

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.10.020

论著·实验研究

硫化氢在单侧输尿管梗阻大鼠肾小管间质纤维化中的水平变化及其干预影响

赵德安¹ 刘君² 黄倩^{1,3} 韩子明¹

(1. 新乡医学院第一附属医院儿内科, 河南 卫辉 453100;
2. 成都市妇女儿童中心医院肾内科, 四川 成都 610091;
3. 新乡医学院第三附属医院儿科, 河南 新乡 453003)

【摘要】 目的 本研究通过构建单侧输尿管梗阻(UUO)诱导肾小管间质纤维化(TIF)大鼠模型,观察硫化氢(H_2S)在血浆中的水平变化及两种关键合成酶胱硫醚 β -合酶(CBS)、胱硫醚 γ -裂解酶(CSE)在梗阻肾中的表达,并探讨 H_2S 在TIF中的作用。**方法** 构建UUO致TIF大鼠模型,96只Sprague Dawley大鼠随机分为假手术组、模型组、NaHS低剂量治疗组(低剂量组)和NaHS高剂量治疗组(高剂量组),每组24只。治疗组分别于术后立即腹腔注射NaHS 1.4 $\mu\text{mol/kg}$ 和7 $\mu\text{mol/kg}$,每日两次;假手术组和模型组同时腹腔注射等量生理盐水。各组分别于术后7 d、14 d及21 d随机处死8只大鼠,采用去蛋白法测定血浆 H_2S 含量;梗阻肾组织行苏木精-伊红及Masson染色,观察肾脏病理学变化;免疫组化方法检测梗阻肾组织CBS、CSE蛋白表达;RT-PCR法检测梗阻肾组织CBS mRNA、CSE mRNA的表达。**结果** UUO大鼠肾小管间质损伤程度与血浆 H_2S 浓度呈负相关($r=-0.891$, $P<0.01$);外源性给予NaHS能显著减轻肾小管间质损伤($P<0.01$),上调肾组织CBS、CSE蛋白及其mRNA的表达和血浆 H_2S 水平($P<0.01$),肾小管间质纤维化程度明显减轻($P<0.01$);低、高NaHS剂量组间血浆 H_2S 水平、CBS、CSE蛋白及其mRNA表达比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** H_2S 参与UUO致肾小管间质纤维化的发展过程,而且CBS/ H_2S 体系和CSE/ H_2S 体系在TIF中发挥关键作用。外源性补充NaHS可以延缓TIF的进展。**【中国当代儿科杂志, 2013, 15(10): 903-908】**

【关键词】 输尿管梗阻;肾小管间质纤维化;硫化氢;胱硫醚 β -合酶;胱硫醚 γ -裂解酶;大鼠

Change in plasma H_2S level and therapeutic effect of H_2S supplementation in tubulointerstitial fibrosis among rats with unilateral ureteral obstruction

ZHAO De-An, LIU Jun, HUANG Qian, HAN Zi-Ming. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui Henan 453100, China (Email: deanzh713@126.com)

Abstract: Objective To observe the level in plasma hydrogen sulfide (H_2S) and the expression of cystathionine beta-synthase (CBS) and cystathionine gamma-lyase (CSE) (two key synthetases for endogenous H_2S generation in the kidney) in obstructed kidney tissue among rats with tubulointerstitial fibrosis (TIF) induced by unilateral ureteral obstruction (UUO), and to explore the role of H_2S in TIF. **Methods** Ninety-six male Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham-operated, model, low-dose NaHS and high-dose NaHS groups ($n=24$ each). TIF was induced by UUO in the model, low-dose NaHS and high-dose NaHS groups. The low-dose and high-dose NaHS groups were intraperitoneally injected with NaHS (1.4 and 7.0 $\mu\text{mol/kg}$ respectively) twice daily immediately after operation, and the sham-operated and model groups were intraperitoneally injected with an identical volume of normal saline. In each group, 8 rats were randomly selected and sacrificed at 7, 14 or 21 days after operation. Plasma H_2S concentration was measured by deproteinization. The obstructed kidney tissue was subjected to hematoxylin and eosin staining and Masson staining, and the renal tubulointerstitial injury was evaluated under a microscope. mRNA and protein expression of CBS and CSE in the obstructed kidney tissue was measured by RT-PCR and immunohistochemistry respectively. **Results** The degree of UUO-induced renal tubulointerstitial injury was negatively correlated with plasma H_2S concentration

