

大鼠阿霉素肾病肾小球细胞凋亡介导因子的表达 及 ACEI 的影响

孙良忠, 岳智慧, 陈述枚, 许韩师, 汤洁如
(中山大学附属第一医院儿科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨肾病肾小球细胞凋亡(脱噬作用)介导因子的表达及依那普利对其的影响。【方法】8~10周雄性SD大鼠72只,随机分为干预组、模型组和对照组,各24只。于实验第1天、第21天分别对干预组、模型组大鼠注射阿霉素2 mg/kg,对照组注射等量生理盐水。第2次注药后干预组大鼠的饮用水加入依那普利50 mg/L。第2次注药后4周、12周、20周、28周各组分别处死4只大鼠,取肾组织行病理检测,并用末端标记法及电镜检测肾组织细胞凋亡。用免疫组化法检测肾组织 Fas 抗原(CD95)、Bcl-2 蛋白和 II 型血管紧张素 II 受体(AT2R)表达;并计算其在肾小球中表达的阳性单位。【结果】在20周后,干预组和模型组大鼠肾小球出现硬化,肾小球细胞凋亡频率也显著增加。但干预组大鼠肾小球硬化指数(GSI)和肾小球细胞凋亡指数(GAI)均较模型组小。在20周和28周,干预组和模型组肾小球 Fas 抗原表达较对照组显著性增加,Bcl-2 蛋白表达较对照组显著性降低;28周时,干预组肾小球 Bcl-2 蛋白表达较模型组显著性增高。3组大鼠肾组织 AT2R 的表达主要在远曲小管,肾小球中未见表达。在干预组和模型组,Fas 抗原和 Bcl-2 蛋白阳性单位值与 GSI 和 GAI 相关均有显著性。【结论】大鼠阿霉素肾病肾小球硬化时,肾小球细胞凋亡可能是受 Fas 抗原介导和 Bcl-2 蛋白调控的。依那普利干预可减少 Bcl-2 蛋白表达降低的程度,这可能是干预组大鼠细胞凋亡减少的原因。

关键词:肾脏;脱噬作用;抗原,CD95;癌前基因蛋白 c-bcl-2;受体,血管紧张素

中图分类号:R692.31

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2003)04-0347-05

The Expression of Apoptotic Mediators in Glomeruli in Adriamycin-induced Nephropathy in Rats and the Effect of ACEI

SUN Liang-zhong, YUE Zhi-hui, CHEN Shu-mei, XU Han-shi, TANG Jie-ru

(Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To detect the expression of apoptotic mediators in glomeruli in adriamycin-induced nephropathy in rats and the effect of enalapril on it.【Methods】72 male SD rats aged 8~10 weeks were randomly divided into three groups: intervention group (IG), model group (MG) and control group (CG). Each group had 24 rats. Rats in IG and MG were given adriamycin (doxorubicin) 2 mg/kg intravenously on the 1st and the 21st day respectively. At the same time, an equal volume of normal saline was given to the rats in CG by the same method. After the second injection, rats in IG received enalapril (50 mg/L) in their drinking water. 4 rats in each group were killed every 8 weeks from the 4th week after the second injection. Apoptotic cells in kidney samples were detected by TUNEL method and electron microscopy. The expression of Fas antigen (CD95), Bcl-2 protein and AT2R in kidney samples were detected by immunohistochemical staining respectively. Gray values of positive staining in glomeruli were obtained by computer image analyzer and quantified as positive unit (PU).【Results】In IG and MG, glomerulosclerosis developed and the number of apoptotic cells in glomeruli increased after the 20th week. But glomerulosclerosis in IG was not so severer com-

收稿日期:2002-11-04

基金项目:中山医科大学科研启动基金资助项目(98024)

