

腺嘌呤所致大鼠慢性肾功能衰竭肾组织中 TGF- β 1、TSP-1、VEGF 的表达

王国强, 陈卫东

[摘要] **目的:**探讨腺嘌呤所致大鼠慢性肾功能衰竭(chronic renal failure, CRF)肾组织中转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、血小板反应因子-1(thrombospondin-1, TSP-1)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达情况。**方法:**雄性 SD 大鼠 60 只,随机分为两组:模型组($n=30$),以 2.5% 腺嘌呤悬液灌胃;正常对照组($n=30$),给相同体积淀粉溶液灌胃。两组分别于 7 天、14 天、21 天留尿标本后,各处死大鼠 10 只,取血、肾脏标本。测定体重(BW)、24 h 尿蛋白定量(24 h U-TP)、尿 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)、肾重指数(肾脏重量/体重, KI)、血肌酐(SCr)、血尿素氮(BUN)、白蛋白(ALB),光镜下观察肾组织的病理变化,免疫组织化学法检测肾脏、TGF- β 1、TSP-1、VEGF 的表达情况。**结果:**7 天时模型组大鼠与同时相点对照组相比, BW 增加缓慢($P < 0.01$), ALB 无明显变化;14 天和 21 天时模型组大鼠与同时相点对照组和前一相点自身对照比较, BW 明显下降($P < 0.01$), 血 ALB 明显降低($P < 0.01$);7 天、14 天和 21 天时模型组大鼠 24 h U-TP、KI、尿 NAG、SCr、BUN 呈进行性升高($P < 0.01$)。7 天、14 天和 21 天时模型组大鼠 TGF- β 1 和 TSP-1 表达均呈进行性增高($P < 0.01$)。在对照组肾组织中, VEGF 广泛表达于肾小管上皮细胞及足突细胞,随着肾间质病理损害程度加重,模型组肾组织中 VEGF 的表达逐渐减少。在模型组大鼠各时相点中,肾间质 TGF- β 1 表达量与肾小管 TGF- β 1 表达量呈显著正相关($r_s = 0.940, P < 0.01$);肾小管 VEGF 与 TGF- β 1 表达量呈显著负相关($r_s = -0.945, P < 0.01$),同时与肾间质 TSP-1 呈显著负相关($r_s = -0.923, P < 0.01$)。各时相点对照组各指标无明显改变。**结论:**TSP-1-TGF- β 1 轴表达增强促使肾间质纤维化发生、发展,推测 TSP-1 在腺嘌呤灌胃法制备 CRF 模型中可能具有重要作用;VEGF 表达下降也是导致肾间质纤维化发生、发展因素。

[关键词] 肾功能衰竭,慢性;肾间质;转化生长因子- β 1;血小板反应因子-1;血管内皮生长因子

[中国图书资料分类法分类号] R 692.5

[文献标识码] A

The expressions of transforming growth factor- β 1, thrombospondin-1 and vascular endothelial growth factor in rat renal tissue in adenine-induced chronic renal failure

WANG Guo-qiang, CHEN Wei-dong

(Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the expressions of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), thrombospondin-1 (TSP-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in rat renal tissue in adenine induced chronic renal failure (CRF). **Methods:** Sixty male SD rats were randomly divided into two groups: model group ($n=30$), 2.5% Adenine solution was administered by gastric gavage daily; control group ($n=30$), the same volume starch solution was administered by gastric gavage daily. At the 7th, 14th and 21th day, ten rats in every group were sacrificed. Urine sample, blood sample and kidney tissue were reserved. The body weight (BW), kidney weight/body weight index (KI), the levels of 24 hours urine protein (24 h U-TP), N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) in urine sample, blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (SCr) and blood albumin (ALB) in blood sample were examined. The histological changes of kidney were observed by light microscopy, and the expressions of TGF- β 1, TSP-1, VEGF were examined by immunohistochemical method.

