

• 论著-实验研究 •

大鼠可复性单侧输尿管部分梗阻中
CTGF 表达的研究*韩建强¹ 刘永东² 李俊峰² 沈刚² 严庆涛² 胡强²

[摘要] 目的:从分子水平研究可复性单侧输尿管部分梗阻(partial unilateral ureteral obstruction, PUUO)后肾小球和肾小管的病理改变,观察梗阻后和解除梗阻后不同时段内结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)的表达情况,及其与梗阻解除前后肾病理变化情况的关系。方法:选择成年健康雄性 Wistar 大鼠 72 只,随机分组并作以下处理:①对照组 24 只,仅行左侧肾盂输尿管处游离+左侧腰大肌钝性分离术;②梗阻组 24 只,将左侧输尿管上段埋入腰大肌下建立 PUUO 动物模型;以上两组分别在术后 1、2、4、8 周各随机选取 6 只处死。③梗阻解除组 24 只,采用相同方法建立 PUUO 动物模型,术后 8 周行梗阻解除术,后 1、2、4、8 周各随机选取 6 只处死。所有处死大鼠均行肾脏病理学检查,用免疫组织化学及 Western blot 法检测 CTGF 蛋白在组织中的分布及表达水平。结果:梗阻组肾脏中不同时期 CTGF 蛋白的表达明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),CTGF 蛋白表达随着梗阻时间延长而显著上调;相较梗阻组,解除梗阻组中 CTGF 蛋白含量在解除梗阻后 1 周(实验开始 9 周)内的变化差异无统计学意义,2 周(实验开始 10 周)、4 周(实验开始 12 周)、8 周(实验开始 16 周)分别与梗阻组 4、2、1 周比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:CTGF 蛋白在大鼠肾积水病理形成过程中可能发挥重要调控作用,为先天性肾积水等临床疾病的机制研究提供了一定的参考依据。

[关键词] 输尿管部分梗阻;结缔组织生长因子;大鼠;肾积水

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2017.03.013

[中图分类号] R693 [文献标识码] A

Study on the expression of CTGF in rats reversible unilateral
ureteral partial obstructionHAN Jianqiang¹ LIU Yongdong² LI Junfeng² SHEN Gang² YAN Qingtao² HU Qiang²

(¹Weifang Medical University, Weifang, Shandong, 261000, China; ²Department of Pediatric Surgery; Weifang People's Hospital)

Corresponding author: HU Qiang, E-mail: dhq7936@163.com

Abstract Objective: To investigate the pathological changes of the glomeruli and the kidney tubules after the reversible partial unilateral ureteral obstruction (PUUO) at molecular level, and to observe the expression of the connective tissue growth factor (CTGF) after obstruction as well as during various periods after obstruction relief, with an aim to observe the relations between the expression of CTGF and the renal pathological changes before and after obstruction relief. **Method:** Seventy-two healthy adult male Wistar rats were randomly divided into three groups and were treated as follows: firstly, the control group ($n=24$), which was performed the left ureteropelvic dissociation combined with blunt dissection of the left psoas major muscle. Secondly, the obstruction group ($n=24$), the upper segment of left ureter of which were embedded into the psoas major muscle to construct the PUUO animal models; and six rats were randomly selected from the above two groups to sacrifice 1 w, 2 w, 4 w and 8 w postoperatively. Thirdly, the obstruction relief group ($n=24$), in which the same method was adopted to construct the PUUO animal models, and the obstruction relief was performed 8 w postoperatively; and six rats were randomly sacrificed 1 w, 2 w, 4 w and 8 w after the surgery, respectively. All the sacrificed rats were performed renal pathological examination, and distribution and protein level of CTGF were determined by immunohistochemistry and the western blot in these models. **Result:** The expression level of CTGF protein in the kidney in the obstruction group during various periods was remarkably higher than that in the control group, with the difference being statistically significant ($P < 0.01$), and the expression of CTGF protein was remarkably up-regulated accompanied by the extension of obstruction; when compared to the control group, the content of CTGF protein in the

