

• 基础实验研究论著 •

SD 大鼠肾衰竭模型 BMP-7 和 TGF- β_1 表达水平分析及药物干预效应研究

解 冰, 江利萍

(镇江市中西医结合肾脏病研究所, 江苏镇江 212028)

摘要:目的 探讨慢性肾衰竭肾组织骨形成蛋白-7(BMP-7)和转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 表达水平及药物干预的作用。方法 SD 大鼠 5/6 肾切除法构建慢性肾衰竭模型, 荧光定量聚合酶链反应测定肾组织 TGF- β_1 及 BMP-7 表达, 观察各研究组肾组织 TGF- β_1 及 BMP-7 表达情况及血尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)及尿蛋白水平。结果 与对照组比较, 未处理组 TGF- β_1 水平增高、BMP-7 水平降低($P<0.05$)。洛汀新组 TGF- β_1 、BMP-7 水平低于对照组($P<0.05$), 且 BMP-7 水平低于未处理组。肾衰康组 TGF- β_1 水平低于病理组($P<0.05$), BMP-7 水平高于未处理组($P<0.05$); 洛汀新组及肾衰康组血 BUN、Cr 及尿蛋白水平均低于未处理组($P<0.05$)。结论 慢性肾衰竭肾组织 TGF- β_1 表达增强、BMP-7 表达降低; 洛汀新可抑制 TGF- β_1 表达, 但无增强 BMP-7 表达的作用; 肾衰康既能抑制 TGF- β_1 表达, 也能增强 BMP-7 表达。

关键词: 骨形成蛋白-7; 转化生长因子 β_1 ; 肾功能衰竭, 慢性; 洛汀新; 肾衰康

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.01.002

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)01-0003-03

Expression of BMP-7 and TGF-1 in renal tissues of SD rat model of renal failure and the efficacy of different drugs

Xie Bing, Jiang Liping

(Zhenjiang Institute of Intergrated Traditional and Westen Nephrology, Zhenjiang, Jiangsu 212028, China)

Abstract: Objective To evaluate the expression of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) and transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) in renal tissues of chronic renal failure and the efficacy of drug intervention. **Methods** Chronic renal failure models were established by nephrectomize 5/6 kidney of SD rats, and the expression of BMP-7 and TGF- β_1 of kidney were detected by fluorescence quantitative polymerase chain reaction, and the concentration of blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr) and urine protein of different groups were observed. **Results** The expression of TGF- β_1 was significantly increased and BMP-7 decreased in untreated group compared with control groups ($P<0.05$). The expression of TGF- β_1 was significantly decreased in Lotensin group, compared with control group ($P<0.05$), but the expression of BMP-7 was decreased, compared with control and untreated groups ($P<0.05$). The expression of TGF- β_1 was significantly decreased in Lotensin group, compared with untreated group, otherwise, the expression of BMP-7 was opposite ($P<0.05$). The concentration of BUN, Cr and urine protein were significantly decreased in Lotensin group and Shenshuai kang group, compared with untreated group ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of TGF- β_1 might be increased and BMP-7 decreased in chronic renal failure. Lotensin could inhibit the expression of TGF- β_1 , but could not enhance the expression of BMP-7. Shenshuai kang could inhibit the expression of TGF- β_1 and enhancing the expression of BMP-7.

Key words: bone morphogenetic protein-7; transforming growth factor- β_1 ; kidney failure, chronic; lotensin; shenshuai kang

