

细胞凋亡与大鼠肾小球硬化关系的初步探讨

甘卫华¹, 蔡毅², 陈荣华², 黄松明², 黄文彦¹, 费莉², 郭梅², 潘晓勤²

(1. 南京医科大学第二附属医院儿科, 江苏 * 南京 210011; 2. 南京医科大学小儿肾脏病研究中心, 江苏 * 南京 210029)

[摘 要] 目的 通过实验性动物模型观察细胞凋亡与肾小球硬化发生发展的相关性。方法 用一侧肾切除加静脉注射柔红霉素的方法建立大鼠肾小球硬化模型,应用原位末端转移酶标记技术(TUNEL)观察细胞凋亡的发生。结果 ①建立的大鼠肾小球硬化模型,其组织形态学特征类似于人类局灶性节段性肾小球硬化的发生发展,第4周开始出现硬化病灶,第8周肾小球大部分节段均成为硬化病灶。②TUNEL结果显示,对照组大鼠肾组织中仅存在极少的细胞凋亡现象,肾小球硬化模型的肾组织2周组无显著的细胞凋亡现象,4周组开始出现小球细胞凋亡现象,与对照组比较差异有显著性[(5.4±1.2)vs(1.6±0.8)](P<0.01);6周至8周组小球细胞凋亡达高峰,凋亡细胞数分别为(8.6±2.8)(10.1±1.9),与对照组比较,分别为(1.8±0.8)(1.7±0.5),差异有显著性(P<0.01)。③4周~8周(硬化初、中期),硬化肾小球中出现的凋亡细胞数与肾小球细胞总数呈明显负相关(r=-0.85,P<0.01);8周(硬化后期)以后,硬化肾小球内出现的凋亡细胞数与肾小球细胞总数呈正相关(r=0.91,P<0.01)。结论 细胞凋亡与大鼠肾小球硬化发生的范围及进展的时相密切相关,细胞凋亡可能是引起肾小球固有细胞减少的重要机制之一。

[关 键 词] 细胞凋亡;肾小球硬化;大鼠
[中图分类号] R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2002)03-0198-03

Relationship between Apoptosis and Experimental
Glomerulosclerosis in Rats

GAN Wei-Hua, CAI Yi, CHEN Rong-Hua, et al.

Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Abstract : **Objective** To study the relationship between apoptosis and glomerulosclerosis by establishing an experimental animal model of glomerulosclerosis. **Methods** The rat model of glomerulosclerosis was established by left nephrectomy and intravenous injection of Daunomycin(model group, n = 30). The other 30 rats(control group) were injected with normal saline at the same time as the model group. Apoptosis was assayed by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL) in the two groups. **Results** ① The features of renal histopathology of the model group rats was resembled primary focal segmental glomerulosclerosis in human. ② No significant apoptosis was noted within two weeks in either the control group or the model group. The phenomenon of apoptosis initiated at 4th week. The level of apoptosis in the model group was significantly higher than that in the control group[(5.4 ± 1.2) vs (1.6 ± 0.8)](P < 0.01) at 4th week. The number of apoptotic cells reached the highest level at 6th and 8th weeks (8.6 ± 2.8 and 10.1 ± 1.9 , respectively) compared with the control group (1.8 ± 0.8 , 1.7 ± 0.5 , respectively) (P < 0.01). ③ The total number of apoptotic cells was negatively correlated to the number of glomerular cells from 4th to 8th weeks (r = - 0.85 , P < 0.01); however , there was a positive correlation between them after 8 weeks (r = 0.91 , P < 0.01) in the model group. **Conclusions** There is a significant correlation between apoptosis and glomerulosclerosis. Apoptosis might play an important role in decreasing glomerular resident cells.

Key words : Apoptosis ; Glomerulosclerosis ; Rat

细胞凋亡作为一种基因控制下特殊类型的主动性细胞死亡现象,其在肾脏疾病中的作用已受到广大学者们的重视^[1-2]。本研究通过建立大鼠肾小球硬化模型,应用原位末端转移酶标记技术(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL),系统地观察了从制备模型到病变形成过程中细胞凋亡发生的时间、部位及程度,初步探讨了细胞凋亡与肾小球硬化发生发展之间的关系。

