

伊马替尼对单侧输尿管梗阻小鼠肾损伤的保护作用

王胃姿,刘玲,张野,许春花* (延边大学附属医院 儿科,吉林 延吉 133000)

摘要:目的 探讨伊马替尼改善单侧输尿管梗阻诱导的小鼠肾损伤中的保护作用。方法 72只昆明小鼠随机分为对照组(Sham组, n=24)、模型组(UUO组, n=24)和治疗组(IM组, n=24)。Sham组麻醉后游离左侧输尿管,不结扎;UUO组麻醉后游离左侧输尿管并结扎;IM组麻醉后游离左侧输尿管并结扎,并于术后第1天起,每日予伊马替尼50 mg/kg灌胃,连续14 d。每组术后第3、7及14天取眼球血,肌酐酶法测血清BUN、Scr含量,ELISA法测血清IL-1 β 和炎症因子TNF- α 水平。每组术后取第3、7及14天肾组织,HE和Masson染色法观察肾组织的病理变化,蛋白免疫印迹法检测肾组织中GRP78、PERK、PDGF-C及PDGF-D蛋白表达水平。**结果** 肾功能检测结果表明,与Sham组相比,UUO组第3天、第7天及第14天各指标逐渐升高($P < 0.05$);与UUO组相比,IM组第3天、第7天各项指标均降低($P < 0.05$),第14天时下降更明显($P < 0.001$)。血清因子检测结果表明:与Sham组相比,UUO组术后不同时间段血清的IL-1 β 和TNF- α 水平显著增高($P < 0.05$);与UUO组相比,IM组第3、7、14天各指标水平显著降低($P < 0.05$)。HE染色结果表明,UUO组肾小球萎缩、玻璃样变、肾小管扩张、间质内炎症细胞浸润、毛细血管管腔结构被破坏、数量减少;IM组肾损伤程度减轻,肾组织结构相似于Sham组。Masson染色结果表明,与Sham组比较,UUO组术后第3天有少量胶原纤维增加,术后第7天和第14天胶原纤维显著增多,间质纤维化明显;IM组术后肾小管扩张程度和胶原纤维的量随梗阻时间逐渐增多,肾纤维化程度减轻。Western Blot检测结果表明,与Sham组相比,UUO组在第7天和14天时GRP78、PERK及PDGF-C、PDGF-D的蛋白表达水平平均明显增高($P < 0.05$);与UUO组相比,IM组在第7天和14天时GRP78、PERK和PDGF-C、PDGF-D蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。**结论** 伊马替尼对肾组织损伤有明显的保护作用,其作用机制与抑制细胞凋亡、炎症因子的产生及调控内质网的应激密切相关。

关键词:左侧输尿管梗阻模型;伊马替尼;GRP78;PERK

中图分类号:R692

文献标志码:A

随着社会的发展,环境的变化及人们生活方式的改变,肾脏疾病的发生率近年来逐渐增长,急性肾损伤的多重发生机制中,内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)起着重要作用^[1-2]。各种因素的干扰使得内质网无法正常处理细胞中的蛋白质,异常蛋白质在内质网中积累从而引起ERS,进而激活相关凋亡通路,促进炎症反应,导致器官损伤,持续的应激状态是许多慢性疾病发生和发展的关键因素^[3]。甲磺酸伊马替尼(imatinib, IMA)可削弱肾脏皮质小管和间质中细胞的增殖,同时在一定程度上降低肾脏中胶原的沉积,还能改善肾损伤诱导的纤维化。IMA可通过多种机制对肾脏起到保护作用^[4]。

本实验制备小鼠单侧输尿管梗阻(unilateral urethral obstruction, UUO)模型,利用IMA进行治疗,观察不同时间点肾组织的病理及肾功能指标变化;检测肾组织中内质网应激相关因子、肾纤维化相关因子和炎症因子的表达,探讨IMA对UUO模型小鼠肾组织损伤的影响,为临床应用伊马替尼治疗肾脏疾