* 基金项目:2009 年潍坊市科学技术发展计划项目(编号 20090203),2014 年潍坊市科学技术发展计划项目(编号 2014WS003)

¹潍坊医学院(山东潍坊,261000)

²潍坊市人民医院小儿外科

通信作者:胡强,E-mail:dhq7936@163.com

obstruction relief group showed no statistically significant difference within 1 w after obstruction relief (9 w after the initiation of experiment), and that within 2 w (10 w after the initiation of experiment), 4 w (12 w after the initiation of experiment), and 8 w (16 w after the initiation of experiment) showed significant difference ($P < 0.05$) when compared with that within 4 w, 2 w and 1 w in the obstruction group, respectively. **Conclusion:** CTGF protein may play an important regulatory role in the pathological process of rat hydronephrosis, which provides certain reference foundation for the mechanism research of diseases like congenital uronephrosis in clinic.

Key words partial ureteral obstruction; connective tissue growth factor; rat; uronephrosis

先天性肾积水 (congenital hydronephrosis) 是小儿泌尿系统常见的先天性畸形疾病, 主要由肾盂输尿管连接处梗阻或狭窄所引起, 大多数为单侧部分梗阻, 其病理生理过程与完全性梗阻差异显著。转化生长因子 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 的表达是介导间质纤维化过程的关键机制, 结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 是 TGF- β_1 致纤维化作用的下游靶基因, 在促进成纤维细胞转分化、胶原蛋白等细胞外基质合成与分泌过程中发挥重要作用^[1,2]。CTGF 是一种重要的促纤维化因子^[3], 有证据表明, TGF- β_1 介导的 CTGF 活化参与了肾间质纤维化 (renal interstitial fibrosis, RIF) 的发生发展过程。本研究建立大鼠可复性单侧输尿管部分梗阻模型, 从分子水平研究可复性单侧输尿管梗阻后肾小球和肾小管的病理改变, 观察梗阻后及解除梗阻后不同时段内 CTGF 的表达情况, 观察 CTGF 与梗阻解除前后肾病理变化情况的关系, 从而为临床小儿先天性肾积水等疾病中干预结缔组织形成、抗纤维化治疗提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选择 10~12 周龄健康雄性 Wistar 大鼠共 72 只 (由山东医科大学动物实验中心提供), 体重 (240 ± 35)g, 统一饲养于潍坊医学院动物实验室。饲养条件: 室温 18~25 °C, 相对湿度 50%~65%, 昼/夜循环照明, 分笼饲养, 全价营养, 定时清洗笼舍。大鼠摄食及饮水不限。

1.2 主要仪器和试剂

采用 BX-50 生物光学显微镜、-150 °C 超低温冰箱 (日本 SANYO 公司)、切片机 (英国姗顿公司)、真彩医学图像分析系统 (德国 Leica 公司)、兔抗大鼠 CTGF 多克隆抗体 (武汉博士德生物工程有限公司)、S-P 免疫组织化学试剂盒 (北京中杉金桥生物技术公司)、BCA 蛋白质定量测定试剂盒、蛋白裂解液 (南京凯基生物科技发展有限公司)、预染蛋白 Marke (北京博奥森公司)、GAPDH 抗体 (北京博奥森公司)、HE 染色试剂 (潍坊市人民医院病理实验室)。