[收稿日期] 2013-03-17; [修回日期] 2013-05-12

[基金项目] 新乡医学院第七批省级重点学科开放课题 (No.ZD2009-12)。

[作者简介] 赵德安,男,硕士,副教授,副主任医师。

in ($r=-0.891$, $P<0.01$). With H_2S supplementation, renal tubulointerstitial injury was reduced ($P<0.01$), the expression of mRNA and protein of CBS and CSE in the kidney tissue and plasma H_2S level were upregulated ($P<0.01$), and the degree of TIF was reduced ($P<0.01$). There were no significant differences in plasma H_2S level and mRNA and protein expression of CBS and CSE between the low-dose and high-dose NaHS groups ($P>0.05$). **Conclusions** H_2S is involved in the development of UUO-induced TIF, and the CBS/ H_2S and CSE/ H_2S systems play key roles in this process. H_2S supplementation can delay the progression of TIF.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(10): 903-908]

Key words: Ureteral obstruction; Tubulointerstitial fibrosis; Hydrogen sulfide; Cystathionine beta-synthase; Cystathionine gamma-lyase; Rat

内源性硫化氢 (hydrogen sulfide, H_2S) 是继 NO 和 CO 之后在哺乳动物细胞中发现的第三种气体生物活性物质。既往研究证实 H_2S 在调节心血管功能方面起重要作用。外源性和内源性 H_2S 诱导血管平滑肌松弛和降低血压, 而抑制内源性 H_2S 合成可以诱导高血压发生。大量证据表明 H_2S 参与大脑、心脏、肺脏、肝脏、肠道、胰腺和阴茎海绵体等组织器官的病理生理过程。哺乳动物细胞 H_2S 主要通过胱硫醚- β -合酶 (cystathionine beta-synthase, CBS) 及胱硫醚- γ -裂解酶 (cystathionine gamma-lyase, CSE) 由 L-半胱氨酸 (L-cysteine, L-Cys) 合成。内源性 H_2S 合成酶具有组织特异性, CBS 在神经系统表达明显, CSE 在心血管系统含量较为丰富。已有证据显示肾脏组织表达 CBS 和 CSE, 且主要集中在近端小管^[1-2]。然而, 内源性 H_2S 在肾小管间质纤维化 (tubulointerstitial fibrosis, TIF) 中的合成及其作用仍不甚清楚。

李虹等^[3]利用博来霉素诱导肺纤维化大鼠模型发现内源性 CSE/ H_2S 体系参与了大鼠肺纤维化的病理生理过程, 外源性补充 H_2S 可能通过减轻氧化应激抑制肺纤维化的发生; 张宁等^[4]研究发现大鼠肝纤维化早、中、晚期门静脉血和下腔静脉血中 H_2S 的含量均明显下降, 且随着肝纤维化进程的发展, H_2S 浓度逐渐降低。体外肝星状细胞培养实验显示 H_2S 对该细胞具有保护作用, 可抑制肝纤维化的发生发展^[5]。肾脏纤维化与肺脏、肝脏纤维化发病机制基本相同, 由此推测 H_2S 亦有可能参与肾脏纤维化的发生与发展。本研究拟通过建立单侧输尿管梗阻 (unilateral ureteral obstruction, UUO) 大鼠模型观察 H_2S 的血浆水平变化以及 H_2S 合成的关键酶 CBS 和 CSE 在梗阻肾组织中的表达; 外源性补充 H_2S 供体硫氢化钠 (NaHS), 探讨 H_2S 对 TIF 的影响及其可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

健康 13 周龄雄性清洁 Sprague-Dawley (SD)

大鼠 96 只, 体重 200~250 g, 由新乡医学院实验动物中心提供。NaHS 购自丹麦 NOVO 公司, 兔抗大鼠 CBS、CSE 多克隆抗体以及 SABC 免疫组化染色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司, IDA-2000 高清晰度数码显微图象分析系统购自北京空海科技有限公司, Trizol 试剂和 Tab DNA 聚合酶购自美国 Invitrogen 公司, M-MLV 逆转录酶购自上海生物工程公司, PCR 引物由上海生物工程公司合成, 紫外分光光度计 (TU-1800) 购自北京谱析通用仪器公司, 琼脂糖凝胶电泳图像分析系统购自 SYNGENE 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型及实验分组 健康 13 周龄雄性 SD 大鼠 96 只, 适应环境 1 周后随机分为假手术组、模型组、NaHS 低剂量治疗组 (低剂量组)、NaHS 高剂量治疗组 (高剂量组), 每组 24 只。按参考文献^[6], 模型组和治疗组大鼠 UUO 手术均于无菌条件下行左侧输尿管结扎并剪断, 假手术组只游离输尿管而不进行结扎。低、高剂量组分别于术后立即腹腔注射 NaHS 1.4 $\mu\text{mol/kg}$ (0.2 $\mu\text{mol/mL}$) 和 7 $\mu\text{mol/kg}$ (1 $\mu\text{mol/mL}$), 每日 2 次直至实验终点; 同时假手术组及模型组分别腹腔注射等量生理盐水。分别于手术后第 7、14 及 21 天每组随机处死 8 只大鼠, 取左肾静脉血约 2 mL, 采用去蛋白法测血浆 H_2S 含量; 留取肾脏标本, 用于苏木精-伊红 (HE)、Masson、免疫组化染色及逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)。

