

讨 论

zaptuzumab 是来源于小鼠单克隆抗体 AD5-10 的人鼠嵌合单克隆抗体,能与 DR5 死亡受体胞外区域结合,结合后不影响 TRAIL 与 DR5 结合,但可以与 TRAIL 协同发挥细胞凋亡作用。zaptuzumab 具有强抗肿瘤活性,对正常细胞的毒害相对比较轻微,特别是 zaptuzumab 可以和化疗药物协同杀伤肿瘤,而不增加不良反应^[5]。笔者试图将 zaptuzumab 标记短半衰期放射性核素^{99m}Tc,对肿瘤进行显像。^{99m}Tc 是临床上常用的显像放射性核素,它具有合适的半衰期、能量和适宜的价格,很容易被临床接受。相对于 AD5-10, zaptuzumab 的恒定区部分是人的,极大地减少了人抗小鼠反应(HAMA)。临床上可能通过显像来鉴别肿瘤 DR5 表达情况,从而指导个体化治疗用药。

理论上,TRAIL 或者 DR5 抗体激动剂诱导的细胞凋亡不依赖 P53,可以适用于 p53 突变的肿瘤患者。但临床实验表明,激活死亡受体治疗肿瘤的效果并不好,这可能和肿瘤患者的死亡受体表达出现的个体差异、肿瘤组织内差异有关^[6]。所以,寻找能够活体显示肿瘤患者的死亡受体表达的探针对于治疗前病人的挑选具有重要意义。笔者的研究结果表明,^{99m}Tc-zaptuzumab 虽然被成功制备,但是对 H460 大细胞肺癌的显像效果并不好。对于其他肿瘤的显像值得研究。以往的研究发现,DR5 的抗体 TRA-

8 标记^{99m}Tc 后能够对乳腺癌进行显像^[7]。可能不同的肿瘤或不同的探针针对肿瘤的显像效果存在差异。另外,也不排除 Hynic 衍生和^{99m}Tc 标记改变了抗体的结构,从而对活体显像造成不利影响。

参考文献

- 1 Wang S. TRAIL: a sword for killing tumors[J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17(29):3309-3317
- 2 Fox NL. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor-1 and receptor-2 agonists for cancer therapy[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2010, 10(1):1-18
- 3 Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1999, 11(2):255-260
- 4 Spierings DC. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors[J]. *J Histo-chem Cytochem*, 2004, 52(6):821-831
- 5 Qiu Y, Zhang Z, Shi J, et al. A novel anti-DR5 chimeric antibody and epirubicin synergistically suppress tumor growth[J]. *IUBMB Life*, 2012, 64(9):757-765
- 6 Kriegl L, Jung A, Engel J, et al. Expression, cellular distribution, and prognostic relevance of TRAIL receptors in hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(22):5529-5538
- 7 Kim H, Chaudhuri TR, Buchsbaum DJ, et al. High-resolution single-photon emission computed tomography and X-ray computed tomography imaging of Tc-99m-labeled anti-DR5 antibody in breast tumor xenografts[J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(3):866-875

(收稿日期:2013-06-28)

(修回日期:2013-07-08)

肝硬化大鼠肾小球收缩敏感度增高参与肝肾综合征肾小球滤过率下降的机制

闻 颖 王 文 刘 沛

摘 要 目的 通过体外测量肝硬化大鼠肾小球对缩血管物质的敏感度,探讨肝硬化时易于发生肝肾综合征的机制。方法 雄性 SD 大鼠被随机分为生理盐水对照组、肝硬化组(四氯化碳法)。12 周结束时颈椎脱臼法处死大鼠,筛网法分离肾小球并进行活性鉴定。体外应用 FITC 标记的菊粉,荧光分光光度计下进行肾小球菊粉容积测量(GIS),并于共聚焦显微镜下测量肾小球周长,观察两组肾小球对内皮素-1 缩血管作用敏感度的差异。**结果** 内皮素-1 刺激后,肝硬化组肾小球的 GIS 变化百分比及肾小球周长变化百分比与对照组相比显著增加(17.26%±4.80%,10.50%±2.83%, $P=0.001$;11.19%±4.14%,8.53%±3.05%, $P=0.007$)。**结论** 肝硬化大鼠肾小球对缩血管物质的敏感度是增高的,这可能是肝硬化晚期易于发生肝肾综合征的机制之一。

关键词 肝硬化 大鼠 肝肾综合征 肾小球菊粉容积 内皮素-1

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270607)

