

· 基础研究 ·

血管紧张素 II 受体拮抗剂与血管紧张素转换酶抑制剂 抗大鼠肾脏纤维化的作用及机制探讨

赵雅妮 李惊子 王海燕

【摘要】 目的 探讨抑制血管紧张素 II (Ang II) 对肾间质纤维化的延缓作用及可能的机制。方法 采用大鼠慢性嘌呤霉素(嘌呤霉素)肾硬化模型,随机分为模型组、血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)依那普利治疗组、血管紧张素受体拮抗剂(AT1RA)厄贝沙坦治疗组和正常对照组。实验全程 12 周,血、尿标本进行生化检测,肾组织病理和免疫组化检测骨桥蛋白、单核巨噬细胞、肌成纤维细胞及细胞外基质纤连蛋白、层连蛋白、胶原的表达。结果 AT1RA 与 ACEI 一样能减少尿蛋白,改善肾功能,肾病理损伤明显减轻,与细胞外基质聚积减少一致;同时间质单核巨噬细胞浸润显著减少,且与肾小管骨桥蛋白的表达呈正相关($r=0.9492, P<0.01$)。结论 AT1RA 与 ACEI 的肾脏保护作用可能与抑制肾脏局部 Ang II 介导的间质巨噬细胞的浸润有关。

【关键词】 受体,血管紧张素;血管紧张素转换酶抑制剂;纤维变性;巨噬细胞;大鼠

Comparison of renoprotective effect between angiotensin II receptor antagonist and angiotensin converting enzyme inhibitor on puromycin nephropathy and their possible mechanism

ZHAO Yani, LI Jingzi, WANG Haiyan

Division of Nephrology, the First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China

【Abstract】 Objective To investigate the renal protective effect and possible mechanism of inhibiting angiotensin II (Ang II) in chronic puromycin nephropathy with tubulointerstitial fibrosis. **Methods** Rats were randomly divided into normal control (NC, $n=7$), nephrotic syndrome (NS, $n=6$), NS with irbesartan treatment ($n=7$), NS with enalapril treatment ($n=7$) groups. After twelve weeks, serum, urine and renal tissue were collected for study. ED1-positive monocyte/macrophage, osteopontin (OPN), fibronectin (FN), laminin (LN), and α -smooth muscle actin (α -SMA) were detected by immunohistochemistry of SP method. Collagen was stained with Sirius red. Cells were counted and semi-quantitative data were analyzed. **Results** In angiotensin receptor antagonist (AT1RA) and angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEI) groups, reduced proteinuria, improvement of renal function and lower tubulointerstitial damage index were found. Both AT1RA and ACEI could inhibit ED1-positive cell infiltration, accompanied with down-regulation of OPN expression, and reduced extracellular matrix. **Conclusions** AT1RA and ACEI could reduce monocyte/macrophage infiltration induced by intrarenal Ang II, which is associated with their renal protective effects.

【Key word】 Receptors, angiotensin; Angiotensin-converting enzyme inhibitors; Fibrosis; Macrophage; Rats

多种肾脏疾病尽管病因、病理类型不同,最终都发展为肾小球硬化和间质纤维化,导致肾功能衰竭。研究表明,肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAS)尤其是血管紧张素 II (Ang II),不仅在血流动力学调节而且在肾硬化和纤维化中起重要作用^[1]。肾脏疾病慢性进展的特征之一是肾实质内大量单核巨噬细

胞的浸润。本实验是在前一实验证实 AT1RA 和 ACEI 均能减少肾局部 Ang II 水平的基础上,进一步研究血管紧张素受体拮抗剂(AT1RA)和血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)对单核巨噬细胞的作用及其与间质纤维化的关系。

1 材料与方法

1.1 动物模型 雄性 SD 大鼠,体重(146±33)g (北京大学医学部动物中心提供),2 次尿蛋白定性检查阴性。用嘌呤霉素(嘌呤霉素, puromycin)100mg/kg

基金项目:本课题得到 Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute 资助
作者单位:100034 北京,北京大学第一医院肾内科
作者简介:赵雅妮,女,医学博士
通讯作者:李惊子,电话:010-66171122-2562