1.2.2 肾组织标本制备及病理评价 取肾组织置于 10% 多聚甲醛中固定 24 h, 常规梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡、石蜡包埋, 4 μm 切片, 行 HE 常规染色和 Masson 染色。每一时间点每只大鼠取 8 张切片, 每张切片选取 10 个互不重叠的肾小管间质视野, 根据每个视野肾小管间质病变评分取其平均数。具体评价参数: 肾小管的扩张和蛋白管型、肾间质纤维化程度、肾间质炎症细胞的浸润。评价标准: 每个参数为 0~3 分 (0=正常, 病变范围为 0; 1=轻度受损, 病变范围 <15%; 2=中度受损, 病变范围 $\geq 15\%$ 且 <50%; 3=重度受损,

病变范围 $\geq 50\%$), 每张组织切片肾小管间质病变的评分为0~9分。Masson染色下IDA-2000高清晰度数码图像分析系统计算TIF相对面积。具体为每一时间点每只大鼠取8张切片, 每张切片随机选取10个不重叠视野, 去除肾小管管腔后肾间质面积作为肾间质总面积, 测定TIF面积与同视野肾小管间质总面积的百分比, 取其平均值作为TIF相对面积^[7]。

1.2.3 免疫组化染色 SABC法检测肾组织中的CBS和CSE蛋白表达, 严格按照SABC试剂盒说明书进行操作, 光镜下染色呈棕黄色颗粒性沉积区域为阳性染色部位。光镜($\times 400$)下, 每一时间点每只大鼠取8张切片, 每张切片随机选择10个肾小管间质不重复视野, 图像采集采用IDA-2000高清晰度数码显微图像分析系统, 通过灰度变换使阳性染色部分与背景部分分开, 计算出每个视野中阳性染色部分的面积占肾小管间质总面积(不包含肾小管管腔面积)的比值, 用其平均值来反映该张切片中所测指标在肾小管间质的阳性表达情况^[8]。

1.2.4 血浆H₂S含量测定 用去蛋白法检测血浆H₂S含量^[9]: 试管中依次加入0.5 mL 1%醋酸锌和0.1 mL血浆标本, 振荡混匀, 使血浆中硫离子与醋酸锌充分反应形成硫化锌沉淀, 然后加入0.5 mL对苯二胺盐酸盐(20 mmol/L)和0.5 mL三氯化铁(30 mmol/L), 室温孵育20 min。再加入1 mL 10%三氯醋酸, 最后加入2.5 mL蒸馏水使体积至5 mL。离心5 min(6000 r/min), 吸取上清液, 分光光度计在波长670 nm处检测上清液的吸光度(A)值。配制NaHS作出标准曲线, 根据标准曲线计算血浆H₂S的含量。

1.2.5 RT-PCR检测肾组织中CBS和CSE mRNA含量 应用Trizol试剂常规一步法提取肾组织标本总mRNA, 按逆转录试剂盒说明进行。CBS引物序列: 上游: 5'-GATCGAGCCGGAACCTTGAAGC-3', 下游: 5'-CACCTATCCACCACCGCCCTGTC-3', 片段长度579 bp; CSE引物序列: 上游: 5'-CATGGATGAAGTGTATGGAGGC-3', 下游: 5'-CGGCAGCAGAGTAACAATCG-3', 片段长度445 bp; β -actin引物序列: 上游: 5'-CTTTTGTGCCTTGATAGTTC-3', 下游: 5'-GAGTCCTTCTGACCCATAC-3', 片段长度265 bp。反应条件: 95℃预变性2 min, 95℃变性30 s, 50℃(CBS)或55℃(CSE)退火30 s, 72℃延伸30 s, 共30个循环; 最后72℃再延伸10 min。PCR产物10 μ L在2%琼脂糖凝胶上电泳, RT-PCR图像采集及分析采用琼脂糖凝胶电泳图像分析系

统(SYNGENE公司), CBS与CSE扩增条带吸光面积的积分比值作为所测各指标mRNA的相对表达水平。

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件对数据进行统计学分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较用LSD-*t*检验法。CBS、CSE蛋白表达与肾间质损伤、肾间质相对面积之间的相关性判断, 应用Pearson相关分析法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾脏组织病理变化

