

硫代硫酸钠在大鼠血管钙化中的干预作用与机制

王 珣,任 伟,汪 鹏,王 科,倪力军,方 媛,潘卉萱

摘要 目的 研究硫代硫酸钠(STS)在大鼠血管钙化中的干预作用与机制。方法 用含有 750 mg/kg 腺嘌呤的颗粒饲料喂养 SD 大鼠 7 周制备尿毒症大鼠模型。设正常对照组、尿毒症组、STS 组,每组各 10 只大鼠,包括 5 只雄鼠和 5 只雌鼠。用腺嘌呤饲料喂养大鼠 7 周以后,予大鼠 STS 每次 0.5 g/kg 腹腔注射,每周 3 次,持续 5 周,并于第 12 周处死动物。取血测血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平,用 ELISA 法测定各组大鼠血浆基质 Gla 蛋白(MGP)、胎球蛋白 A(FA)水平。结果 与正常对照组比较,尿毒症组大鼠血浆 SOD 活性降低而 MDA 水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。STS 组大鼠血浆 SOD 活性降低和 MDA 水平升高受到一定程度的抑制,差异有统计学意义($P < 0.05$)。尿毒症大鼠血浆 MGPs、FA 水平显著降低,STS 组大鼠 MGPs、FA 水平升高,与尿毒症组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 STS 能够治疗并减轻尿毒症大鼠血管钙化的发生。STS 可以通过提高尿毒症大鼠血浆 MGPs 和 FA 水平,从而抑制血管钙化的发生,并且其具有抗氧化特性,能减轻氧化应激损伤,改善血管内皮功能,这也可能是其预防钙化的机制之一。

关键词 尿毒症大鼠;血管钙化;硫代硫酸钠;胎球蛋白 A

中图分类号 R 972

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)11-1626-04

血管钙化是慢性肾脏病(chronic kidney disease,CKD)患者心血管风险发生的独立危险因素,也成为影响 CKD 5 期患者死亡的主要原因之一。因此积极有效地防治血管钙化,对于改善心血管并发症及尿毒症患者的预后及存活率有重要意义。由于血管钙化是多种钙化促进因子以及钙化抑制因子一起参与的病理生理过程,因此治疗尿毒症患者血管钙化应着手在减少钙化促进因子及增加钙化抑制因子。硫代硫酸钠(sodium thiosulfate,STS)可与体内游离钙形成可溶的硫代硫酸钙,减少钙盐在血管的沉积,发挥防治血管钙化作用^[1]。其次,STS 含有

未成对的电子,通过清除自由基发挥抗氧化作用,从而改善血管内皮功能,减少血管钙化的发生。近年,STS 已用于防治卡铂、顺铂应用而诱发的耳、肾毒性,以及尿毒症患者肾源性系统性纤维化。而透析患者早期有效的干预能减轻和延缓血管钙化进程,对降低 CKD 5 期患者心血管死亡率有着重要意义。该研究通过尿毒症大鼠血管钙化模型的建立,来观察 STS 能否对尿毒症大鼠血管钙化起到干预作用,并且对其作用机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康成年 SD 清洁级大鼠 30 只,雌雄各半,200~250 g,购于安徽医科大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 腺嘌呤为南京建成生物工程研究所产品,批号 10437;STS 为上海新亚药业有限公司,批号 1007527;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、丙二醛(malonaldehyde,MDA)等试剂盒购于上海江莱生物科技有限公司,批号 20130401;基质 Gla 蛋白(matrix gla protein,MGP)、胎球蛋白 A(fetuin A,FA) ELISA 试剂盒购于上海韵涵生物科技有限公司,批号 20130321。