病提供实验依据。

1 材料与方

1.1 主要试剂

甲磺酸伊马替尼:中国正大天晴药业集团股份有限公司;GRP78抗体、PERK抗体:美国Santa Cruz Biotechnology;肌酐、尿素氮试剂盒:中国南京建成生物工程有限公司;Mouse TNF- α ELISA Kit、Mouse IL-1 β ELISA Kit:中国南京森贝伽生物科技有限公司;兔抗PDGF-C抗体、PDGF-D抗体:美国Abcam公司。

1.2 动物分组、模型制备及给药方法

本实验用延边大学实验动物中心提供的72只20~25 g雄性昆明小鼠,随机分为Sham组、UUO组和IM组,每组24只。UUO组:小鼠以5%水合氯醛麻醉后,在距离小鼠左侧脊柱1.5 cm区域,从左侧肋骨下缘1 cm位置做纵向切口,显露肾脏,游离左肾下极输

基金项目:吉林省卫生健康技术创新项目(2019J053)

作者简介:王胃姿(1999—),女,辽宁沈阳人,硕士研究生,主要从事小儿泌尿系统疾病研究。

通信作者:许春花,教授(E-mail:1377122113@qq.com)

尿管,对输尿管近端和远端结扎后切断输尿管,造成单侧输尿管梗阻,当肾脏出现肾小管间质纤维化病理改变提示该模型制备成功。Sham组:将左侧输尿管游离不进行结扎。IM组小鼠术后每天按50mg/kg给予伊马替尼混悬液灌胃,Sham组和UUO组分别灌胃同等剂量的0.9%NS溶液。

1.3 血清BUN、Scr、IL-1 β 、TNF- α 测定

术后第3天、7天及14天,每组随机选择8只小鼠眼球取血。制备血清以脲酶法检测血清BUN;以肌氨酸氧化酶法检测血清Scr含量;按照ELISA试剂盒步骤严格操作检测血清TNF- α 和IL-1 β 含量。

1.4 肾病理检测

术后第3天、7天及14天,每个时间点分别取8只小鼠左侧梗阻肾组织,取该肾组织一半进行包埋,另一半肾组织液氮冻存待用,按照试剂盒说明书操作做HE和Masson染色,观察肾组织的病理改变。

1.5 蛋白免疫印迹法检测GRP78、PERK、PDGF-C和PDGF-D表达水平

术后第3天、第7天及14天,每个时间点分别取8只小鼠左侧梗阻肾组织(取冻存肾组织)蛋白提取后测定蛋白浓度。凝胶配制按比例混合蒸馏水、30%

丙烯酰胺、Tris-HCl、SDS、过硫酸铵及TEMED,配置浓度分别为6%、8%和10%的分离胶和5%浓缩胶。以70V电压跑胶至Marker分层,再调至90V至目标蛋白迁移至分离胶底部,控制低温下以200mA、1.5h将蛋白转至PVDF膜,以5%脱脂奶粉封闭PVDF膜1.5h后加入一抗、二抗孵育之后显影、定影。检测肾组织中GRP78、PERK、PDGF-C和PDGF-D蛋白的表达水平。

1.6 统计学分析

所有数据以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,应用软件SPSS 27.0进行分析。采用独立样本 t 检验和单因素方差分析比较组间数据。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组BUN、Scr、IL-1 β 、TNF- α 含量

Sham组BUN含量、血清Scr值、IL-1 β 水平及TNF- α 水平各时段无显著差异。UUO组随梗阻时间延长,BUN含量、Scr值、IL-1 β 及TNF- α 水平上升($P<0.05$)。IM组各指标较UUO组显著降低,且随时间推移效果更显著(表1)。