模型组术后第7天肾小管的上皮细胞胞浆疏松、肿胀、空泡变性、间质水肿, 部分肾小管轻度扩张、间质稍增宽, 肾间质可见少量炎性细胞浸润, 间质区域增宽, 皮质区及皮髓交界区轻度纤维化; 第14天可见肾小管上皮细胞肿胀及空泡变性明显, 肾小管扩张, 部分肾小管因破坏严重而消失, 肾间质炎性细胞浸润增多及间质增宽, 皮质区及皮髓交界区纤维化程度加重; 第21天可见肾小管上皮细胞空泡变性进一步加重, 炎细胞浸润较前减少, 大部分小管上皮细胞萎缩、脱落坏死、消失, 残余的肾小管进一步扩张, 肾小管间质纤维化程度明显。假手术组大鼠肾组织各个时间点未见明显改变。治疗组各时间点与模型组大鼠相比, 肾小管扩张、萎缩改善明显, 肾间质炎性细胞浸润减轻, 肾小管间质损伤面积减少, 肾小管间质损伤评分及TIF相对面积均明显下降, 但仍高于假手术组($P < 0.01$)。高低剂量组之间上述两种指标比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1~2, 图1。

2.2 肾小管间质CBS和CSE蛋白的表达

假手术组大鼠各时间点均表达CBS、CSE于肾小管上皮细胞。模型组和治疗组大鼠各时间点肾小管上皮细胞CBS、CSE表达均较假手术组下降($P < 0.01$), 且随梗阻时间的延长, 肾小管损伤范围的扩大和肾间质纤维化的加重, 二者表达量呈明显减少趋势。与模型组比较, 治疗组大鼠梗阻肾CBS和CSE表达部位基本一致, 但强度增强、区域扩大, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 而高低剂量治疗组间CBS、CSE表达无明显差别, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表3~4, 图2~3。

表 1 各组大鼠肾间质损伤评分 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	7 d	14 d	21 d
假手术组	8	0.50 ± 0.04	0.53 ± 0.03	0.54 ± 0.03
模型组	8	3.69 ± 0.70 ^a	4.94 ± 1.02 ^{a,c}	6.13 ± 1.19 ^{a,c}
低剂量组	8	3.06 ± 1.27 ^{a,b}	3.94 ± 0.90 ^{a,b,c}	4.94 ± 1.27 ^{a,b,c}
高剂量组	8	2.19 ± 0.53 ^{a,b}	3.31 ± 0.70 ^{a,b,c}	4.81 ± 1.07 ^{a,b,c}
F 值		25.739	48.815	46.122
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

a: 与同一时间点假手术组比较, $P<0.01$; b: 与同一时间点模型组比较, $P<0.01$; c: 与同组 7 d 时比较, $P<0.01$

表 3 各组大鼠不同时间点 CBS 相对表达面积

(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	7 d	14 d	21 d
假手术组	8	84.1 ± 0.7	83.7 ± 1.6	81.3 ± 1.6
模型组	8	58.6 ± 0.7 ^a	31.7 ± 1.1 ^{a,c}	24.0 ± 1.4 ^{a,c}
低剂量组	8	63.6 ± 0.5 ^{a,b}	41.2 ± 1.9 ^{a,b,c}	33.4 ± 1.4 ^{a,b,c}
高剂量组	8	67.4 ± 0.5 ^{a,b}	46.0 ± 1.5 ^{a,b,c}	35.5 ± 1.9 ^{a,b,c}
F 值		2611.41	1719.14	2083.78
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

a: 与同一时间点假手术组比较, $P<0.01$; b: 与同一时间点模型组比较, $P<0.01$; c: 与同组 7 d 时比较, $P<0.01$

表 2 各组大鼠肾间质纤维化相对面积 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	7 d	14 d	21 d
假手术组	8	1.05 ± 0.18	1.07 ± 0.15	1.13 ± 0.11
模型组	8	14.82 ± 2.00 ^a	34.61 ± 1.80 ^{a,c}	63.65 ± 2.75 ^{a,c}
低剂量组	8	10.65 ± 1.72 ^{a,b}	20.89 ± 1.49 ^{a,b,c}	45.19 ± 1.79 ^{a,b,c}
高剂量组	8	8.77 ± 1.08 ^{a,b}	18.74 ± 1.59 ^{a,b,c}	39.17 ± 2.04 ^{a,b,c}
F 值		130.38	757.40	1479.97
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

