

Suramin 对环孢素 A 诱导的大鼠肾毒性的影响

叶薇 陈凯 鲍晓荣

【摘要】 目的 探讨 Suramin 对环孢素 A (CsA) 所致肾毒性的拮抗作用及其相关机制。**方法** 将 40 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组、CsA 组、CsA + 小剂量 Suramin 组和 CsA + 大剂量 Suramin 组, 每组 10 只。分别给药 5 周后检测 4 组大鼠 24 h 尿蛋白、尿 α_1 -微球蛋白 (MG)、 β_2 -MG 和 N-乙酰- β -D 氨基葡萄糖苷酶 (NAG)、血肌酐 (SCr)、血尿素氮 (BUN)、尿酸 (UA) 和胱抑素 C (Cys C), 并计算内生肌酐清除率 (Ccr)。通过 Masson 三色染色法对大鼠肾脏组织进行染色并计算其肾间质纤维化指数。采用免疫组化法检测 4 组大鼠转化生长因子 (TGF)- β_1 、胶原 (collagen)-I 和纤维连接蛋白 (fibronectin) 在肾组织中的表达并计算上述指标的平均光密度值 (AOD)。**结果** CsA 组大鼠的尿 α_1 -MG、 β_2 -MG、NAG、BUN、UA 和 Cys C 水平均明显高于对照组, Ccr 水平明显低于对照组 ($P < 0.05$)。CsA + 小剂量 Suramin 组和 CsA + 大剂量 Suramin 组大鼠的尿 α_1 -MG、 β_2 -MG、NAG、BUN、UA 和 Cys C 水平均明显低于 CsA 组, Ccr 水平均明显高于 CsA 组 ($P < 0.05$)。CsA 组大鼠肾间质纤维化指数和 TGF- β_1 、collagen-I、fibronectin 的 AOD 值均明显高于对照组, CsA + 小剂量 Suramin 组和 CsA + 大剂量 Suramin 组大鼠的上述指标均明显低于 CsA 组 ($P < 0.05$)。**结论** Suramin 能拮抗 CsA 诱导的大鼠肾毒性, TGF- β_1 表达下调可能参与了 Suramin 抑制肾间质纤维化的病理生理过程。

【关键词】 环孢素 A; Suramin; 肾毒性

Effect of Suramin on Cyclosporine A induced nephrotoxicity in rats Ye Wei, Chen Kai, Bao Xiaorong. Department of Nephrology, Jinshan Hospital of Fudan University, Shanghai 201508, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of Suramin on Cyclosporine A (CsA)-induced nephrotoxicity in rats and the relevant mechanism. **Methods** Forty male SD rats were randomly divided into control group, CsA group, CsA + Suramin (low dose) group and CsA + Suramin (high dose) group, with 10 rats in each group. After 5 weeks of administration, 24 h urine protein, α_1 -microglobulin (MG), β_2 -MG, N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG), serum creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN), uric acid (UA) and cystatin C (Cys C) in 4 groups were detected. The values of creatinine clearance (Ccr) were calculated. Masson trichrome staining was performed to estimate the degree of interstitial fibrosis. The expression of transform growth factor (TGF)- β_1 , collagen-I and fibronectin were determined qualitatively by immunohistochemistry. The corresponding values of average optical density (AOD) of the above indicators were determined. **Results** The levels of α_1 -MG, β_2 -MG, NAG, BUN, UA and Cys C in CsA group were higher than those in control group, while the level of Ccr was lower than that in control group ($P < 0.05$). The levels of α_1 -MG, β_2 -MG, NAG, BUN, UA and Cys C in CsA + Suramin (low dose) group and CsA + Suramin (high dose) group were lower than that in CsA group, the level of Ccr was higher than that in CsA group ($P < 0.05$). The degree of interstitial fibrosis and the AOD of TGF- β_1 , collagen-I, fibronectin in CsA group were higher than those in control group, while the above indicators in CsA + Suramin (low dose) group and CsA + Suramin (high dose) group were lower than those in CsA group ($P < 0.05$). **Conclusion** Suramin may probably antagonize the nephrotoxicity induced by CsA. Down-regulated expression of TGF- β_1 may probably associated with the mechanism of interstitial fibrosis.