表1 各组小鼠血清BUN、Scr、IL-1 β 、TNF- α 含量($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	BUN/(mmol·L ⁻¹)			Scr/(mmol·L ⁻¹)		
	Day3	Day7	Day14	Day3	Day7	Day14
Sham组	6.20 \pm 0.13	6.11 \pm 0.05	6.09 \pm 0.06	24.06 \pm 1.10	24.33 \pm 1.60	24.83 \pm 2.51
UUO组	7.76 \pm 0.21*	8.39 \pm 0.28* Δ	9.12 \pm 0.13* Δ \blacktriangle	46.58 \pm 0.82	51.23 \pm 1.23* Δ	56.36 \pm 0.59* Δ \blacktriangle
IM组	6.62 \pm 0.10#	7.09 \pm 0.10* Δ	7.72 \pm 0.11* Δ \blacktriangle	37.00 \pm 0.20	41.33 \pm 1.03* Δ	46.45 \pm 0.71* Δ \blacktriangle
组别	IL-1 β 含量/(ng·L ⁻¹)			TNF- α /(ng·L ⁻¹)		
	Day3	Day7	Day14	Day3	Day7	Day14
Sham组	32.91 \pm 2.12	32.86 \pm 1.67	33.17 \pm 1.83	102.98 \pm 1.93	104.85 \pm 1.21	102.28 \pm 2.06
UUO组	86.80 \pm 2.68*	91.23 \pm 1.89* Δ	97.95 \pm 1.33* Δ \blacktriangle	169.47 \pm 3.88*	191.86 \pm 2.72* Δ	209.35 \pm 3.43* Δ \blacktriangle
IM组	64.90 \pm 4.35#	70.81 \pm 1.26* Δ	78.77 \pm 1.52* Δ \blacktriangle	151.90 \pm 1.42#	158.87 \pm 1.70* Δ	164.40 \pm 1.80* Δ \blacktriangle

#:与UUO组对比, $P<0.05$;*:与Sham组对比, $P<0.05$; \blacktriangle :与Day7对比, $P<0.05$; Δ :与Day3对比, $P<0.05$ 。

2.2 各组小鼠肾组织病理改变

HE染色显示,Sham组各时间点肾组织基本正常,肾小球清楚,肾小管无明显扩张,间质内无炎性细胞。UUO组术后3d肾小管扩张,管壁增厚,间质内少许炎症细胞浸润,无明显肾小球系膜细胞及基底膜增生;术后7d,肾小管扩张明显,形态不规则,肾间质血管减少,可见炎性细胞增多,肾小球萎缩,纤维组织增生,病理损伤程度加重;术后14d,随着

梗阻时间延长,肾组织破坏程度最重,肾小球萎缩,毛细血管稀疏,间质内大量炎性细胞浸润,细胞外基质及纤维细胞弥漫性增多。IM组与UUO组比较,伊马替尼治疗后梗阻侧肾组织肾小球和肾小管结构病变程度有所减轻,间质内炎性细胞减少,系膜细胞、基底膜及纤维组织增生降低,肾损伤程度均有改善(见图1)。

