

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.07.009
网络首发 https://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20200220.1529.017.html(2020-02-20)

单侧输尿管梗阻肾纤维化大鼠模型中肾组织 HGF、MBP-7、TGF-β、CTGF 的表达变化^{*}

李丽燕,陈建欧,郑旭旭
(浙江省温州市中医院病理科 325000)

[摘要] **目的** 分析单侧输尿管梗阻不同肾纤维化大鼠模型中肾组织肝细胞生长因子(HGF)、骨形态发生蛋白-7(MBP-7)、转化生长因子-β(TGF-β)、结缔组织生长因子(CTGF)的表达变化。**方法** 选取温州医科大学实验动物中心提供的健康成年雄性清洁级大鼠 64 只,按照随机数字法进行分为假手术组、模型组、中药组、西药组,每组 16 只。给予 4 组大鼠不同的治疗方案并比较治疗后大鼠肾纤维化水平,对不同大鼠模型肾纤维化水平与肾组织 HGF、MBP-7、TGF-β、CTGF 的表达水平的相关性进行比较分析。**结果** 4 组大鼠第 3、7、14 天肾脏病理改变情况、HGF 表达水平、TGF-β 表达水平、BMP-7 表达水平及 CTGF 表达水平差异有统计学意义($P<0.05$)。肾纤维化程度与 HGF、MBP-7 及 CTGF 的表达水平呈正相关,与 TGF-β 的表达水平呈负相关。**结论** 可通过 HGF、MBP-7、TGF-β 及 CTGF 的变化程度对肾纤维化程度进行判断。

[关键词] 单侧输尿管梗阻;纤维化;肺疾病;大鼠,Sprague-Dawley;模型,动物

[中图法分类号] R36 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)07-1072-06

Expression of HGF, MBP-7, TGF-β and CTGF in renal tissue of renal fibrosis rats with unilateral ureteral obstruction^{*}

LI Liyan, CHEN Jianou, ZHENG Xuxu
(Department of Pathology, Wenzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wenzhou, Zhejiang 325000, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the expression of hepatocyte growth factor (HGF), bone morphogenetic protein-7 (MBP-7), transforming growth factor-β (TGF-β) and connective tissue growth factor (CTGF) in rat models with unilateral ureteral obstruction of different renal fibrosis. **Methods** A total of 64 healthy adult male rats were selected from the Experimental Animal Center of Wenzhou University and divided into the sham operation group, the model group, the Chinese traditional medicine group and the Western medicine group, according to random number method, with 16 rats in each group. Rats of 4 groups were given different treatment regimens. And levels of renal fibrosis after treatment were compared. The correlation between the level of renal fibrosis and the expression levels of HGF, MBP-7, TGF-β and CTGF in different rat models was analyzed. **Results** At the 3rd, 7th and 14th day, pathological changes, HGF, TGF-β and CTGF expression among the 4 groups were statistically different ($P<0.05$). The degree of renal fibrosis was positively correlated with the expression levels of HGF, MBP-7 and CTGF, and negatively correlated with the expression level of TGF-β. **Conclusion** The degree of renal fibrosis can be judged by the changes of HGF, MBP-7, TGF-β and CTGF.

[Key words] unilateral ureteral obstruction; fibrosis; lung diseases; rats, Sprague-Dawley; models, animal

肾纤维化是所有肾脏疾病进展至终末期肾功能衰竭的共同病理途径,且大量动物及临床试验表明,生物机体的肾功能恶化取决于其肾小管间质损伤的程度及范围,而肾小管间质纤维化程度是反映生物机体出现肾功能异常及判断其预后情况的重要指标之一^[1-3]。随着人们生活习惯的不断改变,终末期肾功能衰竭的患者逐年增加,给患者家庭及社会带来不同程度的经济负担,肾纤维化也逐渐成为世界广受关注

