

反复注射顺铂诱导小鼠慢性肾功能不全模型的建立

黄统生[#], 郭赞[#], 杨陈^{*}, 安宁, 叶霖, 唐皓璇, 黄希杰,
许勇芝, 潘庆军, 刘华锋^{*}

(广东医科大学附属医院肾病研究所, 湛江市慢性肾脏病防控重点实验室, 湛江 524001)

【摘要】 目的 构建慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD) C57BL/6 小鼠模型, 探索其小管损伤指标和间质纤维化程度随顺铂造模剂量的改变, 为研究从 AKI 到 CKD 进展过程提供动物实验依据。**方法** 将 24 只 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠随机平均分为对照组和低、中、高剂量顺铂模型组。模型组小鼠按 5、7、10 mg/kg 顺铂腹腔注射给药, 每周 1 次, 连续注射 4 周构建模型。处死小鼠后, 留取标本进行相关检测。检测血浆肌酐和 24 h 尿蛋白排量来评估小鼠肾功能; PAS 染色观察肾脏病理学变化; 免疫组化检测肾损伤分子 1(KIM-1) 和尿液检测 N-乙酰-β-D 氨基葡萄糖苷酶(NAG) 水平以评估肾小管损伤情况; 免疫组化法检测肾脏 CD3 阳性 T 细胞和免疫荧光法检测 F4/80 阳性巨噬细胞浸润情况; 天狼星红染色、免疫组化法检测胶原 I 和 α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA) 表达以评估肾脏纤维化情况。**结果** 与正常对照组相比, 随着注射顺铂浓度的升高, 小鼠肾脏损伤越明显, 其中 10 mg/kg 顺铂高剂量组最为显著。与对照组相比, 顺铂高剂量组小鼠肾功能下降, 表现为血浆肌酐浓度和 24 h 尿蛋白排量显著升高($P < 0.05$ 和 $P < 0.001$); 肾小管上皮细胞坏死、空泡变性等病理学改变显著, 肾组织 KIM-1 表达显著上升($P < 0.05$), 尿 NAG 水平升高; 肾组织浸润的 CD3 阳性 T 细胞和 F4/80 阳性巨噬细胞增多; 肾组织天狼星红染色阳性胶原纤维区域显著增多($P < 0.001$), 胶原 I 和 α-SMA 表达也明显增多($P < 0.01$), 肾小管-间质发生纤维化。**结论** 反复注射 4 周 10 mg/kg 顺铂可诱导小鼠慢性肾功能不全模型, 可为研究 AKI 向 CKD 的转化机制提供了新的实验模型。

【关键词】 慢性肾功能不全; 肾小管-间质损伤; 顺铂; 巨噬细胞; 肾损伤分子 1; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 01-0020-09

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.01.004

Establishment of a mouse model of chronic renal insufficiency induced by repeated administration of cisplatin

HUANG Tongsheng[#], GUO Yun[#], YANG Chen^{*}, AN Ning, YE Lin, TANG Haoxuan, HUANG Xijie,
XU Yongzhi, PAN Qingjun, LIU Huafeng^{*}

(Institute of Nephrology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, and Key Laboratory of Prevention and Management of Chronic Kidney Disease of Zhanjiang City, Zhanjiang 524001, China)

Corresponding author: YANG Chen. E-mail: yangchen307@126.com. LIU Huafeng. E-mail: hf-liu@263.net.

【Abstract】 Objective To observe the changes of renal tubular injury and the extent of interstitial fibrosis in the C57BL/6 mouse models of chronic kidney disease (CKD), and provide experimental animal evidence for study of the progression of acute kidney injury (AKI) to chronic kidney disease as well as its mechanisms. **Methods** Twenty-four 8-

【基金项目】 国家自然科学基金(No. 81471530, No. 81470959); 广东省医学科研基金(No. A2016135)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(No. 81471530, No. 81470959); Medical Scientific Research Foundation of Guangdong Province(No. A2016135)。

【作者简介】 黄统生(1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 肾小管间质纤维化。E-mail: 1141818099@qq.com; 郭赞(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 肾小管间质纤维化。E-mail: 853582250@qq.com。#共同第一作者

【通信作者】 杨陈, 博士, 助理研究员, 从事免疫相关肾小球疾病研究, E-mail: yangchen307@126.com; 刘华锋, 博士, 教授, 从事肾小管-间质损伤及防治研究, E-mail: hf-liu@263.net。* 共同通信

week-old male C57BL/6 mice were randomly and equally divided into control group, low-dose, medium-dose, and high-dose cisplatin groups, 6 mice in each group. Mice in the cisplatin groups were administrated with 5, 7 or 10 mg/kg cisplatin by intraperitoneal injection once a week for 4 weeks. Plasma creatinine and 24-hour urinary protein were detected to assess the renal function. The mice were sacrificed, and plasma and kidney samples were collected for subsequent tests. Pathological changes were observed using periodic acid-Schiff (PAS) staining. To evaluate renal tubules injury, the expression of kidney injury molecule 1 (KIM-1) was examined by immunohistochemistry and the level of urinary N-Acetyl- β -D-glucosaminidase was detected with a commercial kit. The infiltration of CD3-positive T cells and F4/80-positive macrophages was observed by immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence. The expression of collagen I and α -smooth muscle actin (α -SMA) were tested by immunohistochemistry to assess the renal fibrosis, while total kidney collagen was detected by Picrosirius red staining. **Results** In contrast to the normal control group, the kidney injury became more serious in the cisplatin-treated mice as cisplatin concentration increased. Particularly, significant kidney damage was observed in the high-dose cisplatin group. Compared with the control group, the plasma creatinine and 24-hour urinary protein were significantly increased in the high-dose cisplatin group ($P < 0.05$ and $P < 0.001$) indicating impaired renal function. Morphologically, numerous clear vacuoles and necrosis were present in renal tubule epithelial cells in the high-dose cisplatin group. The expression of KIM-1 was markedly up-regulated and the level of urinary NAG was elevated. Infiltration of CD3-positive T cells and F4/80-positive macrophages was enhanced in the mice of high-dose cisplatin group. Data from immunohistochemistry and picrosirius red staining showed that mice of the high-dose cisplatin group developed renal fibrosis evidenced by markedly up-regulated expression of collagen I and α -SMA. **Conclusions** Repeated administration of 10 mg/kg cisplatin for 4 weeks can induce chronic renal insufficiency in mice, which may serve as a novel model for the research on underlying mechanisms of progression from acute kidney injury to chronic kidney disease.