a: 与同一时间点假手术组比较, $P<0.01$; b: 与同一时间点模型组比较, $P<0.01$; c: 与同组 7 d 时比较, $P<0.01$

表 4 各组大鼠不同时间点 CSE 相对表达面积

(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	7 d	14 d	21 d
假手术组	8	85.3 ± 2.1	83.5 ± 1.7	82.3 ± 1.3
模型组	8	62.1 ± 1.5 ^a	34.9 ± 2.1 ^{a,c}	21.3 ± 1.7 ^{a,c}
低剂量组	8	66.7 ± 1.2 ^{a,b}	41.8 ± 1.9 ^{a,b,c}	39.9 ± 1.8 ^{a,b,c}
高剂量组	8	72.2 ± 1.6 ^{a,b}	47.9 ± 1.1 ^{a,b,c}	44.9 ± 1.5 ^{a,b,c}
F 值		299.572	1265.178	2127.866
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

a: 与同一时间点假手术组比较, $P<0.01$; b: 与同一时间点模型组比较, $P<0.01$; c: 与同组 7 d 时比较, $P<0.01$

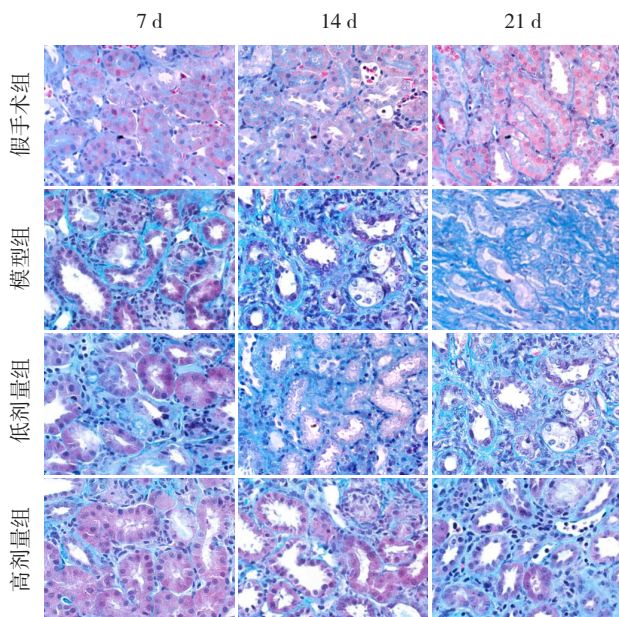


图 1 各组肾小管间质病理改变 (Masson 染色, $\times 400$)

随着输尿管梗阻时间延长, 肾小管损伤和间质纤维化逐渐加重, 低、高剂量组肾小管间质病变较模型组减轻, 两种剂量 NaHS 干预效果比较无明显差异。假手术组肾小管间质无明显病理改变。

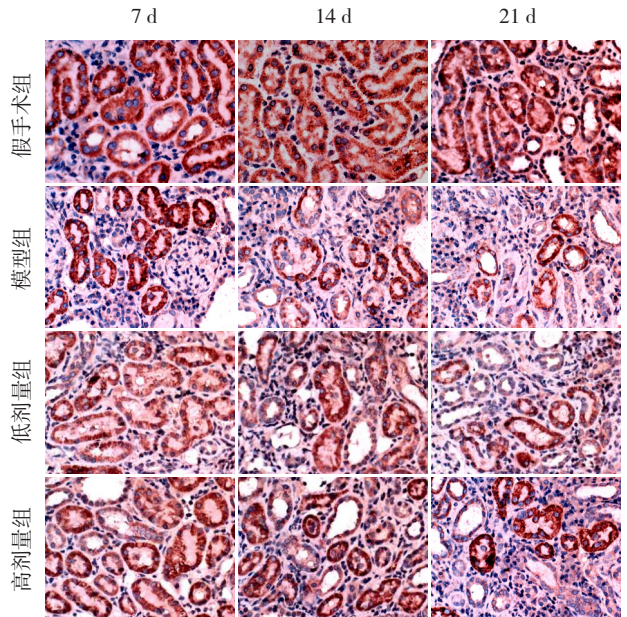


图 2 各组大鼠不同时间点 CBS 蛋白表达情况 (SABC, $\times 400$)

随着肾小管间质纤维化的逐渐加重, 模型组和治疗组肾小管上皮 CBS 的表达呈下调趋势, 且模型组 CBS 蛋白表达较治疗组降低更显著, 而假手术组肾小管 CBS 表达改变不明显。

2.3 血浆 H₂S 的水平变化

模型组与治疗组大鼠血浆 H₂S 含量均呈逐渐降低趋势, 在实验第 21 天降低最明显, 与假手术组比较, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$); 但各个时间点治疗组血浆 H₂S 水平均高于模型组 (均 $P<0.01$), 而低、高剂量组在同一时间点比较, 血