^{*} 基金项目:温州市科技计划经费自筹项目(Y20160519)。 作者简介:李丽燕(1982—),主治医师,本科,主要从事病理诊断研究。

的研究热点^[4-6]。有研究表明,中医药治疗肾脏疾病具有一定疗效,其益气活血是应用较为广泛的方法之一,肾康注射液是由大黄、黄芪及丹参等中药组成治疗慢性肾衰竭的一种中药制剂,对延缓肾小球硬化具有良好治疗疗效,但对于治疗肾间质纤维化方面的研究较缺乏^[7-10]。本研究分析单侧输尿管梗阻不同肾纤维化大鼠肾组织肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor,HGF)、骨形态发生蛋白-7(bone morphogenetic protein-7,MBP-7)、转化生长因子-β(transforming growth factor,TGF-β)、结缔组织生长因子(Connective tissue growth factor,CTGF)的表达变化。

1 材料与方法

1.1 材料

选取健康成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠 64 只,平均体重质量(245±15)g,由温州医科大学实验动物中心提供;本研究方案经本院动物委员会批准,符合美国国立卫生研究院动物使用和护理指南。入组大鼠于实验开始前于本院动物饲养室内适应环境 3 d,饲养室温度不超过 25℃,湿度保持在 55%左右,12 h 亮黑循环(6:00~18:00 为照明时间),大鼠随意获取食物和水。

1.2 方法

按照随机数字法分为假手术组、模型组、中药组、西药组,每组大鼠 16 只。模型组、中药组及西药组大鼠行左侧输尿管梗阻术,假手术组大鼠仅打开腹腔并游离大鼠左侧输尿管不予结扎。中药组于大鼠术前 24 h 给予肾康注射液(国药准字 Z20040110,西安世纪盛康药业有限公司)5 g/kg 于大鼠腹腔注射,西药组大鼠采用贝那普利(国药准字 H20000292,北京诺华制药有限公司)10 mg/kg 磨细后溶于生理盐水灌胃。4 组大鼠经过 10% 水合氯醛(国药准字 H37022673,青岛宇龙海藻有限公司)30 mL/kg 麻醉后将其右侧卧位固定于手术台上,剪去毛发后对腹部皮肤进行消毒,采取左侧腹部切口,假手术组大鼠仅需切开腹腔并游离大鼠左侧输尿管,不予结扎和剪断,其他组大鼠采用 4 号线进行结扎并剪断输尿管,逐层缝合。4 组大鼠术后继续灌胃,于术后第 3、7、14 天给予断头处死,左侧部分去掉包膜的肾组织于中性福尔马林固定后包埋。

1.3 观察指标

取出左侧肾组织,以 10% 中性福尔马林固定,经脱水、包埋、切片,2 μm 厚石蜡片作 HE、MASSION 染色,同时做病理学检查,计算肾小管间质损伤指数。4 μm 厚石蜡片用于免疫组织化学染色。免疫组织化学方法主要程序:冰冻或石蜡切片→水化→血清封闭

→Ⅰ抗孵育→Ⅱ抗孵育→加底物→显色→复染→封片(具体操作参阅免疫组化试剂盒说明书)。在每张不包含肾小球及血管的肾小管间质区域选取 10 个不重叠视野(×200),采用免疫组织化学分析对阳性着色部位的总积分光密度平均值对 CTGF、HGF 及 TGF-β 进行评价;在每张不包含肾小球及血管的肾小管间质区域选取 10 个不重叠视野(×400),分开测量百分比平均值对 BMP-7 进行评价。

