚 50 nm,铀铅双重染色,日立 H600 型透射电镜下观察肾小球和肾小管间质的超微结构。

2.4 免疫组织化学检测 (1)石蜡切片常规二甲苯脱蜡和梯度酒精水化;(2)蒸馏水冲洗 3 次,3 min/次;(3)3% 过氧化氢溶液,室温下孵育 20 min;(4)柠檬酸盐缓冲液对组织抗原进行微波修复 10 min,室温冷却 30 min 后,蒸馏 PBS 冲洗 3 次,3 min/次;(5)5% 山羊血清封闭,室温孵育 20 min;(6)甩去血清滴加 OPN、Col-IV、FN 一抗(1:200),以 PBS 代替一抗作为阴性对照,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;(7)室温复温 30 min, PBS 冲洗 3 次,5 min/次;滴加酶标抗鼠/兔聚合物,37 $^{\circ}$ C 温箱下孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次,3 min/次;(8)滴加新鲜配制 DAB 溶液,显微镜下控制显色时间;流水冲洗 10 min,苏木素复染,1% 盐酸分化,流水冲洗;(9)梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封片。细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性结果,对肾组织免疫组化结果行半定量分析,用平均光密度(OD)表示阳性物质的相对含量。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行组间单因素方差分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

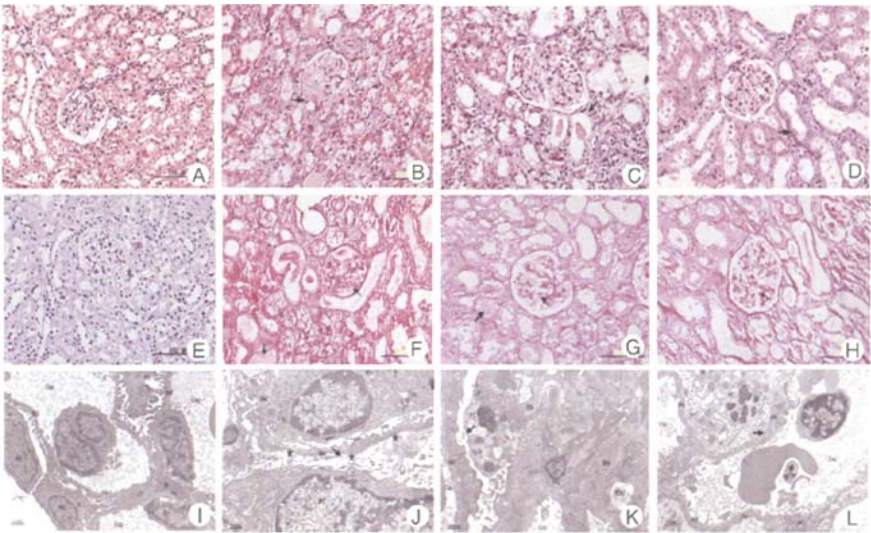
1 各组 24h 尿蛋白定量、血 TP、ALB、TC、TG、BUN、Scr 比较(表 1) M 组与 N 组比较,血 TP、ALB 明显降低($P < 0.05$),且第 8 周 TP 比第 4 周更低,血 TC、TG、BUN、Scr 及 24 h 尿蛋白定量均明显升高($P < 0.05$),第 8 周比第 4 周更高;B、J 组各时间点与 M 组比较,均能降低 CHO、TG,改善肾功能,降低尿蛋白($P < 0.05$),J 组用药 4 周 Scr 及 B、J 组 8 周 BUN、Scr 均低于 M 组,TP、ALB 均高于 M 组($P < 0.05$),其中 J 组在改善 TP、CHO 方面比 B 组明显,但降低尿蛋白效果不如 B 组($P < 0.05$)。

2 肾组织病理变化(图 1) 光镜:HE、PAS 染色, N 组肾小球结构清晰, M 组肾脏体积缩小,间质炎性细胞增多,可见纤维化及蛋白管型,系膜细胞增生和上皮细胞出现空泡变性,系膜基质增多,毛细血管塌陷,可见部分局灶节段性硬化改变。B、J 组系膜细胞轻度增生,病变明显轻于 M 组, N 组 M/G 值为 0.30 ± 0.03 ; M 组为 0.63 ± 0.04 ,与 N 组相比较,差异有统计学意义($P < 0.05$); B 组为 (0.48 ± 0.04) , J 组为 0.46 ± 0.04 ;与 M 组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。电镜检查: N 组肾小球结构正常,基膜厚度