[Key words] chronic renal insufficiency; tubulo-interstitial injury; cisplatin; macrophage; kidney injury molecule 1; mice

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是指各种原因引起的肾功能快速丢失为特点的临床综合征^[1]。除具有较高的死亡风险外, AKI 患者远期预后很差,常进展成慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)和终末期肾脏疾病(end stage renal disease, ESRD)^[2]。由于 AKI 向 CKD 转化的机制尚未阐明,因此针对性的改善 AKI 转归的治疗方法仍十分缺乏。

目前可用于研究 AKI 向 CKD 转化时肾脏病理生理学改变和机制的动物模型非常少。缺血再灌注、肾毒性物质以及脓毒血症等刺激因素引起的 AKI 动物模型大多应用在急性期肾损伤研究,难以观察到 AKI 向 CKD 转化的过程。因此,需要建立一些更好地反映 AKI 向 CKD 转化过程的动物模型,以阐明 AKI 向 CKD 转化机制,研发针对性治疗策略。

顺铂(cisplatin)是临床上常用的治疗实体瘤的一种化疗药物,具有剂量依赖的肾毒性^[3]。小鼠单次大剂量(>25 mg/kg)注射顺铂,可构建模拟肾毒性物质引起的 AKI 模型。但此模型导致肾损伤过于严重,动物死亡率高,无法用于 AKI 向 CKD 转化的相关研究^[4]。既往报道庆大霉素可诱导大鼠肾

小管间质纤维化模型^[5],还有通过口服腺嘌呤^[6]、肾大部切除和肾梗死制备的大鼠 5/6 肾切除模型^[7]、单侧输尿管梗阻模型^[8]等方法建立慢性肾功能不全的动物模型。此外,Daisuke 等^[9]报道了顺铂可导致肾小管间质纤维化。结合既往研究报道,我们在本实验中,采用小剂量反复注射顺铂的方法,引起小鼠慢性肾功能不全的表现,有望为研究 AKI 向 CKD 的转化机制提供了新的模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本实验采用 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠(8 周龄,体重 22 ~ 23 g)作为实验对象,由广东省实验动物中心提供【SCXK(粤)2013-0002】,饲养于广东医科大学实验动物中心屏障环境中【SYXK(粤)2015-0147】,环境温度为(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度为 50% ~ 70%,12 h 光照阴暗交替。本实验得到广东医科大学动物伦理委员会许可(伦理审查批准编号:GDY1702001),所有动物实验操作均按照广东医科大学实验动物中心的操作指南执行,并符合中华人民共和国《实验动物管理条例》。

1.1.2 试剂

顺铂和天狼星红染料购买于美国 Sigma 公司;肌酐检测试剂盒和 N-乙酰- β -D 氨基葡萄糖苷酶(N-acetyl- β -D-glucosaminidase, NAG)试剂盒购买于南京建成生物科技有限公司;山羊抗肾损伤分子 1(kidney injury molecule 1, KIM-1)抗体购买于美国 R&D 公司,兔抗 CD3 抗体和兔抗胶原 I 抗体购买于美国 Abcam 公司,大鼠抗小鼠 F4/80 抗体购买于美国 Bio-Rad 公司(MCA497GA);DAB 显色试剂盒、辣根过氧化物酶标记的驴抗山羊 IgG 抗体和山羊抗兔 IgG 抗体均购买于碧云天生物科技公司, Alexa594 标记的驴抗大鼠 IgG 抗体购买于美国 Invitrogen 公司(A-21209), DAPI 试剂购买于中国 Beyotime 公司(C1005)。其他试剂均购自国内外知名试剂公司,化学试剂至少为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 反复注射顺铂造模

24 只 C57BL/6 雄性小鼠随机分成对照组(CON 组)、顺铂低剂量组(LD 组)、顺铂中剂量组(MD 组)以及顺铂高剂量组(HD 组),共 4 组,每组 6 只小鼠。顺铂组按体重采用腹腔注射顺铂,低剂量为 5 mg/kg,中剂量为 7 mg/kg,高剂量为 10 mg/kg,每周 1 次,连续注射 4 周。于每周注射后 3 d 收血液和尿液标本备检。于第 4 次注射后 3 d 处死小鼠,留取血液、尿液以及肾组织标本待检。

1.2.2 尿液收集和检测

小鼠置代谢笼中收集 24 h 尿液标本。尿液经 4000 r/min 离心 15 min,去除尿沉渣, -20℃ 保存。采用 Bradford 法检测小鼠尿液蛋白水平,结合尿量计算小鼠 24 h 尿蛋白排泄量。利用试剂盒检测小鼠尿液 NAG 水平。

1.2.3 血肌酐的检测

采用尾静脉采血每周收集小鼠少量血液标本。实验终点采血方法:动物麻醉后,心脏取血约 1 mL, 4℃ 静置于 EDTA- Na_2 抗凝管 30 min 后, 4000 r/min 离心 15 min,分离出血浆, -80℃ 保存。按照血肌酐检测试剂盒说明书的步骤,检测小鼠血浆肌酐浓度。

1.2.4 肾脏病理染色

肾组织经甲醛固定 24 h 后,梯度脱水,进行常规石蜡包埋并切片。石蜡切片经 PAS 染色(periodic acid-Schiff staining)后,在显微镜下观察并进行肾小管损伤评分。损伤指标包括坏死细胞、刷状缘脱落、管型及小管扩张。按照每个 200 倍镜视野下,损伤

指标所占面积百分比评分,评分标准为 0 分:0~5%, 1 分:5%~10%, 2 分:11%~25%, 3 分:26%~45%, 4 分:46%~75%, 5 分:>76%。采用双盲随机分析方法,取 5 个视野平均值进行评估分析^[10]。