【Key words】 Cyclosporine A; Suramin; Nephrotoxicity

环孢素 A (CsA) 于 20 世纪 80 年代开始作为免疫抑

制剂用于拮抗肾脏和其他实体器官移植后的排异反应, 明显改善移植早期器官的存活率。CsA 的肾毒性在最初应用时即被发现, 主要表现为肾功能不全和间质纤维化^[1], 上述不良反应限制了其在临床上长期应用。Suramin 的化学成份为 polysulfonated naphthylurea, 曾是美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准的用于治

DOI: 10.3969/j.issn.1001-9057.2019.12.016

基金项目: 上海市金山区卫生和计划生育委员会科研课题面上项目 (JSKJ-KTMS-2016-06)

作者单位: 201508 上海, 复旦大学附属金山医院肾内科

通讯作者: 鲍晓荣, E-mail: wangyu_syd@sina.com

疗锥虫病的药物,后来发现该药物能够抑制多种细胞因子和生长因子受体活化,减轻肌肉和肝脏的纤维化^[2-3],进一步研究发现该药能够缓解多种动物模型的慢性肾损伤^[4-5]。在本研究中,我们应用 CsA 制作大鼠肾毒性动物模型,同时给予其 Suramin 干预,探讨该药物能否减轻或逆转 CsA 诱导的肾毒性及其相关机制。

材料与方 法

1. 材料:实验动物:雄性 SD 大鼠(SPF 级)40 只购于上海杰思捷实验动物公司,饲养于复旦大学附属公共卫生中心实验动物房,体重 180 ~ 200 g,环境温度维持在 20 ± 2 ℃,相对湿度维持在 40% ~ 60%,每日光照 12 h,自由进食和饮水。实验药物:CsA 购于瑞士诺华公司, Suramin 购于 MCE 公司,转化生长因子(TGF)-β₁、胶原(collagen)-I、纤维连接素(fibronectin)抗体购于 Abcam 公司,Masson 三色染色试剂盒购于珠海贝索公司。

2. 方法:

(1)实验分组及处理:将 40 只大鼠随机分为 4 组:对照组(橄榄油 + 生理盐水)、CsA 组(CsA 25 mg/kg + 生理盐水)、CsA + 小剂量 Suramin 组(CsA 25 mg/kg + Suramin 10 mg/kg)、CsA + 大剂量 Suramin 组(CsA 25 mg/kg + Suramin 20 mg/kg),每组 10 只。每日给药前准确称取大鼠体重,按体重计算给药剂量。CsA 以橄榄油稀释,采用皮下注射给药。Suramin 溶于生理盐水腹腔注射,根据药物半衰期每周给药 1 次。以上各组大鼠给药时间均为 5 周。

(2)大鼠尿液与血液的检测:处死大鼠前 2 天将其置于代谢笼中,记 24 h 尿量,留取尿液标本,检测 24 h 尿蛋白定量和尿 α₁-微球蛋白(MG)、β₂-MG、N-乙酰-β-D 氨基葡萄糖苷酶(NAG)、尿肌酐。大鼠处死前禁食 12 h,准确称取体重,按体重腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉,心脏取血留取血液标本,检测血肌酐(SCr)、血尿素氮(BUN)、血尿酸(UA)和胱抑素 C 指标。内生肌酐清除率(Ccr) = 尿肌酐(μmol/L) × 24 h 尿量(ml) / SCr(μmol/L) × 1 440。

(3)肾间质纤维化程度的半定量分析:大鼠处死后分离其左肾,用 4% 多聚甲醛固定后,经脱水、浸蜡和包埋,制成 3 μm 厚切片,Masson 三色染色后在光学显微镜下观察。每张切片均采集 10 个不重复的视野,使用 Image-Pro Plus 6.0 软件,将视野中染成蓝色的胶原面积作为阳性目标,以阳性面积占整个视野面积的百分比值作为肾小管间质纤维化水平的定量标准,10 个视野的百分比的平均值即为该标本的肾间质纤