表 1 各组 24 h 尿蛋白定量、血 TP、ALB、TC、TG、BUN、Scr 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	24 h 尿蛋白 (mg/24 h)	BUN (mmol/L)	Scr (μ mol/L)	TP (g/L)	ALB (g/L)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)
N	6	用药 4 周	11.12 $\pm$ 1.12	10.42 $\pm$ 0.33	48.83 $\pm$ 5.11	63.83 $\pm$ 1.94	27.00 $\pm$ 0.89	1.28 $\pm$ 0.34	0.25 $\pm$ 0.26
		用药 8 周	12.30 $\pm$ 5.27	9.36 $\pm$ 1.21	56.50 $\pm$ 8.53	64.00 $\pm$ 2.97	27.50 $\pm$ 1.38	1.33 $\pm$ 0.23	0.28 $\pm$ 0.22
M	6	用药 4 周	38.57 $\pm$ 2.65 $^{\Delta}$	7.54 $\pm$ 1.39 $^{\Delta}$	89.17 $\pm$ 10.30 $^{\Delta}$	45.67 $\pm$ 3.50 $^{\Delta}$	18.33 $\pm$ 3.01 $^{\Delta}$	3.67 $\pm$ 0.19 $^{\Delta}$	1.46 $\pm$ 0.42 $^{\Delta}$
		用药 8 周	97.20 $\pm$ 12.05 $^{*\Delta}$	38.30 $\pm$ 8.84 $^{*\Delta}$	169.17 $\pm$ 16.75 $^{*\Delta}$	39.17 $\pm$ 1.47 $^{*\Delta}$	17.50 $\pm$ 1.87 $^{\Delta}$	10.32 $\pm$ 1.04 $^{*\Delta}$	3.61 $\pm$ 1.51 $^{*\Delta}$
B	6	用药 4 周	23.17 $\pm$ 2.58 $^{\Delta}$	7.78 $\pm$ 0.93	88.50 $\pm$ 28.16	43.33 $\pm$ 5.64	18.83 $\pm$ 2.14	2.75 $\pm$ 0.61 $^{\Delta}$	0.40 $\pm$ 0.53 $^{\Delta}$
		用药 8 周	49.67 $\pm$ 8.26 $^{*\Delta}$	21.40 $\pm$ 4.01 $^{*\Delta}$	105.83 $\pm$ 14.61 $^{*\Delta}$	47.83 $\pm$ 2.4 $^{\Delta}$	19.50 $\pm$ 1.05 $^{\Delta}$	4.55 $\pm$ 0.48 $^{*\Delta}$	1.00 $\pm$ 0.32 $^{*\Delta}$
J	6	用药 4 周	31.26 $\pm$ 1.83 $^{\Delta\circ}$	7.87 $\pm$ 1.01	59.83 $\pm$ 9.22 $^{\Delta}$	50.17 $\pm$ 7.76 $^{\circ}$	17.17 $\pm$ 2.32	2.15 $\pm$ 0.40 $^{\Delta\circ}$	0.43 $\pm$ 0.26 $^{\Delta}$
		用药 8 周	60.25 $\pm$ 8.59 $^{*\Delta\circ}$	19.37 $\pm$ 4.20 $^{*\Delta}$	95.00 $\pm$ 25.61 $^{*\Delta}$	55.67 $\pm$ 2.25 $^{*\Delta\circ}$	21.17 $\pm$ 1.17 $^{*\Delta}$	3.65 $\pm$ 0.36 $^{*\Delta\circ}$	0.66 $\pm$ 0.14 $^{\Delta}$

注：与 N 组用药 4 周比较， $^{*}P < 0.05$ ；与 N 组比较， $^{\Delta}P < 0.05$ ；与 M 组比较， $^{\Delta}P < 0.05$ ；与 B 组比较， $^{\circ}P < 0.05$ ；下表同