体重给予大鼠腹腔注射,其后每隔2周给25mg/kg共5次;正常对照组($n=7$)腹腔注射等量生理盐水。选取首次给药后2周,尿蛋白 $>150\text{mg}/24\text{h}$ 的大鼠,随机分为模型组($n=6$),ACEI组($n=7$),AT1RA组($n=7$)。在首次注射噻罗霉素后2周,各组均以灌胃给药:ACEI组每天给依那普利(enalapril)10mg/kg体重;AT1RA组每天给厄贝沙坦(irbesartan)50mg/kg体重;正常组和模型组每天给自来水3ml。共给药10周。

1.2 试剂 噻罗霉素氨基核苷(Sigma公司);依那普利(佛山康宝顺药业有限公司);厄贝沙坦(施贵宝公司);第一抗体包括小鼠抗大鼠单核巨噬细胞抗体(ED1抗体, Serotec公司),小鼠抗大鼠骨桥蛋白(OPN)抗体(中山医科大学余学清教授赠),兔抗人层连蛋白(laminin, LN)抗体、兔抗人纤连蛋白(fibronectin, FN)抗体、小鼠抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA, Zymed公司),第二抗体为生物素标记马抗小鼠IgG抗体、生物素标记山羊抗兔IgG抗体(北京中山生物技术有限公司);第三抗体为辣根过氧化物酶、碱磷酶标记链

亲和素(北京中山生物技术有限公司);显色底物为二氨基联苯胺(DAB)和硝基蓝四氮唑(NBT)(北京中山生物技术有限公司)。

1.3 观察指标

1.3.1 血、尿生化指标 每周进行尿蛋白定量,采用丽春红S法;血浆尿素氮水平,采用Beckman自动生化分析仪。

1.3.2 肾组织 Ang II 的测定 肾皮质在含0.1mol/L NaCl, 0.05mol/L NaH_2PO_4 , 0.05mol/L Na_2HPO_4 , 5mmol/L 依地酸(EDTA), 5mmol/L 8-羟基喹啉的缓冲液(pH 7.4)中进行匀浆。Ang II浓度的测定采用北京北方生物技术研究所的相关放射免疫分析测定试剂盒方法测定。

1.3.3 光镜检查 切片厚 $2\mu\text{m}$, HE和Masson染色,每张切片在高倍镜下单盲观察20个肾小球,按表1中6项指标评分,计算其均值,作为该标本的肾小球损伤指数。每张标本低倍镜下单盲依序观察左上、右上、左下、右下、中间5个肾小管间质视野,按表2中8项指标评分,计算其均值,作为该标本的肾小管间质损伤指数。

表1 镜下肾小球损伤评分标准

分值	系膜细胞数量(个/每毛细血管袢)	系膜基质	毛细血管腔狭窄或基底膜断裂	肾小球硬化	细胞新月体	球囊粘连
0	1~3	无增生	无狭窄或断裂	无	无	无
1	4~6	轻度局灶节段性增生	轻度(肾小球的 $<25\%$)	轻度(肾小球的 $<25\%$)	轻度(肾小球面积的 $<25\%$)	轻度(肾小球面积的 $<25\%$)
2	7~10	中度节段或轻度弥漫增生	中度(肾小球的 $25\% \sim 50\%$)	中度(肾小球的 $25\% \sim 50\%$)	中度(肾小球面积的 $25\% \sim 50\%$)	中度(肾小球面积的 $25\% \sim 50\%$)
3	>10	广泛或弥漫中度以上增生	重度(肾小球的 $>50\%$)	重度(肾小球的 $>50\%$)	重度(肾小球面积的 $>50\%$)	重度(肾小球面积的 $>50\%$)