转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 是公认的促纤维化因子, 在慢性肾脏病 (CKD) 的进展中起重要作用; 骨形成蛋白-7 (BMP-7) 则为纤维化的负因子, 可拮抗 TGF- β_1 的促纤维化作用, 对 CKD 有保护作用。为探讨慢性肾衰竭时肾内 TGF- β_1 、BMP-7 的变化, 本研究对 SD 大鼠 5/6 肾切除所致慢性肾衰竭的肾脏表达 BMP-7 和 TGF- β_1 的变化进行观察, 并分析中药肾衰康及洛汀新干预的作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物模型制作 SD 大鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司 (合格证: 2007000502705), 清洁级、雄性、体质量 (140 ± 10) g; 饲料购自南京协同医药有限公司。随机抽取大鼠采用 5/6 肾切除法分 2 次进行切除肾脏 (试验组)^[1]。第 1 次切除 2/3 左肾, 避免损伤肾上腺, 且不能切除肾盂, 1 周后切除右肾, 1 周后随机分为肾衰康组、洛汀新组和未处理组, 每组 10 只, 均为灌胃法摄入。另设 1 组为假手术组 (对照组), 手术暴露肾脏后即缝合伤口, 不摄入任何药物。试验结束时采集心脏血,

并取剩余部分肾脏在冰水浴中去髓质并研磨成细颗粒状置于 Trizol 中, -70 ℃ 保存。

1.2 治疗方法 肾衰康配方为红参 15 g、黄芪 50 g、丹参 40 g、当归 40 g、仙灵脾 30 g、大黄 25 g。由本院制剂室制成口服液, 相当于生药 2 g/mL。每日灌服 2 mL, 相当于人体用量 3 倍。洛汀新购自北京诺华制药有限公司 (批号: X1427), 每日 0.1 mg 溶于水灌服, 相当于人体用量 3 倍。

1.3 仪器与试剂 ABI2720 普通聚合酶链反应 (PCR) 扩增仪 (美国 Applied Biosystems); SYNGENE 全自动图像分析系统 (美国 GENE); Rotor-gene6000 荧光定量 PCR 扩增仪 (澳大利亚 Corbett); 核酸/蛋白定量仪 (德国 Ependorf); BS-200 生化分析仪 (深圳迈瑞)。Trizol、逆转录 PCR (RT-PCR) 试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒 (美国 Invitrogen); 酶法肌酐 (Cr) 检测试剂 (上海申索佑福); 酶法尿素氮 (BUN) 检测试剂 (上海荣盛); 比色法尿蛋白检测试剂 (浙江康特)。引物设计采用 Primer 软件, 并经 GeneBank Blast 进行同源检索后由上海生物工程技术

服务有限公司合成。PCR 引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

靶基因	引物序列(5'-3')	扩增产物长度(bp)	退火温度(℃)
β-actin	For: CACGAAACTACCTTCAACTCC	265	56
	Rev: CATACTCCTGCTTGCTGATC		
rat-BMP7	For: ACCTAGTGGAGCACGACAAG	338	59
	Rev: TCTCCACGGAGAGCTGTAA		
TGF-β ₁	For: GCAACAACGCAATCTATGAC	301	60
	Rev: CCCTGTATTCCGTCTCCTT		

1.4 方法

1.4.1 总 RNA 提取 取出保存的肾脏标本,冰上溶化,加入 200 μL 氯仿,剧烈振荡,12 000×g 离心 15 min。吸出上清,加入等量异丙醇,轻微混匀,12 000×g 离心 10 min,去上清,沉淀即为 RNA。加入 0.1%焦碳酸二乙酯(DEPC)稀释的 75%乙醇 500 μL 充分混匀,12 000×g 离心 5 min,去上清。在超净台中将残余乙醇充分挥发至沉淀呈半透明状时加入 30 μL 去 RNA 酶(RNase)双蒸水,并对 RNA 按 1:99 稀释,260 nm 处检测 RNA 浓度及纯度。RNA 保存于-70 ℃。

1.4.2 逆转录反应 采用 ReverAidTM 逆转录试剂盒(MBI)进行逆转录反应。反应总体积为 20 μL,包括 4 μL 5×RT 缓冲液、2 μL dNTPs(10 mmol/L)、1 μL RNase 抑制剂(10 U/μL)、1 μL Oligo(dT)(10 pmol/μL)、1 μL 逆转录酶(5 U/μL)、X μL RNA(5 μg)及(12-X) μL 去 RNase 双蒸水。反应条件为 42 ℃ 60 min,70 ℃ 5 min,4 ℃ 5 min,短暂离心后-20 ℃ 保存。