Results: At the 7th day, rat BW in model group was increased slowly than that in control group ($P < 0.01$); ALB was no significant change in these two groups. At the 14th and 21th day, BW and ALB in model group were decreased clearly than those in the same group at 7th day ($P < 0.01$); At 7th, 14th and 21th day, the levels of 24 h U-TP, NAG, BUN and SCr in model group were progressively increased ($P < 0.01$). And the expressions of TGF- β 1 and TSP-1 were also progressively increased. In control group, VEGF was broadly expressed in renal tubular epithelial cells and podocytes. With the aggravation of pathological injury in renal tubulointerstitial tissue, VEGF expression was decreased in model group. In different times in model group, the expressions of TGF- β 1 in renal tubulointerstitial tissue and tubule were positive correlation ($r_s = 0.940, P < 0.01$). The expression of VEGF in renal tubule was negative correlation with the expression of TGF- β 1 in renal tubule ($r_s = -0.945, P < 0.01$) and TSP-1 in renal tubulointerstitial tissue ($r_s = -0.923, P < 0.01$). **Conclusions:** The increase of TSP-1-TGF- β 1 axis expressions enhanced renal interstitial fibrosis and development, the TSP-1 may play an important role in adenine induced chronic renal failure; the decline of VEGF expression also led to

renal interstitial fibrosis.

[收稿日期] 2009-03-23

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 肾病科, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 王国强(1980-),男,硕士研究生。

[通讯作者] 陈卫东, 研究生导师, 主任医师。

[Key words] renal failure, chronic; tubulointerstitial; transforming growth factor- β 1; thrombospondin-1; vascular endothelial growth factor

慢性肾功能衰竭(chronic renal failure, CRF)是指所有原发病或继发性慢性肾脏疾患致进行性肾功能损害所出现的一系列症状或代谢紊乱组成的临床综合征,研究其进行性发展的机制,阻断或延缓肾病进行性毁损速度,保护残余肾功能,具有重要的意义。制作符合人类 CRF 的动物模型,对研究 CRF 的发病机制,探讨组织形态的变化与生化指标及临床表现的相互关系,筛选有效药物(特别是中草药),阐明疗效机制均有重要作用。本实验用腺嘌呤悬混液给大鼠灌胃制作 CRF 模型,采用免疫组织化学技术,动态观察转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)、血小板反应因子-1 (thrombospondin-1, TSP-1)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在肾组织中的表达情况,以探讨腺嘌呤所致大鼠慢性肾功能衰竭的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 Sprague-Dawley 大鼠,雄性,60 只,体重 220 ~ 260 g 由浙江省动物实验中心提供(实验动物质量合格证号: NO. 浙: 00S-001)。腺嘌呤 (Adenine, 99.8%): 购于 Sigma 公司(分装,批号: 200908);兔抗大鼠 TGF- $\beta 1$ 多克隆抗体、小鼠抗大鼠血小板反应因子 (TSP-1) 单克隆抗体、兔抗大鼠 VEGF 多克隆抗体均购自武汉博士德生物有限公司;生物素化山羊抗小鼠 IgG/山羊抗兔 IgG、 H_2O_2 -氨基联苯胺 (DAB)、链霉亲和素-生物素-辣根过氧化物酶复合物工作液均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,随机分为 2 组:模型组以 2% 的淀粉溶液将腺嘌呤配成 2.5% 腺嘌呤悬混液,按 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 清晨灌胃^[1-2];正常对照组给相同体积 2% 的淀粉溶液按上述时间清晨灌胃。两组分别于 7 天、14 天、21 天留取尿标本后,各处死大鼠 10 只,取血、肾脏标本。

1.2.2 生化等实验室检测 测定体重 (BW)、24 h 尿蛋白定量 (24 h U-TP)、尿 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶 (NAG)、肾重指数 (肾脏重量/体重, KI)、肌酐 (SCr)、尿素氮 (BUN)、血白蛋白 (ALB)。

1.2.3 病理观察 取肾脏后,经 10% 甲醛缓冲液固定,经 TSJ-Q 型全自动封闭组织脱水机脱水后,浸蜡,石蜡包埋,制成 $4 \mu\text{m}$ 厚组织切片,分别进行 HE 和 MASSON 染色,观察肾小管-间质病理形态学改变。

1.2.4 免疫组织化学染色 采用链霉亲和素-生物素复合物技术。肾组织经常规脱水、包埋、切片后,脱腊至水。 $4 \mu\text{m}$ 厚组织切片用 3% 过氧化氢-甲醇封闭内源性过氧化物酶 15 min,微波炉 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 4 min 修复抗原。血清封闭 20 min,加入第一抗体(稀释度 TGF- $\beta 1$ 、TSP-1、VEGF 分别为 1:50、1:70、1:100), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。再顺序滴加生物素标记第二抗原($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 孵育 30 min)及辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 孵育 20 min), H_2O_2 -DAB 显色,苏木素复染细胞核。实验同时以磷酸盐缓冲液代替第一抗体作阴性对照。