1.2 模型制备 所有大鼠随机分为正常对照组、尿毒症组、STS 组,每组 10 只,雌雄各半。正常对照组用不含腺嘌呤的饲料喂养,投放量为 320 mg/(kg·d),尿毒症组及 STS 组用含有 7 000 mg/kg 腺嘌呤的颗粒饲料喂养,投放量为 320 mg/(kg·d),连续喂养 7 周。7 周后将 STS 与生理盐水按 1:3 比例配成溶液,按 0.5 g/kg 给予 STS 组腹腔注射,每周 3 次,持续 5 周。正常对照组及尿毒症组大鼠用等量生理盐水腹腔注射,每周 3 次,持续 5 周。注射 5 周后,实验中各组大鼠均存活。

1.3 标本采集 在实验第 12 周处死所有大鼠前,大动脉取血 2 ml,分离出血清,-20℃保存备用。处死后仔细分离出所有大鼠主动脉,去除血管内残余血液后,用 PBS 冲洗后,-70℃保存备用。

1.4 血管钙含量的测定 将留取的所有大鼠动脉组织烘干后称取重量,然后再放入 2 mmol/L 的浓硝

2014-04-14 接收

基金项目:安徽省卫生厅医学科研课题(编号:2010C040)

作者单位:安徽医科大学附属医院肾内科,合肥 230001

作者简介:王 珣,男,硕士研究生;

任 伟,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:renweishn@163.com

酸中,在 20~25 °C 下消化 24 h,将消化后的血管放置于备用的消化器上消化,等到浓硝酸全部挥发并冷却后,用去离子水 2 ml 充分振荡并溶解消化后的血管组织 12 h,然后取 2 ml 消化后的血管组织,加入 1% 氯化锶 150 μ l,充分接触后,用原子吸收分光光度计测定 422.5 nm 波长下的正常对照组、尿毒症组、STS 组血管组织的 A 值,最后在标准曲线上分别查出相对应的血管的钙含量,然后换算成 mol/g。同时把尿毒症组及 STS 组的血管组织经 Alizarin 钙染色及 von Kossa 染色后在光镜下观察两者血管钙化情况。

1.5 大鼠血清中 SOD、MDA、MGP 与 FA 水平的测定 大鼠主动脉取血后,静置 5 min,4 °C、2 500 r/min 离心 15 min,分离出血清后,按照试剂盒的相关说明书测定各组大鼠血清 MDA 与 SOD 含量。应用 ELISA 法测定各组大鼠血 MGP 和 FA 含量。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布的多样本均数的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法检验;相关分析采用 Spearman 相关的非参数方法。

2 结果

2.1 尿毒症大鼠模型建立 腺嘌呤喂养大鼠 7 周后,正常对照组大鼠血肌酐、尿素氮维持在正常水平,尿毒症组、STS 组大鼠血肌酐及尿素氮水平明显升高,达到尿毒症水平。成功建立尿毒症大鼠模型。见表 1。

表 1 实验 7 周各组动物血清肌酐及尿素氮水平比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	肌酐 (μ mol/L)	尿素氮 (mmol/L)
正常对照	65.2 $\pm$ 10.3	6.1 $\pm$ 0.4
尿毒症	342.3 $\pm$ 39.2	38.3 $\pm$ 4.7
STS	341.2 $\pm$ 38.7	38.4 $\pm$ 4.8

2.2 各组动物血管钙含量、血清 MDA 及 SOD 水平变化 与正常对照组相比,尿毒症组血管钙含量明显增加,而 STS 组大鼠血管钙含量显著低于尿毒症组 ($P < 0.05$)。与正常对照组相比,尿毒症组血清 MDA 明显升高, SOD 含量明显降低,与尿毒症组相比,STS 组大鼠血清 MDA 含量显著降低, SOD 水平明显提高 ($F = 21.46, P < 0.05$)。见表 2。

2.3 大鼠血管组织光镜 Alizarin 钙染色及 von Kossa 染色结果 把尿毒症组及 STS 组的血管组织通过 Alizarin 钙染色及 von Kossa 染色后在光镜下观