作者单位:110001 沈阳,中国医科大学附属第一医院传染科

通讯作者:刘沛,博士生导师,电子信箱:syliupeit2013@163.com

Hyper-responsiveness of Glomeruli to Vasoconstrictor in Cirrhotic Rats Participates in the Decreased Glomerular Filtration Rate in Hepatorenal Syndrome. Wen Ying, Wang Wen, Liu Pei. Department of Infectious Diseases, Affiliated No. 1 Hospital of China Medical University, Liaoning 110001, China

Abstract Objective To explore the mechanism of cirrhosis prone to hepatorenal syndrome by measuring the reactivity of glomeruli to endothelin-1 (ET-1) in vitro. **Methods** Male sprague dawley (SD) rats were randomly divided into saline control group, cirrhosis group (carbon tetrachloride, CCl_4). At the end of 12 weeks, rats were put to death by cervical dislocation method. Glomeruli was isolated by the gradual sieving technique, whose activity was identified. By measuring glomerular inulin space (GIS) with FITC-labeled inulin, and glomerular circumference with confocal microscopy, we observed the different reactivity of glomeruli to ET-1 between two groups. **Results** Compared to control group, the change percentage of GIS and of glomerular circumference in cirrhotic group to endothelin stimulation was significantly larger ($17.26\% \pm 4.80\%$, $10.50\% \pm 2.83\%$, $P = 0.001$; $11.19\% \pm 4.14\%$, $8.53\% \pm 3.05\%$, $P = 0.007$). **Conclusion** The reactivity of glomerular to ET-1 in cirrhotic rats is increased, which may be one of the mechanisms of cirrhosis prone to hepatorenal syndrome.

Key words Liver cirrhosis; Rats; Hepatorenal syndrome; Glomerular inulin space; Endothelin-1

肝肾综合征(HRS)是肝硬化晚期时常见的并发症及导致死亡的重要原因,其发病机制至今尚未完全阐明,普遍认为是由多种因素引起肾脏血流灌注减少所致的功能性肾衰竭^[1]。肝硬化及暴发性肝衰竭大鼠模型中,肾脏肾血管平滑肌细胞和肾小球系膜细胞(GMCs)的1,4,5-三磷酸肌醇受体(IP_3R)蛋白表达明显增加^[2,3]。肝病晚期肾脏 IP_3R 蛋白表达增加可能参与了GFR的下降。 IP_3R 可介导细胞内钙释放和细胞外钙内流从而引起细胞收缩^[4]。肾小球滤过率(GFR)的下降除与肾血管平滑肌细胞收缩有关外,还与GMCs收缩有关,后者可减少肾小球毛细血管袢数量,减少滤过面积,滤过系数减少。前期研究在细胞水平上证实了肿瘤坏死因子 α 可增强肾小球系膜细胞内钙释放及细胞收缩^[5]。本研究旨在通过肝硬化大鼠的动物模型分离肾小球,在器官水平上利用离体肾小球菊粉容积(GIS)、肾小球周长测量等方法,探讨肝硬化大鼠肾小球对缩血管物质内皮素的敏感度,探讨引起肝肾综合征肾小球滤过率下降的可能机制。

对象与方法

1. 对象:健康雄性SD大鼠(中国医科大学动物室提供),FITC标记菊粉、内皮素、台盼蓝、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、小牛血清白蛋白(BSA),美国Sigma公司;分析纯四氯化碳,橄榄油,TritonX-100,中国医药集团上海化学试剂公司。光学显微镜(奥林巴斯公司,型号AX70, SZX12),扫描电子显微镜(日立, S-3400N)、荧光分光光度计(Shimadzu岛津, RF-5301PC)、激光共聚焦显微镜(德国蔡司, ZEISS-510Meta)。80目、120目、200目不锈钢筛网(河北博盈金属网有限公司)。