1.3 各组模型建立及分组

① 大鼠适应性饲养 1 周, 期间无死亡。② 随机

选取 24 只大鼠为对照组, 以氯胺酮 50 mg/kg 腹腔注射麻醉, 仰卧固定于大鼠固定板, 备皮消毒, 取腹部正中切口开腹。入腹腔后找到并显露左侧肾盂输尿管连接处向下游离 (长约 2.5 cm), 钝性分离左侧腰大肌一条深 0.5 cm 沟状裂隙, 逐层缝合关腹。③ 建立单侧输尿管部分梗阻 (partial unilateral ureteral obstruction, PUUO) 动物模型, 随机选取梗阻组和梗阻解除组各 24 只, 前期手术方法同上。左腰大肌形成沟隙后, 将输尿管游离段置于沟隙底部, 用 5-0 丝线间断缝合 3~4 针关闭沟隙, 使腰大肌沟隙包绕输尿管游离段。各手术术中及术后 3 天每天肌肉注射青霉素 30 000 U, 未见过敏反应。④ 梗阻解除组于建立 PUUO 动物模型术后 4 周行解除梗阻术, 准备工作同前, 麻醉后取左侧旁正中切口, 进入腹腔, 辨别并剪除缝线, 仔细游离包埋于腰大肌后的输尿管, 恢复其正常解剖关系。

1.4 实验方法

对照组、梗阻组于术后 1、2、4、8 周各随机选取 6 只处死。梗阻解除组形成 PUUO 模型后常规饲养 8 周, 然后于 1、2、4、8 周各随机选取 6 只处死。所有处死大鼠均行肾脏病理学检查, 用免疫组织化学染色法及 Western blot 法检测 CTGF 蛋白在组织中的分布及表达水平。

1.5 指标检测

肾脏病理检测: 留取左肾下 1/2 组织, 用 10% 多聚甲醛固定, 常规脱水浸蜡 (Thermo Fisher), 石蜡包埋, 作 4 μ m 切片, 脱蜡透明后由潍坊市人民医院病理科行 HE 染色, 光镜下观察组织病理改变并摄片评分。计算 20 个高倍视野 (400 \times) 中发生病理侵害 (肾小管出现扩张、萎缩、坏死等, 纤维束走行紊乱, 增生肥厚, 肌束层次改变, 黏膜上皮皱折等) 的肾小管数目和总肾小管数, 取损害的肾小管数占总肾小管数的百分比值。取平均数, 得该标本肾间质纤维化分值。

分级评分标准^[4]: $< 10\%$ 为 0; $10\% \sim 25\%$ 为 1; $25\% \sim 50\%$ 为 2; $50\% \sim 75\%$ 为 3; $75\% \sim 100\%$ 为 4。

免疫组织化学法检测各组大鼠肾标本 CTGF 蛋白的表达: 采用 SABC 法, 标本石蜡包埋、切片, 放恒温箱烘烤, 后二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化; 用 3% 过氧化氢甲醇封闭内源性过氧化酶, PBS 缓冲

液漂洗;0.02 mol/L 柠檬酸盐缓冲液微波辐射修复抗原;非免疫性动物血清封闭;兔抗大鼠 CTGF 多克隆抗体稀释度为 1 : 100,置于 4 ℃ 冰箱中过夜孵育;添加生物素标记的二抗(按 SP 试剂盒说明)孵育 30 min;滴加 SABC 适量,孵育 30 min;DAB 显色,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。苏木精复染,脱水,透明,封片处理,置于通风柜中晾干。同时取先天性肾积水的标本做阳性对照。显微镜下观察,计算细胞阳性率(选取皮质及外髓质不重叠处 10 个高倍视野,细胞阳性率=阳性细胞数/视野所有细胞数×100%),取平均值作为每个标本的检测值,通过统计学方法行半定量分析。

Western blot 法检测各组大鼠肾标本 CTGF 蛋白的表达:取保存肾标本组织 100 mg,在冰上剪碎,在玻璃匀浆器中研磨成浆,EP 管中超声破碎,提取组织总蛋白。采用 BCA 法测蛋白浓度。依据 Western blot 步骤行凝胶电泳、转膜(湿转),分别加 CTGF 多克隆抗体(1 : 100)、β-actin 多克隆抗体(1 : 300)行免疫检测。用 IPP 图像分析软件检测蛋白条带 OD 值,β-actin 蛋白作内参照,计算目的蛋白的表达量(即目的蛋白 OD 值/β-actin 蛋白 OD 值)。