浆 H₂S 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 5。

2.4 CBS 和 CSE mRNA 表达变化

假手术组大鼠肾脏大量表达 CBS mRNA, CSE mRNA。模型组和各治疗组大鼠 CBS mRNA, CSE mRNA 表达比假手术组均明显减少, 差异有统计学意义 ($P<0.01$); 且随病情的进展, CBS mRNA,

CSE mRNA 的表达量逐渐下降, 下降趋势持续至第 21 天实验结束。高、低剂量组与模型组相比, 各相应时间点 CBS mRNA, CSE mRNA 的表达较模型组均明显增加, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。见图 4~5。

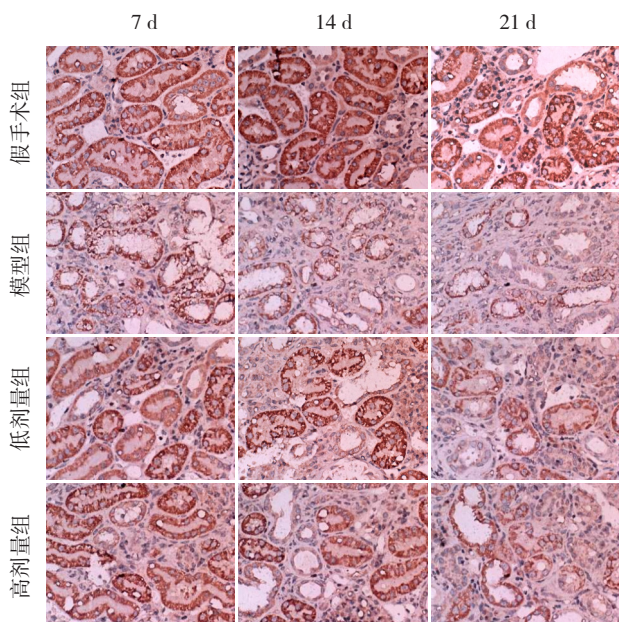


图 3 各组大鼠不同时间点 CSE 蛋白表达情况 (SABC, $\times 400$) 随着肾小管间质纤维化的逐渐加重, 模型组和治疗组肾小管上皮 CSE 的表达呈下调趋势, 且模型组 CSE 蛋白表达较治疗组降低更显著, 而假手术组肾小管 CSE 表达改变不明显。

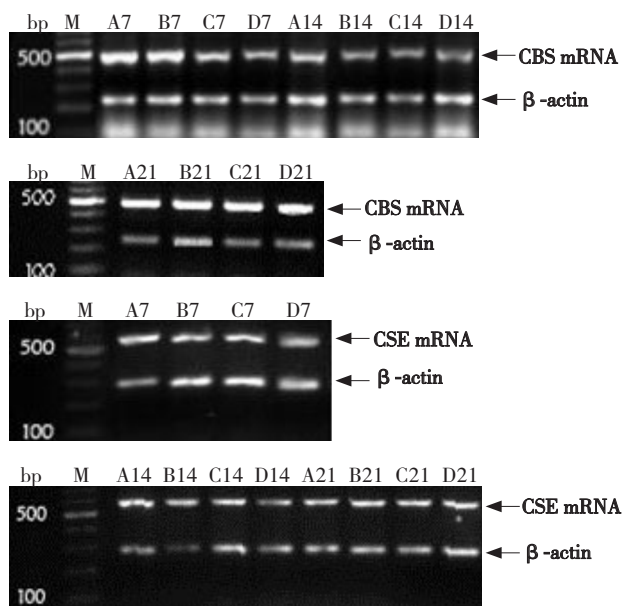


图 4 各组大鼠不同时间点肾脏 CBS 和 CSE mRNA 表达的电泳图 M: 500 bp Marker, A: 假手术组, B: 模型组, C: 低剂量组, D: 高剂量组; 7、14、21 代表实验进行的天数。