1.4 统计学处理

采用 SPSS20.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

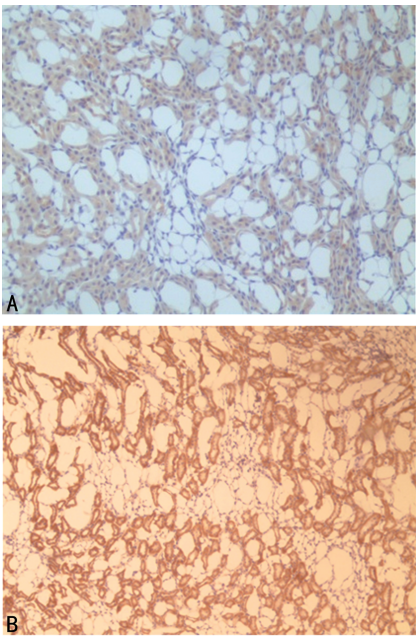
2 结果

2.1 各组大鼠术后 HGF 表达水平

假手术组术后第 3、7、14 天 HGF 表达水平明显低于模型组、中药组及西药组,差异有统计学意义($P < 0.05$);模型组术后第 3、7、14 天 HGF 表达水平明显低于中药组及西药组,差异有统计学意义($P < 0.05$);中药组与西药组术后第 3、7、14 天 HGF 表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1,图 1~3。

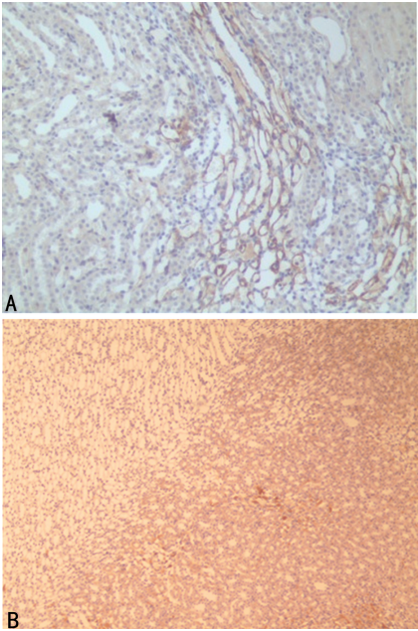
表 1 各组大鼠术后 HGF 表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天
假手术组	11.94±1.65	12.41±1.61	12.75±1.59
模型组	394.99±14.05	269.44±12.51	71.39±6.41
中药组	511.59±24.31	409.74±6.35	105.69±8.71
西药组	529.75±27.69	408.31±18.05	105.31±6.69

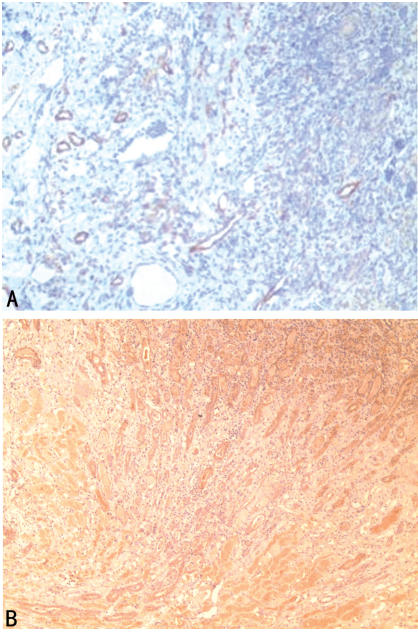


A:HE×200;B:HE×100。

图 1 模型组术后第 3 天 HGF 表达水平



A:HE×200;B:HE×100。
图 2 模型组术后第 7 天 HGF 表达水平



A:HE×200;B:HE×100。
图 3 模型组术后第 14 天 HGF 表达水平

2.2 各组大鼠术后 BMP-7 表达水平

假手术组术后第 3、7、14 天 BMP-7 表达水平明显高于模型组、中药组及西药组,差异有统计学意义($P<0.05$);模型组术后第 3、7、14 天 BMP-7 表达水平明显低于中药组及西药组,差异有统计学意义($P<0.05$);中药组与西药组术后第 3、7、14 天 BMP-7 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

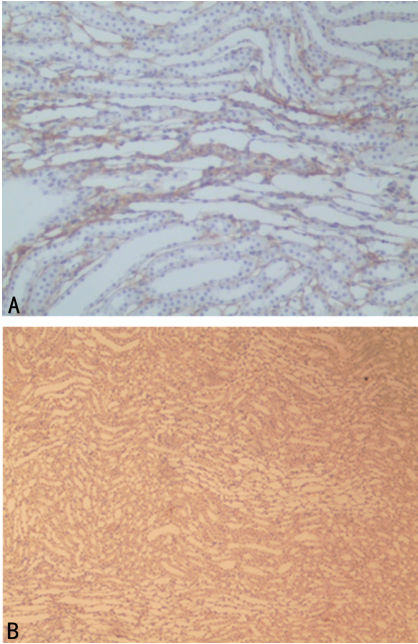
2.3 各组大鼠术后 TGF-β 表达水平

假手术组术后第 3、7、14 天 TGF-β 表达水平明显低于模型组、中药组及西药组,差异有统计学意义($P<0.05$);模型组术后第 3、7、14 天 TGF-β 表达水