1.2.5 免疫组织化学图像分析 应有多功能病理图像分析系统进行检测及分析。光学显微镜($\times 400$)随机采集肾皮质图像,共 20 个视野,测量肾小管阳性染色面积,计算肾小管相对阳性面积(肾小管阳性面积与统计场面积比值%)。以上选取的肾皮质均不包含肾小球及较大动脉。

1.3 统计学方法 采用方差分析、 q 检验和等级相关分析。

2 结果

2.1 生化指标 7 天时模型组大鼠体重均低于同时相点对照组 ($P < 0.01$), ALB 无明显变化;14 天和 21 天时模型组大鼠与同时相点对照组和前一时相点自身对照比较, BW 均明显下降 ($P < 0.01$), 血 ALB 均明显降低 ($P < 0.01$);7 天、14 天和 21 天时模型组大鼠 24 h U-TP、KI、尿 NAG、SCr、BUN 呈进行性升高 ($P < 0.01$)。各时相点对照组除体重增加外 ($P < 0.01$), 其余指标均无明显改变(见表 1、2)。

2.2 肾组织病理改变 对照组肾小管间质基本正常,未见明显病变。模型组,实验 7 天时,肾小管扩张,间质单核细胞浸润、水肿,可见间质纤维组织灶性增生。14 天时,肾小管扩张明显,肾小管上皮空泡或颗粒性变性,基底膜断裂,小管间质区域增宽,纤维化明显。21 天时,可见肾小管明显萎缩及消失,间质广泛纤维化(见图 1)。

2.3 肾组织免疫组织化学变化

2.3.1 TGF- $\beta 1$ 在肾组织表达比较 正常对照组大鼠肾小管上皮细胞中偶见 TGF- $\beta 1$ 表达。与对照组同一时相点比较,模型组大鼠 7 天时 TGF- $\beta 1$ 表达已明显增多 ($P < 0.01$),随着病变程度加重,14 天、21 天时表达量进一步增加 ($P < 0.01$),主要分布于肾小管上皮细胞、间质成纤维细胞胞质中、间质基质区和炎性细胞大量浸润区,有时可见于间质小血管周围和血管内皮细胞中,以皮质肾小管为著(见表 3、图 2)。

表 1 模型组和对照组大鼠在不同时相点 BW、24 h U-TP、KI、尿 NAG 变化($n_i = 10; \bar{x} \pm s$)

分组	体重(g)	24 h U-TP(mg)	肾重指数($\times 10^{-3}$)	尿 NAG(u/mmol)	
对照组	7 天	299.70 \pm 6.12	7.21 \pm 0.49	5.15 \pm 0.15	3.89 \pm 0.07
	14 天	319.20 \pm 4.62 **	7.39 \pm 0.37	5.18 \pm 0.17	3.92 \pm 0.14
	21 天	357.50 \pm 8.00 ▲▲	7.32 \pm 0.44	5.21 \pm 0.14	3.87 \pm 0.20
	F	211.24	0.43	0.38	0.29
	P	<0.01	>0.05	>0.05	>0.05
MS _{组内}	40.933	0.190	0.024	0.022	
模型组	7 天	269.92 \pm 4.47 **	24.64 \pm 1.25 **	8.19 \pm 0.25 **	15.03 \pm 0.56 **
	14 天	261.00 \pm 8.40 **	32.06 \pm 0.59 **	15.98 \pm 0.53 **	19.80 \pm 0.74 **
	21 天	232.00 \pm 4.60 ▲▲	32.68 \pm 0.44 **	21.16 \pm 0.55 ▲▲	24.16 \pm 0.63 ▲▲
	F	105.57	285.34	1979.70	497.26
	P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MS _{组内}	37.234	0.701	0.215	0.419	

q 检验:与同组 7 天比较, ** $P < 0.01$;与同组 14 天比较, ▲▲ $P < 0.01$;与对照组相同时间比较, ## $P < 0.01$