表2 镜下肾小管间质损伤评分标准

分值	肾小管上皮细胞空泡变性	肾小管扩张	肾小管萎缩	红细胞管型	蛋白管型	间质水肿	间质纤维化	间质细胞浸润
0	无变性	无	无	无	无	无(肾小管间无间隙)	无	无
1	轻度局灶变性	轻度(相应视野区域 $<25\%$)	轻度(相应视野区域 $<25\%$)	轻度(偶见)	轻度(偶见)	轻度(轻度弥漫或局灶小管分离)	轻度(相应视野区域 $<25\%$)	轻度(轻度局灶细胞浸润)
2	中度局灶或轻度弥漫变性	中度($25\% \sim 50\%$)	中度($25\% \sim 50\%$)	中度(相应视野内 $<10\%$ 的肾小管)	中度(相应视野内 $<10\%$ 的肾小管)	中度(轻度弥漫或局灶中度肾小管分离)	中度($25\% \sim 50\%$)	中度(轻度弥漫或局灶中度细胞浸润)
3	广泛或弥漫中度以上变性	重度($>50\%$)	重度($>50\%$)	重度(相应视野内 $>10\%$ 的肾小管)	重度(相应视野内 $>10\%$ 的肾小管)	重度(肾小管重度分离)	重度($>50\%$)	重度(重度细胞浸润)

1.3.4 天狼星红染色 切片脱蜡至水,0.1%天狼星红苦味酸室温 1h,梯度乙醇脱水,中性树脂封片。

1.4 免疫组化 4μm 石蜡切片脱蜡至水,3% H₂O₂ 甲醇封闭 10min,微波抗原修复 10min,或 4%胃酶 37℃ 消化 30min,1%小牛血清白蛋白封闭 20min,分别加入第一抗体(OPN 1:50; ED1 1:50; α-SMA 1:50; LN 1:50; FN 1:50)37℃ 孵育 60min、第二抗体(生物素化马抗小鼠 IgG 1:200; 生物素化羊抗兔 IgG 1:200) 37℃ 孵育 30min 及第三抗体(辣根过氧化物酶标记链亲和素 1:200) 37℃ 孵育 30min, DAB 显色,苏木素复染,中性树脂封片。每组均以 PBS 和正常非免疫鼠/兔血清代替第一抗体作阴性对照。

双重染色:石蜡切片按上述步骤行骨桥蛋白染色后,不经苏木素复染,再次微波抗原修复,其后步骤同上行单核巨噬细胞染色,第二抗体换用碱性磷酸酶标记的抗体,并换用 NBT 显色。

结果分析 采用单盲法:① 每个标本高倍镜依序观察 20 个视野,分别计数 ED1 染色阳性细胞数,以阳性细胞数/高倍视野表示。② 用多媒体彩色病理分析系统对 OPN, LN, FN, α-SMA,天狼星红进行半定量分析,每份标本测 15 个视野,用面积比计算该成分在肾组织中的相对含量。

1.5 统计学处理 采用 SPSS Windows 8.0 统计软件进行统计分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,相关分析采用线性回归法。

2 结果

2.1 血、尿生化和肾病理的变化 厄贝沙坦和依那普利治疗组与模型组相比均能减少尿蛋白,改善肾功能,肾小球硬化指数和小管间质损伤指数明显降低(表 3、图 1、图 2)。

2.2 单核巨噬细胞、骨桥蛋白、α-SMA、细胞外基质的改变

2.2.1 正常组肾间质内偶见单核巨噬细胞,模型组明显增多,呈灶状或弥漫分布,肾小管内及肾小球内偶见,单核巨噬细胞浸润明显的部位肾小管的损伤也较重。厄贝沙坦和依那普利治疗组单核巨噬细胞数都明显少于模型组(表 4)。

2.2.2 正常鼠肾组织的髓祥升支厚段和远曲小管、集合管及肾小球囊壁层上皮细胞有少量 OPN 的表达,模型组 OPN 在肾小管的表达明显增加,厄贝沙坦和依那普利均明显减少肾小管内 OPN 的表达,双染显示 OPN 阳性小管周围单核巨噬细胞的浸润较 OPN 阴性小管周围明显为多(表 4、图 3)。

2.2.3 正常组中除血管平滑肌外几无 α-SMA 的表达,模型组肾组织中,肾小球系膜区、肾小管间质纤维化明显处表达量显著增多,两治疗组 α-SMA 的表达明显减少(表 4)。α-SMA 在间质的分布区域与单核巨噬细胞分布区域一致。