1.6 统计学方法

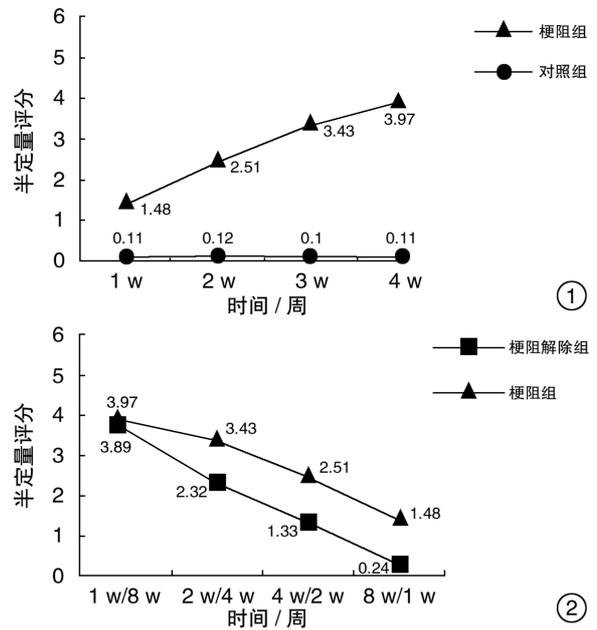
数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 21.0 统计软件对数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA),两组间比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肾脏病理变化

对照组大鼠肾脏各部位无明显病理变化,肾小球及肾小管间质基本正常。而梗阻组肾脏病理改变呈进行性发展:梗阻 1 周时,肾小球肾小管结构尚未显著改变,开始出现肾小管扩张,少量间质纤维化,见少量成纤维细胞;2 周时,皮质开始变薄,肾小管出现萎缩,部分肾小管扩张,成纤维细胞浸润增多;4 周时,肾皮质明显变薄,肾小管萎缩,间质纤维化严重,炎性细胞浸润,肾小囊扩张,部分肾小球失去正常形态,结构破坏;至 8 周时,肾小管扩

张更加明显,正常肾小球数目相比之前明显减少,间质内增生大量成纤维细胞,但炎性细胞浸润程度减轻。随着梗阻的解除,肾小管、肾小球、间质结构逐渐趋于好转,正常肾小球数量逐渐增多,间质纤维化不同程度缓解。半定量评分结果显示,在相同时间点与对照组比较,梗阻组大鼠纤维化分值明显增高,差异有统计学意义($P < 0.01$);梗阻解除组与梗阻组对应时间点比较,1 周(实验开始 9 周)内变化差异无统计学意义,2(实验开始 10 周)、4(实验开始 12 周)、8 周(实验开始 16 周)与梗阻组 4、2、1 周比较,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 1、2)。



①梗阻组与对照组肾小管间质半定量评分比较, $P < 0.01$;
②梗阻解除组与对照组肾小管间质半定量评分比较, $P < 0.05$

图 1 各组肾小管间质半定量评分比较

2.2 大鼠肾组织 CTGF 蛋白的表达

对照组大鼠肾小管偶见少量 CTGF 蛋白表达;梗阻组大鼠从 1 周开始可见 CTGF 蛋白表达量相比对照组增多,并随时间延长呈进行性增多,至 8 周时最多。与对照组同时间点相比较,差异有