作者简介:孙良忠(1970-),男,湖南郴州人,博士研究生,讲师;许韩师,本院风湿科。

pared with that in MG at the 20th week. Glomerular cell apoptotic indexes (GAI) in IG at the 20th and 28th week were less than those in MG. The Fas antigen PUs in glomeruli were significantly increased and the Bcl-2 protein PUs in glomeruli were significantly decreased in IG and MG compared with CG at the 20th and 28th week. The Bcl-2 protein PUs in IG was significantly higher than that in MG at the 28th week. Expression of AT2R could not be detected in glomeruli. The PUs of Fas antigen and Bcl-2 protein in glomeruli in IG and MG were significantly correlated to glomerular sclerotic index(GSI) and GAI respectively. 【Conclusion】 In the process of glomerulosclerosis in adriamycin-induced nephropathy, glomerular cell apoptosis may be induced by the increased expression of Fas antigen and the decreased expression of Bcl-2 protein. Enalapril intervention can partially reverse the reduction of Bcl-2 expression in glomeruli, which may contribute to reduce apoptosis during glomerulosclerosis in IG.

Key words: kidney; apoptosis; antigens, CD95; genes, proto-oncogene proteins c-bcl-2; receptor, angiotensin

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(4): 347 ~ 351]

大多数肾小球疾病的后期,肾小球逐渐硬化,其基本的病理改变是肾小球细胞外基质增多和细胞数丧失。近来研究发现,细胞凋亡是肾小球硬化时细胞丧失的重要形式^[1, 2]。我们前期研究发现依那普利干预,可减轻阿霉素肾病大鼠肾小球硬化,同时肾小球细胞凋亡也减少,且二者显著性相关^[3]。为进一步揭示血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitors, ACEI)保护肾小球固有细胞的机理,我们在1999年12月至2000年9月观测了依那普利干预治疗阿霉素肾病大鼠后,肾小球细胞Fas抗原(CD95)、Bcl-2蛋白和Ⅱ型血管紧张素Ⅱ受体(angiotensin Ⅱ type Ⅱ receptor, AT2R)表达及其与肾小球细胞凋亡和肾小球硬化的关系。

1 材料和方法

1.1 材料和分组

8~10周雄性SD大鼠72只,随机分为3组:干预组、模型组和对照组,各24只。于实验第1天、第21天分别对干预组、模型组注射2 mg/kg阿霉素^[4],对照组注射等量生理盐水。第2次注药后干预组大鼠每天喂含依那普利50 mg/L的饮用水,模型组和对照组大鼠喂饮用水。

1.2 检测项目和方法

血、尿生化指标:第1次注药后第3天取尿测尿蛋白,之后每周测1次尿蛋白。以第2次注药后计数周数(第2次注药前1周为0周),4周、12周、20周、28周各组分别处死4只大鼠(模型组和干预

组大鼠部分在实验过程中死亡,至28周后干预组、模型组和对照组分别剩3只、2只和8只,延长观察至32周时全部处死,期间干预组再死亡1只大鼠),取血测白蛋白、尿素氮(BUN)和肌酐(Cr)。

肾组织病理检测:光镜及电镜检测肾组织病理改变,并计算每组大鼠不同时期的肾小球硬化指数(glomerular sclerotic index, GSI)^[5]。

细胞凋亡检测方法:间接免疫荧光原位末端标记法和电镜检测观察肾组织的细胞凋亡情况,并计算每组大鼠不同时期的肾小球细胞凋亡指数(glomerular cell apoptotic index, GAI)^[5]。