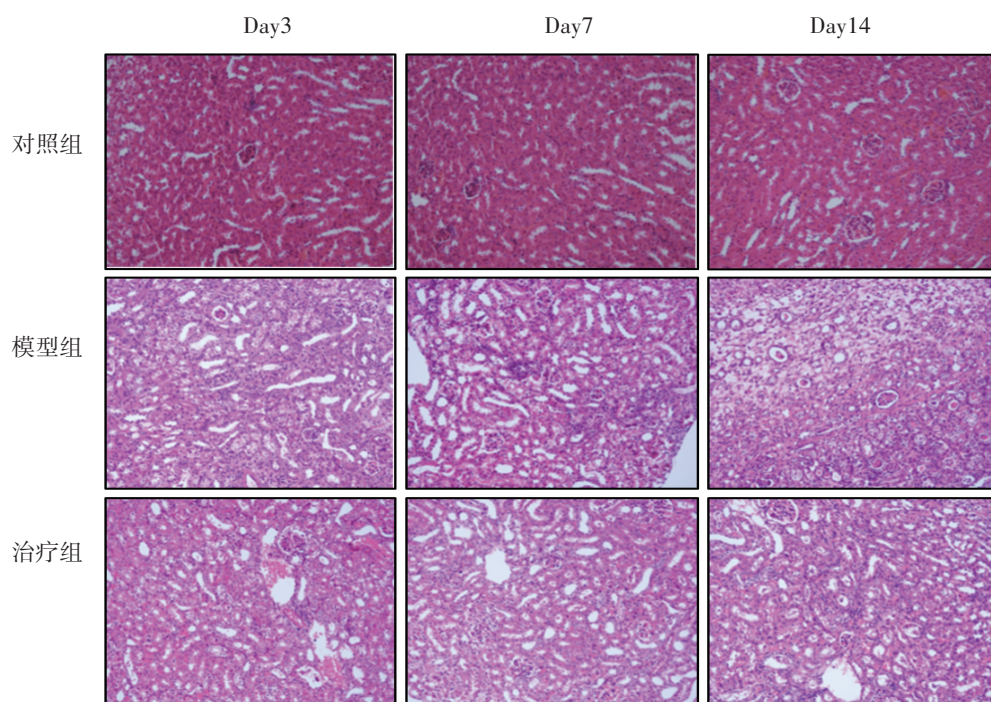


图1 各组小鼠肾组织病理改变(HE,200×)

2.3 各组小鼠肾组织纤维化程度

Masson 染色显示,Sham 组术后3天、7天、14天未观察到显著的蓝染胶原纤维。UUO组:随梗阻时间延长,蓝染胶原纤维面积逐渐增加;术后3 d,可见肾间质增宽,间质内胶原纤维沉积;术后7d,可见肾

小管萎缩、结构破坏,蓝染面积较3天增多;术后14天,上述病理变化较前明显加重。IM组在各时间点的肾小管破坏程度及胶原纤维分布情况等肾组织病理学改变较同时间点UUO组减轻(见图2)。

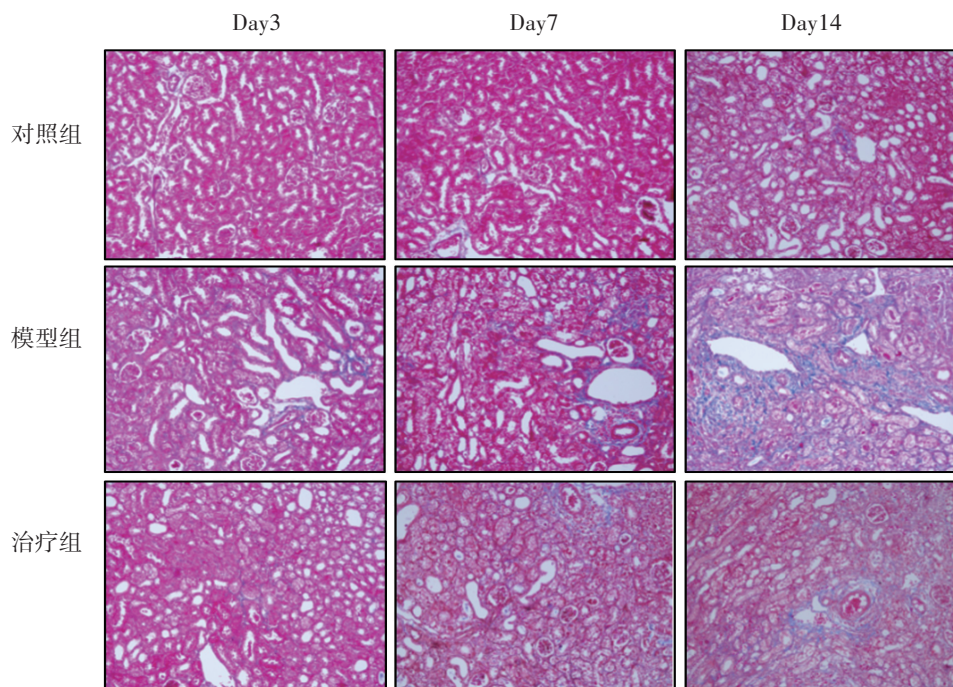


图2 各组小鼠肾组织的形态学改变(Masson,200×)