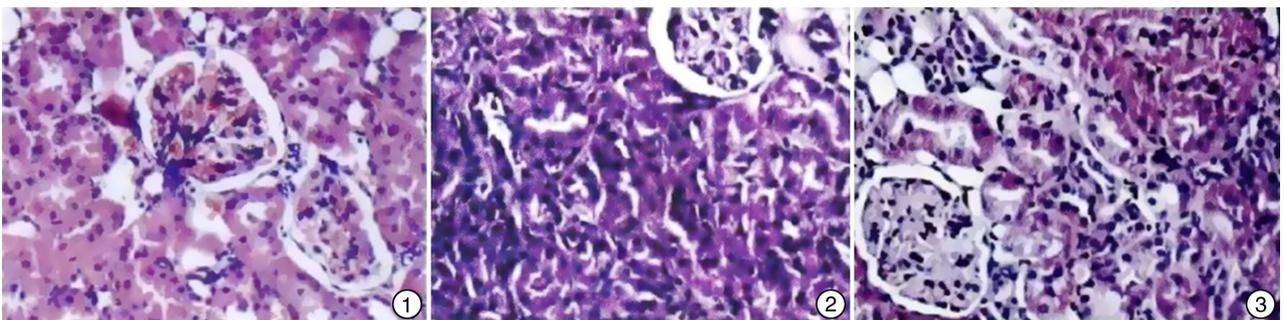


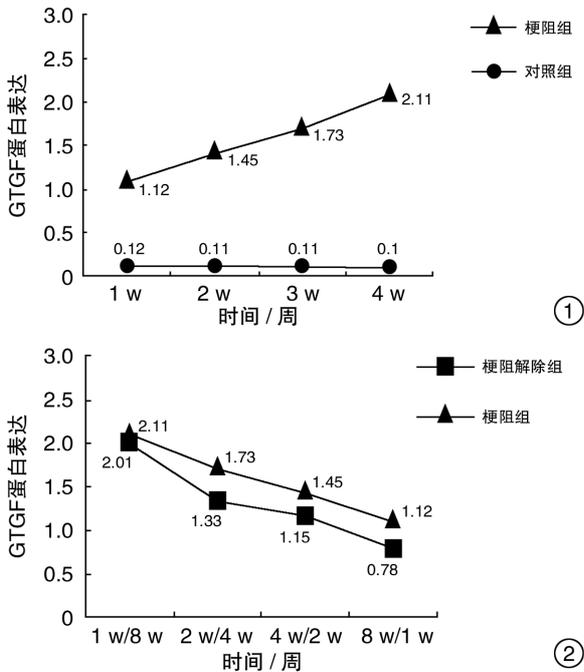
图 2 各组大鼠肾组织 HE 染色情况(400×)

统计学意义($P < 0.01$)。结缔组织生长因子 CTGF 与肾脏病理严重程度呈正相关关系。梗阻解除后,肾小管 CTGF 表达量下调,1 周内变化差异无统计学意义,2、4、8 周与梗阻组 4、2、1 周比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),支持半定量评分结果(图 3~5)。

3 讨论

近几年,国外一些学者从分子水平研究了梗阻性肾病的发生发展过程,建立了输尿管完全及部分梗阻的动物模型,如输尿管不全结扎法、输尿管内支架法、输尿管套管法、输尿管隔段结扎并剪断法,但这些方法缺点较多。根据研究需要,Ulm 等于 1962 年首先报道了输尿管腰大肌隧道包埋法,后经过 Wen 等^[5]、杨观天等^[6]学者的研究,表明用梗阻程度可以量化肾积水的渐进性发展。本实验充分验证了上述观点,发现该模型的可复性梗阻解除操作简单,成功率高,与先天性肾积水临床特点基本匹配,是一个比较完美的模拟临床先天性肾积水发展及转归的动物模型。

结缔组织生长因子 CTGF 是一种富含半胱氨酸的多肽,属即刻早期基因 CCN(CTGF、Cyr61、nov)家族成员之一^[7],是 TGF- β_1 致纤维化作用的下游关键性效应因子,具有促进成纤维细胞分化,并促进它合成和分泌胶原蛋白等细胞外基质的多种作用^[8,9]。在生理情况下,CTGF 蛋白表达水平低下,促进细胞有丝分裂、增殖、分化和存活,促进细胞趋化、黏附和迁移,亦发挥刺激凋亡、血管形成及胶原、纤维连接素的合成等多种生物学功能。有证据表明其作用范围仅限于结缔组织^[10]。本实验用病理切片检测、免疫组织化学及 Western blot 法,检测不同时段大鼠可复性单侧输尿管部分梗阻模型的病理变化、CTGF 蛋白表达水平,发现梗阻肾脏病理改变呈进行性发展,随着时间延长,肾小管扩张日益明显,肾间质内成纤维细胞大量增生,