Fas抗原、Bcl-2蛋白和AT2R的检测:肾组织用100 g/L甲醛固定,石蜡包埋,切片4 μm,脱蜡后用SP法检测,以不加一抗的标本作为空白对照。兔抗鼠Fas和Bcl-2多抗(博士德),羊抗鼠AT2R多抗(美国Santa Cruz),SP试剂盒(北京中山)。显色封片后,用计算机图象分析仪(德国KONTRON IBAS 2.5全自动图象分析系统)进行定量分析。每个标本任取5个肾小球,测量每个小球中阳性反应产物的平均灰度 G_{α} 和面积 A_{α} ,以及该小球的平均灰度 G_A 和面积 A_A ,按公式^[5]: $PU = \frac{G_A - G_{\alpha}}{(1 - \frac{A_{\alpha}}{A_A}) \cdot G_{max}} \times 100$,分别计算每个肾小球的阳性单位(positive unit, PU), $A_{\alpha} = A_{\alpha} / A_A$ 是阳性反应产物的面积密度, G_{max} 为最大灰度分级(所用仪器为256, G_{max} 为白,0级为黑)。取5个小球阳性单位值的均数代表该标本的阳性单位值。

1.3 统计方法

以中位数和范围表示每组大鼠不同时期的GSI、GAI和阳性单位值,组间比较用方差分析、LSD

法和秩和检验,相关分析用Spearman等级相分析法^[6],数据用SPSS8.0软件处理, $P < 0.05$ 视为有显著意义。

2 结果

2.1 血、尿生化结果

模型组和干预组大鼠血白蛋白第12周后较对照组显著降低[(25.1±1.4)g/L,(25.4±1.7)g/L比(37.2±3.0)g/L, P 均<0.05];血BUN和Cr在第20周后已较对照组显著升高[BUN为(20.6±2.3)mmol/L,(19.6±2.2)mmol/L比(7.0±1.1)mmol/L,Cr为(122±19) μ mol/L,(111±23) μ mol/L比(68±16) μ mol/L, P 均<0.05]。模型组和干预组间血生化差异无显著性。第2次注药后4周,模型组和干预组大鼠24h尿蛋白排出量较对照组已显著增加[(218±37)mg,(218±29)mg比(55±17)mg, P 均<0.05]。在20周和28周时模型组大鼠24h尿蛋白排出量较干预组多,差异均有显著性[分别为:(818±114)mg比(732±73)mg,(811±104)mg比(723±75)mg, P 均<0.05]。

2.2 病理改变

对照组肾小球、肾小管和肾间质无明显改变。干预组和模型组大鼠第2次注药后4周,光镜下肾小球无明显改变,电镜可见肾小球上皮细胞足突融合。12周时,部分肾小球细胞可见空泡变性,20周时,可见肾小球系膜细胞轻至中度增生,少数小球内可见节段性硬化,28周和32周时,上述病变加重,部分小球呈全球硬化。干预组大鼠肾小球硬化较轻,20周时差异有显著性,见表1。肾小管和间质结构在4周和12周时无明显改变,仅在远曲小管偶见有蛋白管型。20周后,远曲小管蛋白管型明显增多,部分近曲小管萎缩,间质单个核细胞浸润和纤维化。干预组肾小管和肾间质改变较轻。

2.3 肾组织细胞凋亡情况

模型组和干预组4周、12周及对照组各期大鼠肾组织(肾小球、小管和间质)内仅偶见凋亡细胞。在模型组和干预组20周、28周大鼠肾组织中,凋亡细胞出现的频率显著增多,但干预组大鼠GAI较模型组少,在20周和28周时均有显著性差异,见表2。

表1 3组大鼠不同时期肾小球硬化指数

Table 1 Glomerular sclerotic index(GSI)at different weeks in 3 groups rats (M and range, n=4)

Weeks	Model group	Intervention group	Control group	χ^2_H
4	0.00(0.00,0.00)	0.00(0.00,0.00)	0.00(0.00,0.00)	0.00
12	0.00(0.00,0.00)	0.00(0.00,0.00)	0.00(0.00,0.00)	0.00
20	0.22(0.07,0.33) ¹⁾	0.10(0.07,0.10) ^{1),2)}	0.00(0.00,0.00)	8.01 ³⁾
28	0.62(0.37,0.77) ¹⁾	0.35(0.20,0.50) ¹⁾	0.00(0.00,0.00)	9.61 ³⁾
χ^2_H	14.50 ³⁾	14.50 ³⁾	0.00	