维化指数。

(4)TGF-β₁、collagen-I 和 fibronectin 的定量分析:常规石蜡切片脱蜡水化后采用免疫组化法检测 TGF-β₁、collagen-I 和 fibronectin 在组织中的表达。每张切片在不含肾小球的肾小管间质区域选取 10 个高倍视野(×400),使用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析各视野的平均光密度值(AOD)值,AOD 为阳性目标光密度和阳性面积百分比,代表待测抗原量。

3. 统计学处理:应用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 *P* < 0.05 为差异统计学意义。

结 果

1.4 组大鼠 24 h 尿蛋白定量和尿 α₁-MG、β₂-MG、NAG 水平的比较:CsA 组大鼠的尿 α₁-MG、β₂-MG 和 NAG 水平明显高于对照组(*P* < 0.05)。CsA + 小剂量 Suramin 组和 CsA + 大剂量 Suramin 组大鼠的尿 α₁-MG、β₂-MG 和 NAG 水平明显低于 CsA 组,随着 Suramin 剂量的增加,尿 α₁-MG、β₂-MG 和 NAG 水平明显下降(*P* < 0.05)。各组大鼠间 24 h 尿蛋白定量比较差异均无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 1。

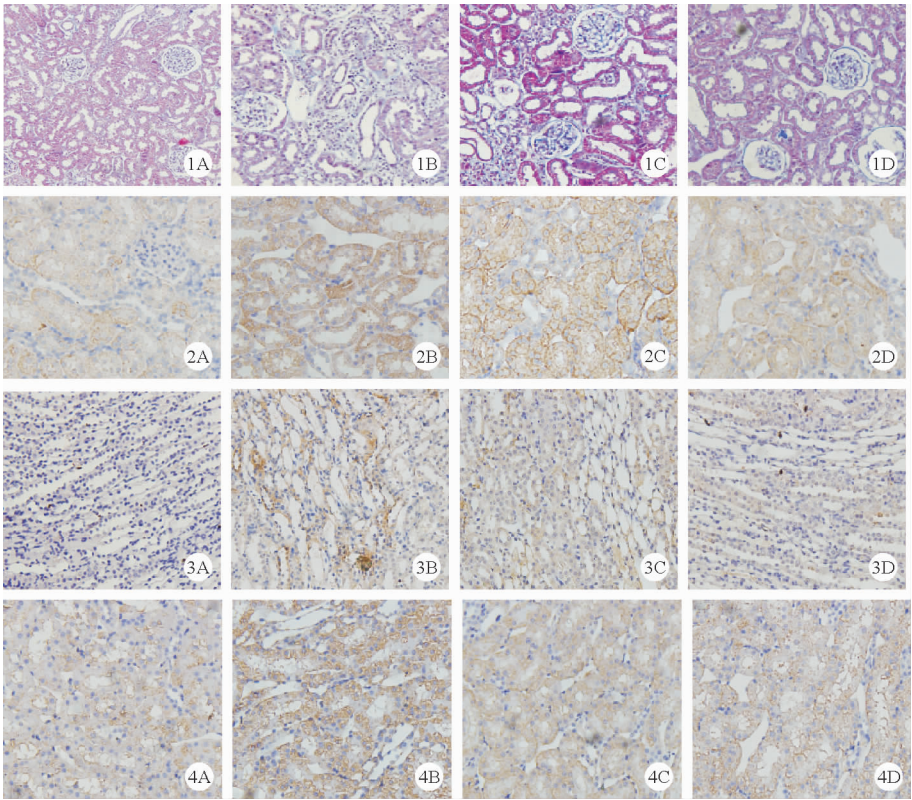
表 1 4 组大鼠 24 h 尿蛋白定量和尿 α₁-MG、β₂-MG、NAG 水平的比较(*n* = 10, $\bar{x} \pm s$)