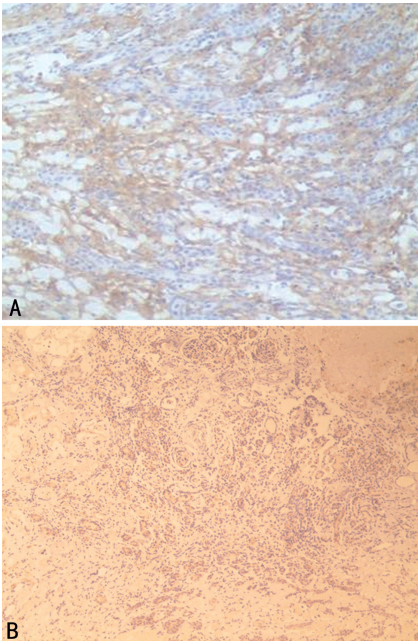
平明显高于中药组及西药组,差异有统计学意义($P<0.05$);中药组与西药组术后第 3、7、14 天 TGF-β 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3、图 4~6。

表 2 各组大鼠术后 BMP-7 表达水平($\bar{x}\pm s$)

组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天
假手术组	0.329±0.021	0.319±0.059	0.219±0.310
模型组	0.244±0.031	0.161±0.071	0.049±0.031
中药组	0.295±0.029	0.251±0.054	0.194±0.002
西药组	0.294±0.031	0.249±0.061	0.201±0.004

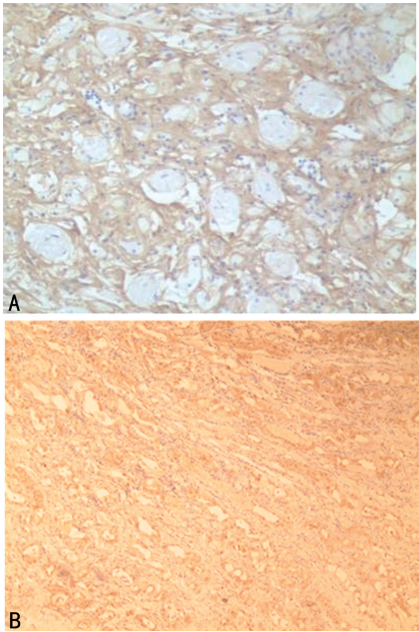


A:HE×200;B:HE×100。
图 4 模型组术后第 3 天 TGF-β 表达水平



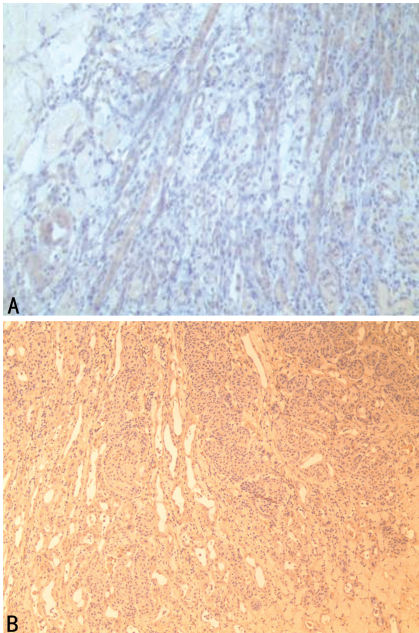
A:HE×200;B:HE×100。
图 5 模型组术后第 7 天 TGF-β 表达水平