1)Compared with control group, $P < 0.05$. 2) Compared with model group, $P < 0.05$. 3)Compared between groups or between weeks, $P < 0.05$

表2 3组大鼠不同时期肾小球细胞凋亡指数

Table 2 Glomerular apoptotic index(GAI)at different weeks in 3 groups rats (M and range, n=4)

Weeks	Model group	Intervention group	Control group	χ^2_H
4	0.00(0.00,0.05)	0.00(0.00,0.05)	0.00(0.00,0.05)	0.69
12	0.00(0.00,0.10)	0.00(0.00,0.05)	0.00(0.00,0.10)	0.63
20	0.20(0.10,0.25) ¹⁾	0.05(0.00,0.10) ^{1),2)}	0.00(0.00,0.10)	7.77 ³⁾
28	0.20(0.15,0.35) ¹⁾	0.10(0.05,0.10) ^{1),2)}	0.00(0.00,0.10)	8.84 ³⁾
χ^2_H	11.93 ³⁾	11.40 ³⁾	0.71	

1)Compared with Control group, $P < 0.05$. 2) Compared with model group, $P < 0.05$. 3) Compared between groups or between weeks, $P < 0.05$

2.4 Fas 抗原、Bcl-2 蛋白和 AT2R 的表达

在干预组和模型组 4 周和 12 周以及各期的对照组, Fas 抗原在肾小球、远曲小管和集合管的表达微弱, 在近曲小管表达稍多, 各组间无明显差异。但在 20 周和 28 周, 干预组和模型组肾小球 Fas 抗原表达较对照组显著增加(图 1); 干预组 Fas 抗原表达较模型组减少, 但差异无显著性, 见表 3。干预组和模型组肾小管和间质 Fas 抗原表达可见局灶性增强, 对照组无此改变。Bcl-2 蛋白在对照组以及 4 周和 12 周时的干预组和模型组的肾小球、肾小管和肾间质中表达均较强。在 20 周和 28 周时, 干预

组和模型组肾小球 Bcl-2 蛋白的表达较对照组显著性降低(图 2)。28 周时, 干预组肾小球 Bcl-2 蛋白表达较模型组高, 差异有显著性, 见表 4。3 组大鼠肾小管和肾间质 Bcl-2 蛋白表达未见明显改变。3 组大鼠肾组织 AT2R 的表达主要在远曲小管和部分集合管, 大部分近曲小管无表达, 很少部分近曲小管有微弱表达, 肾间质有少量阳性表达, 肾小球中未见表达。同时发现 AT2R 在肾小管的基底膜侧表达密度较高。在不同组别和时间, AT2R 表达未见明显差别。

表 3 3 组大鼠不同时期肾小球 Fas 抗原的表达

Table 3 Expression of Fas antigen in glomeruli at different time in 3 groups rats (M and range of PU, $n=4$)

Weeks	Model group	Intervention group	Control group	χ^2_H
4	2.75(2.17, 3.46)	3.12(2.79, 3.48)	2.64(2.18, 3.10)	3.25
12	2.98(2.79, 3.15)	2.77(2.56, 3.18)	2.87(2.49, 3.18)	0.81
20	5.58(5.13, 6.72) ¹⁾	5.32(4.55, 6.34) ¹⁾	3.23(2.32, 3.35)	7.54 ²⁾
28	6.70(5.59, 8.15) ¹⁾	6.41(5.04, 7.38) ¹⁾	2.68(2.44, 3.31)	7.42 ²⁾
χ^2_H	11.87 ²⁾	12.00 ²⁾	2.05	

1) Compared with Control group, $P < 0.05$, 2) Compared between groups or between weeks, $P < 0.05$

表 4 3 组大鼠不同时期肾小球 Bcl-2 蛋白的表达

Table 4 Expression of Bcl-2 in glomeruli at different time in 3 groups rats (M and range of PU, $n=4$)