组别	24 h 尿蛋白 (g/24 h)	尿 α ₁ -MG (mg/L)	尿 β ₂ -MG (mg/L)	尿 NAG (U/L)
对照组	0.26 ± 0.03	3.90 ± 0.37	0.01 ± 0.00	6.98 ± 1.79
CsA 组	0.21 ± 0.16	8.13 ± 0.50 ^a	0.08 ± 0.01 ^a	19.63 ± 3.79 ^a
CsA + 小剂量 Suramin 组	0.37 ± 0.24	5.05 ± 0.36 ^{ab}	0.05 ± 0.01 ^{ab}	14.28 ± 3.12 ^{ab}
CsA + 大剂量 Suramin 组	0.47 ± 0.34	5.16 ± 0.49 ^{ab}	0.02 ± 0.01 ^{bc}	10.88 ± 2.77 ^{abc}

注:与对照组比较,^a*P* < 0.05;与 CsA 组比较,^b*P* < 0.05;与 CsA + 小剂量 Suramin 组比较,^c*P* < 0.05

2.4 组大鼠 SCr、BUN、UA、Cys C 和 Ccr 水平的比较:CsA 组大鼠的 BUN、UA 和 Cys C 水平均明显高于对照组,Ccr 水平明显低于对照组,随着 Suramin 剂量的增加,BUN、UA 和 Cys C 水平明显下降,CCr 明显升高(*P* < 0.05)。各组大鼠间 SCr 水平比较差异均无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 2。

3.4 组大鼠肾间质纤维化程度比较:4 组大鼠肾脏组织 Masson 染色结果显示,对照组大鼠肾脏组织无明显异常,CsA 组大鼠肾小管上皮细胞变性,管腔扩张,间质炎症细胞浸润,间质细胞增殖,胶原增生。CsA + 小剂量 Suramin 组和 CsA + 大剂量 Suramin 组大鼠肾脏组织上述改变均有所减轻,大剂量 Suramin 组减轻最为明显,见图 1。CsA 组[(12.43 ± 0.11)%]大鼠肾间



注:A:对照组;B:CsA 组;C:CsA + 小剂量 Suramin 组;D:CsA + 大剂量 Suramin 组

图 1 4 组大鼠肾脏组织 Masson 染色结果(×400) 图 2 4 组大鼠肾脏组织中 TGF-β₁ 的表达(IHC, ×400) 图 3 4 组大鼠肾脏组织中 collagen- I 的表达(IHC, ×400) 图 4 4 组大鼠肾脏组织中 fibronectin 的表达(IHC, ×400)

表 2 4 组大鼠 SCr、BUN、UA、Cys C 和 Ccr 水平的比较($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	SCr(μmol/L)	BUN(mmol/L)	UA(μmol/L)	Cys C(mg/L)	Ccr[ml·min ⁻¹ ·(100g) ⁻¹]
对照组	37.40 ± 5.36	7.31 ± 1.11	96.90 ± 18.20	0.24 ± 0.02	0.84 ± 0.08
CsA 组	42.50 ± 6.15	9.10 ± 1.27 ^a	150.10 ± 43.30 ^a	0.28 ± 0.04 ^a	0.59 ± 0.09 ^a
CsA + 小剂量 Suramin 组	44.50 ± 8.82	8.97 ± 1.21 ^a	123.10 ± 26.92 ^{ab}	0.29 ± 0.03 ^a	0.62 ± 0.12 ^a
CsA + 大剂量 Suramin 组	40.90 ± 2.81	7.17 ± 1.17 ^{bc}	103.50 ± 54.80 ^{bc}	0.24 ± 0.03 ^{bc}	0.71 ± 0.15 ^{abc}

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与 CsA 组比较,^b $P<0.05$;与 CsA + 小剂量 Suramin 组比较,^c $P<0.05$

质纤维化指数明显高于对照组[(2.21 ± 0.02)%, $P<0.05$],CsA + 小剂量 Suramin 组[(8.44 ± 0.09)%]和 CsA + 大剂量 Suramin 组[(5.29 ± 0.14)%]大鼠肾间质纤维化指数明显低于 CsA 组[(12.43 ± 0.11)%, $P<0.05$]。