2.2.4 模型组中 ECM 成分 LN, FN, 及胶原在肾小球系膜区及间质纤维化区聚集明显增加, 两治疗组

表 3 各组尿蛋白、尿素氮、肾局部 ANG II 和肾损伤指数比较

组别	例数	尿蛋白 (mg/24h)	尿素氮 (mmol/L)	ANG II (μg/g 蛋白)	肾小球损伤指数	肾小管间质损伤指数
正常组	7	<20	8.19 ± 0.85	40.35 ± 6.36	0.26 ± 0.05	0.50 ± 0.15
模型组	6	1208 ± 122*	31.70 ± 25.34*	76.62 ± 12.88*	6.46 ± 1.29*	11.5 ± 01.41*
ACEI 组	7	203 ± 59	9.31 ± 1.09	34.36 ± 4.89	1.16 ± 0.15	1.11 ± 0.31
ATIRA 组	7	195 ± 44	7.76 ± 1.08	43.79 ± 11.72	1.02 ± 0.14	1.89 ± 0.26

注:与两治疗组比较, * P < 0.05

表 4 各组 ED1 阳性细胞数、骨桥蛋白、间质细胞外基质、α-SMA 比较

组别	例数	ED1 阳性细胞个数/HP	骨桥蛋白 (%)	LN (%)	FN (%)	α-SMA (%)	天狼星红 (%)
正常组	7	2.0 ± 1.6	0.26 ± 0.18	1.32 ± 0.60	0.23 ± 0.04	0.00 ± 0.00	1.56 ± 0.59
模型组	6	27.1 ± 9.1*	11.50 ± 0.34*	5.21 ± 1.24*	2.90 ± 1.07*	1.54 ± 0.40*	8.21 ± 3.67*
ACEI 组	7	4.4 ± 2.1	0.44 ± 0.19	2.03 ± 0.45	0.22 ± 0.02	0.18 ± 0.07	1.18 ± 0.45
ATIRA 组	7	3.8 ± 1.8	0.57 ± 0.31	1.85 ± 0.58	0.28 ± 0.03	0.16 ± 0.07	1.14 ± 0.67

注:与两治疗组比较, * P < 0.05

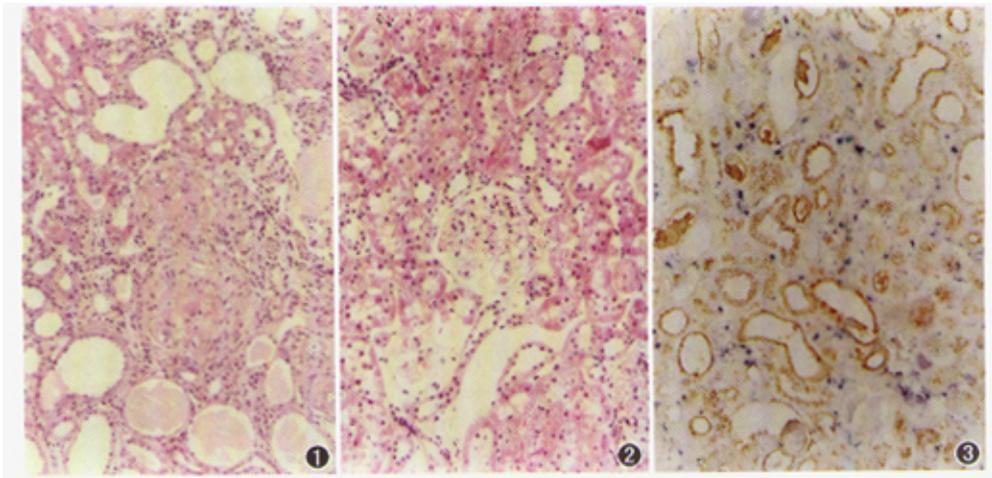


图 1 模型组肾小球硬化和肾小管扩张、萎缩,肾间质细胞浸润(HE 染色×200);图 2 厄贝沙坦治疗组相应的病理改变明显减轻(HE 染色×200);图 3 肾桥蛋白阳性的肾小管周围单核巨噬细胞(ED1 阳性)浸润(免疫组化×200)