2.4 各组小鼠肾组织 GRP78、PERK、PDGF-C、PDGF-D 表达

如图3、4所示,与Sham组相比,UUO组和IM组在术后7天、14天时,GRP78、PERK及PDGF-C、

PDGF-D的表达水平均显著升高($P<0.05$);而与UUO组相比,IM组中这些指标的表达水平均显著降低($P<0.05$),提示伊马替尼可抑制内质网应激及促纤维化信号通路。

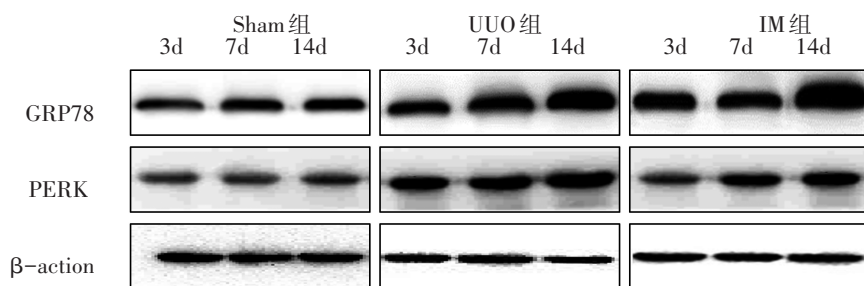


图3 各组小鼠GRP78、PERK蛋白表达

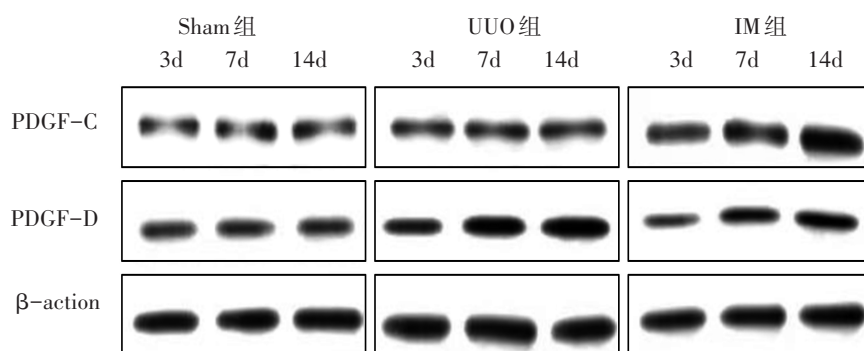
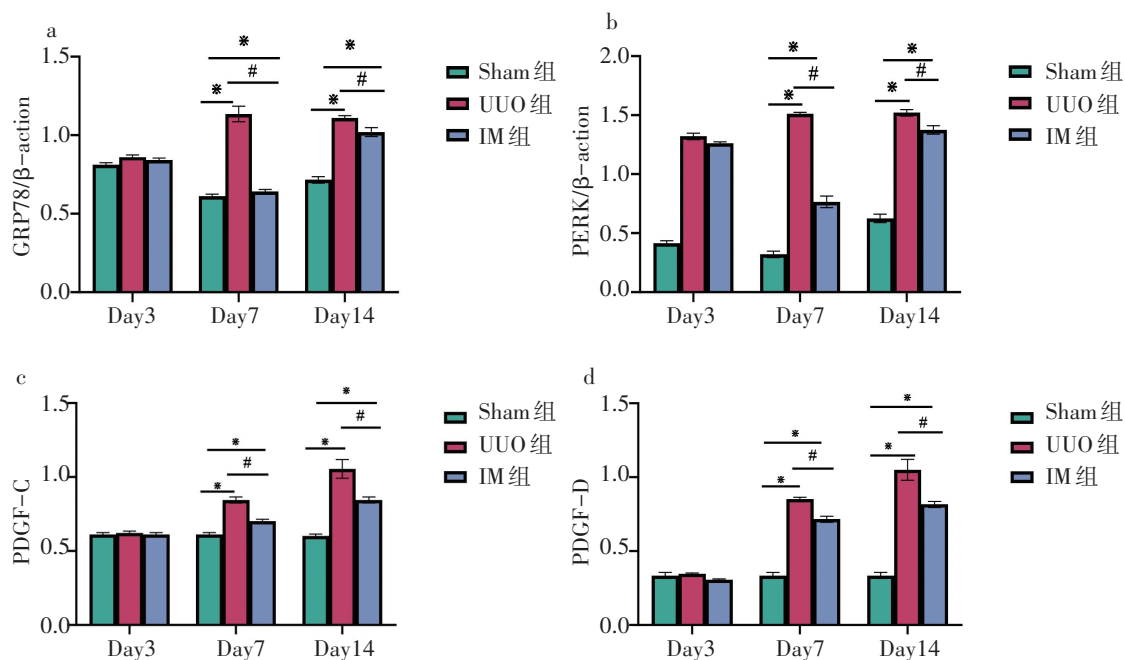