4.4 组大鼠 TGF-β₁、collagen- I 和 fibronectin AOD 值的比较:CsA 组大鼠肾脏组织中 TGF-β₁、collagen- I 和 fibronectin 的表达水平明显高于对照组,而 CsA + 小剂量 Suramin 组和 CsA + 大剂量 Suramin 组大鼠的肾脏组织中 TGF-β₁、collagen- I 和 fibronectin 的表达水平均低于 CsA 组。见图 2 ~ 4。CsA 组大鼠 TGF-β₁、collagen- I 和 fibronectin 的 AOD 值明显高于对照组($P<0.05$)。CsA + 小剂量 Suramin 组和 CsA + 大剂量 Suramin 组大鼠 TGF-β₁、collagen- I 和 fibronectin 的 AOD 值明显低于 CsA 组($P<0.05$),见表 3。

表 3 4 组大鼠 TGF-β₁、collagen- I 和 fibronectin AOD 值的比较($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	TGF-β ₁	collagen- I	fibronectin
对照组	0.13 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.16 ± 0.00
CsA 组	0.24 ± 0.05 ^a	0.13 ± 0.01 ^a	0.37 ± 0.07 ^a
CsA + 小剂量 Suramin 组	0.19 ± 0.05 ^{ab}	0.08 ± 0.00 ^{ab}	0.22 ± 0.03 ^{ab}
CsA + 大剂量 Suramin 组	0.14 ± 0.02 ^{bc}	0.04 ± 0.00 ^{bc}	0.17 ± 0.01 ^{bc}

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与 CsA 组比较,^b $P<0.05$;与 CsA + 小剂量 Suramin 组比较,^c $P<0.05$

讨 论

CsA 的化学成份为钙调磷酸酶抑制剂,是目前器官移植领域中应用最广泛的免疫抑制剂之一,其应用不但极大地提高了移植器官的近期存活率,对于自身免疫性疾病的治疗也取得了良好的临床效果。随着应

用时间的延长和应用范围的延伸,临床上对其不良反应的认识也逐渐加深。CsA 的不良反应中,肾毒性备受关注,主要表现为肾功能不全和肾间质纤维化。

目前认为 CsA 引起肾功能不全的发病机制为血流动力学改变和 CsA 直接毒性的共同作用。CsA 可直接刺激球旁细胞活化肾素-血管紧张素系统^[6],使肾小球入球小动脉收缩。CsA 还能刺激内皮素和血栓素生成增多,进一步加剧入球小动脉收缩。入球小动脉收缩造成低灌注性缺氧,增加自由基和活性氧(ROS)生成,不仅导致肾小管上皮细胞损伤和功能障碍,还导致一氧化氮(NO)生物利用度下降,抑制了 NO 依赖性的血管内皮舒张机制^[7-8],而该机制是 CsA 引起肾小球滤过率降低的主要原因。此外,CsA 直接刺激肾小管上皮细胞内 TGF- β_1 的表达增加,TGF- β_1 进一步激活信号转导和转录激活因子-3 及细胞外信号调节激酶等数条信号转导途径,进一步激活成纤维细胞,导致细胞外基质 collagen- I 和 fibronectin 沉积增加,最终导致肾间质纤维化形成^[9]。