Weeks	Model group	Intervention group	Control group	χ^2_H
4	6.51(5.39, 9.98)	6.70(6.65, 9.24)	7.31(6.12, 8.44)	0.27
12	6.29(4.46, 6.73)	6.24(5.82, 6.74)	7.04(6.13, 8.92)	1.63
20	3.84(2.93, 5.15) ¹⁾	4.34(3.28, 5.39) ¹⁾	7.22(5.79, 8.44)	7.73 ³⁾
28	3.55(2.65, 4.09) ¹⁾	4.26(3.79, 5.19) ¹⁾²⁾	6.93(5.92, 8.15)	9.27 ³⁾
χ^2_H	11.01 ³⁾	11.85 ³⁾	0.23	

1) Compared with Control group, $P < 0.05$, 2) Compared with model group, $P < 0.05$, 3) Compared between groups or between weeks, $P < 0.05$

2.5 相关性分析

在干预组和模型组, Fas 抗原和 Bcl-2 蛋白阳性单位值与 GSI 和 GAI 均显著相关, P 均 < 0.01 。在干预组, Fas 与 GSI 的等级相关系数 $r_s = 0.870$, Fas 与 GAI $r_s = 0.637$, Bcl-2 与 GSI $r_s = -0.779$, Bcl-2 与 GAI $r_s = -0.665$, P 均 < 0.01 。在模型组 Fas 与 GSI $r_s = 0.814$, Fas 与 GAI $r_s = 0.777$, Bcl-2 与 GSI $r_s = -0.799$, Bcl-2 与 GAI $r_s = -0.690$, P 均 < 0.01 。

3 讨论

本研究在实验 20 周后, 阿霉素肾病大鼠肾小

球硬化和肾小球细胞凋亡均增加, 肾小球细胞 Fas 抗原表达增加, Bcl-2 表达降低。且 Fas 抗原和 Bcl-2 蛋白阳性单位值与肾小球细胞凋亡指数和肾小球硬化指数相关。依那普利干预可减少肾小球 Bcl-2 表达下降的程度, 减少肾小球细胞凋亡和减轻肾小球硬化。这提示阿霉素肾病肾小球硬化时, 肾小球细胞凋亡增加可能与 Fas 抗原的介导和 Bcl-2 的调控有关; 依那普利可能通过减少肾小球细胞 Bcl-2 表达下降的程度, 减少肾小球细胞凋亡, 保护肾小球固有细胞的功能, 延缓肾小球硬化。

Ying 等^[7]在研究研究高盐喂养大鼠诱发肾小球硬化时也发现, 肾小球 Fas 抗原表达增加, 但 Bcl-2 表达无增加。最近 Ding 等^[8]研究发现, 血管紧

张素Ⅱ(AngⅡ)可下调体外培养的肾小球上皮细胞Bcl-2表达,上调Fas抗原的表达,从而增加细胞凋亡。使用I型血管紧张素Ⅱ受体(AT1R)拮抗剂Losartan或AT2R拮抗剂PD123319均可部分抑制细胞凋亡,而二者联合应用则可完全阻止AngⅡ引起的细胞凋亡。这与本研究在阿霉素肾病大鼠肾小球观察到的结果是一致的;不过我们未观察到大鼠肾小球内AT2R表达。由于依那普利干预在大鼠体内可引起血压下降、抑制系膜细胞增生和系膜基质产生等一系列病理生理改变^[9, 10],因此本研究观测到依那普利干预组大鼠肾小球硬化时,肾小球细胞表达Bcl-2下降程度减轻和Fas抗原表达增加程度减少(干预组与模型组比较差异无显著性,可能与样本例数不足有关),肾小球细胞凋亡减少等。所有这些结果目前尚难以区分是依那普利阻断AngⅡ生成后直接影响肾小球细胞所致的结果,还是由于依那普利干预引起大鼠体内一系列病理生理变化后的间接作用。