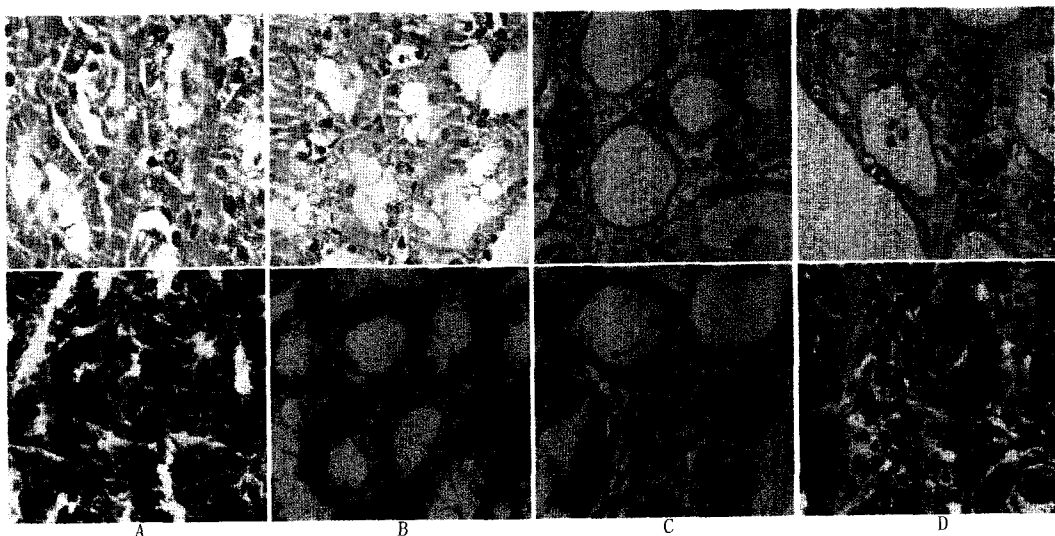
表 2 模型组和对照组大鼠在不同时相点 BUN、SCr、血 ALB 变化($n_i = 10; \bar{x} \pm s$)

分组	BUN(mmol/L)	SCr(μ mol/L)	血 ALB(g/L)	
对照组	7 天	7.03 \pm 0.42	22.07 \pm 1.50	26.61 \pm 0.73
	14 天	7.21 \pm 0.63	23.57 \pm 2.01	26.73 \pm 0.39
	21 天	7.39 \pm 0.52	23.82 \pm 2.18	27.14 \pm 0.77
	F	1.15	2.43	1.81
	P	>0.05	>0.05	>0.05
MS _{组内}	0.281	3.681	0.426	
模型组	7 天	20.51 \pm 1.17 **	65.20 \pm 5.28 **	26.28 \pm 0.54
	14 天	30.26 \pm 1.83 **	133.33 \pm 10.81 **	24.89 \pm 0.56 **
	21 天	44.51 \pm 1.80 ▲▲	188.67 \pm 13.36 ▲▲	21.22 \pm 0.60 ▲▲
	F	549.23	355.00	212.42
	P	<0.01	<0.01	<0.01
MS _{组内}	2.653	107.741	0.322	

q 检验:与同组 7 天比较, ** $P < 0.01$;与同组 14 天比较, ▲▲ $P < 0.01$;与对照组相同时间比较, ## $P < 0.01$

2.3.2 TSP-1 在肾组织表达比较 TSP-1 在正常对照组中,仅少量表达于肾小球壁层及肾间质。与对照组同一时相点比较,模型组大鼠第 7 天时 TSP-1 表达已明显增多($P < 0.01$),随着病变程度加重,第 14 天、21 天时模型组大鼠 TSP-1 表达量进一步增加($P < 0.01$),广泛分布于从近端小管到髓质集合管处的上皮细胞胞质中,呈黄色或棕黄色(见表 3、图 2)。

2.3.3 VEGF 在肾组织表达比较 在正常对照组肾组织中,VEGF 广泛表达于肾小管上皮细胞及足突细胞,呈黄色颗粒状分布于细胞胞质中;随着肾间质病理损害程度加重,VEGF 的表达逐渐减少,21 天时模型组中,仅在少许肾小管上皮细胞中呈弱阳性($P < 0.01$)(见表 3、图 2)。



A: 对照组;B: 模型组第 7 天;C: 模型组第 14 天;D: 模型组第 21 天。上行为 HE 染色,下行为 MASSON 染色
图 1 HE 和 MASSON 染色肾脏病理组织学变化

