

维拉帕米阻抑 UUO 大鼠肾间质纤维化

万青松,谢红萍,杨波

(南华大学附属第一医院肾内科,湖南衡阳 421001)

摘要: **目的** 探讨维拉帕米对单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠肾间质纤维化的影响。**方法** 将24只大鼠随机分为对照组(即假手术组)、UUO模型组、维拉帕米治疗组,采用单侧输尿管梗阻模型,术后8天观察梗阻肾组织病理改变,比色法测定肾组织羟脯氨酸(HYP)、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)含量,并应用放射免疫法检测血浆和肾组织内皮素-1(ET-1)的含量。**结果** 与对照组比较,模型组肾组织HYP和MDA含量明显升高,血浆和肾组织内皮素-1含量明显升高,肾组织SOD含量显著下降($P < 0.01$),维拉帕米治疗组与模型组相比,肾组织HYP和MDA含量明显下降,血浆和肾组织内皮素-1下降,肾组织SOD含量显著升高,差异均有显著性($P < 0.05$)。**结论** 维拉帕米能减少单侧输尿管梗阻大鼠脂质过氧化物的产生,降低血浆和肾组织内皮素-1的含量,增加抗氧化酶的含量,从而阻抑UUO大鼠肾间质纤维化。

关键词: 肾间质纤维化; 氧化应激; 内皮素-1; 维拉帕米

中图分类号:R692 文献标识码:A

Anti-fibrosis Effect of Varapamil on Rat Kidney with Unilateral Ureteral Obstruction

WAN Qingsong, XIE Hongping, YANG Bo

(Department of Nephropathy, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of varapamil on kidney of rats with interstitial fibrosis after unilateral ureteral obstruction(UUO). **Methods** Twenty-four rats were randomly assigned to sham operation group(normal group), UUO group and varapamil treatment group after unilateral ureteral obstruction. Renal tissues were examined by light microscopy 8 days after operation. Hyd-roxyl puamino acid (HYP), Malondiadehyde(MDA) and superoxide dismutase(SOD) content were measured. Endothelin (ET-1) was measured by radioimmunoassay. **Results** In comparison with sham operation group, HYP and MDA content significantly increased, the level of plasmic and renal endothelin-1 significantly increased, SOD content significantly decreased($P < 0.01$). In comparison with UUO group, varapamil significantly ameliorated what had mentioned ($P < 0.05$). **Conclusions** Varapamil can suppress renal interstitial fibrosis by reducing lipid peroxidation production and reducing the level of plasmic and renal endothelin-1 and improving antioxidative enzyme contents.

Key words: renal interstitial fibrosis; oxidative stress; endothelin-1; varapamil

几乎所有慢性进行性肾脏疾病都是纤维化破坏过程的结果,由于肾间质纤维化的程度与肾功能受损的程度密切相关,单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)是研究肾间质纤维化的经典

模型^[1]。研究表明氧化应激参与肾间质纤维化的形成^[2]。维拉帕米可通过舒张血管平滑肌,改善肾脏灌注,抑制黄嘌呤脱氢酶向黄嘌呤氧化酶转化而具有抗氧化应激作用^[3],在医学研究中,维拉帕米对于顺帕诱导的肾毒性有保护作用^[4],在临床肾移植实践中,维拉帕米可拮抗免疫抑制剂的肾毒性,因此,探讨维拉帕米对肾间质纤维化的影响,对于延缓慢性肾功能衰竭的进程具有重要意义。

收稿日期:2013-12-18

基金项目:衡阳市科技局课题(2009 KJ39)。

作者简介:万青松,硕士,副主任医师,副教授,研究方向:肾纤维化, E-mail:Wanqs40@sina.com.

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组

SD 大鼠(南华大学动物实验中心提供)24 只,雌性,体重 210 ± 30 g,随机分为 3 组:对照组、模型组、维拉帕米治疗组,每组大鼠为 8 只。

1.2 主要试剂及药物

维拉帕米(也称异博定),哈药集团制药四厂生产,批号:H23020197。组织羟脯氨酸(Hydroxyl puamino acid, HYP)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)购于南京建成生物工程研究所。内皮素-1(Endothelin-1, ET-1)放射免疫测试盒购自北京北免东雅生物技术研究所。

1.3 UUO 模型建立

在无菌条件下将 24 只大鼠腹腔注射氯氨酮(50 mg/kg),背部肾区开腹后结扎左侧肾下极输尿管,缝合腹腔,即制备 UUO 模型,对照组不结扎输尿管,其余操作同上。术前 24 h、术后每日、维拉帕米组予维拉帕米(每天 0.5 mg/kg)混悬液 2 mL 灌胃,对照组、手术组予 2 mL 生理盐水灌胃。术后第 8 天,每组处死 8 只大鼠取左侧肾脏。