①梗阻组与对照组肾组织 CTGF 蛋白表达的比较, $P < 0.01$;②梗阻解除组与对照组肾组织 CTGF 蛋白表达的比较, $P < 0.05$

图 3 各组肾组织 CTGF 蛋白表达的比较

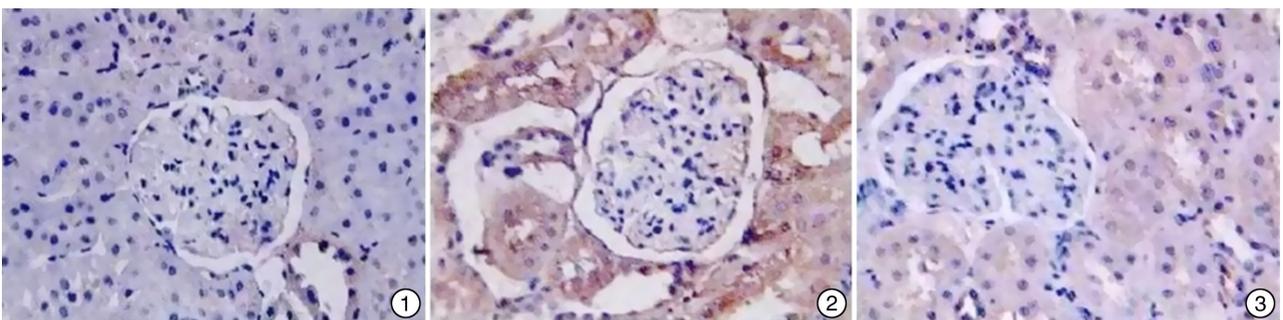
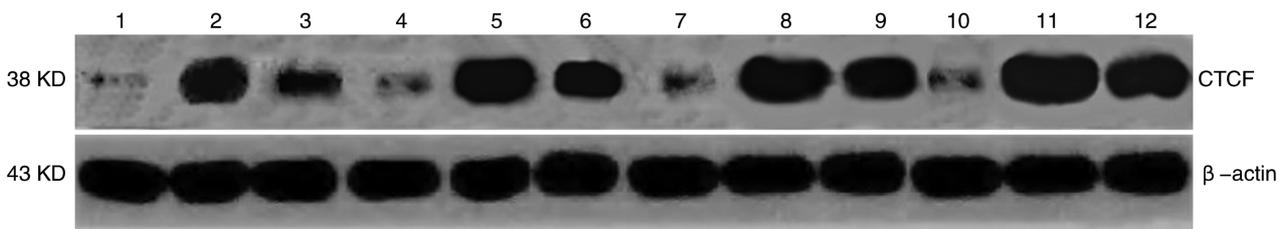


图 4 各组大鼠肾小管 CTGF 蛋白的表达情况(免疫组织化学,400×)



1=对照组 1 周;2=梗阻组 1 周;3=梗阻解除组 8 周;4=对照组 2 周;5=梗阻组 2 周;6=梗阻解除组 4 周;7=对照组 4 周;8=梗阻组 4 周;9=梗阻解除组 2 周;10=对照组 8 周;11=梗阻组 8 周;12=梗阻解除组 1 周

图 5 各组大鼠肾组织 CTGF 蛋白的表达情况(western blot)

同时正常肾小球数目显著减少。伴随梗阻的解除,肾小管、肾小球结构的破坏逐渐趋于好转,正常肾小球数渐多,肾间质纤维化不同程度得到缓解。CTGF 蛋白表达量随着病理情况的加重出现相应的进行性上调,病理情况好转,其表达量相应下调。结缔组织生长因子 CTGF 与肾脏病理损害严重程度呈正相关关系。