(本文图1,2见封3. Fig. 1,2 shown inside back cover)

参考文献:

- [1] Sugiyama H, Kashihara N, Makino H, *et al.* Apoptosis in glomerular sclerosis[J]. *Kidney Int*, 1996, 49(1): 103.
- [2] 孙良忠,岳智慧,汤洁如,等. 细胞凋亡在阿霉素肾病大鼠肾小球硬化过程中的意义[J]. *中华儿科杂志*, 2000, 38(5): 285.
- [3] 孙良忠,岳智慧,陶瑜,等. 依那普利减轻肾小球硬化及与肾小球细胞凋亡的关系[J]. *中华儿科杂志*, 2001, 39(5): 289.
- [4] Okuda S, Oh Y, Tsuruda H, *et al.* Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease[J]. *Kidney Int*, 1986, 29(2): 502.
- [5] 申洪. 免疫组织化学染色定量方法研究(Ⅲ)[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 1995, 4(1): 89.
- [6] 方积乾,凌莉,张敏瑞. 近期医学论文中常见统计错误及其纠正[J]. *中山医科大学学报*, 1999, 20(4): 314.
- [7] Ying W Z, Wang P X, Sangers P W. Induction of apoptosis during development of hypertensive nephrosclerosis[J]. *Kidney Int*, 2000, 58(5): 2007.
- [8] Ding G, Reddy K, Kapasi A A, *et al.* Angiotensin II induces apoptosis in rat glomerular epithelial cells[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, 283(1): F173.
- [9] 张道友,叶任高,李幼姬,等. 成人原发性肾病综合征临床及实验系列研究[J]. *中山医科大学学报*, 1999, 20(2): 81.
- [10] 杨荣泽,严励,傅祖植,等. 糖尿病鼠肾脏肾素血管紧张素系统活性的改变[J]. *中山医科大学学报*, 1997, 18(2): 104.

(编辑 张恩健)

(上接第339页 from page 339)

al. Fertilization and pregnancy after assisted oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection in a case of round-headed sperm associated with deficient oocyte activation capacity[J]. *Fertil Steril*, 1997, 68(6): 1144.

[5] Sofikitis N V, Toda T, Miyagawa I, *et al.* Beneficial effects of electrical stimulation before round spermatid nuclei injections into rabbit oocytes on fertilization and subsequent embryonic development[J]. *Fertil Steril*, 1996, 65(1): 176.

[6] 舒益民,庄广伦,周灿权,等. 应用钙离子载体A23187及6-甲基嘌呤对人卵母细胞进行孤雌激活

[J]. *生殖医学杂志*, 2002, 11(3): 145.

- [7] Rhoton-Vlasak A, Lu P Y, Barud K M, *et al.* Efficacy of calcium ionophore A23187 oocyte activation for generating parthenotes for human embryo research[J]. *J Assist Reprod Genet*, 1996, 13(10): 793.
- [8] Ikeda K, Takahashi Y. Effects of maturational age of porcine oocytes on the induction of activation and development *in vitro* following somatic cell nuclear transfer[J]. *J Vet Med Sci*, 2001, 63(9): 1003.

(编辑 张恩健)