表 3 各组大鼠 TGF-β 表达水平($\bar{x}\pm s$)			
组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天
假手术组	0.09±0.04	0.11±0.06	0.12±0.07
模型组	0.59±0.04	0.72±0.21	0.89±0.19
中药组	0.41±0.03	0.54±0.14	0.69±0.21
西药组	0.35±0.08	0.49±0.21	0.68±0.19



A:HE×200;B:HE×100。

图 6 模型组术后第 14 天 TGF-β 表达水平



A:HE×200;B:HE×100。

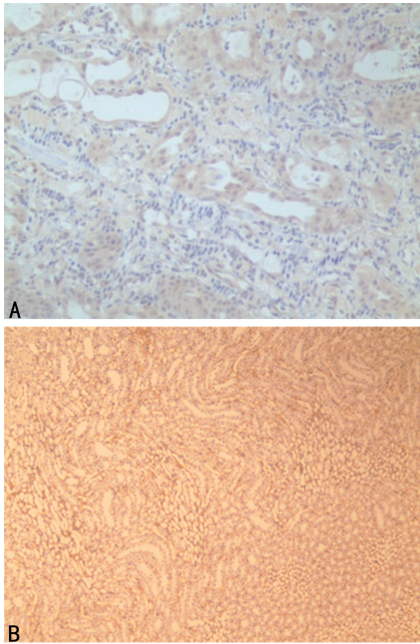
图 7 模型组术后第 3 天 CTGF 表达水平

2.4 各组大鼠术后 CTGF 表达水平

假手术组术后第 3、7、14 天 CTGF 表达水平明显低于模型组、中药组及西药组,差异有统计学意义

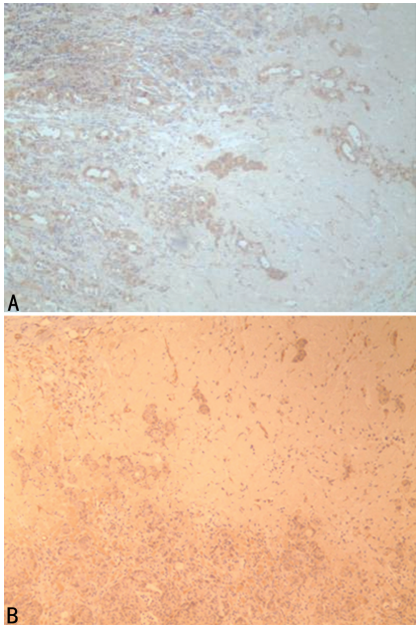
($P<0.05$);模型组术后第 3、7、14 天 CTGF 表达水平明显高于中药组及西药组,差异有统计学意义($P<0.05$);中药组与西药组术后第 3、7、14 天 CTGF 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),见表 4,图 7~9。

表 4 各组大鼠术后 CTGF 表达水平($\bar{x}\pm s$)			
组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天
假手术组	15.01±0.82	15.29±0.55	14.49±0.88
模型组	94.21±0.81	241.39±15.31	381.89±11.59
中药组	53.94±3.51	155.05±14.29	231.24±13.05
西药组	54.41±2.31	152.24±14.35	231.84±7.84



A:HE×200;B:HE×100。

图 8 模型组术后第 7 天 CTGF 表达水平



A:HE×200;B:HE×100。

图 9 模型组术后第 14 天 CTGF 表达水平

2.5 各组大鼠术后不同时间点肾脏病理改变情况

假手术组术后第 3、7、14 天肾脏病理改变明显低于模型组、中药组及西药组,差异有统计学意义($P<0.05$);模型组术后第 3、7、14 天肾脏病理改变明显高于中药组及西药组,差异有统计学意义($P<0.05$);中药组与西药组术后第 3、7、14 天肾脏病理改变差异无统计学意义($P>0.05$),见表 5。

表 5 各组大鼠术后肾脏病理改变情况($\bar{x}\pm s$)			
组别	第 3 天	第 7 天	第 14 天
假手术组	2.19±0.23	2.31±0.15	2.31±0.19
模型组	17.49±0.61	29.21±0.79	61.79±1.15
中药组	11.05±0.21	22.21±0.75	36.98±0.77
西药组	10.88±0.58	20.21±1.05	37.05±1.31