2. 方法:(1)肝硬化动物模型制备:选择健康雄性SD大鼠20只,体重180~220g。分组:肝硬化组10只,对照组10

只。参照文献制备肝硬化大鼠动物模型^[6]。动物随机分为两组:生理盐水对照组(10只),肝硬化组(10只)。给予四氯化碳(CCl_4)400ml/L及橄榄油0.2ml/kg腹腔注射,每周2次,共12周;对照组10只大鼠给予同等量的橄榄油腹腔注射,每周2次,共12周。期间观察大鼠的毛色、状态、体重、存活情况。12周结束,颈椎脱臼法处死,75%乙醇浸泡1~2min,2次,置超净台内,打开腹腔取出肝脏、肾脏,留取标本做HE染色。(2)肾小球的分离与鉴定:将取出的双侧肾脏剪碎,置含1%BSA的Hank's液的无菌培养皿洗涤。参照文献应用过筛法分离肾小球^[7]。首先将剪碎的肾组织置于80目不锈钢筛网上,用注射器柄轻轻碾磨组织透过筛网,滤过组织与1%BSA的Hank's液混合物用吸管吸至120目不锈钢筛网,滤去小组织块,滤过物吸至200目不锈钢筛网,轻轻滤过,1%BSA的Hank's液洗涤1次,收集滤网上肾小球,取少量镜下观察肾小球并行0.04%台盼蓝染色、MTT(1mg/ml)鉴定活性,并留取标本做扫描电镜;余用含1%BSA PBS重悬肾小球,稀释成10个/微升待用。(3)肾小球菊粉容积测量(GIS)^[8]:取400 μl 肾小球重悬液(约4000个肾小球),加入2 μl (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)FITC标记的菊粉,避光,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴100r/min摇动30min,等分为2管,其中1管不加内皮素(收缩前组),另1管加100nmol/L内皮素10min(收缩后组)。5000 $\times g$ 离心5s,取20 μl 上清加480 μl 0.3%TritonX-100待测,后弃上清,吸净残余液体,向管底沉淀之肾小球团块中加500 μl 0.3%TritonX-100,重悬后溶解过夜,后应用荧光分光光度计分别检测每个样品上清及肾小球团块FITC标记菊粉的荧光强度(FI),应用公式 $\text{GIS}(\text{pl}) = \text{FI}(\text{肾小球})/\text{FI}(\text{上清}/20\mu\text{l}) \times 2000$ 计算出GIS值,并计算每个样品收缩前后GIS变化百分比($= \text{收缩前GIS} - \text{收缩后GIS} / \text{收缩前GIS} \times 100\%$)。(4)肾小球周长测量:35mmol/L平皿中加200 μl 多聚-L赖氨酸(0.1mg/ml),37 $^{\circ}\text{C}$,10min,后在不同的平皿中加入对照组及肝硬化组的100 μl 肾小球重悬液(约肾小球1000个),5min后肾小球贴壁,用HBSS冲洗平皿,加2ml HBSS,共聚焦显微镜下测收缩前肾小球周长(每个样品选3个肾小球测量)。后加100nmol/

L 内皮素 10min,再测肾小球收缩后周长,并计算收缩前后周长变化百分比(%)=(收缩前周长-收缩后周长)/收缩前周长×100%。

3. 统计学方法:采用 SPSS 10.0 软件分析,计量资料数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间的比较经方差齐性检验后,采用两独立样本间 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 肝硬化模型制备成功:肝硬化模型组共有 9 只存活(1 只于第 11 周死亡),毛色黯淡,体重在 0~4 周增加,4~8 周下降,8~12 周体重又有所增加,其中有 7 只大鼠有腹腔积液形成。光学显微镜下,肝硬化组大鼠肝脏 HE 染色标本显示:肝小叶结构破坏及明显硬化结节形成(图 1A)。而肾脏 HE 染色标本显示肾小管与肾小球结构完好(图 1B)。

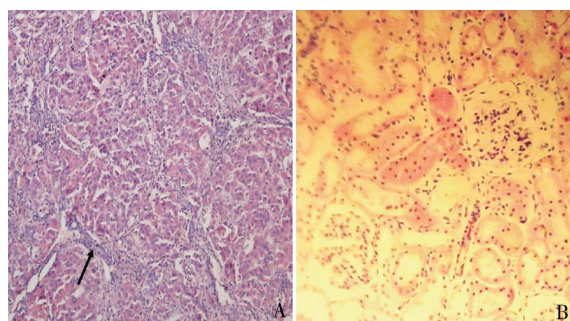


图 1 肝硬化大鼠肝脏、肾脏标本(HE 染色,×200)

A. 肝小叶结构破坏及明显硬化结节形成,箭头所示;B. 肾脏 HE 染色标本显示肾小管与肾小球结构完好。

2. 肾小球形态及活性鉴定:光镜下筛网法分离出的肾小球呈球形或椭圆形,无囊,无肾小管及小动脉成分,肾小球毛细血管丛完整(图 2A)。扫描电镜下超微结构正常(图 2B)。MTT 法(1mg/ml)(图 2C)及 0.04% 台盼蓝染色(图 2D)证明细胞有活性。