1 材料及方法

1.1 建立大鼠肾小球硬化模型

雄性 SD 大鼠 60 只,体重 80~100 g(购自南京医科大学实验动物中心),无菌手术下切除左肾,随机分为实验组(30 只)和对照组(30 只)。实验组 2 周后两次静脉注射柔红霉素(购自意大利 Calo Erba 公司),每次 5 mg/kg,间隔 1 周。同时对照组大鼠静脉注射生理盐水。以后每 2 周处死 6 只实验组大鼠及 6 只对照组大鼠(2 周、4 周、6 周、8 周、10 周)。取大鼠右肾组织,取材后立即入 10% 福尔马林溶液固定 24 h,经梯度酒精脱水,常规石蜡包埋,切片,片厚 2 μm,行 HE 染色、光镜、电镜、免疫荧光及 TUNEL 检测。

1.2 肾组织切片 TUNEL 标记

TUNEL 试剂盒购自德国宝灵曼公司。操作步骤如下^[3]:切片脱蜡后,PBS 清洗,20 μg/ml 蛋白酶 K 消化 15 min,0.2% 甘氨酸中和,PBS 清洗,4% 多聚甲醛固定 20 min。切片经 PBS 清洗 3 次,行 TUNEL

标记(TDT 酶:标记缓冲液=1:10)60 min,PBS 洗 3 次,加 AP-flu-Ab 30 min,PBS 及 Tris Buffer 平衡后滴加显色液至阳性对照显色良好(15~20 min),流水冲洗,封片,光镜下观察。

1.3 结果观察

1.3.1 HE 染色切片 光镜高倍视野下,随机观察 10 个肾小球,计数小球细胞数及观察硬化病灶范围。

1.3.2 TUNEL 标记切片 光镜高倍视野下,随机观察 10 个肾小球,计数小球细胞数及阳性显色的凋亡细胞数。

1.4 统计学方法

所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 统计分析软件,组间比较方差齐性用 t 检验,方差不齐用 t' 检验,数据呈非正态分布时用秩和检验。

2 结果

2.1 HE 染色

随着实验周期的延长,实验组大鼠肾小球硬化的范围逐渐扩大,肾小球细胞数逐渐减少。2 周组仅表现为系膜基质增多,肾小球细胞数无明显减少;4 周时出现 1/4 节段硬化病灶,小球细胞数开始减少,但与对照组比较差异无显著性($P>0.05$);6 周后,肾小球细胞数的减少与对照组比较差异有显著性($P<0.01$);10 周时,肾小球大部分节段毛细血管襻塌陷,被硬化物质取代,硬化范围 $>2/3$ 节段,肾小球细胞数减少为 20.5 ± 5.6 。见表 1。

表 1 各实验组单个肾小球硬化范围、总细胞数及凋亡细胞数的比较

Table 1 Comparison of the scale of glomerulosclerosis, the total number of glomerular cells and apoptotic cells in each group ($\bar{x} \pm s$)

	组别	小球硬化范围	小球细胞总数	凋亡细胞数	凋亡细胞数/小球细胞总数(%)
2 周	对照组	无系膜基质增多	76.8±11.5	1.4±0.6	1/54.85(1.8)
	实验组	系膜基质增多	78.3±13.2	2.9±0.7	1/27.00(3.7)
4 周	对照组	无硬化灶	81.3±12.5	1.6±0.8	1/50.81(1.9)
	实验组	1/4 节段	63.5±15.1	5.4±1.2 ^a	1/11.80(8.5)
6 周	对照组	无硬化灶	75.9±13.6	1.8±0.8	1/42.1(2.4)
	实验组	1/2 节段	41.9±8.4 ^a	8.6±2.8 ^a	1/4.87(20.5)
8 周	对照组	无硬化灶	78.4±11.8	1.7±0.5	1/46.11(2.2)
	实验组	2/3 节段	28.1±11.1 ^a	10.1±1.9 ^a	1/2.78(35.9)
10 周	对照组	系膜基质轻度增多	73.5±16.4	2.1±0.9	1/35.87(2.8)
	实验组	>2/3 节段	20.5±5.6 ^a	9.3±0.9 ^a	1/2.20(45.5)

注 ^a 与对照组比较 $P<0.01$

2.2 TUNEL 标记

对照组大鼠肾组织中仅存在极少的凋亡细胞,硬化模型2周组大鼠与对照组大鼠比较,其凋亡细胞数的差异无统计学意义($P > 0.05$),其余各组与对照组大鼠的细胞凋亡水平差异均具有显著性意义($P < 0.01$),见表1。4~8周(硬化初、中期),硬化肾小球中出现的凋亡细胞数与肾小球细胞总数呈明显负相关($r = -0.85, P < 0.01$)8周(硬化后期)以后,硬化肾小球内出现的凋亡细胞数与肾小球细胞总数呈正相关($r = 0.91, P < 0.01$)。