注：A-D 为 HE 染色结果 ($\times 400$)，E-H 为 PAS 染色结果 ($\times 400$)，I-L 为电镜结果；A、E、I 为正常对照组，B、F、J 为模型组，C、H、L 为贝那普利组，D、K、M 为蝙蝠蛾拟青霉 Cs-4 组

图 1 各组大鼠肾组织 HE 染色、PAS 染色结果、电镜结果

一致，毛细血管腔充盈，足突排列规则，内皮孔分布均匀，M 组观察到大鼠肾小球代偿性肥大，系膜细胞增生，肾小球脏层上皮细胞足突部分融合，足细胞内质网肿胀形成大小不等的泡，胞质中高密度颗粒多见，基底膜部分增厚，厚薄不一，结构疏松。B、J 组明显轻于 M 组。

3 各组大鼠 OPN、Col-IV、FN 比较(表 2、图 2) M 组 OPN、Col-IV、FN 的表达较 N 组明显增强($P < 0.05$)，B、J 组各指标较 M 组降低($P < 0.05$)，J 组 FN 低于 B 组($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠 OPN、Col-IV、FN 比较 ($\bar{x} \pm s$)

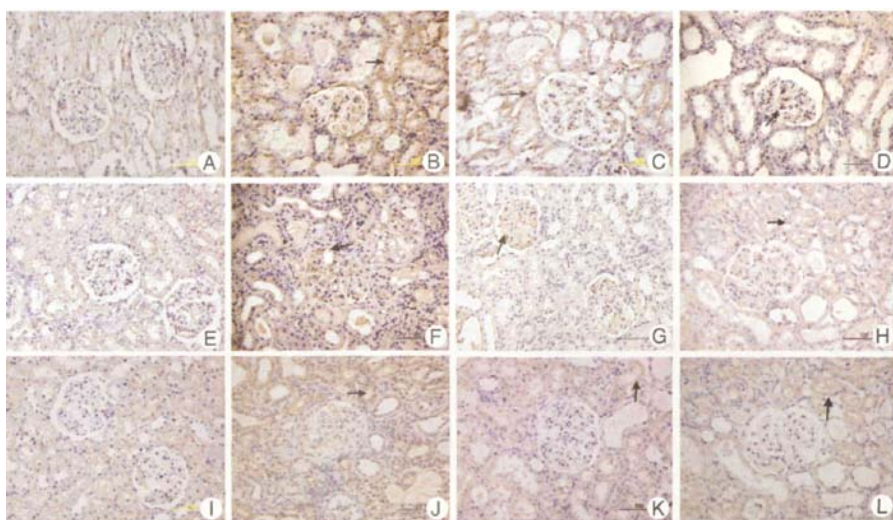
组别	n	OPN	Col-IV	FN
N	6	7.87 $\pm$ 0.22	11.78 $\pm$ 0.44	4.99 $\pm$ 0.22
M	6	18.76 $\pm$ 0.23 $^{\Delta}$	25.90 $\pm$ 0.64 $^{\Delta}$	20.40 $\pm$ 1.48 $^{\Delta}$
B	6	13.25 $\pm$ 0.41 $^{\Delta}$	12.98 $\pm$ 0.37 $^{\Delta}$	18.43 $\pm$ 0.45 $^{\Delta}$
J	6	14.75 $\pm$ 0.50 $^{\Delta\circ}$	12.61 $\pm$ 0.21 $^{\Delta}$	15.00 $\pm$ 0.74 $^{\Delta\circ}$

注：与 N 组比较， $^{\Delta}P < 0.05$ ；与 M 组比较， $^{\Delta}P < 0.05$ ；与 B 组比较， $^{\circ}P < 0.05$

讨 论

慢性肾脏病最终会导致肾脏纤维化，其机制较为复杂，以细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肾脏组织的过度积聚与沉积，以及成纤维细胞的增生为特征，是多种细胞、生长因子、细胞因子共同参与，相互作用的结果^[4]，持续的细胞外基质沉积导致纤维化形成。阿霉素诱导的大鼠肾脏模型是较成熟的可以用于研究肾小球硬化和肾间质纤维化的动物模型^[5]。