3. 肾小球菊粉容积(GIS):对照组收缩前 GIS 为 $737.96 \pm 143.18 \text{ pl}$,收缩后 GIS 为 $656.08 \pm 118.29 \text{ pl}$,收缩后 GIS 减少的百分比为 $10.50\% \pm 2.83\%$;肝硬化组收缩前 GIS 为 $834.94 \pm 149.99 \text{ pl}$,收缩后 GIS 为 $691.36 \pm 132.89 \text{ pl}$,收缩后 GIS 减少的百分比为 $17.26\% \pm 4.80\%$,肝硬化组收缩后 GIS 减少百分比与对照组比较统计学差异显著($P = 0.001$)。对照组与肝硬化组收缩前 GIS 及收缩后 GIS 无统计学差异($P = 0.168$; $P = 0.548$)。

4. 肾小球周长测量:对照组收缩前肾小球周长为 $476.87 \pm 68.95 \mu\text{m}$,收缩后为 $436.77 \pm 69.53 \mu\text{m}$,收缩后周长变化的百分比为 $8.53\% \pm 3.05\%$;肝硬化

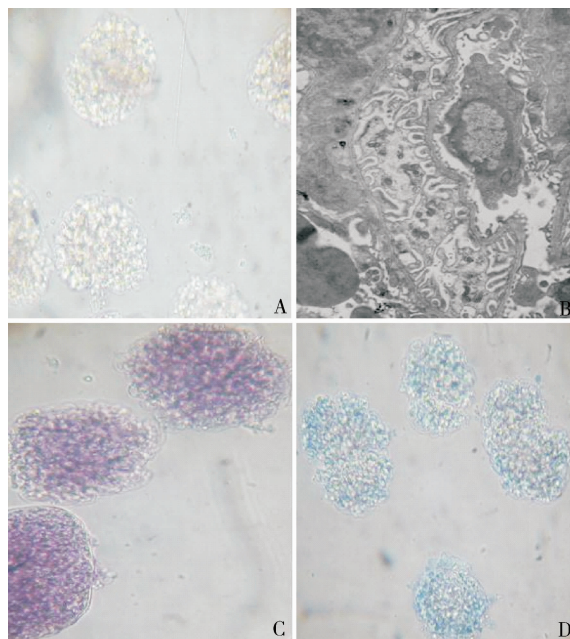


图 2 肾小球鉴定

A. 光镜下见肾小球呈球形或椭圆形,无囊,无肾小管及小动脉成分,肾小球毛细血管丛完整(×200);B. 扫描电镜下可见毛细血管基膜及系膜基质完整,上皮细胞及内皮细胞正常,毛细血管管腔开放,内皮细胞有正常孔窗,上皮细胞足突规律分布(×15000);C. MTT 法肾小球内细胞普遍紫蓝色着色(×200);D. 肾小球内细胞不能被台盼蓝染色(×200)

组收缩前肾小球周长为 $493.70 \pm 58.96 \mu\text{m}$,收缩后 GIS 为 $439.59 \pm 62.35 \mu\text{m}$,收缩后周长变化的百分比为 $11.19\% \pm 4.14\%$,与对照组比较,统计学差异显著($P = 0.007$)。对照组与肝硬化组收缩前肾小球周长及收缩后周长无统计学差异($P = 0.329$, $P = 0.873$)。

讨 论

肝肾综合征时 GFR 明显下降,其确切发病机制不明。被普遍接受的假说是由于内脏血管扩张最终导致了肾脏血管收缩及肾脏血流低灌注,而局部产生的一氧化氮是引起内脏血管扩张的原因^[9]。此外,细菌移位、各种细胞因子、肠系膜血管生成也是内脏血管扩张的原因。肾脏自调节功能的改变也参与了肾脏血管收缩^[10]。肝硬化患者血清中许多缩血管活性物质(如儿茶酚胺、血管紧张素 II、血管加压素、血栓素 A₂、内皮素、白三烯等)均明显增高。内皮素等可通过刺激胞内第 2 信使 1,4,5-三磷酸肌醇(IP₃)产生发挥作用的。前期实验证实严重肝病大鼠肾脏血管平滑肌细胞及肾小球系膜细胞 IP₃R 表达增加,且与肿瘤坏死因子 α(TNF-α)有关。并在体外培养