表 5 各组大鼠不同时间点血浆 H_2S 含量

($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	7 d	14 d	21 d
假手术组	8	161 $\pm$ 4	153 $\pm$ 5	159 $\pm$ 6
模型组	8	144 $\pm$ 10 ^a	135 $\pm$ 5 ^{a,c}	124 $\pm$ 7 ^{a,c}
低剂量组	8	152 $\pm$ 8 ^{a,b}	143 $\pm$ 6 ^{a,b,c}	133 $\pm$ 9 ^{a,b,c}
高剂量组	8	154 $\pm$ 6 ^{a,b}	145 $\pm$ 8 ^{a,b,c}	140 $\pm$ 11 ^{a,b,c}
<i>F</i> 值		6.881	11.745	28.516
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

a: 与同一时间点假手术组比较, $P<0.01$; b: 与同一时间点模型组比较, $P<0.01$; c: 与同组 7 d 时比较, $P<0.01$

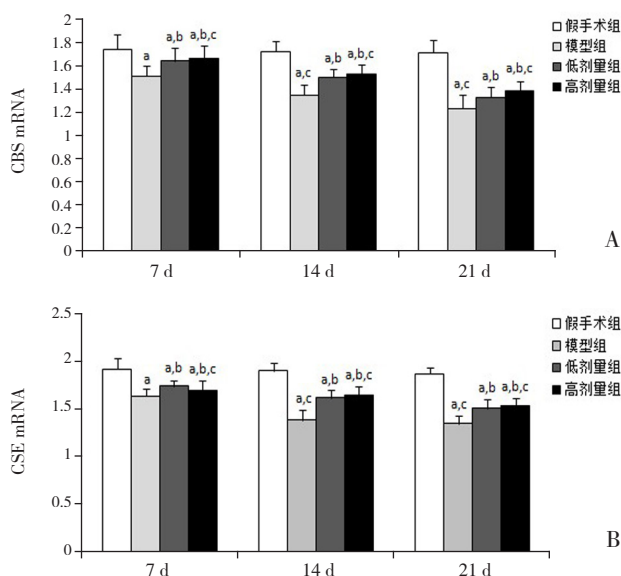


图 5 各组大鼠不同时间点肾脏 CBS 及 CSE mRNA 的表达 A: 各组大鼠不同时间点肾脏 CBS mRNA 表达水平柱状图; B: 各组大鼠不同时间点肾脏 CSE mRNA 表达水平柱状图。

a: 与同一时间点假手术组比较, $P<0.01$; b: 与同一时间点模型组比较, $P<0.01$; c: 与同组 7 d 时比较, $P<0.05$ 。

2.5 相关性分析结果

CBS 蛋白阳性染色面积与肾小管间质损伤、TIF 相对面积均呈负相关 ($r=-0.966$, -0.918 , 均 $P<0.01$) ; CSE 蛋白阳性染色面积与肾小管间质损伤、TIF 相对面积均呈负相关 ($r=-0.944$, -0.921 , 均 $P<0.01$) ; CBS mRNA 表达量与肾小管间质损伤、TIF 相对面积均呈负相关 ($r=-0.812$, -0.836 , 均 $P<0.05$) ; CSE mRNA 表达量与肾小管间质损伤及 TIF 相对面积均呈负相关 ($r=-0.813$, -0.855 , 均 $P<0.05$) ; 血浆 H_2S 水平与 CBS 和 CSE mRNA 表达均呈正相关 ($r=0.935$, 0.944 , 均 $P<0.01$) 。

3 讨论

内源性 H_2S 作为一种新型的内源性气体信号

分子,在机体内发挥着广泛的生物学效应, H_2S 不仅在神经系统具有诱导海马长时程记忆增强,调控下丘脑-垂体-肾上腺轴,影响神经内分泌等功能,以及舒张血管及调节消化道平滑肌张力,抑制血管平滑肌细胞增殖等作用,而且还参与了肺纤维化、肝纤维化等组织器官纤维化的病理生理过程^[3-5]。

肾脏纤维化包括肾小球硬化和TIF,其中TIF几乎是所有慢性肾脏疾病发展至终末期肾衰的最终共同通路,其病理学基础是以肾间质大量细胞外基质过量积聚为特征。TIF已经作为反映肾脏病患者肾功能下降严重程度和判断预后的一个重要指标^[10]。早在1982年Stipanuk等^[1]就证实在大鼠肾脏中存在内源性 H_2S ,近年来,已有部分证据显示内源性 H_2S 在缺血-再灌注^[11]、顺铂诱导肾损伤^[12]以及尿毒症综合征患者进行血液透析^[13]等过程中通过抗凋亡、抗氧化、抗炎起积极的肾保护作用。在肾脏 H_2S 的合成酶途径中,有研究者用L-Cys作为底物,在孵育的肾组织匀浆中以浓度依赖方式诱导合成 H_2S , H_2S 合成可完全被氨基-羟乙酸(一种CBS的阻滞剂)和炔丙基甘氨酸(一种CSE的阻滞剂)所阻断,然而,单独对CBS或CSE进行阻断,只能较小地减少 H_2S 的合成^[14],说明CBS和CSE是肾脏转硫途径中两种关键酶。实验观察到假手术组大鼠体内存在一定含量的内源性 H_2S ,肾小管上皮细胞广泛表达CBS和CSE蛋白及其mRNA。UUO模型大鼠梗阻肾静脉血浆 H_2S 水平则逐渐下降,以实验第21天最为显著,而CBS和CSE蛋白及其mRNA的表达亦随肾小管间质损伤的加重呈逐渐降低趋势,血浆 H_2S 的含量以及CBS、CSE的表达均与肾小管间质损伤的程度呈负相关,说明TIF过程中血浆 H_2S 的含量与CBS、CSE酶的活性一致性降低。提示内源性CBS/ H_2S 和CSE/ H_2S 体系直接参与了TIF的发生与发展。