1.4 肾组织病理检查

肾组织纵切,一部分用于放免测 ET-1,另一部分 10% 中性甲醛固定,经梯度酒精脱水、石蜡包埋,组织切片 $4 \mu\text{m}$,作 HE、Masson 染色。

1.5 肾组织羟脯氨酸(HYP)含量测定

精确称取肾组织湿重 100 mg 放入试管中,按照试剂盒说明操作,用 721 分光光度计,在波长为 550 nm 光波下比色,测定前制备羟脯氨酸标准液及空白对照。

1.6 MDA、SOD 测定

用预冷的 0.85% 生理盐水裂解肾组织,制成 10% 和 1% 匀浆,比色法分别测定肾组织 MDA 含量及总 SOD 活性,按试剂盒说明书操作。

1.7 血浆、肾组织 ET-1 放免测定

取出活肾组织,吸去血迹称取 100 mg,尽快放入 1 mol/L 醋酸 1 mL 略做碾磨,然后在 100 °C 水浴中煮沸 10 min,匀浆。 4 °C 3000 rpm 离心 15 min,取上清液 0.5 mL, -20 °C 以下保存,测定时用 PBS 五倍稀释。取静脉血 1 mL,注入含 10% EDTA 二钠 $3 \mu\text{L}$ 和抑肽酶 $40 \mu\text{L}$ 的试管中,混匀, 4 °C 3000 rpm 离心 10 min,分离血浆,取上清液 0.5 mL, -20 °C 以下保存,测定前,使样本在室温中复融,再

次 4 °C 3000 rpm 离心 5 min,取上清 0.2 mL。用放射免疫平衡法检测上述上清液 ET-1 含量。

1.8 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计软件,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用方差分析 F 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 一般形态学改变

HE 染色和 Masson 染色结果:模型组病理片表现肾小管上皮萎缩,肾小管腔扩张,间质炎症细胞浸润,成纤维细胞增生,间质纤维化,维拉帕米治疗组也有以上表现,但炎症细胞、成纤维细胞数量较模型组少。对照组肾脏胶原染色主要位于肾小管肌膜、肾小囊、系膜区和肾小管间的毛细血管周围,肾小管间质染色较少,而模型组肾小管间质染色较对照组明显增强,维拉帕米治疗组肾小管间质染色较对照组增强,但较模型组明显降低(图 1)。

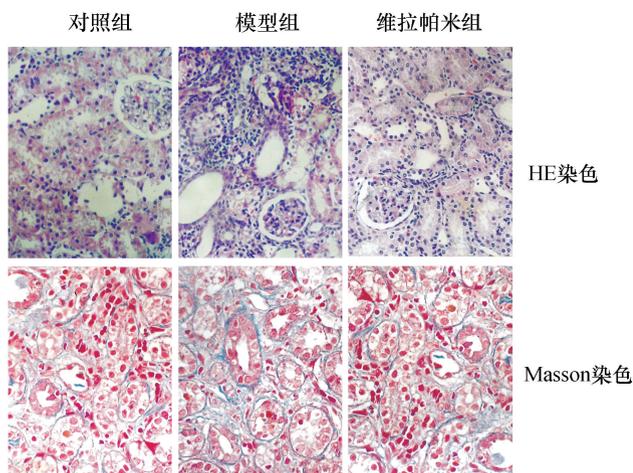


图 1 各组 HE 染色及 Masson 染色($\times 200$)

2.2 3 组羟脯氨酸、MDA 和 SOD 含量比较

与对照组大鼠肾组织 HYP 含量($0.39 \pm 0.14 \mu\text{g}/\text{mg}$)比较,模型组大鼠肾组织 HYP 含量($0.69 \pm 0.17 \mu\text{g}/\text{mg}$)显著升高($P < 0.01$),维拉帕米治疗组大鼠肾组织 HYP 含量($0.47 \pm 0.13 \mu\text{g}/\text{mg}$)较模型组明显降低($P < 0.05$)。与对照组比较,模型组肾组织 MDA 含量显著升高($P < 0.01$),而抗氧化酶 SOD 含量显著下降($P < 0.01$)。与模型组比较,维拉帕米治疗组 MDA 含量显著降

低($P < 0.05$), SOD 含量显著升高。见表 1。

表 1 各组大鼠肾组织 HYP、MDA 和 SOD 含量的变化

组别	n	HYP ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	MDA ($\text{nmol}/\text{mgprol}$)	SOD (U/mgprol)
对照组	8	0.39 \pm 0.14	1.72 \pm 0.34	291.24 \pm 45.34
模型组	8	0.69 \pm 0.17 ^a	3.56 \pm 0.23 ^a	182.35 \pm 29.42 ^a
维拉帕米组	8	0.47 \pm 0.13 ^b	2.50 \pm 0.47 ^b	221.77 \pm 39.72 ^b