1.2.5 免疫组化染色

检测肾组织中 KIM-1、胶原 I 和 CD3 的表达。石蜡切片脱蜡水化后,利用枸橼酸修复液进行高压抗原修复,然后过氧化氢封闭内源性过氧化物酶;接着用含正常血清的磷酸盐缓冲液封闭切片,再滴加抗 KIM-1 抗体(按 1:100 稀释)或抗 CD3 抗体(按 1:50 稀释)或抗胶原 I 抗体(按 1:100 稀释), 4℃ 过夜,用磷酸盐缓冲液代替一抗做空白对照。第二天,切片清洗后,滴加相应二抗(按 1:200 稀释), DAB 显色,梯度酒精脱水、封片,显微镜下观察结果。KIM-1、胶原 I 和 CD3 抗体检测在肾组织中出现棕黄色染色为阳性。每张切片于 200 倍镜下随机选取 5 个视野,用 Image J 软件照相并对 KIM-1 和胶原 I 免疫组化染色进行分析,以面积表示 KIM-1 和胶原 I 阳性表达的相对含量。每张切片于 200 倍镜下随机选取 5 个视野,统计 CD3 表达阳性的 T 细胞数。

肾组织切片进行天狼星红染色,梯度酒精脱水、封片,显微镜下观察。每张切片于 200 倍镜下随机选取 5 个视野,用 Image J 软件拍照并对天狼星红染色进行分析,以面积表示天狼星红染色阳性的的相对含量。

1.2.6 免疫荧光染色法

冰冻组织切片经磷酸盐缓冲液清洗后,用含 2.5% 牛血清白蛋白的缓冲液封闭 30 min,滴加抗 F4/80 抗体(按 1:100 稀释), 4℃ 过夜。次日清洗后,滴加荧光二抗(按 1:100 稀释),孵育 1 h 后,滴加 DAPI 染核,用抗荧光淬灭剂封片。利用磷酸盐缓冲液替代一抗做空白对照。荧光显微镜镜下观察。

1.3 统计学分析

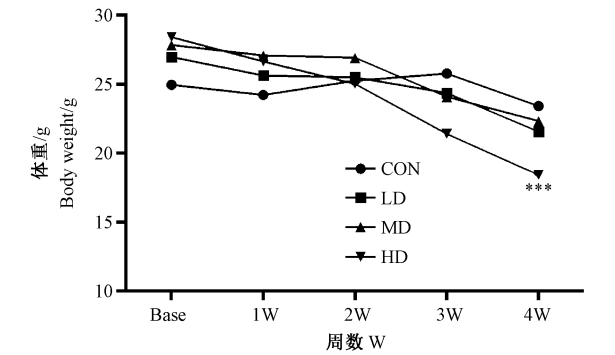
应用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。实验数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多个样本均数的比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),多个样本均数间每两个均数的比较采用 Turkey 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况

顺铂高剂量组有 1 只小鼠死亡,其余各组小鼠

均生存至实验终点。对照组小鼠体重平稳,而顺铂各剂量组小鼠体重较给药前均有下降。与注射顺铂前相比,顺铂高剂量组小鼠体重从第 2 周始至实验终点显著下降,差异有显著性($P < 0.001$)(图 1)。此外,高剂量组小鼠一般情况较其他组差,表现为精神萎靡,毛发缺少光泽,及行动迟缓。



注:与对照组比较, *** $P < 0.001$ 。CON 代表对照组,LD 代表顺铂低剂量组,MD 代表顺铂中剂量组,HD 代表顺铂高剂量组。W 代表周数。

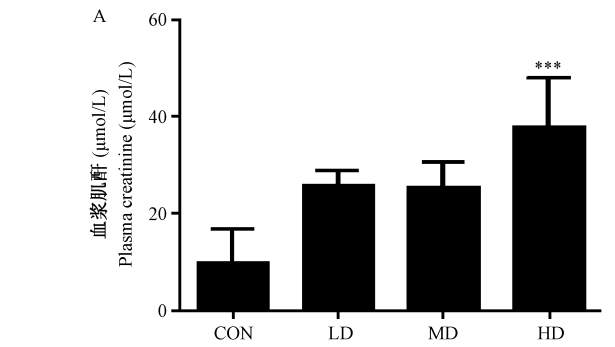
图 1 反复注射顺铂对各组小鼠体重的影响

Note. Compared with the control group, *** $P < 0.001$. CON: control group. LD: low-dose cisplatin group. MD: medium-dose cisplatin group. HD: high-dose cisplatin group. W: weeks.

Fig. 1 Effect of repeated administration of cisplatin on body weight in the mice

2.2 各组小鼠血浆肌酐浓度和尿蛋白水平

与对照组相比,反复注射不同剂量顺铂均能引起小鼠血浆肌酐浓度上升和增加小鼠 24 h 尿蛋白排泄。其中顺铂高剂量组血浆肌酐浓度和 24 h 尿蛋白排泄量升高最为显著,与对照组相比差异有显



注:A. 各组小鼠血浆肌酐浓度;B. 各组小鼠 24 h 尿蛋白水平。与对照组比较, * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ 。CON 代表对照组,LD 代表顺铂低剂量组,MD 代表顺铂中剂量组,HD 代表顺铂高剂量组。

图 2 反复注射顺铂对各组小鼠血浆肌酐浓度和尿蛋白水平的影响

Note. A: plasma creatinine. B: 24-hour urinary protein. Compared with the control group, * $P < 0.05$. *** $P < 0.001$. CON: Control group. LD: Low-dose cisplatin group. MD: Medium-dose cisplatin group. HD: High-dose cisplatin group.

Fig. 2 Effects of repeated administration of cisplatin on plasma creatinine and 24-hour urinary protein in the mice

著性($P < 0.05$)(图 2)。

2.3 各组小鼠肾脏病理学变化情况

对照组小鼠肾脏组织肾小球和肾小管结构正常。肾小管细胞上皮细胞连接紧密、形态规则、排列整齐、边缘完整,细胞间隙未见水肿和炎症浸润。低剂量组病变较轻,偶见肾小管上皮细胞脱落;而中剂量组的肾组织皮质局部可见有肾小管上皮细胞刷状缘的脱落,基底膜部分裸露,炎性细胞浸润。高剂量组肾脏病变最重,肾组织皮质、皮髓交界可见大面积上皮细胞坏死,肾小管上皮细胞空泡变性、刷状缘消失、基底膜裸露、上皮细胞脱落及管型形成。