的系膜细胞水平上证实了 $\text{TNF} - \alpha / \text{PKC} - \alpha / \text{IP}_3\text{R}$ 信号机制^[11]。由于肾小球是主管肾脏滤过功能的重要器官,本研究应用体外分离的肾小球,在器官水平上通过肾小球毛细血管容量测量来证实肾小球对内皮素的敏感度。菊粉分子质量为 5.5kDa,可自由通过肾小球滤过膜且不被肾小管重吸收及分泌。FITC 分子质量仅为 0.39kDa,用其标记菊粉后,通过测定肾小球菊粉容积(GIS)间接测量了肾小球毛细血管容量,当 GIS 减少 >5% 时证明肾小球有收缩。GIS 增加 >5% 时证明肾小球有舒张。通过 MTT 比色法,发现蓝紫色结晶甲瓚沉积在细胞中,而死细胞无此功能;通过台盼蓝染色发现肾小球内细胞没有被染成蓝色证明了我们分离的肾小球其形态学、活性、GIS 及肾小球周长均与文献报道的相似。本研究通过肾小球菊粉容积测量、肾小球周长测量证实了肝硬化大鼠肾小球对缩血管物质内皮素的敏感度较对照组增强,这可能是肝硬化晚期易于发生肾小球滤过率下降的原因之一。能否在肝肾综合征动物模型上验证阻断 $\text{TNF} - \alpha$ 、 IP_3R 可改善 GFR 及探讨相关的信号通路是我们进一步研究的方向。

参考文献

- 1 Prakash J, Mahapatra AK, Ghosh B, *et al.* Clinical spectrum of renal disorders in patients with cirrhosis of liver[J]. *Ren Fail*, 2011; 33(1): 40 - 46
- 2 王静艳,刘洪艳,刘沛.肝硬化大鼠肾小球血管袢和肾小球前小动脉 I 型 1,4,5 - 三磷酸肌醇受体的表达[J]. *中华肝脏病杂志*, 2004, 12(10): 609 - 611

- 3 Ying W, Wei C, Pei L. Renal I inositol 1,4,5 - triphosphate receptors increased in fulminant hepatic failure mice[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13: 2344 - 2348
- 4 White C, McGeown JG. Inositol 1,4,5 - triphosphate receptors modulate Ca^{2+} sparks and Ca^{2+} store content in vas deferens myocytes[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003, 285(1): C195 - 204
- 5 闻颖,陆旭,刘沛.肿瘤坏死因子 α 增强肾小球系膜细胞胞内钙释放参与肝肾综合征发病机制[J]. *中国医师杂志*, 2013; 15(1): 11 - 14
- 6 涂云忠,张坚,刘惠萍,等.白细胞介素 10 基因修饰的骨髓间充质干细胞抑制大鼠肝纤维化形成的实验研究[J]. *中华肝脏病杂志*, 2012, 20(12): 908 - 911
- 7 Wyczalkowska - Tomasiak A, Bartłomiejczyk I, Gornicka B, *et al.* Strong association between fibronectin accumulation and lowered cathepsin B activity in glomeruli of diabetic rats[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2012, 63(5): 525 - 530
- 8 van Bemmelen MX, Szczepańska - Konkel M, Jastorff B, *et al.* Effect of cAMP analogues on glomerular inulin space of isolated rats renal glomeruli[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2005, 56(1): 111 - 120
- 9 Kayali Z, Herring J, Baron P, *et al.* Increased plasma nitric oxide, L - arginine, and arginase - 1 in cirrhotic patients with progressive renal dysfunction[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24(6): 1030 - 1037
- 10 Wong F. Recent advances in our understanding of hepatorenal syndrome[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012, 9(7): 382 - 391
- 11 闻颖,王冬蕾,刘沛.蛋白激酶 C α 激活参与了肿瘤坏死因子 α 引起的肝肾综合征时肾小球滤过率下降[J]. *医学研究杂志*, 2013, 3: 120 - 123

(收稿日期:2013 - 06 - 11)

(修回日期:2013 - 06 - 25)

p38 MAPK 通路介导急性肺栓塞大鼠单核细胞趋化蛋白 1 表达的研究

蔡学定 陈 淳 丁 城 徐晓梅 黄晓颖 王良兴

摘 要 **目的** 探究急性肺栓塞后大鼠肺组织中 MCP - 1 的表达及 p38 MAPK 信号通路对 MCP - 1 的影响。**方法** 通过自体血栓回输法复制大鼠急性肺栓塞模型,分成 1、4、8h 组。采用免疫组化法检测急性肺栓塞大鼠 MCP - 1、p38 MAPK 磷酸化蛋白的表达,采用半定量 RT - PCR 检测急性肺栓塞大鼠肺组织 MCP - 1 mRNA 的表达,采用 Western blot 检测急性肺栓塞大鼠肺组织 p - p38 MAPK 表达。**结果** 免疫组化检测结果显示 MCP - 1、p - p38 MAPK 在大鼠肺组织中有明显表达,RT - PCR、Western blot

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30871138)

作者单位:325003 浙江省温州医学院附属第一医院呼吸内科(蔡学定、丁城、徐晓梅、黄晓颖、王良兴);310014 杭州,浙江省人民医院呼吸内科(陈淳)

通讯作者:王良兴,电子信箱:38805@163.com