图4 各组小鼠PDGF-C、PDGF-D蛋白表达



*:与Sham组比较, $P<0.05$;#:与UUO组比较, $P<0.05$ 。

图5 各组小鼠GRP78、PERK、PDGF-C、PDGF-D蛋白表达

3 讨论

肾脏作为人体重要器官,其主要作用是维持体内平衡稳态,分泌激素和生物活性分子。在多种因素下肾脏受到的不同程度损伤均可缩短其寿命,最终导致肾衰竭,造成不可逆的脏器受损。早期急性肾损伤的主要组织学特征为肾小管细胞坏死、凋亡,逐渐进展为肾纤维化、肾衰竭等,最终形成CKD,使肾脏功能出现不可逆转的结果。因此,正确的认识肾损伤的病理改变过程,可为临床治疗肾脏疾病提供新的方案^[5-6]。本实验通过单侧输尿管结扎方式创建UUO小鼠肾损伤模型,在UUO梗阻侧肾脏中发现BUN和Scr水平显著升高,结合肾组织病理改变及炎症因子的结果证实为UUO模型制备成功。

在肾脏中,ERS与多种肾脏疾病的发生和进展有关,其中,ERS介导的细胞凋亡是发病的重要因素。研究数据表明,持续的ERS可导致肾小管细胞凋亡,最终引起肾间质纤维化,造成慢性肾脏病^[7]。有研究发现^[8],敲入GRP78基因后的小鼠随着年龄增长表现出明显的肾小管间质病,出现肾小管细胞凋亡。还有研究发现^[9],肾小管坏死评分和细胞凋亡指数升高时PERK通路被激活,同时ERS标志蛋白GRP78、CHOP等在缺氧和ERS作用下蛋白表达水平显著升高,并参与肾近端肾小管上皮细胞系凋亡。

本实验通过单侧输尿管结扎方式创建UUO小鼠肾损伤模型,并严格设置对照组和药物治疗组,分别于3天、7天及14天后收集血液和肾脏组织样本,检测小鼠血液中的BUN和Scr水平,以评估各组的肾功能。肾脏组织病理学分析显示,相对于模型组小鼠,伊马替尼治疗后,肾脏病变整体略有减轻,肾小球萎缩减少,肾小管扩张降低,间质纤维化程度减轻。同时发现,与模型组相比,伊马替尼治疗后的IL-1 β 和TNF- α 的水平显著降低,表明伊马替尼治疗有利于抑制肾脏的炎症反应。与Sham组相比,UUO组和IM组在术后7天、14天时,GRP78、PERK及PDGF-C、PDGF-D的表达水平均显著升高;而与UUO组相比,IM组中这些指标的表达水平均显著降低,提示伊马替尼可抑制内质网应激及促纤维化信号通路。

IM作为一种选择性酪氨酸激酶抑制剂,最初用于治疗慢性粒细胞白血病,能够通过抑制PDGFR的激酶活性^[10],进而干扰PDGF诱导的信号传导,从而抑制肿瘤细胞的增殖和存活,使其成为一种有效的免疫调节剂。IM在各种肾脏疾病模型中具有肾脏保