表 5 单核巨噬细胞与 OPN, α -SMA, ECM 的相关性分析(r 值)

细胞	OPN	α -SMA	LN	FN	天狼星红
单核巨噬细胞	0.949*	0.779*	0.673*	0.748*	0.874*

注: * $P < 0.01$

明显减轻(表 4)。

2.3 肾组织 Ang II、单核巨噬细胞、骨桥蛋白、 α -SMA、细胞外基质之间的相关关系 肾组织内 Ang II 的水平与骨桥蛋白的表达具有明显的正相关关系($r = 0.730, P < 0.01$)。

肾小管骨桥蛋白的表达与间质单核巨噬细胞的数目呈正相关($r = 0.949, P < 0.01$)(表 5、图 4)。

α -SMA 在间质的表达与单核巨噬细胞数目相关($r = 0.799, P < 0.01$)。

间质单核巨噬细胞的数量与 ECM 的含量相关。

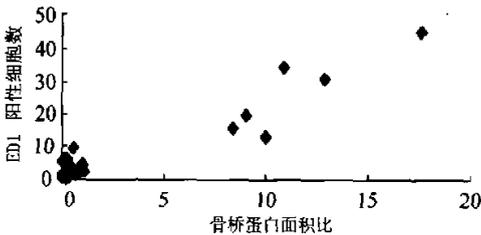


图 4 骨桥蛋白与 ED1 阳性细胞数的相关性分析

3 讨论

肾脏疾病慢性进展的防治一直是肾脏病专业研

究的热点。ACEI 对于肾脏的保护作用无论在动物模型还是在人类肾脏疾病中都得到肯定。近年来发现的 AT1RA 从受体水平上阻断 Ang II 的生物学作用。大量研究显示, AT1RA 和 ACEI 在降低血压、减少尿蛋白、改善肾小球和小管间质损伤以及保护肾功能上具有相同的效果。但 Klahr 等^[2]发现在单侧尿路梗阻模型中, 虽然它们具有相似的肾保护作用, 却只有 ACEI 能抑制单核巨噬细胞的浸润, 而 AT1RA 则不能。本研究结果显示, 在慢性噻罗霉素致肾病综合征-肾纤维化模型中 AT1RA 和 ACEI 均能抑制肾实质中单核巨噬细胞浸润, 与 Klahr 等的观察有所不同, 这是否与所采用的动物模型有关, 尚需得到更多的实验证实。在减少尿蛋白, 改善肾功能, 降低肾小球和肾小管间质损伤指数方面则与其他报道相同。这一肾脏保护作用与肾内 Ang II 水平下降一致, 而与循环 RAS 无明显关系^[3], 表明肾内 Ang II 在介导该实验动物的肾损伤中起着重要作用。

浸润的单核巨噬细胞可通过释放氧代谢产物直接造成细胞损伤, 也可通过释放炎性介质、生长因子等促进其他细胞活化和表型转化, 参与肾脏疾病进展^[4]。本研究显示, 模型组中单核巨噬细胞在间质

中大量浸润,单核巨噬细胞聚集明显的部位肾小管间质损伤也较重,而 AT1RA 和 ACEI 治疗组间质中仅可见少数的单核巨噬细胞,两治疗组间无明显的差异,表明在此模型中单核巨噬细胞参与了肾损伤,而且至少部分是由局部 Ang II 所介导的。