Zhuang 等^[4]和 Korrapati 等^[10]分别在缺血再灌注和横纹肌溶解综合征的急性肾损伤模型中发现, Suramin 能通过抑制炎症和氧化应激反应,减少白细胞浸润及自由基生成,进而减轻肾损伤的程度。Liu 等^[11]在梗阻性肾病的大鼠模型中发现, Suramin 能通过抑制 TGF- β_1 的表达,阻断成纤维细胞的活化,减少细胞外基质的生成。Xiong 等^[12]发现在大鼠腹膜纤维化模型中, Suramin 也是通过同样的机制减轻腹膜纤维化的程度。在本研究中,与对照组比较, CsA 组 BUN、UA 和 Cys C 水平明显升高, Ccr 水平明显下降,反映肾小管功能的尿 α_1 -MG、 β_2 -MG 和 NAG 水平也明显升高。Suramin 干预后,上述反映肾功能不全和肾小管损伤指标的恶化程度均明显缓解,且大剂量组的改善效果更明显,故推测 Suramin 可能通过抑制 CsA 诱导的氧化应激反应,减少自由基和 ROS 的生成,从而减轻 NO 介导的血流动力学改变和肾小管损伤。在病理方面,与对照组比较, CsA 组大鼠肾间质纤维化程度明显增加,但 Suramin 干预后,肾间质纤维化程度亦明显减

轻,进一步探索其机制发现, Suramin 也能抑制 CsA 诱导的 TGF- β_1 的表达,同时细胞外基质 collagen- I 和 fibronectin 生成也减少,故推测 Suramin 可能是通过抑制 TGF- β_1 途径活化缓解 CsA 诱导的肾间质纤维化。

综上所述,在本研究中,我们发现 Suramin 可减轻 CsA 诱导的大鼠肾毒性,推测该药物在临床上或许可作为辅助用药,拮抗 CsA 的不良反应,但目前 Suramin 对肾脏保护作用的研究仅停留在动物实验阶段,其在人体内应用的有效性和安全性仍需进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Myer D, Ross J, Newton L, et al. Cyclosporine-associated chronic nephropathy[J]. N Engl J Med, 1984, 311(11): 699-705.
- [2] Coffey RJ, Leof EB, Shipley GD, et al. Suramin inhibition of growth factor receptor binding and mitogenicity in AKR-2B cells [J]. J Cell Physiol, 1987, 132(1): 143-148.
- [3] Kloen P, Jennings CL, Gebhardt MC, et al. Suramin inhibits growth and transforming growth factor-beta 1 in osteosarcoma cell lines [J]. Eur J Cancer, 1994, 30A(5): 678-682.
- [4] Zhuang S, Lu B, Daubert RA, et al. Suramin promotes recovery from renal ischemia/reperfusion injury in mice [J]. Kidney Int, 2009, 75(3): 304-311.
- [5] Liu N, Tolbert E, Ponnusamy M, et al. Delayed administration of suramin attenuates the progression of renal fibrosis in obstructive nephropathy [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2011, 338(3): 758-766.
- [6] Bobadilla NA, Gamba G. New insights into the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: A role of aldosterone [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2007, 293(1): F2-F9.
- [7] Zhong Z, Arteel GE, Connor HD, et al. Cyclosporine A increases hypoxia and radical production in rat kidneys [J]. Am J Physiol, 1988, 275(4): F595-F604.
- [8] Diederich D, Skopek J, Diederich A, et al. Cyclosporine produces endothelial dysfunction by increased production of superoxide [J]. Hypertension, 1994, 23(6 Pt 2): 957-961.
- [9] Song CY, Kim BC, Hong HK, et al. TGF- β type II receptor deficiency prevents renal injury via decrease in ERK activity in crescentic glomerulonephritis [J]. Kidney Int, 2007, 71(9): 882-888.
- [10] Korrapati MC, Shaner BE, Schnellmann RG. Recovery from glycerol-induced acute kidney injury is accelerated by Suramin [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2012, 341(1): 126-136.
- [11] Liu N, Tolbert E, Pang M, et al. Suramin inhibits renal fibrosis in chronic kidney disease [J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(6): 1064-1075.
- [12] Xiong CX, Liu N, Fang L, et al. Suramin inhibits the development and progression of peritoneal fibrosis [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2014, 351(2): 373-382.

(收稿日期: 2019-03-27)

(本文编辑: 余晓曼)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊关于参考文献著录和核对的要求

请作者在投稿和修稿时,按《临床内科杂志》稿约参考文献著录格式要求著录参考文献。同时,参考文献必须由作者本人亲自阅读,并经书刊、光盘或网上查对核实过,以免出现差错。谢谢合作!