FN 在纤维化过程中最早出现，并成为 ECM 积聚的促发因素，使得胶原更容易沉积^[6]。Col-IV 是构成肾小球基膜网架结构的支架，其变化与总的 ECM 的变化趋势相一致；OPN 在肾间质纤维化的形成中发挥重要作用。局部 FN 和胶原的堆积促进成纤维细胞、肾小球系膜细胞、肾小管上皮细胞的增殖及肾脏纤维化的形成。



注: A-D 为 Col-IV 表达结果 (×400), E-H 为 FN 表达结果 (×400), I-L 为 OPN 表达结果 (×400); A、E、I 为正常对照组, B、F、J 为模型组, C、G、K 为贝那普利组, D、H、L 为蝙蝠蛾拟青霉 Cs-4 组

图 2 各组大鼠肾组织免疫组化染色结果

蝙蝠蛾拟青霉 Cs-4 正常情况下可以通过对多种不同的免疫细胞发挥不同的作用而增强免疫功能^[7], 而在免疫增强的情况下又能起到免疫抑制作用^[8]。前期研究证明蝙蝠蛾拟青霉 Cs-4 和贝那普利联合应用有相加作用, 能有效延缓肾间质纤维化^[9]。本研究结果证明蝙蝠蛾拟青霉 Cs-4 能明显升高 ALB, 降低 CHO、TG, 改善肾功能, 降低尿蛋白, 与 M 组比较, 差异均有统计学意义, 并且其在降低血脂方面优于 B 组; 肾脏病理结构改变无论是光镜还是电镜均较 M 组减轻; 免疫组化可见 Col-IV、FN、OPN 在肾小球及肾间质中少量表达, 与 M 组相比明显减轻, 并且 FN 的表达较 B 组相比明显减轻。由此证明蝙蝠蛾拟青霉 Cs-4 可以改善 ADR 肾病大鼠的肾功能, 并能减轻肾脏纤维化, 其机制可能是通过减少 Col-IV、FN、OPN 的表达从而减轻 ECM 的合成。

参 考 文 献

- [1] Levey AS, Coresh J, Balk E, et al. National kidney foundation practice guidelines for chronic kidney disease; evaluation, classification, and stratification [J]. *Ann Intern Med*, 2003, 139(2):137-47.
- [2] 王泰华, 钱家麒, 张介玉, 等. 阿霉素肾病肾硬化动物模型的实验改进 [J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 1997, 6(2):191-193.
- [3] 张碧丽, 李志军, 宋兰云, 等. 参麦、苯那普利综合治疗局灶节段性肾小球硬化的实验研究 [J]. *天津医药*, 2002, 30(9):549-552.
- [4] Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis [J]. *Pediatr Nephrol*, 2000, 15(3-4):290-301.
- [5] Wang Y, Wang YP, Tap YC, et al. Progressive adriamycin nephropathy in mice; sequence of histologic and immunohistochemical events [J]. *Kid Int*, 2000, 58(4):1797-1804.
- [6] Van Vliet A, Baelde HJ, Vleming LJ, et al. Distribution of fibronectin isoforms in human renal disease [J]. *J Pathol*, 2001, 193(2):256-262.
- [7] 王旭丹, 周勇, 张丽, 等. 冬虫夏草对小鼠免疫功能的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 1998, 21(6):34-36.
- [8] 李锋, 刘利, 饶邦复, 等. 冬虫夏草免疫抑制作用研究现状 [J]. *川北医学院学报*, 2001, 16(2):108-110.
- [9] 李锋, 甄军辉, 胡昭, 等. 联合用药延缓阿霉素肾病大鼠肾间质纤维化的研究 [J]. *山东大学学报(医学版)*, 2007, 45(6):599-603.
- [10] Li F, Zhen JH, Hu Z, et al. Combination drugs delay renal interstitial fibrosis of rats with adriamycin nephropathy [J]. *J Shandong Univ (Health Sci)*, 2007, 45(6):599-603.

(收稿:2009-09-09 修回:2010-02-02)