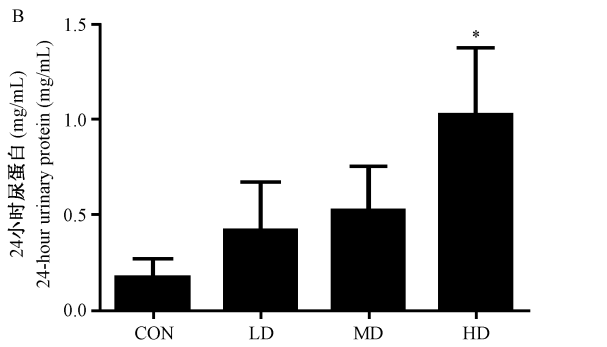
通过统计肾小管损伤评分发现,随着注射的顺铂浓度增加,肾小管损伤评分逐渐升高;高剂量组小管损伤显著高于对照组,差异有显著性($P < 0.01$)(图 3)。

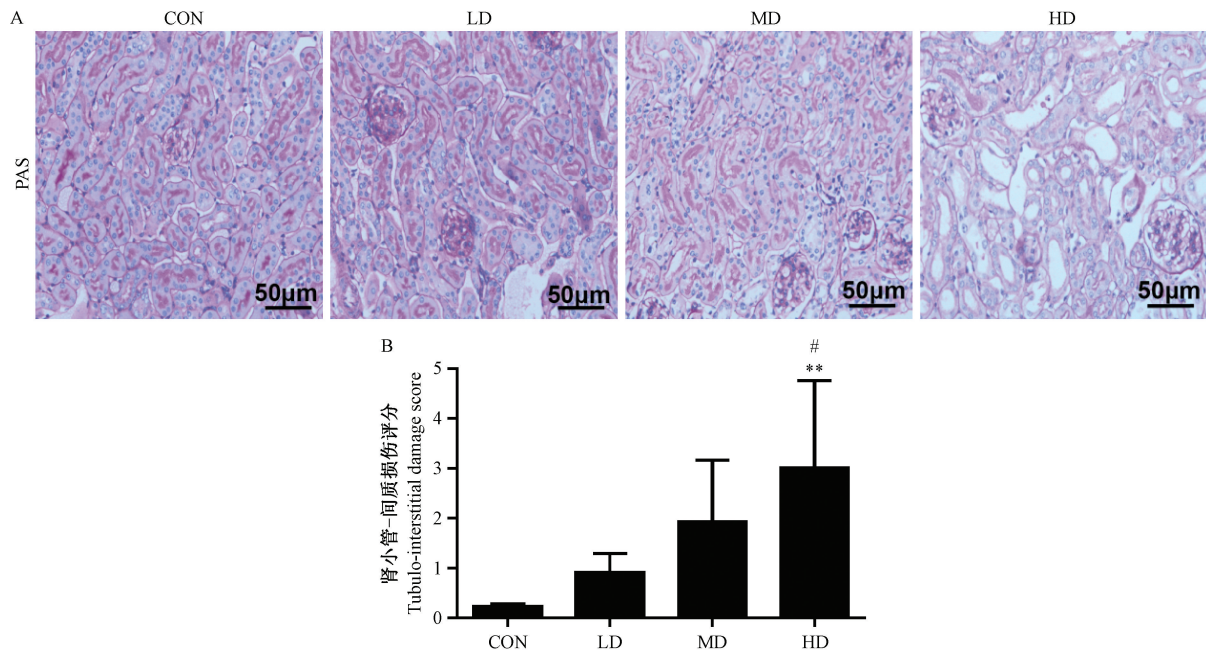
2.4 各组小鼠肾小管损伤标记物 KIM-1 表达和尿液 NAG 水平

通过免疫组化检测肾小管损伤标记物 KIM-1 的表达以及试剂盒检测尿液 NAG 的活性,进一步明确各组小鼠肾小管损伤情况。如图 4 所示,与对照组相比,随着顺铂注射浓度的增加,肾脏组织中 KIM-1 阳性肾小管数量逐渐增多,且顺铂高剂量组显著多于对照组,差异有显著性($P < 0.05$)。尿 NAG 水平的升高可以反应小管损伤情况。结果显示,与对照组相比,仅顺铂高剂量组小鼠尿 NAG 活性有所提升,但差异无显著性。

2.5 各组小鼠肾脏 CD3 阳性 T 细胞和 F4/80 阳性巨噬细胞的浸润情况

免疫组化法检测各组小鼠肾组织 CD3 阳性 T





注:A. 各组小鼠肾组织 PAS 染色(PAS×400, bar=50 μm);B. 各组小鼠肾小管损伤评分($\bar{x} \pm s$)。与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与低剂量组比较, # $P < 0.01$ 。CON 代表对照组, LD 代表顺铂低剂量组, MD 代表顺铂中剂量组, HD 代表顺铂高剂量组。

图3 各组小鼠肾组织病理情况

Note. A. PAS staining, bar=50 μm. B. Tubulo-interstitial damage score($\bar{x} \pm s$). Compared with the control group, ** $P < 0.01$. Compared with the low-dose cisplatin group, # $P < 0.01$. CON: Control group. LD: Low-dose cisplatin group. MD: Medium-dose cisplatin group. HD: High-dose cisplatin group.

Fig.3 Pathological changes of kidney tissues in the mice

细胞和 F4/80 阳性巨噬细胞的浸润情况。结果发现,与对照组相比,反复注射不同剂量顺铂均能引起小鼠肾组织浸润的 CD3 阳性 T 细胞和 F4/80 阳性巨噬细胞增多(巨噬细胞主要分布在肾小管-间质周围,红色荧光,形态为狭长条形),但差异无显著性(图 5)。上述结果提示,反复注射顺铂引起 T 细胞和巨噬细胞的浸润可能参与肾脏病变进程。