与对照组比较, a: $P < 0.01$; 与模型组比较, b: $P < 0.05$

2.3 血浆和肾组织 ET-1 的检测

模型组血浆和肾组织 ET-1 的含量与对照组相比显著增高($P < 0.01$), 维拉帕米治疗组与模型组相比则显著减少($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 大鼠血浆及肾组织 ET-1 含量变化

组别	n	血浆 ET-1 (pg/mL)	肾组织 ET-1 (pg/100mg)
对照组	8	39.8 \pm 7.13	297.8 \pm 23.3
模型组	8	66.2 \pm 10.37 ^a	506.4 \pm 39.2 ^a
维拉帕米组	8	50.7 \pm 6.16 ^b	392.5 \pm 11.8 ^b

与对照组比较, a: $P < 0.01$; 与模型组比较, b: $P < 0.05$

3 讨 论

肾间质纤维化是多种慢性肾脏疾病发展的共同结局, UUO 模型是目前常用的肾小管损伤模型之一, 肾间质纤维化时, 肾组织内胶原纤维量增加, 由于 HYP 为胶原纤维所特有, 故常作为判断纤维化程度的指标^[5]。本文模型组大鼠 UUO 后 8 天梗阻肾病理呈现肾间质纤维化, HYP 含量显著高于对照组, 而维拉帕米组肾间质纤维化较模型组轻, HYP 含量显著低于模型组, 证明维拉帕米可阻抑肾间质纤维化。

目前认为, UUO 模型肾脏病理损伤与肾缺血、低氧、血管紧张素 II、转化生长因子 $\beta 1$ 、活性氧等产物诱发的损伤有关。脂质过氧化使细胞膜完整性破坏, 引发细胞周围炎症, 丙二醛 (MDA) 是在氧自由基作用下发生脂质过氧化反应的一种产物, 其本身也能破坏细胞膜的结构与功能, 对细胞具有毒性, 并能刺激间质细胞胶原基因表达 MDA 量的变化提示体内脂质过氧化, 间接反映细胞损伤的程度^[6]。超氧化物酶 (SOD) 能清除超氧化物阴离子, 可拮抗脂质过氧化, 其活力的高低可间接反映机体清除氧自

由基的能力。因此, 抑制已产生的自由基及加强抗自由基等方法可作为阻抑肾间质纤维化有效的措施。

Ca^{2+} 促进细胞损伤的主要部位在质膜、线粒体、内质网和细胞骨架系统, UU 模型大鼠, 血浆和肾组织中 ET-1 的浓度明显增高, 这与本研究一致, ET-1 与特异的 ET 受体结合后, 使肾内小动脉出现较持续的收缩反应, 还能促进胞内钙池释放 Ca^{2+} , 以及开放钙通道, 使 Ca^{2+} 大量内流, 结果造成钙超载和细胞坏死, 并使肾血流量下降和肾小球滤过率降低。维拉帕米可与细胞膜上钙通道结合, 改变其通透性而阻止细胞外 Ca^{2+} 内流, 并具有血管扩张效应而对抗 ET-1 的作用^[7], 还具有干扰自由基损害的作用, 因此可减轻肾间质的损伤。总之, 维拉帕米能够阻抑 Ca^{2+} 大量内流, 从而减少单侧输尿管梗阻大鼠脂质过氧化物的产生, 降低血浆和肾组织内皮素-1 的含量, 增加抗氧化酶的含量, 从而阻抑 UUO 大鼠肾间质纤维化。

参考文献:

- [1] 韩红, 孙东, 麻艳艳, 等. 单侧输尿管梗阻模型小鼠肾脏微血管损伤与肾间质纤维化的关系研究[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(12): 2478-2481.
- [2] 邹赞, 朱炜, 邵命海, 等. 健脾清化方对 5/6 肾切除大鼠 AT II/NADPH 氧化应激通路的干预作用[J]. 中南大学学报, 2013, 35(8): 25-30.
- [3] 林宗明, 方银忠, 张永康, 等. 维拉帕米和超氧化物歧化酶对体外冲击波肾损伤的保护作用[J]. 中华泌尿外科杂志, 2014, 24(2): 93-95.
- [4] 姜华茂, 郭敏, 张春阳, 等. 维拉帕米对 ESWL 所致肾损伤保护作用的实验研究[J]. 辽宁医学院学报, 2009, 30(5): 405-406.
- [5] 孙蔚楠, 卢钊宇, 谢院生, 等. 氯沙坦对肾间质纤维化的抑制作用[J]. 中国中西医杂志, 2012, 13(5): 383-386.
- [6] 张晓喧, 李银辉, 郑伟, 等. 单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化中氧化应激的变化[J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(4): 414-417.
- [7] Topcu SO, Celik S, Erturhan S, et al. Verapamil prevents the apoptotic and hemodynamic change in response to unilateral ureteral obstruction[J]. Int J Urol, 2008, 15(4): 350-355.

(此文编辑: 蒋湘莲)