CTGF 作为重要的促纤维化因子,与先天性肾积水关系密切,可以作为临床小儿先天性肾积水等疾病中干预结缔组织形成、抗纤维化治疗的一种重要因素。本实验基于 CTGF 表达及其促纤维化效应的研究,为先天性肾积水的发生、发展及转归方面的分子研究提供了重要的方法和依据,也为先天性肾积水等肾纤维化疾病的治疗提供了一个新的靶点^[10]。抑制其活性或阻断其表达可能是一种更有效、更特异的治疗纤维化疾病的方法。调控纤维化肾 CTGF 的表达,对延缓肾纤维化进展可能有一定的意义。

[参考文献]

- 1 Okada H, Kikuta T, Kobayashi T, et al. Connective tissue growth factor expressed in tubular epithelium plays a pivotal role in renal fibrogenesis[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(1):133-143.
- 2 Chujo S, Shirasaki F, Kawara S, et al. Connective tissue growth factor causes persistent proalpha2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor-beta in a mouse fibrosis model[J]. Cell Physiol, 2005, 203(2):447-456.
- 3 Kisseleva T, Brenner D A. Mechanisms of fibrogenesis[J]. Exp Biol Med, 2008, 233(2):109-122.
- 4 Lv J, Feng M, Zhang L, et al. Protective effect of epigallocatechin gallate, a major constituent of green tea, against renal ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Int Urol Nephrol, 2015, 47(8):1429-1435.
- 5 Wen J G, Chen Y, Frokier J, et al. Experimental partial unilateral ureter obstruction[J]. J Urol, 1998, 160(4):1567-1571.
- 6 杨关天, 杨建军, 姚茂银. 可逆性输尿管部分梗阻动物模型的建立[J]. 江苏医药杂志, 2006, 32(8):749-751.
- 7 Katsube K, Sakamoto K, Tamaura Y, et al. Role of CCN, a vertebrate specific gene family, in development[J]. Dev Growth Differ, 2009, 51(1):55-67.
- 8 Okada H, Kikuta T, Kobayashi T, et al. Connective tissue growth factor expressed in tubular epithelium plays a pivotal role in renal fibrogenesis[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(1):133-143.
- 9 Chujo S, Shirasaki F, Kawara S, et al. Connective tissue growth factor causes persistent proalpha2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor-beta in a mouse fibrosis model[J]. Cell Physiol, 2005, 203(2):447-456.
- 10 Phanish M K, Winn S K, Dockrell M E, et al. Connective tissue growth factor-(CTGF, CCN2)-a marker, mediator and therapeutic target for renal fibrosis[J]. Nephron Exp Nephrol, 2010, 114(3):e83-e92.

(收稿日期:2016-08-23)

网上投稿注意事项

本刊采用远程投稿处理系统,请登录“<http://www.whuhzss.com>”投稿。注册用户名上传文章后,投稿系统一旦收到稿件,即自动发送“收稿回执”并通知编号。作者可根据此编号网上查询稿件处理情况。凡寄给个人的稿件,本刊一律不予受理。凡通过 E-mail 投寄的稿件均不算正式投稿(编辑部通知除外)。投稿时请注明第一作者和通信作者有效的联系方式(手机、邮箱),以便联系。

投稿完毕后请作者将一份纸质稿件(注明稿件编号)和单位介绍信及论文授权书一并寄至本刊编辑部(武汉市解放大道 1277 号《临床泌尿外科杂志》编辑部,430022)存档。作者中如有外籍作者或论文系作者在国外进修、学习、工作后撰写,还应附有国外所属工作单位同意在本刊发表的函件。

本刊再次强调:在审阅中的稿件,作者如欲改投他刊,请立刻与本刊联系说明原因,如发现一稿两投的情况,视为学术不端,我们将严肃处理,通报所有相关杂志和该作者单位,并予以披露。本刊一般不退原稿,请作者自留底稿。

如有疑问,请拨打编辑部电话咨询,电话:(027)85726342-8018。

《临床泌尿外科杂志》编辑部