外源性补充 H_2S 供体NaHS可以显著提高血浆 H_2S 的水平, H_2S 通过发挥抗炎、抗凋亡、抗氧化应激等生物学效应降低UUO导致的肾小管的损伤^[11-13],有效地保护了肾小管的结构和功能,同时也在一定程度上保持了肾小管上皮CBS和CSE的生物活性,上调CBS和CSE通过L-Cys底物催化产生内源性 H_2S ,从而延缓TIF的发生和进展,达到保护肾功能的目的。

实验表明两种剂量NaHS外源性补充虽然在干预效果方面无显著差异,但从保护肾小管间质损伤、提升血浆 H_2S 水平以及CBS、CSE活性表达等方面分析,高剂量组对TIF的改善效果稍占优势,

由此推测如果适当增加外源性NaHS剂量可能会产生更为明显的肾保护作用,但仍需进一步的实验验证。另外,TIF发病机制是涉及多种细胞因子、生长因子、粘附因子等参与的复杂过程,内源性 H_2S 在TIF中的精确作用以及与两种气体信号分子NO和CO的相互关系尚需进一步探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Stipanuk MH, Beck PW. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat[J]. *Biochem J*, 1982, 206(2): 267-277.
- [2] House JD, Brosnan ME, Brosnan JT. Characterization of homocysteine metabolism in the rat kidney[J]. *Biochem J*, 1997, 328(Pt1): 287-292.
- [3] 李虹,刘新民,耿彬,潘春水,齐永芬,吴胜英,等.新型气体信号分子硫化氢在大鼠肺纤维化发病中的作用[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2006, 38(2): 140-145.
- [4] 张宁,郑勇,王于理,李睿,孙侃,常向云,等.内源性硫化氢在不同时期大鼠肝硬化中的作用[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(3): 307-311.
- [5] 阳丹才让,邓勇,任利,王聪,樊海宁.硫化氢对MDA及GSH在大鼠肝星状细胞氧应激中表达的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(36): 3725-3728.
- [6] Bascands JL, Schanstra JP. Obstructive nephropathy: Insights from genetically engineered animals[J]. *Kidney Int*, 2005, 68(3): 925-937.
- [7] Nishida M, Hamaoka K. Macrophage phenotype and renal fibrosis in obstructive nephropathy[J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2008, 110(1): e31-e36.
- [8] Cregger M, Berger AJ, Rimm DL. Immunohistochemistry and quantitative analysis of protein expression[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2006, 130(7): 1026-1030.
- [9] 石琳,杜军保,卜定方,齐建光,魏冰,唐朝枢,等.高肺血流量对肺血管结构及胱硫醚- γ 裂解酶基因表达的影响[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2003, 35(6): 566-570.
- [10] Nanqaku M. Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure[J]. *Intern Med*, 2004, 43(1): 9-17.
- [11] Tripatara P, Patel NS, Collino M, Gallicchio M, Kieswich J, Castiglia S, et al. Generation of endogenous hydrogen sulfide by cystathionine gamma-lyase limits renal ischemia/reperfusion injury and dysfunction[J]. *Lab Invest*, 2008, 88(10): 1038-1048.
- [12] Della Coletta Francesco H, Cunha FQ, Costa RS, Barbosa Junior F, Boim MA, Arnoni CP, et al. Inhibition of hydrogen sulphide formation reduces cisplatin-induced renal damage[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(2): 479-488.
- [13] Perna AF, Luciano MG, Ingrosso D, Raiola I, Pulzella P, Sepe I, et al. Hydrogen sulfide, the third gaseous signaling molecule with cardiovascular properties, is decreased in hemodialysis patients[J]. *J Ren Nutr*, 2010, 20(5): S11-S14.
- [14] Xia M, Chen L, Muh RW, Li PL, Li N. Production and actions of hydrogen sulfide, a novel gaseous bioactive substance, in the kidneys[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 329(3): 1056-1062.

(本文编辑:冯丹丹)