近年发现,骨桥蛋白是一种高度酸性磷酸化的分泌糖蛋白,对单核巨噬细胞具有趋化和粘附功能。有较多的证据表明骨桥蛋白表达的上调与局部单核巨噬细胞的聚集相关^[5]。本研究结果也发现,小管间质中单核巨噬细胞的浸润与小管骨桥蛋白的高表达有明显的相关性,凡骨桥蛋白阳性的小管周围单核巨噬细胞的浸润较阴性小管周围明显增多。更有兴趣的是肾局部 Ang II 的水平与骨桥蛋白的表达呈明显的相关性,而 AT1RA 和 ACEI 都能减少骨桥蛋白的表达,且与单核巨噬细胞浸润减少同步,提示在嘌呤霉素肾病中 Ang II 通过调节骨桥蛋白的表达介导肾间质单核巨噬细胞聚集而发挥其生物作用的。已有实验证实肾小管上皮细胞用 Ang II 刺激后骨桥蛋白 mRNA 和蛋白表达都明显增多,而且 AT1RA 可阻断此作用^[6],本结果进一步加深了此认识。虽然 Ang II 能直接影响骨桥蛋白的表达,也不除外通过其他的细胞因子如 TGF-β 上调骨桥蛋白的表达,已有实验证实 Ang II 和 TGF-β 都能刺激肾小管上皮细胞上调骨桥蛋白的表达。

单核巨噬细胞在肾内的聚集能引起肾固有细胞损伤和表型转化^[7],发现模型组肾间质内 α-SMA 的表达与单核巨噬细胞的分布区域一致,此处小管间质损伤亦明显加重^[3],提示单核巨噬细胞的浸润可能引起间质成纤维细胞和(或)肾小管上皮细胞的活化,转型为成肌纤维细胞,这是一种表达平滑肌细胞骨架蛋白 α-SMA 的细胞,它直接参与间质纤维化^[8]。本实验还显示小管间质浸润的单核巨噬细胞与间质细胞外基质成分 FN, LN, 胶原的表达明显相关,AT1RA 和 ACEI 均减少了单核巨噬细胞浸润的同时也减少了 ECM 在小管间质的聚集。目前认为,单核巨噬细胞通过分泌致硬化因子如 β 转化生长因子(TGF-β),血小板衍生生长因子(PDGF)及碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)等,作用于间质的成

纤维细胞和(或)肾小管上皮细胞,促进其增殖、活化及产生胞外基质(ECM),并可能通过直接分泌 ECM 如 FN、I 型胶原等,促进间质纤维化。

综上所述,在慢性嘌呤霉素肾病模型中,AT1RA 和 ACEI 均可减少单核巨噬细胞浸润,抑制间质成纤维细胞活化,及减少细胞外基质聚积,改善小球硬化和间质纤维化,这一效应与其抑制局部 Ang II 的产生,下调趋化因子骨桥蛋白的表达密切平行相关。

参考文献

- 1 Taal MW, Brenner BM. Renoprotective benefits of RAS inhibition: from ACEI to angiotensin II antagonists. *Kidney Int*, 2000, 57: 1803-1817.
- 2 Klahr S, Morrissey JJ. Comparative study of ACE inhibitors and angiotensin II receptor antagonists in interstitial scarring. *Kidney Int*, 1997, 63: S111-S114.
- 3 Zhou AY, Yu L, Li JZ, et al. Renal protective effects of blocking the intrarenal renin-angiotensin system: angiotensin II type I receptor antagonist compared with angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Hypertens Res*, 2000, 23: 391-397.
- 4 Erwig LP, Kluth DC, Rees AJ. Macrophages in renal inflammation. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2001, 10: 341-347.
- 5 Magil AB, Fichler RH, Johnson RJ. Osteopontin in chronic puromycin aminonucleoside nephrosis. *J Am Soc Nephrol*, 1997, 8: 1383-1390.
- 6 Cao Z, Cox A, Bonnet F. Increased osteopontin expression following renal ablation is attenuated by angiotensin type 1 receptor antagonism. *Exp Nephrol*, 2002, 10: 19-25.
- 7 Yang N, Wu LL, Nikolic-Paterson DJ, et al. Local macrophage and myofibroblast proliferation in progressive renal injury in the rat remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant*, 1998, 13: 1967-1974.
- 8 Badid C, Vincent M, Fouque D, et al. Myofibroblast: a prognostic marker and target cell in progressive renal disease. *Ren Fail*, 2001, 23: 543-549.

(收稿日期:2002-03-25)

(本文编辑 周国泰)