2.6 相关性分析

肾纤维化程度与 HGF、MBP-7 及 CTGF 的表达水平呈正相关,与 TGF-β 的表达水平呈负相关。

3 讨 论

肾纤维化在临床上主要表现为患者体内肾间质成纤维细胞的增生及细胞外基质的过度集聚,既往研究表明,肾纤维化与患者肾功能的相关性明显优于肾小球硬化与患者肾功能的相关性,肾纤维化是临床反映患者肾功能下降严重程度及判断患者预后的主要指标^[11-14]。单侧输尿管梗阻模型是临床上研究肾纤维化的理想模型,该模型与尿路压力升高、炎性细胞浸润及生长因子过度表达等因素具有密切关系,且能够有效避免高血脂、高血糖及高血压等多因素的干扰^[15-18]。本次研究中,梗阻后大鼠会随着模型成型时间的不断增加,其纤维化病变情况会逐渐加重,与国外研究结果一致。临床上对肾纤维化的发病机制尚不明确,但肾小管间质细胞的活化、炎症细胞浸润等因素过度表达因素在生物机体内肾纤维化中发挥着至关重要的作用^[19-20]。

HGF 是一类来源于间质细胞的生长因子,HGF 与受体相结合可能在一定程度上能够引起生物体内酪氨酸激酶活化,进而通过不同的信号通路促进细胞生长及分化,形成肿瘤或胚胎,既往研究表明,HGF 在肾脏中的表达水平明显高于体内其他器官。肾脏 HGF 表达仅来源于间质细胞,HGF 在出现急性肾损伤时,会出现表达水平增高的情况,进而促进肾功能恢复。本次研究中 HGF 表达水平的变化形态,进一步说明 HGF 的诱导性表达会在血浆中体现。TGF-β 作为现阶段已知的细胞因子中较为重要的调节因子之一,具有刺激纤维细胞的增殖、抑制胶原酶、增加金属蛋白酶抑制物合成等作用,在正常生物机体内的肾

脏仅存在微量 TGF-β;而在纤维化间质中的表达水平会明显升高,与本次研究结果变化形态相一致;在一定程度上说明原发性肾小球肾炎中 TGF-β 的表达水平与大鼠肾纤维化具有密切关系,随着肾纤维化程度的不断加重,其 TGF-β 的表达水平也会逐渐增加。CTGF 是近年发现的一种定位于新的致纤维化生长因子并在核内体降解的一种细胞因子,是属于即刻反映基因的表达产物,多广泛存在于多种组织器官中,尤其在肾脏中含量最高。CTGF 可通过促进成纤维细胞增殖、诱导细胞凋亡等方面发挥重要的作用,且生物学效应主要表现为促进有丝分裂,加强其他细胞因子的有丝分裂作用,调节其 ECM 的合成等多种作用。BMP-7 是肾脏最重要的保护因子,能够有效抑制 TGF-β 的破坏作用,通过拮抗 TGF-β 表达水平的升高,促使 BMP-7 表达水平降低。本研究显示,大鼠肾纤维化程度与 HGF、MBP-7 及 CTGF 的表达水平呈正相关,与 TGF-β 的表达水平呈负相关。

综上所述,TGF-β 与诱导单侧输尿管梗阻肾纤维化发生与发展呈负相关,临床上可通过 HGF、MBP-7、TGF-β 及 CTGF 的变化程度对肾纤维化程度进行判断。

参考文献

[1] 徐建华,肖红波,程玉花,等. 吡非尼酮对大鼠肾间质纤维化的防治作用研究[J]. 中国现代医学杂志,2017,27(19):1-6.

[2] SCHWALM S,BEYER S,FREY H,et al. Sphingosine kinase-2 deficiency ameliorates kidney fibrosis by up-regulating Smad7 in a mouse model of unilateral ureteral obstruction[J]. Am J Pathol,2017,187(11):2413.