护作用^[11],可降低caspase-3的表达和活性,防止地塞米松诱导的胰腺 β 细胞凋亡^[12]。在白蛋白诱导的肾小管损伤模型中^[13],以剂量依赖性方式通过降低白蛋白诱导的GRP78和eIF2 α 来抑制细胞外基质和ERS。IM治疗可下调小鼠PERK、CHOP等蛋白的表达,降低JNK通路激活,减少胰岛细胞死亡,从而调节ERS^[14]。在膀胱炎小鼠的实验研究^[15]中发现,IM可降低PERK等蛋白的表达。本实验中IM治疗后GRP78和PERK蛋白的表达含量显著下调。IM通过抑制内质网应激从而减少肾小管细胞凋亡,减弱肾炎症损伤,减轻肾细胞外基质沉积,延缓肾损伤,与文献报道一致^[16]。

PDGF/PDGFR信号通路在肾脏纤维化发生发展中发挥重要作用。PDGF家族包括四个成员:PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C和PDGF-D^[17]。在肾小球中,主要涉及PDGF-B和-D的自分泌和旁分泌效应,即PDGFR- β 配体,推动系膜细胞增殖和肾小球硬化的发展。PDGF-C是一种生长因子,与PDGFR- α 受体结合,促进肾间质纤维化的发生。在动物实验中发现,输注PDGF-C能显著加速肾小球毛细血管的愈合。因此,PDGF-C也是促进肾脏血管修复的重要因子,对治疗与内皮细胞损伤相关的肾小球疾病具有重要临床意义。PDGF-D是一种在肾脏中表达的生长因子,在健康肾脏中,它主要由间质成纤维细胞和血管平滑肌细胞表达。在肾脏纤维化的晚期阶段PDGF-D通过促进成纤维细胞的增殖、激活和外部基质的转换发挥作用。在纤维化方面,PDGF-C和PDGF-D通过启动平滑肌细胞、成纤维细胞等细胞的增殖和迁移,促进纤维组织的形成。

IM主要作用于Bcr-Abl、c-Kit、PDGFR- α 和PDGFR- β 。有研究表明IM长期治疗显著减缓了肾小球硬化和小管间质损伤的进展,同时降低了肾皮质中胶原I型和TGF- β 的表达水平^[18]。还有实验证明^[19],IM显著抑制间质成纤维细胞和肌成纤维细胞数量的增加,通过抑制c-abl活性改善大鼠的实验性肾纤维化。这些发现暗示着IM可能通过抑制PDGF信号通路,减少细胞增殖和纤维化反应。本实验结果显示,与模型组比较IM组肾组织PDGF-C和PDGF-D蛋白表达水平明显降低,IM通过调节肾组织中PDGF-C和PDGF-D蛋白的表达,抑制RIF的发生。

IM通过调节肾功能损伤、凋亡和下调内质网应激及肾纤维化相关信号通路来减轻UUO模型的肾损

伤程度,从而延缓肾损伤过程,保护肾组织。未来需要更多的研究来进一步阐明IM保护肾损伤的潜在机制,从而发现预防肾损伤的新干预策略。

参考文献:

- [1] ULLAH M M, BASILE P D. Role of renal hypoxia in the progression from acute kidney injury to chronic kidney disease[J]. *Semin Nephrol*, 2019, 39(6):567-580.
- [2] YOUNG I K, KYEONG Y P, HEON S S, et al. Role of Akt1 in renal fibrosis and tubular dedifferentiation during the progression of acute kidney injury to chronic kidney disease [J]. *Korean J Intern Med*, 2020, 36(4):962-974.
- [3] NIIDA Y, MASUDA M, ADACHI Y, et al. Reduction of stearoyl-CoA desaturase (SCD) contributes muscle atrophy through the excess endoplasmic reticulum stress in chronic kidney disease[J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2020, 67(2):20-24.
- [4] CHEN H K, HSU H H, YANG Y H, et al. Salinomycin attenuates kidney fibrosis and inflammation in mice with unilateral ureteral obstruction[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2025, 742:151130.
- [5] 缪长秀. 慢性肾脏病患者血清甲状腺激素与肾间质纤维化的相关性研究[D]. 长春:吉林大学, 2023.
- [6] LEE E L, DOKE T, MUKHI D, et al. The key role of altered tubule cell lipid metabolism in kidney disease development[J]. *Kidney Int*, 2024, 106(1):24-34.
- [7] 惠鹏祥, 杨潇, 王旭, 等. 肾脏孤立性纤维性肿瘤并发肾盂积水1例报告及文献复习[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2022, 48(6):1593-1598.
- [8] 苏焯, 赵靛, 王萌萌, 等. 基于PERK/ATF4/CHOP的益肾通络方抑制内质网应激改善肾小管上皮细胞凋亡的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(2):26-36.
- [9] SHIN S G, PARK Y, KIM Y J, et al. Propylparaben-induced endoplasmic reticulum stress triggers G2/M phase cell cycle arrest and initiates caspase-3-dependent apoptosis in human lung cells[J]. *Genes Genomics*, 2025, 47(2):223-233.
- [10] OKABE S, ARAI Y, GOTOH A. Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor to overcome imatinib resistance in chronic myeloid leukemia[J]. *Discov Oncol*, 2024, 15(1):835-835.
- [11] 夏冰天, 何芳, 宋冰欣, 等. 伊马替尼通过PDGF/PDGFR通路对A549非小细胞肺癌裸鼠移植瘤的抑制作用及机制研究[J]. *肿瘤防治研究*, 2023, 50(9):854-859.
- [12] KUTPRUEK S, SUKRI K, MANEETHORN P, et al. Imatinib prevents dexamethasone-induced pancreatic β -cell apoptosis via decreased TRAIL and DR5[J]. *Cell Biol Int*, 2023, 124(9):1309-1323.
- [13] 苏晓乐, 闫冰娟, 乔晞, 等. 阿托伐他汀调控PERK/eIF2 α /CHOP通路减轻造影剂诱导的大鼠肾小管上皮细胞凋亡[J]. *中华肾病研究电子杂志*, 2019, 8(3):102-108.
- [14] 尹珊珊, 马红, 姜琦. 荜苳苳抑制PERK/ATF4/CHOP通路改善癫痫小鼠认知功能障碍机制[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2023, 41(5):578-582.
- [15] WANG S, WILKES M C, LEOF E B, et al. Imatinib mesylate blocks a non-Smad TGF- β pathway and reduces renal fibrogenesis in vivo[J]. *FASEB J*, 2005, 19(1):1-11
- [16] JING D, JIGUANG S, LINA D, et al. Treatment with imatinib was useful to delay the neointimal hyperplasia of aortocaval fistula in adenine-induced renal failure rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 672:10-16.
- [17] MICHAEL B, KRISTIAN P. PDGF family function and prognostic value in tumor biology [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(2):984-990.
- [18] IYODA M, SHIBATA T, WADA Y, et al. Long- and short-term treatment with imatinib attenuates the development of chronic kidney disease in experimental anti-glomerular basement membrane nephritis [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2013, 28(3):576-584.
- [19] EL TOHAMY M, ADEL M, RASHAD EL-MENABAWY F, et al. Role of cannabinoid type 2 receptor activation in renal fibrosis induced by unilateral ureteric obstruction in rats[J]. *Rep Biochem Mol Biol*, 2023, 12(1):59-73.

Protective Effect of Imatinib on Renal Injury in a Mouse Model of Unilateral Ureteral Obstruction

WANG Weilou, LIU Ling, ZHANG Ye, XU Chunhua* (Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji, Jilin Province 133000, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effects of imatinib on renal injury in a mouse model of unilateral ureteral obstruction (UUO).

Methods Seventy-two Kunming mice were randomly divided into three groups: the sham group (Sham, n=24), the UUO model group (UUO, n=24), and the imatinib treatment group (IM, n=24). In the Sham group, the ureter was freed but not ligated under anesthesia. In the UUO group, the ureter was freed and ligated. In the IM group, after ureter ligation, imatinib (50 mg/kg) was administered orally once daily starting