1.4.3 PCR 扩增 反应体系包括 2.5 μL 10×PCR 缓冲液、0.5 μL dNTPs(2.5 mmol/L)、0.5 μL 引物 1、2(10 pmol/μL)、0.2 μL Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)、1.0 μL cDNA 模板,双蒸水添加至 25 μL,1 000 r/min 离心 30 s。反应条件为 94 ℃ 10min;94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,35 个循环。取扩增产物 8 μL 以 1.5%琼脂糖凝胶进行电泳(110 V,30 min),溴化乙啶染色 10 min。

1.4.4 荧光定量 PCR 反应体系包括 10 μL 2×SYBGMix (ToYoBo),0.4 μL 引物 1、2(10 pmol/μL),0.1 μL Taq DNA 聚合酶,1 μL cDNA,补水至总体积 20 μL。按下列程序循环 35 次:94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,85 ℃ 收集荧光;72 ℃ 5 min,分析 72~99 ℃ 溶解曲线。数据采用 ΔΔCt 法处理。ΔCt=Ct_{靶基因}-Ct_{β-actin},ΔΔCt=ΔCt_{试验组}-ΔCt_{对照组},本研究中 ΔΔCt=-4.4,计算相对表达量的差值 2^{-ΔΔCt}=21.1。

1.5 统计学处理 生化指标检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 CS2000 13.0 软件进行统计分析;定量 PCR 表达采用 Graph-Pad. Prism. v5.0 软件进行统计分析。计量资料组间比较采用 *t* 检验,显著性检验水准为 α=0.05。

2 结 果

洛汀新和肾衰康均有降低 BUN、Cr 和尿蛋白的作用,但洛汀新组 BUN、Cr 水平较肾衰康组更低(*P*<0.05);洛汀新组尿蛋白水平与肾衰康组无统计学差异(*P*>0.05),见表 2。未处理组与对照组比较,TGF-β₁ 表达水平增高(*P*<0.05)、BMP-7 水平降低(*P*<0.05);洛汀新组 TGF-β₁ 表达水平低于对照组(*P*<0.05),且 BMP-7 水平不仅低于对照组(*P*<

0.05),亦低于未处理组(*P*<0.05)。肾衰康组 TGF-β₁ 表达水平低于未处理组(*P*<0.05),BMP-7 水平高于未处理组(*P*<0.05),见图 1~2。

表 2 各研究组生化指标检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	BUN (mmol/L)	Cr (μmol/L)	尿蛋白 (mg/24 h)
洛汀新组	10	9.31±1.63*#	65.90±9.76*#	5.95±2.48
肾衰康组	10	11.20±1.19△	78.00±4.91*△	6.92±2.89△
未处理组	10	12.32±1.50	88.50±14.60	7.77±3.54
对照组	10	9.18±1.41*	59.90±10.00*	4.13±1.15*