[3] 宋菲,杨发奋. 白芍总苷对糖尿病肾病大鼠的治疗作用及对肾组织 TGF-β1、CTGF 表达的影响[J]. 山东医药,2017,57(6):35-37.

[4] WANG C H,WANG Z,LIANG L J,et al. The inhibitory effect of eplerenone on cell proliferation in the contralateral kidneys of rats with unilateral ureteral obstruction [J]. Nephron, 2017,136(4):328-338.

[5] 刘敏,谭小月,张勉之. 补肾活血中药对肾小球肾炎大鼠肾组织 TGF-β1 及 CTGF 表达影响[J]. 中国公共卫生,2017,33(3):474-478.

[6] LIU N,ZHANG Y,SU H,et al. Effects of cholecalciferol cholesterol emulsion on renal fi-

- brosis and aquaporin 2 and 4 in mice with unilateral ureteral obstruction[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 102(4): 633-638.
- [7] 刘颖, 张晓妍. 基于 TGF- β 1、CTGF 在糖尿病大鼠肾脏中的表达研究通心络对肾脏的保护作用[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2018, 36(1): 61-66.
- [8] REN Y, DU C, SHI Y, et al. The Sirt1 activator, SRT1720, attenuates renal fibrosis by inhibiting CTGF and oxidative stress[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(5): 1317.
- [9] 达静静, 查艳, 杨克魁, 等. 1, 25-二羟基维生素 D3 调控腹膜纤维化大鼠结缔组织生长因子和热休克蛋白 47 的表达[J]. *中华肾脏病杂志*, 2018, 34(7): 531.
- [10] LEITE D D S, CARVALHO P L G, LEMOS L R D, et al. Hydrometallurgical separation of copper and cobalt from lithium-ion batteries using aqueous two-phase systems[J]. *Hydrometallurgy*, 2017, 169(4): 245-252.
- [11] 金智生, 魏玉娇, 林海龙, 等. 红芪多糖对早期糖尿病肾病 db/db 小鼠肾间质纤维化的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2017, 40(8): 677-683.
- [12] SAVCI U, SUNGUR M, SAHIN M, et al. In vitro bactericidal effect of Ho: YAG laser and pneumatic lithotripsy on ureteral stones colonized with *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*[J]. *Urolithiasis*, 2019, 5(1): 1-7.
- [13] 李庆, 宋学君, 李志军. 糖尿病肾病细胞因子的研究进展[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2017, 24(1): 99-100.
- [14] ARIAANS M B P A, ROOVERS E A, CLAASSEN M A A, et al. Increased overall survival after introduction of structured bedside consultation in *Staphylococcus aureus* bacteraemia[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2018, 37(2): 1-7.
- [15] 李海剑, 程根阳, 刘栋, 等. 固醇调节元件结合蛋白-1 对血管紧张素 II 介导的肾小球纤维化的影响[J]. *广东医学*, 2017, 38(21): 3239-3242.
- [16] CHENG A, DINULOS M B P, NEUFELD-KAISER W, et al. 6q25. 1 (TAB2) microdeletion syndrome: Congenital heart defects and cardiomyopathy[J]. *Am J Med Genet Part A*, 2017, 173(7): 1848-1857.
- [17] 蔡洲, 李道, 吴际, 等. 丹酚酸 B 对肾间质纤维化大鼠的肾保护作用及其机制[J]. *山东医药*, 2017, 57(20): 34-37.
- [18] XIAO X, DU C, YAN Z, et al. Inhibition of necroptosis attenuates kidney inflammation and interstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction[J]. *Am J Nephrol*, 2017, 46(2): 131.
- [19] 赫连曼, 王浩, 赵海鹰, 等. 黄芩苷对肾性高血压大鼠血压及抑制左心室重构的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(7): 693-700.
- [20] CHEN J F, WU Q S, XIE Y X, et al. TRAP1 ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction by protecting renal tubular epithelial cell mitochondria[J]. *Faseb J*, 2017, 31(10): 4503.

(收稿日期: 2019-11-10 修回日期: 2020-02-11)