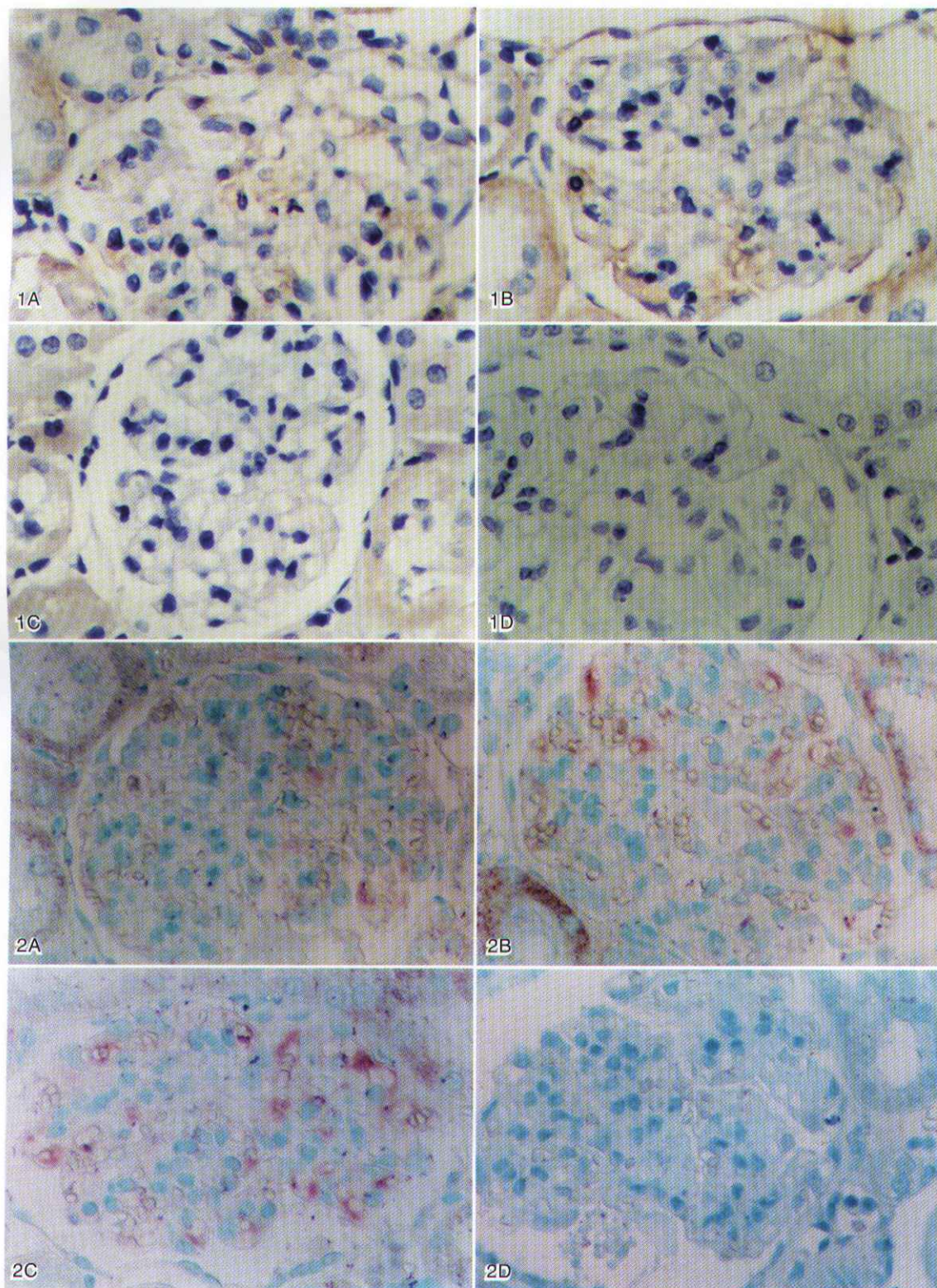


图 1 阿霉素肾病大鼠 28 周肾组织 Fas 抗原表达

图 2 阿霉素肾病大鼠 28 周肾组织 BCL-2 蛋白表达

Fig. 1 Expression of Fas antigen in glomeruli in adriamycin-induced nephropathy at 28 weeks (DAB-stained, hematoxylin-restained, $\times 100$)

1A. model group, 1B. intervention group, 1C. control group, 1D. negative control

Fig. 2 Expression of BCL-2 protein in glomeruli in adriamycin-induced nephropathy at 28 weeks (ABC-stained, hematoxylin-restained, $\times 100$)

2A. model group, 2B. intervention group, 2C. control group, 2D. negative control