3 讨论

肾小球硬化是各种肾小球疾病进展到慢性肾衰的共同病理途径^[4]。在形态学上,其病变除表现为细胞外基质成分合成增多,毛细血管丛塌陷外,尚存在肾小球固有细胞的逐渐减少,到疾病晚期,成为无细胞的玻璃样小球,丧失正常功能。目前,尽管对细胞外基质成分在硬化病灶形成中的作用进行了大量的研究,但对进行性细胞减少的原因和机制却了解甚少,肾小球硬化的发病机理仍然不清楚。近年的研究发现^[5,6],人类肾小球疾病时,肾组织中有细胞凋亡的发生,初步结果提示可能与肾小球硬化存在某种关联。但由于人体取材的限制,难以进行系统观察以明确两者间的关系,为此本研究在“单纯肾切除肾小球硬化模型”的基础上,自创建立了加速型肾小球硬化的大鼠模型(柔红霉素注射加一侧肾切除)动态地观察从制备模型到病变形过程中,细胞凋亡发生的时间、部位及程度,从而进一步了解细胞凋亡在肾小球硬化形成中的作用。

本研究发现,大鼠一侧肾切除后,注射柔红霉素所建立的肾小球硬化模型,方法学稳定,模型的硬化病变出现早(4周),其病理组织学改变和进展更类似于人类的局灶节段性肾小球硬化。2周仅表现为系膜基质增多,肾小球细胞数无明显减少。4周开始1/4节段硬化病灶,小球细胞数开始减少,至10周小球大部分节段毛细血管祥塌陷,被硬化物质取代。我们自创的此加速型肾小球硬化模型方法学稳定,重复性较好,已成功地用于多项国家级及省级科研课题的研究。

我们的资料显示,大鼠正常肾组织中凋亡细胞极少,硬化模型2周组大鼠肾组织亦仅存在少量的细胞凋亡现象,与对照组无显著差别。硬化初期(4

周组)开始出现明显增多的凋亡细胞,硬化中晚期(6~8周),肾组织中的细胞凋亡达高峰,结果提示肾小球硬化模型大鼠的肾组织中存在明显的细胞凋亡现象,且凋亡的程度与肾小球硬化发生的范围和进展的时相密切相关。

有研究显示^[7,8],在增殖性肾小球肾炎如新月体肾炎的发生和进展过程中,以及在糖尿病肾病肾间质纤维化的进展中,细胞凋亡机制起着极其关键的调节作用,认为细胞凋亡是使肾小球细胞数减少的主要机制。细胞凋亡可清除过度增殖的有害细胞,如肾小球系膜细胞、肾间质纤维细胞等,改善或延缓增殖性肾小球肾炎和肾间质纤维化的进展,此为细胞凋亡有益的作用,但另一方面,若细胞凋亡过于活跃,则可导致肾小球固有细胞过量减少(此为细胞凋亡有害的作用),进而促使肾小球疾病进展至肾小球硬化^[5,6]。我们对大鼠硬化模型的研究结果进一步论证了他们的观点。

本研究从肾小球固有细胞减少这个角度来阐明肾小球硬化的发病机理,初步证实细胞凋亡可能是导致肾小球固有细胞减少的主要机制之一,此为进一步寻找人为调节细胞凋亡的手段,延缓或终止进行性肾小球硬化的过程提供了理论依据。

[参 考 文 献]

[1] Truong LD, Petrussevska G, Yang G, et al. Cell apoptosis and proliferation in experimental chronic obstructive uropathy [J]. *Kidney Int*, 1996, 50(1): 200-203.

[2] Savill J. Apoptosis and the kidney [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1994, 5(1): 12-21.

[3] Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, et al. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: insitu end-labeling of fragmented DNA [J]. *J Histochem Cytochemi*, 1993, 41(1): 7-12.

[4] Korbet SM, Schwartz MM, Lewis EJ. Primary focal segmental glomerulosclerosis clinical course and response to therapy [J]. *Am J Kidney Dis*, 1994, 23(6): 773-783.

[5] Sugiyama H, Kashiwara N, Makino H, et al. Apoptosis in glomerular sclerosis [J]. *Kidney Int*, 1996, 49(1): 103-111.

[6] Makino H, Kashiwara N, Sugiyama H, et al. Role of apoptosis in the progression of glomerulosclerosis [J]. *Contrib Nephrol*, 1996, 118: 41-47.

[7] Shimizu A, Masuda Y, Kitamura H, et al. Apoptosis in progressive crescentic glomerulonephritis [J]. *Lab Invest*, 1996, 74(5): 941-951.

[8] Ohashi R, Kitamura H, Yamanaka N, et al. Peritubular capillary injury during the progression of experimental glomerulonephritis in rats [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11(1): 47-56.