察两者血管钙化情况。镜下可见 STS 组的血管组织钙化情况较尿毒症大鼠组明显减轻。见图 1。

表 2 各组大鼠血管钙含量及血清 SOD、MDA 水平 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	血管钙含量 (μ mol/g)	MDA (nmol/mg)	SOD (IU/kg)
正常对照	18.9 $\pm$ 2.1	5.2 $\pm$ 0.3	20.5 $\pm$ 0.9
尿毒症	57.1 $\pm$ 5.0*	11.2 $\pm$ 1.0*	10.8 $\pm$ 1.0*
STS	24.8 $\pm$ 3.2 [#]	7.5 $\pm$ 0.4 [#]	16.7 $\pm$ 0.8 [#]

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与尿毒症组比较: [#] $P < 0.05$

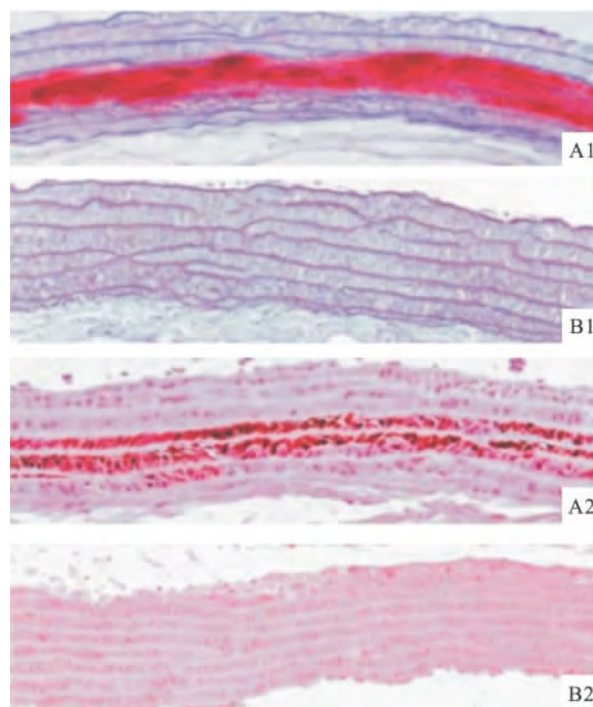


图 1 大鼠血管组织光镜 Alizarin 钙染色及 von Kossa 染色 $\times 400$
A: 尿毒症组; B: STS 组; 1: Alizarin 染色; 2: von Kossa 染色

2.4 各组动物血浆 MGP 和 FA 水平 与正常对照组比较,尿毒症组 MGP 和 FA 水平降低明显。而尿毒症大鼠经过 STS 治疗后, MGP 和 FA 水平比未治疗的尿毒症大鼠显著提高 ($F = 18.36, P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组动物血 MGP Fetusin-A 水平 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	MGP (nmol/L)	FA (ng/ml)
正常对照	12.6 $\pm$ 2.1	1.7 $\pm$ 0.4
尿毒症	8.0 $\pm$ 1.7*	0.5 $\pm$ 0.1*
STS	11.2 $\pm$ 1.5 [#]	1.3 $\pm$ 0.2 [#]

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与尿毒症组比较: [#] $P < 0.05$

3 讨论

MGP 通过抑制血管壁钙磷沉积、晶体形成来抑

制血管钙化的发生。同时还通过拮抗 BMP-2 诱导的 VSMC 成骨性转分化,达到抑制血管钙化的作用。研究^[2]表明,在 FA 基因敲除的小鼠中,其血管和软组织发生广泛的钙化。且血浆 FA 的水平与临床患者动脉钙化的发生呈负相关。

FA 是体内最重要的血管钙化抑制因子之一。目前认为,FA 抑制钙化的机制如下:在血液中通过 MGP 的参与,与钙磷形成矿化胎球蛋白复合物,起到抑制矿物质在血管及组织中的形成和沉积;在局部能够抑制相关促钙化因子的作用,如 TGF- β 和 BMP-2。另外,FA 与炎症密切相关,因为也是一种负性急性反应蛋白。在血液透析患者中,由于慢性炎症状态以及营养不良的存在,导致血清 FA 的水平降低,能够导致血管钙化的进展。因此,积极增加 FA 循环水平,可能对血管钙具有预防以及治疗的作用,还能有效减少心血管死亡事件的发生。而本研究表明 STS 能有效的增加 FA 的水平。