表3 模型组和对照组大鼠在不同时相点 TGF-β1、TSP-1、VEGF 比较($n_i = 10; \bar{x} \pm s$)

分组	TGF-β1	TSP-1	VEGF
对照组 7天	1.14 ± 0.09	1.29 ± 0.12	33.87 ± 0.31
14天	1.37 ± 0.11**	1.31 ± 0.22	34.20 ± 0.35*
21天	1.41 ± 0.13**	1.37 ± 0.26	34.37 ± 0.29**
F	17.17	0.40	6.41
P	<0.01	>0.05	<0.01
MS _{组内}	0.012	0.044	0.101
模型组 7天	17.13 ± 0.31##	15.74 ± 0.32##	21.01 ± 0.48##
14天	26.52 ± 0.42***	25.00 ± 0.23***	7.62 ± 0.24***
21天	39.91 ± 0.51▲▲##	39.22 ± 0.61▲▲##	1.66 ± 0.14▲▲##
F	7382.58	7956.64	9577.96
P	<0.01	<0.01	<0.01
MS _{组内}	0.178	0.176	0.103

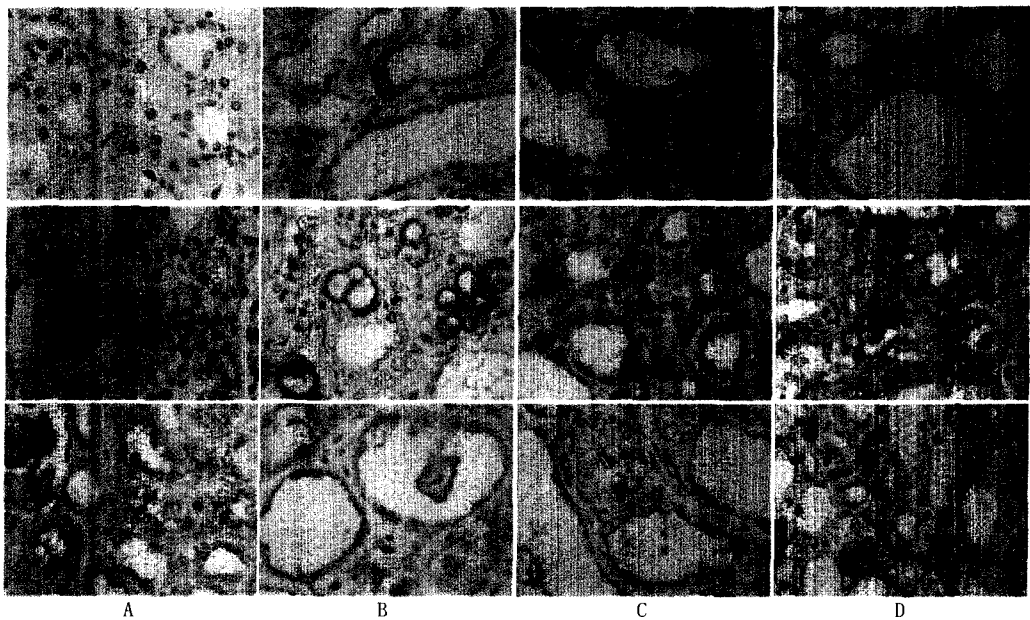
q 检验:与同组7天比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与同组14天比较,▲▲ $P < 0.01$;与对照组相同时间比较:## $P < 0.01$

2.3.4 各免疫组织化学染色指标表达量的相关性分析 在模型组大鼠中:肾间质 TSP-1 表达量与肾小管 TGF-β1 表达量呈显著正相关关系($r_s = 0.940, P < 0.01$)。肾小管 VEGF 与 TGF-β1 表达量呈显著负相关关系($r_s = -0.945, P < 0.01$),同时与肾间质 TSP-1 呈显著负相关关系($r_s = -0.923, P < 0.01$)。

3 讨论

自20世纪80年代由日本学者研制成功,2003年我国楚非等^[1]以灌胃法成功复制了腺嘌呤制作SD大鼠CRF的动物模型后,该法在国内成为CRF大鼠模型的常用制备方法之一。然而,该模型肾小管间质纤维化的发生是个复杂的病理生理过程,其机制尚未完全清楚。