2.6 各组小鼠肾脏纤维化情况

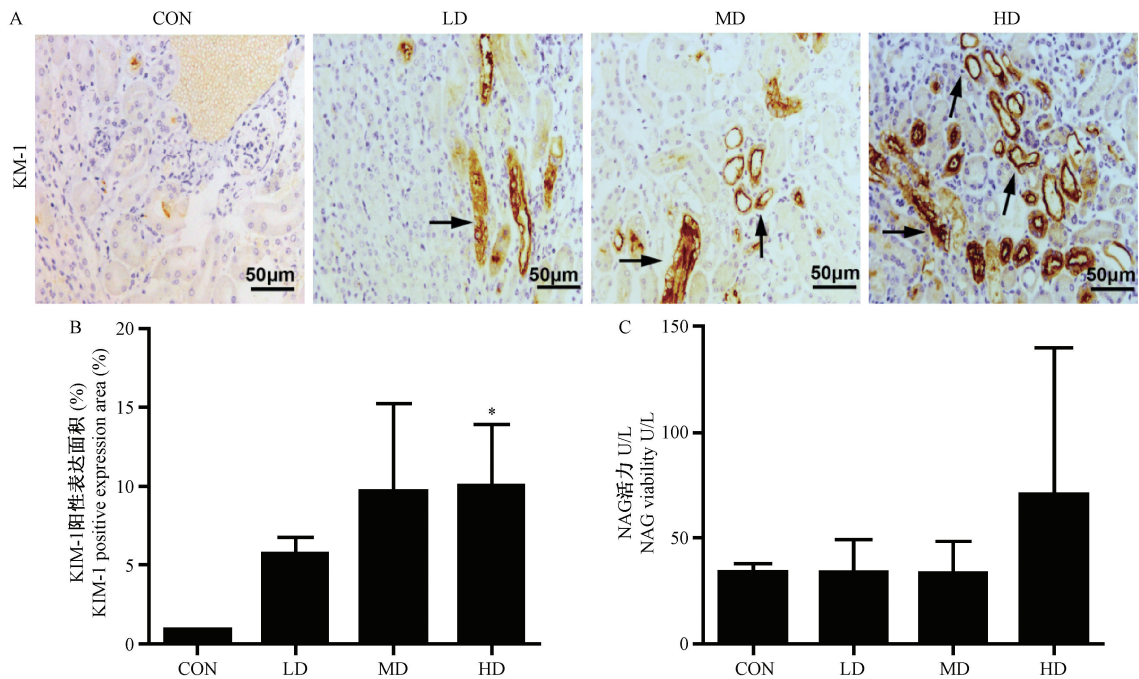
天狼星红染色可将肾组织的胶原蛋白染成亮红色,是检测器官纤维化的常用染色方法之一。如图 6 所示,对照组肾小管-间质可见少量天狼星红染色阳性的胶原组织。而与对照组相比,随着顺铂注射浓度的增加,肾脏组织中天狼星红染色阳性面积逐渐增多,且顺铂高剂量组显著多于对照组,差异有显著性 ($P < 0.001$)。进一步利用免疫组化检测各组小鼠肾脏胶原 I 的表达情况发现,与对照组相比,随着注射的顺铂浓度增加,肾脏组织中胶原 I 染色阳性区域逐渐增多,且顺铂中剂量和高剂量组显著多于对照组,差异有显著性 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。不仅如此,与对照组相比,随着注射的顺铂浓度增

加,肾脏组织中表达肌成纤维细胞标记物 α -SMA 的细胞数量显著增加,高剂量组显著多于对照组,差异有显著性 ($P < 0.01$)。上述结果提示,反复注射顺铂可以引起小鼠肾脏发生纤维化。

3 讨论

小鼠单次大剂量 (20 ~ 40 mg/kg) 注射顺铂可诱导严重的 AKI 模型,常用于研究 AKI 急性期病理学改变和机制,但由于肾损伤过重,小鼠易死亡,不适用于研究顺铂慢性肾毒性作用以及 AKI 向 CKD 转化相关研究。低剂量反复多次注射顺铂,更符合临床癌症化疗指南推荐的剂量和疗程,能模拟顺铂所致的肾脏长期慢性毒副作用,且小鼠死亡率低。本实验中,小鼠每周注射一次 10 mg/kg 的顺铂,连续注射 4 周,可诱导肾功能、病理生理改变均较符合临床 CKD 患者肾脏状态的 CKD 模型。

既往研究中,常利用大鼠作为顺铂诱导肾小管-间质纤维化模型的实验动物,但由于机制研究需要转基因操作,而大量现存的转基因动物以小鼠最多。因此,近年有课题组尝试在小鼠上构建此种模型。



注:A. 各组小鼠肾组织免疫组化 KIM-1 染色 (IHC ×400, bar = 50 μm, 黑色箭头为 KIM-1 的阳性表达肾小管);B. 各组小鼠尿液 NAG 的活性 ($\bar{x} \pm s$)。与对照组比较, * $P < 0.05$ 。CON 代表对照组,LD 代表顺铂低剂量组,MD 代表顺铂中剂量组,HD 代表顺铂高剂量组。

图 4 各组小鼠肾小管损伤情况

Note. A. Expression of KIM-1 in the kidney tissue in each group (immunohistochemistry staining, × 400, bar = 50 μm. Black arrows; KIM-1 positive expression in the tubules. B: KIM-1 positive expression area (%). C: Urinary NAG activity($\bar{x} \pm s$). Compared with the control group, * $P < 0.05$. CON represents the control group, LD represents low-dose cisplatin group, MD represents the medium-dose cisplatin group, and HD represents the high-dose cisplatin group.

Fig. 4 Changes of tubulo-interstitial damage of the mice in each group

此前曾有报道 C57BL/6 背景小鼠不易产生纤维化^[11],而本实验所采用的方法成功诱导 C57BL/6 背景小鼠肾脏发生纤维化,表现为肌成纤维细胞数量增多和肾小管-间质胶原沉积增加,提示反复注射顺铂在 C57BL/6 背景小鼠上诱导慢性肾功能不全模型是可行的。此外,我们的模型也可以适用于小鼠的肿瘤模型使用顺铂长期治疗后的肾毒性研究。

顺铂所致 AKI 的主要受累的是近端小管的上皮细胞,引起细胞凋亡、坏死,此过程涉及 T 细胞, T reg 细胞,巨噬细胞等炎症细胞的浸润^[12]。本实验中,反复注射 10 mg/kg 顺铂的模型组小鼠出现肾小管上皮细胞空泡变性、刷状缘消失、基底膜裸露、上皮细胞脱落及管型形成等病理学改变。慢性肾病的组织学特点,例如:小管-间质纤维化、小管萎缩或扩张,小球结构基本完整,这些病变在本实验中均可见。目前认为,顺铂可引起肾小管上皮细胞线粒体功能障碍、DNA 损伤、反应氧簇生成增多、凋亡、坏死等病变^[13],诱导肾小管-间质炎症反应,造成小管细胞严重损伤时则直接引起小鼠肾衰竭,甚至死亡。