近年国内外学者^[3-4]使用 STS 治疗转移性钙化,以及尿毒症钙化小动脉病取得较好的疗效。本实验结果显示 STS 组大鼠血管钙含量显著低于尿毒症大鼠,表明 STS 能延缓血管钙化的进展。其治疗机制可能通过螯合游离钙,进而发挥抗血管钙化的作用^[5]。其次,STS 可以通过清除自由基,改善血管内皮功能^[6],达到防治血管钙化的目的。另有研究^[7]表明,STS 可能通过导致患者轻微的酸中毒,从而减轻血管钙化。而且 STS 在体内还可以产生镇痛消炎的作用^[8]。然而 STS 对于骨组织的影响,目前尚存在争议。临床上将 STS 与西那卡塞等联合用药,对尿毒症动脉硬化的治疗取得了不错的疗效^[9]。

本实验表明与正常对照组大鼠比较,尿毒症组大鼠血浆 MGP、A 水平显著降低,血浆 SOD 活性明显提高。而 STS 组大鼠血浆 MGP、FA 则有显著提

高,血浆 SOD 活性明显降低,这表明尿毒症大鼠血 MGP、Fetuin-A 等血管钙化抑制蛋白明显降低,从而起到防治血管钙化的作用。

参考文献

- [1] Heiro M, Mäkelä L, Koivuviita N, et al. Sodium thiosulfate-new hope for the treatment of calciphylaxis [J]. *Duodecim*, 2011, 127 (16):1690-6.
- [2] Ix J H, Katz R, de Boer I H, et al. Fetuin-A is inversely associated with coronary artery calcification in community-living persons: the multi-ethnic study of atherosclerosis [J]. *Clin Chem*, 2012, 58 (5):887-95.
- [3] Nigwekar S U, Brunelli S M, Meade D, et al. Sodium thiosulfate therapy for calcific uremic arteriolopathy [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2013, 8(7):1162-70.
- [4] Ross E A. What is the role of using sodium thiosulfate or bisphosphonates in the treatment for calciphylaxis [J]. *Semin Dial*, 2011, 24(4):434-6.
- [5] Mathews S J, de Las Fuentes L, Podaralla P, et al. Effects of sodium thiosulfate on vascular calcification in end-stage renal disease: a pilot study of feasibility, safety and efficacy [J]. *Am J Nephrol*, 2011, 33(2):131-8.
- [6] Block G A, Wheeler D C, Persky M S, et al. Effects of phosphate binders in moderate CKD [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(8):1407-15.
- [7] Selk N, Rodby R A. Unexpectedly severe metabolic acidosis associated with sodium thiosulfate therapy in a patient with calcific uremic arteriolopathy [J]. *Semin Dial*, 2011, 24(1):85-8.
- [8] Mathews S J, de Las Fuentes L, Podaralla P, et al. Effects of sodium thiosulfate on vascular calcification in end-stage renal disease: A pilot study of feasibility, safety and efficacy [J]. *Am J Nephrol*, 2011, 33(2):131-8.
- [9] Becker L E, Koleganova N, Piecha G, et al. Effect of paricalcitol and calcitriol on aortic wall remodeling in uninephrectomized ApoE knockout mice [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 300(3):F772-82.

Intervention of sodium thiosulfate and mechanisms of vascular calcification in rats

Wang Xun, Ren Wei, Wang Peng, et al

(Dept of Nephrology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To study the intervention effect and mechanism of sodium thiosulfate (STS) in the vascular calcification of the rat. **Methods** SD rats were fed with pellet feed for 7 weeks to prepare the uremic rats model, which contained 750 mg adenine per kg. Rats were divided into three groups: normal control group, the uremic rats group and the uremic rats and STS group. Each group had 10 rats, including 5 male rats and 5 female rats. These