*:与未处理组比较,*P*<0.05;#:与肾衰康组比较,*P*<0.05;△:与对照组比较,*P*<0.05。

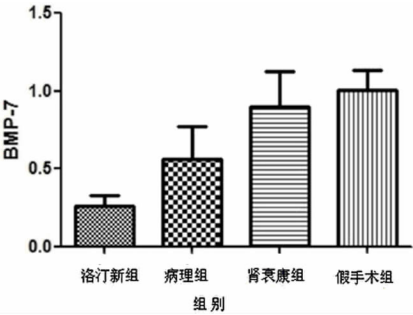


图 1 各研究组 BMP-7 水平比较

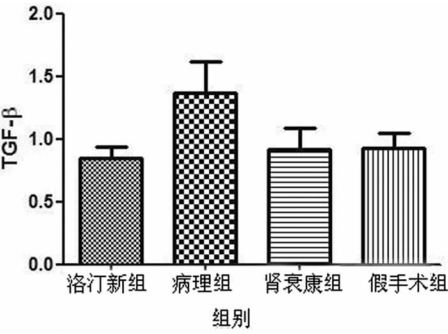


图 2 各研究组 TGF-β₁ 水平比较

3 结 论

TGF-β₁ 是具有多功能的细胞因子,在肾损伤的发展、促进肾小球硬化和肾间质纤维化中起着重要作用,不仅能直接促使细胞外基质分泌,而且能诱导纤维酶原激活物抑制物-1(PAI-1)的产生,从而抑制细胞外基质的降解,导致肾小球硬化的发

生^[2-4]。在本研究结果亦证实了该结论。洛汀新组与未处理组 TGF- β_1 表达水平差异有统计学意义($P < 0.05$),说明洛汀新有抑制肾组织表达 TGF- β_1 的作用,但洛汀新组 BMP-7 水平低于未处理组和肾衰康组($P < 0.05$),提示洛汀新不能促进 BMP-7 表达。

BMP-7 是具有肾脏保护功能的细胞因子,能降低肾小球滤过率、减轻尿蛋白、保护肾单位^[5]。BMP-7 表达减少也是 TGF- β_1 引起肾纤维化的一种重要机制^[6]。BMP-7 主要通过拮抗 TGF- β_1 而避免肾组织纤维化,发挥保护肾脏的作用。BMP-7 在肾脏发生、发育及维持正常上皮功能中发挥重要作用,肾组织 BMP-7 减少与肾小管间质纤维化的发生有关^[7-11]。本研究中未处理组肾 BMP-7 水平低于对照组($P < 0.05$),亦说明慢性肾衰竭导致 BMP-7 水平降低。肾衰康组 BMP-7 水平虽低于对照组,但明显高于未处理组及洛汀新组,提示肾衰康可促进 BMP-7 表达。本研究结果显示洛汀新及肾衰康均可降低肾衰竭模型小鼠 BUN、Cr 及尿蛋白水平,但洛汀新作用比肾衰康稍强,然而洛汀新仅可抑制 TGF- β_1 表达,而肾衰康则不仅可抑制 TGF- β_1 表达,更可促进 BMP-7 表达。笔者既往研究已证实肾衰康具有抗纤维化作用^[12]。本次研究进一步证实肾衰康抗纤维化作用的机制与其抑制肾组织表达 TGF- β_1 和增强 BMP-7 表达有关。

致谢:本研究中的 PCR 系列操作由江苏大学钱晖教授协助完成,特此致谢!

参考文献

- [1] 陈孝文,吴东,刘华锋.慢性肾衰竭[M].北京:中国中医药科技出版社,2006:160-162.
- [2] Sato F, Narita I, Goto S, et al. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphism modifies the histological and clinical manifes-

tations in Japanese patients with IgA nephropathy[J]. Tissue Antigens, 2001, 64(1):35-40.