近年大量研究显示,TGF-β1 是最重要的一种强效的致纤维化因子,它参与了肾间质纤维化的各个



A: 正常对照组;B: 模型组第7天;C: 模型组第14天;D: 模型组第21天。上行为 TGF-β1, 中行为 TSP-1, 下行为 VEGF

图2 TGF-β1、TSP-1、VEGF 染色肾脏病理组织学变化

环节。研究表明,在急性嘌呤霉素氨基核苷肾病模型中近端肾小管的 TGF-β1 mRNA 的表达量是正常的3倍。Geleilate 等^[3]在庆大霉素肾纤维化大鼠模型中也同样发现 TGF-β1 的升高,其参与了细胞外基质(ECM)的沉积和肾间质纤维化过程。Ogata 等^[4]研究结果显示,单侧输尿管梗阻大鼠模型 TGF-β1 表达增强,梗阻解除后肾纤维化缓解,IV型胶原表达下降,TGF-β1 表达亦下降,证明 TGF-β1 在梗阻侧肾脏促进 ECM 的合成。Ling 等^[5]研究表明,TGF-β1 在环孢菌素 A 肾病中起着重要作用。另外,TGF-β1 可干扰正常的细胞周期,诱导周期数依

赖蛋白激酶(CDK)抑制剂如 p27kip1 和 p21,后者可抑制 CDK 的激活,使细胞停留在 G1 阶段,引起细胞肥大^[6]。在成纤维细胞,TGF-β1 与结缔组织生长因子共同作用能明显提高 α1 型胶原、α5 整合素和纤维结合素的转录,促进 ECM 的沉积^[7]。本实验结果显示,第7天时肾小管上皮细胞及间质细胞中有大量 TGF-β1 表达,与同时相点正常对照组有统计学意义($P < 0.01$),第14天和第21天时肾小管上皮细胞及间质细胞中 TGF-β1 表达进一步增强,说明 TGF-β1 在肾小管间质纤维化过程中作用明显。

TSP-1 是一种 ECM 糖蛋白,能由多种肾脏细胞

(如肾小管上皮细胞、肾间质成纤维细胞及浸润入肾组织的巨噬细胞等)分泌并释放到肾间质^[8-9],具有复杂的生物学功能。它可与细胞表面受体、蛋白酶及 ECM 发生作用,可刺激细胞增生,并参与胚胎发育、组织分化、细胞迁移、血管生成、炎症以及凝血与纤溶等病理生理过程^[10]。TSP-1 是 TGF- β 1 的主要激活物,肾间质中 TSP-1 能与 TGF- β 1 前体复合物中潜在相关肽(LAP)及 TGF- β 1 结合,形成新的 TSP-1-LAP-TGF- β 1 复合物,发生内部构象改变,从而 TGF- β 1 产生活性^[9,11-12]。该具有活性的 TGF- β 1 能够与其受体结合,发挥生物学效应^[9],能强有力地促进 Col I 等 ECM 合成,并能通过减少基质降解酶(如 MMPs)生成及增加基质降解酶抑制物(如 TIMPs)合成而抑制 ECM 降解,导致肾间质 ECM(包括 Col I)蓄积,促进纤维化发生^[13]。另外,TGF- β 1 还对 TSP-1 具有正反馈效应,促进 TSP-1 合成^[14-15]。为此,Hugo 等^[9]提出了“TSP-1-TGF- β 1 轴”概念,并证实它在肾脏纤维化中具有重要致病作用。本实验结果显示,正常对照组 TSP-1 几乎无阳性表达,模型组大鼠 7 天时肾小管上皮细胞及间质细胞中有大量 TSP-1 表达,与同时相对照组有统计学意义($P < 0.01$),14 天时肾小管上皮细胞及间质细胞中 TSP-1 表达进一步增强,而到 21 天时增强更明显,说明 TSP-1 在肾小管间质纤维化的过程中作用明显。因此可以推测,肾脏 TSP-1-TGF- β 1 轴在腺嘌呤灌胃法制备 CRF 模型中可能发挥重要作用。