姜黄素对内质网应激诱导小鼠肝损伤的保护作用

马晓磊^{1,2}, 李晓明³, 储菲³, 董清清³, 刘浩³, 张磊¹

摘要 目的 探讨姜黄素对内质网应激(ERS)诱导小鼠急性肝损伤的保护作用。方法 建立衣霉素诱导 ERS 的肝损伤模型,测定肝损伤小鼠血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)水平、肝匀浆中还原型谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)含量及肝指数。实时荧光定量 PCR 法检测小鼠肝组织中葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78/Bip) mRNA 表达及半定量免疫组化法检测肝组织 GRP78/Bip 蛋白水平,并行肝组织病理学检查。结果 姜黄素能降低衣霉素诱导 ERS 肝损伤小鼠血清中 ALT、AST 水平和肝组织匀浆中 MDA 含量;提高肝组织匀浆中 SOD、GSH 活性;同时姜黄素能明显抑制肝组织中 GRP78/Bip mRNA 和蛋白的表达。HE 染色结果显示姜黄素能明显改善模型组小鼠肝脏组织病变范围与程度,使炎细胞浸润减少。结论 姜黄素可能通过抗氧化作用对 ERS 诱导的肝损伤小鼠发挥保护作用。

关键词 姜黄素;内质网应激;肝损伤;衣霉素

2014-06-27 接收

基金项目:安徽省高校省级自然科学研究重点项目(编号:KJ2011A174)

作者单位:¹安徽医科大学药学院,合肥 230032

²蚌埠市第三人民医院药学部,蚌埠 233000

³蚌埠市医学院药理学系,蚌埠 233000

作者简介:马晓磊,男,药师,硕士研究生;

张磊,女,硕士生导师,副教授,责任作者,E-mail: 573345149@qq.com;

刘浩,男,硕士生导师,教授,责任作者,E-mail: li-uhao6886@foxmail.com

中图分类号 R 965.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)11-1629-05

内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是由各种原因导致内质网(endoplasmic reticulum, ER)功能紊乱,钙稳态失衡,错误折叠或未折叠蛋白质在 ER 腔内聚集的一种亚细胞器的病理状态。ERS 发生时伴随脂质合成和促炎症反应^[1],是导致脂肪肝、酒精肝、慢性肝炎等肝脏损伤疾病的重要原因之一。姜黄素是从姜黄中提取出来的一种脂溶性酚类色素,是姜黄中主要的活性成分。研究^[2]证明,姜黄素具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、清除自由基等多方面的药理作用。对肝脏的相关研究^[3]显示,姜黄素可通过清除肝脏自由基、抑制肝脏炎症反应等作用发挥抗肝脏损伤作用。该研究采用衣霉素诱导小鼠 ERS 肝损伤模型,以 ERS 标志蛋白、氧化应激指标为对象,研究其在肝损伤中的变化并探讨姜黄素的干预作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 衣霉素(T062-40UG)购自美国 Sigma 公司(批号:2013094);丙二醛(malondialdehyde, MDA)测试盒(批号:2013062)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测试盒(批号:2010064)、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione,

rats were treated with adenine for 7 weeks, then intraperitoneally injected with STS [0.5 g/(kg · w), Tid for 5 weeks] and killed at last. Blood was used to test serum SOD and MDA level and determine MGP and fetuin A (FA) level. **Results** Compared with the normal control groups, the plasma SOD activity of uremic rats decreased and the the MDA level increased. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). The plasma SOD activity of the STS treatment rats group decreased and the increase of MDA level was controlled to some extent. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). The MGP and FA level of the uremic rats group decreased obviously. The MGP and FA level of the STS treatment rats group increased. The difference between the STS treatment rats group and the uremic rats group was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** STS can treat and ease the vascular calcification of the uremic rats. STS can restrain vascular calcification by increasing the MGP and FA level of the uremic rats. STS also has antioxidant activity, which can alleviate oxidative stress injury and improve the function of vascular endothelium. This is probably one of the mechanisms that can prevent calcification.

Key words uremic rats; vascular calcification; thiosulfate; fetuin A