- [3] 陈香美,李岩,李文歌,等.血管紧张素转化酶抑制剂减轻肾小球硬化机制的探讨[J].中华肾脏病杂志,1998,14(3):139-142.
- [4] 张翥,苏克亮,黄颂敏,等.肾小管间质纤维化的发生机理[J].国外医学泌尿系统分册,2005,25(3):419-422.
- [5] Wang S, Chen Q, Simon TC, et al. Bone morphogenic protein-7 (BMP-7) a novel therapy for diabetic nephropathy[J]. Kidney Int, 2003, 63(6):2037-2049.
- [6] Wang SN, Lapage J, Hirschberg R. Loss of tubular bone morphogenetic protein-7 in diatic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2001, 12(11):2392-2399.
- [7] 杨林,段惠军.骨形成蛋白-7 在肾纤维化中的作用[J].河北医科大学学报,2006,27(3):225-227.
- [8] Brabcova I, Tesar V, Honsova E, et al. Association of advanced vasculopathy and transforming growth factor-beta1 gene expression with immunoglobulin A nephropathy progression[J]. Nephrol Dial Transplant, 2011, 26(2):573-579.
- [9] Boor P, Floege J. Chronic kidney disease growth factors in renal fibrosis[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2011, 38(7):441-450.
- [10] Tossidou I, Schiffer M. TGF- β /BMP pathways and the podocyte[J]. Semin Nephrol, 2012, 32(4):368-376.
- [11] Veerasamy M, Nguyen TQ, Motazed R, et al. Differential regulation of E-cadherin and alpha-smooth muscle actin by BMP 7 in human renal proximal tubule epithelial cells and its implication in renal fibrosis[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 297(5):1238-1248.
- [12] 朱辟疆,韦先进,周逊,等.肾衰康抗肾间质纤维化的实验研究[J].中国中西医结合急救杂志,2003,10(6):344-349.

(收稿日期:2012-07-18)

(上接第 2 页)

- [6] Brussee V, Guo G, Dong Y, et al. Distal degenerative sensory neuropathy in a long-term type 2 diabetes rat model[J]. Diabetes, 2008, 57(6):1664-1673.
- [7] Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening[J]. Pharmacol Res, 2005, 52(4):313-320.
- [8] 杨红英,王娴默,王卓,等.2 型糖尿病鼠脑梗死模型的建立及相关指标分析[J].临床神经电生理学杂志,2009,18(5):270-274.
- [9] 南征,高彦彬,钱秋海,等.糖尿病中西医结合治疗[M].北京:人民卫生出版社,2002:1-7.
- [10] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. N Engl J Med, 2010, 362(12):1090-1101.
- [11] 田婷,马向华,沈捷.2 型糖尿病动物模型研究概况[J].医学综述,2011,17(6):905-908.
- [12] 刘德慧,翔翔飞.2 型糖尿病大鼠模型的特点及评价[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(12):212-214.
- [13] 李娟娥,王磊,秦灵灵,等.自发性 2 型糖尿病啮齿类动物模型研究概况[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(6):267-271.
- [14] 高秀娟,马会霞,江春花.2 型糖尿病动物模型研究概况[J].华北

煤炭医学院学报,2009,11(6):783-785.

- [15] 李娜,曲卉,曹宇立,等.Ⅱ型糖尿病动物模型的研究进展[J].实验动物与比较医学,2009,29(1):66-70.
- [16] 孙晓芳,赵长勇,陈晖,等.高糖高脂饮食加链脲佐菌素建立实验性大鼠 2 型糖尿病模型[J].南京医科大学学报,2009,29(6):797-806.
- [17] 燕娟,郭巍伟,梁执群,等.2 型糖尿病大鼠模型的建立及其验证[J].临床和实验医学杂志,2009,8(4):5-6.
- [18] 魏泓.医学实验动物学[M].成都:四川科学技术出版社,1998:348-349.
- [19] 刘科宇,王春华.链脲佐菌素致大鼠高血糖模型的实验研究[J].哈尔滨医科大学学报,2006,40(4):272-274.
- [20] Wu Z, Mata M, Fink DJ. Prevention of diabetic neuropathy by regulatable expression of HSV-mediated erythropoietin[J]. Mol Ther, 2011, 19(2):310-317.
- [21] Himeno T, Kamiya H, Naruse K, et al. Beneficial effects of exendin-4 on experimental polyneuropathy in diabetic mice[J]. Diabetes, 2011, 61(9):2397-2406.
- [22] 廖永锋,朋立超.糖尿病病性周围神经病变大鼠脊髓小胶质细胞 Toll 样受体 3 的变化[J].中国临床医学,2011,18(3):284-286.

(收稿日期:2012-07-28)