本实验研究发现,正常对照组中,肾小管间质 TSP-1 无阳性表达,而 VEGF 广泛表达于肾小管上皮细胞及足突细胞胞质中。随着肾间质病理损伤程度加重,TSP-1 表达增加,而 VEGF 表达下降;尤其在模型组 21 天时,TSP-1 表达明显增强,VEGF 表达却明显减弱,两者呈显著负相关关系($P < 0.01$),这种变化趋势与肾间质纤维化程度相一致,这可能与 TSP-1 通过与 VEGF 竞争结合微血管内皮细胞上的硫酸乙酰肝素结合位点,或直接结合 VEGF 两种方式抑制 VEGF 促血管生成作用有关^[16]。用抗体阻断 TSP-1 的 type I 重复序列与硫酸乙酰肝素结合,能抑制 TSP-1 对 VEGF 的结合,也能解除对 VEGF 促血管生成效应的抑制作用^[17]。在肾间质纤维化进程中,TSP-1 通过 CD36 分子-Src 家族蛋白激酶 p59fyn-caspase-3 样蛋白水解酶-p38 分裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)级联反应,诱导内皮细胞凋亡,抑制血管新生,致毛细血管数量减少^[18];VEGF 则与其受体结合后引起受体的酪氨酸激酶激活,充当第二信使促进血管生成,维持毛细血管数量相对稳定^[19],推测 VEGF 表达下降及 TSP-1 表达增强共同

导致了促血管生成效应减弱,肾小管周围毛细血管数量减少致肾间质缺氧加重,缺氧进一步促进肾小管上皮细胞、间质细胞活化,分泌致纤维化细胞因子,直接调控纤维化相关基因,促进 ECM 的积聚,抑制 ECM 降解,进而影响肾间质纤维化发生、发展^[20]。

此外,VEGF 能促进血管内皮细胞增殖及血管形成,它还能拮抗 TGF- β 1 的一些致纤维化效应^[21]。肾小管上皮细胞合成和分泌的 VEGF 能受多种因素调节,其中缺血(缺血可促进低氧诱导因子 1 分泌,进而刺激 VEGF 高表达)及 TGF- β 1 都是重要的刺激因子^[22-23]。在老年肾模型中观察到,肾小管周围毛细血管丢失所导致的缺血可引起皮质肾小管 VEGF 代偿性的表达增高^[24]。而在本实验中,从模型组 7 天时发现,肾小管上皮细胞中 VEGF 表达即呈显著性降低,未见到代偿性增加,且与肾小管 TGF- β 1 表达呈显著负相关关系($P < 0.01$)。这些结果提示,模型组在实验第 7 天时已经超出了代偿期。

总之,腺嘌呤制备的 CRF 大鼠动物模型其病理机制包括肾脏炎症性免疫反应与嘌呤物质积蓄而发生的一系列复杂的至纤维化的病理过程。本研究观察到 TSP-1-TGF- β 1 轴表达增强促使肾间质纤维化发生、发展,故初步推论 TSP-1 在腺嘌呤灌胃法制备 CRF 模型中可能具有重要作用。此外,VEGF 表达下降也是导致肾间质纤维化发生、发展因素。不过,本文仅进行了肾组织免疫组织化学研究,受方法限制此推论还需今后进一步验证。

[参 考 文 献]

- [1] 楚非,邹万忠,孙锁柱,等. 大鼠肾小管间质纤维化中肾小管上皮细胞表型转化的研究[J]. 中华肾脏病杂志,2003,19(1):10-14.
- [2] 赵德安,杨达胜,毕凌云,等. 百令胶囊对肾小管间质纤维化大鼠肾小管上皮-间质转分化的干预作用[J]. 实用儿科临床杂志,2005,20(9):939-942.
- [3] Geleilate TJ, Melo GC, Costa RS, et al. Role of myofibroblasts, macrophages, transforming growth factor-beta endothelin, angiotensin-II, and fibronectin in the progression of tubulointerstitial nephritis induced by gentamicin[J]. J Nephrol, 2002,15(6):633-642.
- [4] Ogata Y, Ishidoya S, Fukuzaki A, et al. Upregulated expression of transforming growth factor-beta, type IV collagen, and plasminogen activator inhibitor-1 mRNA are decreased after release of unilateral ureteral obstruction[J]. Tohoku J EXP Med, 2002,197(3):159-168.
- [5] Ling H, Li XM, Wang W, et al. Therapeutic role of TGF- β -Neutralizing Antibody in mouse cyclosporin a nephropathy: morphologic improvement associated with functional preservation[J]. J Am Soc Nephrol,2003,14(2):377-388.