而损伤轻微时(如小剂量单次注射顺铂),残存的小管细胞通过去分化、增殖、再分化的途径补充受损小管细胞,完成肾脏修复。有研究指出一旦小管细胞受到超出修复能力的持续打击,小管上皮细胞则停滞在细胞周期的 G2/M 期,产生促纤维化因子,如 TGF-β 增多,从而分泌胶原 I 和 α-SMA 等,诱导肾脏纤维化^[14]。因此,肾小管上皮细胞损伤和修复是影响 AKI 转归的核心环节^[15]。

本实验所采取的反复注射适量顺铂会引起小管细胞反复损伤,可能通过诱导其发生不恰当修复,参与慢性肾功能不全的病变进程。而反复注射顺铂引起肾小管上皮细胞高表达的 KIM-1,可能是参与此过程的关键分子之一。研究发现,KIM-1 可以促进顺铂的肾毒性病情发展^[16]。在本实验中,反复注射 10 mg/kg 顺铂可诱导肾小管上皮细胞 KIM-1 表达显著升高。大量的文献证实,正常情况下,肾脏组织几乎不表达 KIM-1 蛋白,但是在肾脏损伤后数小时内的表达水平即显著升高,且其表达量随肾小管损伤范围的增加明显升高。KIM-1 可诱导肾小管上皮

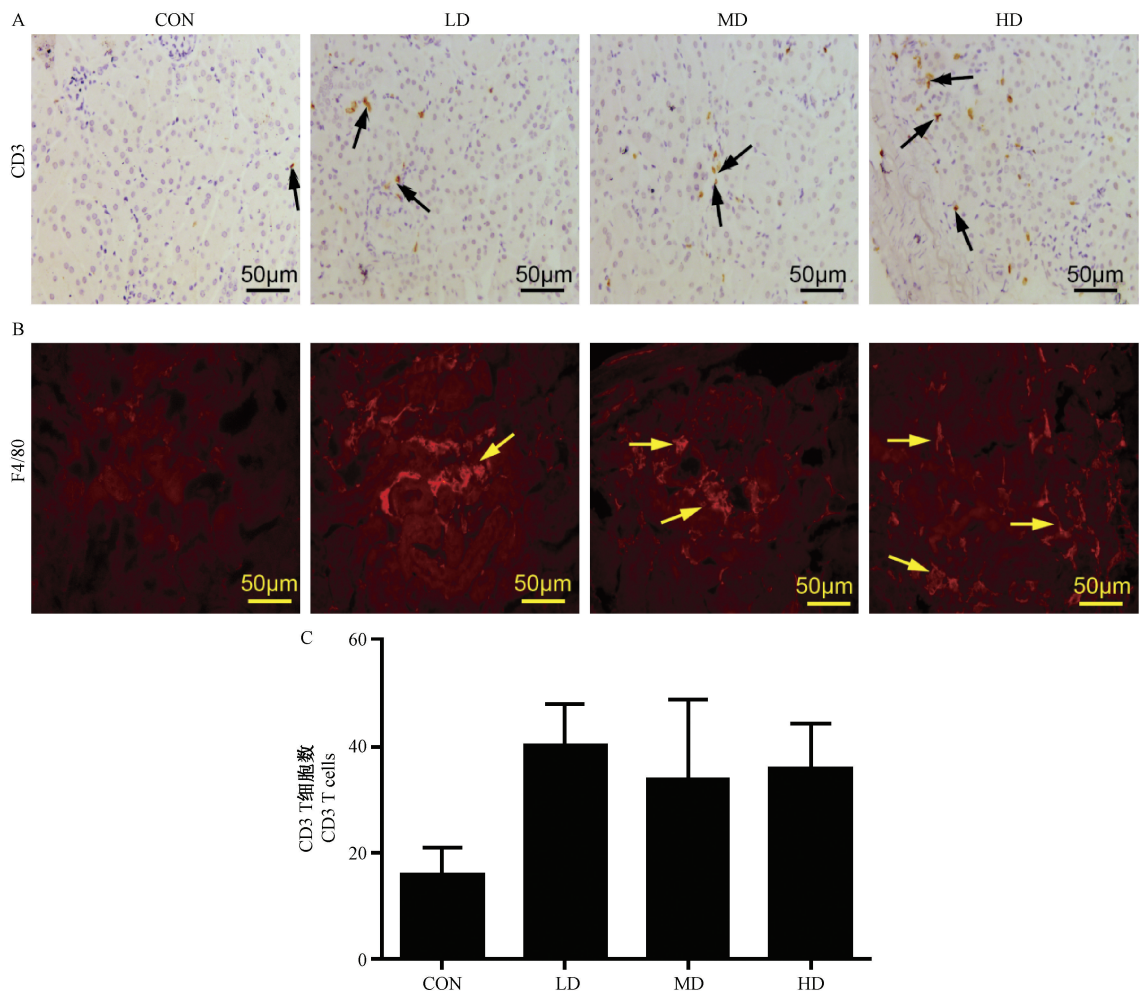


图5 各组小鼠肾小管-间质炎症细胞浸润情况

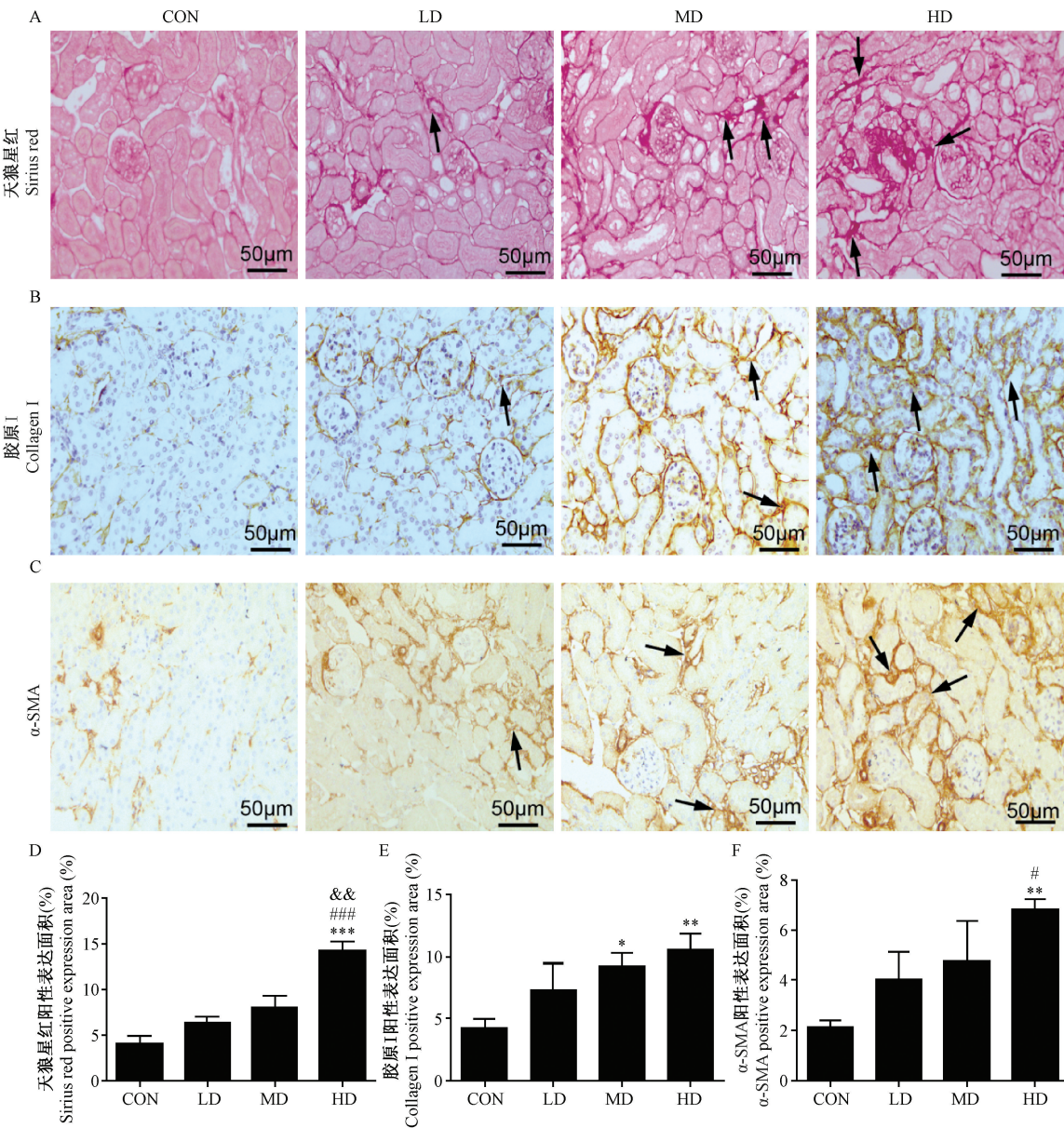
Note. A. Expressions of CD3 positive T cells in the kidney tissues (immunohistochemical staining). B. Expressions of F4/80 positive macrophages in the kidney tissues (immunofluorescence staining). C. Numbers of CD3 positive T cells (IHC, $\times 400$, bar = 50 μm , black arrows indicate CD3 positive cells, yellow arrows indicate F4/80 positive cells). CON represents the control group, LD represents the low-dose cisplatin group, MD represents the medium-dose cisplatin group, and HD represents the high-dose cisplatin group.

Fig. 5 Changes of tubulo-interstitial inflammatory cells in the mice of each group

细胞持续分泌多种促炎症因子,使肾脏处于活化的前炎症反应状态,进而诱导巨噬细胞及 T 细胞迁徙入肾间质,大量活化的炎症细胞促发肾脏炎症级联反应,最终导致肾间质炎症损伤及进行性纤维化加重^[17-18]。我们对各组模型的肾脏组织进行 CD3 和 F4/80 染色,可以看到,模型组皮质和皮髓交界处有很明显的 KIM-1 表达,且小管间质可见 CD3 阳性 T 细胞和 F4/80 阳性巨噬细胞的浸润,提示反复注射顺铂引起小管细胞高表达的 KIM-1 可能是介导模型慢性炎症反应的关键分子。

众所周知,肾小管-间质纤维化是各种原因引起

的 CKD 的共同的病理学变化,其损害程度与肾功能毁损程度密切相关是加速肾功能衰竭的主要驱动力。本实验中,反复注射顺铂引起小鼠肾脏肌成纤维细胞数量增多和肾小管-间质胶原沉积增加的纤维化病变。表达 α -SMA 的肌成纤维细胞是公认的强力产生细胞外基质,促进肾脏纤维化的关键细胞,其来源很广。有报道称,发生不恰当修复的可通过 Twist 和 Snail 介导的上皮细胞-间充质细胞转分化途径(epithelial-mesenchymal transition, EMT)转分化为肌成纤维细胞^[19],分泌大量胶原等细胞外基质,参与肾小管-间质纤维化^[20]。此外,最近研究发现,



注: A. 肾组织天狼星红染色; B. 肾组织胶原 I 免疫组化染色; C. 肾组织 α-SMA 免疫组化染色; D. 天狼星红染色的阳性表达面积; E. collagen I 的阳性表达面积; F. α-SMA 的阳性表达面积($\bar{x} \pm s$)。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与低剂量组比较, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$; 与中剂量组比较, && $P < 0.01$ 。CON 代表对照组, LD 代表顺铂低剂量组, MD 代表顺铂中剂量组, HD 代表顺铂高剂量组。(IHC $\times 400$, 黑色箭头为阳性表达, bar = 50 μm)

图 6 各组小鼠的肾组织纤维化改变

Note. A. Sirius red staining. B. Expression of collagen I. C. Expression of α-SMA. D. Sirius red positive expression. E. Collagen I positive expression. F. α-SMA positive expression. ($\bar{x} \pm s$). Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Compared with the low-dose cisplatin group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$; compared with the medium-dose cisplatin group, && $P < 0.01$. CON: Control group. LD: Low-dose cisplatin group. MD: Medium-dose cisplatin group. HD: High-dose cisplatin group. (immunofluorescence staining, $\times 400$, black arrows indicate positive expression of tubulo-interstitial changes, bar = 50 μm)

Fig. 6 Tubulo-interstitial fibrosis in the kidney tissue of the mice in each group