- [6] Wahab NA, Yevdokimova N, Weston BS, *et al.* Role of connective tissue growth factor in the pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. *Biochem J*, 2001, 359(Pt 1): 77-87.
- [7] Frazier K, Williams S, Kothapalli D, *et al.* Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor [J]. *J Invest Dermatol*, 1996, 107(3): 404-411.
- [8] Kang DH, Kanellis J, Hugo C, *et al.* Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(3): 806-816.
- [9] Hugo C. The thrombospondin 1-TGF- β axis in fibrotic renal disease [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2003, 18(7): 1241-1245.
- [10] Bornstein P. Diversity of function is inherent in matrixcellular proteins: an appraisal of thrombospondin-1 [J]. *Cell Biol*, 1995, 130(3): 503-506.
- [11] Yevdokimova N, Waha NA, Mason RM, *et al.* Thrombospondin-1 is the key activator of TGF- β 1 in human mesangial cells exposed to high glucose [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2001, 12(4): 703-712.
- [12] Daniel C, Wiede J, Krutzsch HC, *et al.* Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β in fibrotic renal disease in the rat *in vivo* [J]. *Kidney Int*, 2004, 65(2): 459-468.
- [13] Douthwaite JA, Johnson TS, Haylor JL, *et al.* Effects of transforming growth factor- β 1 on renal extracellular matrix components and their regulating proteins [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1999, 10(10): 2109-2119.
- [14] Nskagawa T, Li JH, Garcia G, *et al.* TGF- β induces proangiogenic and antiangiogenic factors via parallel but distinct Smad pathways [J]. *Kidney Int*, 2004, 66(4): 605-613.
- [15] Nakagawa T, Lan HY, Glushakova O, *et al.* Role of ERK 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases in the regulation of thrombospondin-1 by TGF- β 1 in rat proximal tubular cells and mouse fibroblasts [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(4): 899-904.
- [16] Hansen L, Arden KC, Rasmussen SB, *et al.* Chromosomal mapping and mutational analysis of the coding region of the glycogen synthase kinase-3 α and β isoforms in patients with NIDDM [J]. *Diabetologia*, 1997, 40(8): 940-946.
- [17] Gupta K, Gupta P, Wild R, *et al.* Binding and displacement of vascular endothelial growth factor (VEGF) by thrombospondin effect on human microvascular endothelial cell proliferation and angiogenesis [J]. *Angiogenesis*, 1999, 3(2): 147-158.
- [18] Bachelder RE, Yoon SO, Franci C, *et al.* Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of snail transcription implications for the epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Cell Biol*, 2005, 168(1): 29-33.
- [19] Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17(5): 548-558.
- [20] Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(1): 112.
- [21] Yamanuchi K, Nishimura Y, Shigematsu S, *et al.* Vascular endothelial cell growth factor attenuates actions of transforming growth factor- β in human endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(53): 55104-55108.
- [22] Nakagawa T, Lan HY, Zhu HJ, *et al.* Differential regulation of VEGF by TGF- β and hypoxia in rat proximal tubular cells [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004, 287(4): F658-F664.
- [23] Hellwig-Burgel T, Stiehl DP, Katschinski DM, *et al.* VEGF production by primary human renal proximal tubular cells: requirement of HIF-1, PI3-kinase and MAPKK-1 signaling [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2005, 15(11): 99-108.
- [24] Kang DH, Anderson S, Kim YG, *et al.* Impaired angiogenesis in the aging kidney: vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in renal disease [J]. *Am J Kidney Dis*, 2001, 12(7): 601-611.

校 对 须 知

为了进一步提高校对质量,维护本刊和作者的学术信誉,减少出刊差错,凡在本刊发表的论文,刊出前均须作者亲自校对。具体要求如下:

- 1 本着严谨求实的学风,请通读全文,对样稿中责任编辑提出的问题(有“?”处)请补充、核实。
- 2 在未征得责任编辑同意的情况下,除原则性、科学性差错需要改动外,一般不要作大段增删文字的改动。
- 3 请核实作者简介,包括出生年,性别,民族(汉族可省略),职称。
- 4 请注意医学论文的规范表达,对样稿中的标点符号、药物名称(请用正规名称,不用商品名)、医学名词、法定计量单位及药物剂量认真核实。
- 5 认真核实所引用的文献是否正确,并核查文内角码是否与文末文献序号相对应。参考文献缺项的内容请务必参照本刊格式核实、补充。
- 6 请用红笔直接在校样上修改,勿需重新打字,并在校样上签名(以示对文章负责)。