在小鼠梗阻肾模型中,巨噬细胞通过转分化成肌成纤维细胞,参与肾脏纤维化^[21-22]。而在体外实验,最近报道了 M2 型巨噬细胞可以协同成纤维细胞诱导顺铂条件下的肾小管上皮细胞 EMT,促进肾小管-间质纤维化的进展^[23]。本实验中,反复注射顺铂引起大量巨噬细胞浸润肾脏,极可能通过此途径参与后续肾小管-间质纤维化进程,可能还有更多的免疫细胞参与到这个过程,但尚需进一步实验证实,这为

研究 AKI 向 CKD 转化的治疗提供了靶点。

本研究通过在 C57BL/6 小鼠上反复注射顺铂,引起小鼠肾小管损伤、肾脏 T 细胞和巨噬细胞浸润增多以及肾小管-间质纤维化病变,进而造成小鼠血肌酐上升和尿蛋白排泌增多,引起肾功能下降,炎症,纤维化等慢性肾功能不全的表现,有望为后续研究 AKI 向 CKD 的转化过程提供新的工具。此研究有一定的应用价值,可进行慢性肾功能不全的实验研究,如何保护肾功能、延缓甚至逆转肾功能的进展等热点。

参 考 文 献 (References)

- [1] Jorres A, John S, Lewington A, et al. A European Renal Best Practice (ERBP) position statement on the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Clinical Practice Guidelines on Acute Kidney Injury: part 2: renal replacement therapy [J]. *Nephrol Dialysis Transplant*, 2013, 28(12): 2940–2945.
- [2] Chawla LS, Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome [J]. *Kidney Int*, 2012, 82(5): 516–524.
- [3] Kodama A, Watanabe H, Tanaka R, et al. Albumin fusion renders thioredoxin an effective anti-oxidative and anti-inflammatory agent for preventing cisplatin-induced nephrotoxicity [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(3): 1152–1162.
- [4] Sharp CN, Doll MA, Dupre TV, et al. Repeated administration of low-dose cisplatin in mice induces fibrosis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2016, 310(6): F560–568.
- [5] 王飞, 陆海英, 张悦, 等. 庆大霉素诱导大鼠肾小管间质纤维化模型的建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(9): 60–64.
Wang F, LU HY, Zhang Y, et al. Establishment of a rat model of renal tubulointerstitial fibrosis induced by gentamicin [J]. *Chin J Comp Med*, 2008, 18(9): 60–64.
- [6] 郭德玉, 敖平, 孙淑玲, 等. 慢性肾功能不全小鼠动物模型的建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2001, 11(3): 142–145.
Guo DY, Ao P, Sun SL, et al. Establishment of an animal model for chronic renal insufficiency [J]. *Chin J Comp Med*, 2001, 11(3): 142–145.
- [7] 李红艳. 大鼠慢性肾功能不全模型两种制作方式的比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2008, 16(1): 59–61.
Li HY. Comparison of two models of reduced renal mass in the rat [J]. *Acta Lab Animalis Scin Sin*, 2008, 16(1): 59–61.
- [8] 周敬, 潘兴华, 庞荣清, 等. 兔慢性肾功能衰竭模型的建立与评价 [J]. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(10): 48–51.
Zhou J, Pan XH, Pang RQ, et al. Establishment of the rabbit model of chronic renal failure [J]. *Chin J Comp Med*, 2010, 20(10): 48–51.
- [9] Katagiri D, Hamasaki Y, Doi K, et al. Interstitial renal fibrosis due to multiple cisplatin treatments is ameliorated by semicarbazide-sensitive amine oxidase inhibition [J]. *Kidney Int*, 2016, 89(2): 374–385.
- [10] Choi EK, Jung H, Kwak KH, et al. Inhibition of oxidative stress in renal ischemia-reperfusion injury [J]. *Anesth Analg*, 2017, 124(1): 204–213.
- [11] Walkin L, Herrick SE, ummers A, et al. The role of mouse strain differences in the susceptibility to fibrosis: a systematic review [J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2013, 6(1): 18.
- [12] Ozkok A, Edelstein CL. Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury [J]. *BioMed Res Int*, 2014, 2014(967826).
- [13] Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies [J]. *Kidney Int*, 2008, 73(9): 994–1007.
- [14] Bonventre JV. Primary proximal tubule injury leads to epithelial cell cycle arrest, fibrosis, vascular rarefaction, and glomerulosclerosis [J]. *Kidney Int Suppl*, 2014, 4(1): 39–44.
- [15] 陈金颖, 杨陈, 刘华锋. 肾小管上皮细胞损伤在急性肾损伤向慢性肾脏病转化中的作用 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2017, 33(2): 155–160
Chen JY, Yang C, Liu HF. Role of renal tubular epithelial cell injury in the transformation of acute renal injury to chronic kidney disease [J]. *Chin J Nephrol*, 2017, 33(2): 155–160
- [16] Nozaki Y, Nikolic-Paterson DJ, Yagita H, et al. Tim-1 promotes cisplatin nephrotoxicity [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 301(5): F1098–1104.
- [17] 陈国纯. Kim-1 小鼠模型的构建及其肾纤维化机理研究 [D]; 中南大学, 2011.
Chen GC. Mechanism of kidney fibrosis in a kim-1 transgenic model [D]. Central South University, 2011.
- [18] Humphreys BD, Xu F, Sabbiseti V, et al. Chronic epithelial kidney injury molecule-1 expression causes murine kidney fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(9): 4023–4035.
- [19] Lovisa S, Lebleu VS, Tampe B, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis [J]. *Nat Med*, 2015, 21(9): 998–1009.
- [20] Tang R, Yang C, Tao J L, et al. Epithelial-mesenchymal trans-differentiation of renal tubular epithelial cells induced by urinary proteins requires the activation of PKC- α and beta1 isozymes [J]. *Cell Biol Int*, 2011, 35(9): 953–959.
- [21] Meng XM, Wang S, Huang XR, et al. Inflammatory macrophages can transdifferentiate into myofibroblasts during renal fibrosis [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(12): e2495.
- [22] Wang YY, Jiang H, Pan J, et al. Macrophage-to-myofibroblast transition contributes to interstitial fibrosis in chronic renal allograft injury [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(7): 2053–2067.
- [23] Yu CC, Chien CT, Chang TC. M2 macrophage polarization modulates epithelial-mesenchymal transition in cisplatin-induced tubulointerstitial fibrosis [J]. *BioMedicine*, 2016, 6(1): 5, 29–34.