

# 阿霉素肾病大鼠肌肉和静脉注射心钠素基因 利尿作用的比较研究

李 涛 梁红雁 闫 峰 卢圣栋\*

(中国医学科学院 中国协和医科大学 基础医学研究所 医学分子生物学国家重点实验室 北京 100005)

**摘 要** 为探讨心钠素基因经体细胞转移对阿霉素诱导的肾病动物泌尿功能的影响及其治疗肾病的潜力,采用肌肉或静脉内直接注射裸 DNA 的方法,将人心钠素基因的逆转录病毒载体分别导入阿霉素肾病动物体内,以期为其提供持续性的心钠素来源。结果发现,人心钠素基因经肌肉和静脉内直接注射这 2 种途径导入后,均可使阿霉素肾病动物的尿量/体重比明显增加,有效利尿作用时间大于 15d。试验期间,实验组肾病动物的体重明显增长,血浆中的心钠素浓度在基因转移 5d 后明显升高,但动物尿中的  $K^+$  和  $Na^+$  浓度无明显变化。以上结果说明,心钠素基因经肌肉和静脉 2 种途径导入均可明显改善肾病动物的泌尿功能,具有治疗肾病的潜力。

**关键词** 心钠素基因,基因治疗,逆转录病毒载体,肾病

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)06-0671-05

主要由心房肌细胞合成和分泌的人心钠素(Human atrial natriuretic peptide, hANP)已在临床上用于急性心衰和慢性心衰急性恶变期患者的治疗<sup>[1]</sup>,Murakami H 等<sup>[2]</sup>采用先静脉注射心钠素基因的重组腺病毒、再用庆大霉素造成肾损伤的方法也证实,心钠素基因转移对药物性肾损伤具有预防作用。但是,在将心钠素多肽以静脉滴注的方式短期用于肾病综合征和肝硬化患者或阿霉素肾病大鼠时,却未能观察到明显的利尿利钠作用<sup>[3]</sup>。据称这可能与受损肾脏合成 cGMP 的能力低下有关<sup>[4]</sup>,因为 cGMP 是心钠素发挥其生理作用所需的信号分子。而我们认为,导致上述结果的原因主要在于心钠素作用的发挥具有时效性,亦即心钠素在静脉滴注的有限时间内无法充分表现出其利尿利钠活性。为证实这种推测,也为探讨心钠素基因经体细胞转移治疗肾病的潜力,我们进行了此项研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂

限制酶购自中国协和医科大学医学科学技术开发公司。Klenow DNA 聚合酶和连接酶等购自 Pro-

mega 公司。心钠素放免检测试剂盒购自北京北方免疫试剂所。注射用盐酸阿霉素为珙滨制药厂产品。

### 1.2 动物

Wistar 大鼠购自中国医学科学院实验动物研究所。

### 1.3 人心钠素基因逆转录病毒表达载体 pLHY19 的构建过程简介

在构建人心钠素基因 hANP 的逆转录病毒表达载体 pLHY19 的过程中,我们首先将经过序列分析并得到确认的 hANP 与巨细胞病毒的启动子 CMVp 和兔  $\beta$ -珠蛋白基因的第二内含子 Intron 在过渡载体中组装成“XbaI-CMVp→Intron→hANP-HindⅢ”的关系,然后用“XbaI/Klenow/HindⅢ”的方法处理该过渡重组体,并回收片段“平端-CMVp→Intron→hANP-HindⅢ”(1870bp),最后将该片段与经过“BamHⅠ/Klenow/HindⅢ”的方法处理过的逆转录病毒载体 pLNCX 相连,从而获得人心钠素基因 hANP 的逆转录病毒表达载体 pLHY19。在该表达载体中,hANP 与其它主要元件之间共同组成了以下关系:5'LTR→Neo→CMVp→Intron→hANP→3'LTR。其中的“5'

收稿日期 2002-04-11,修回日期 2002-07-09。

基金项目 国家攀登计划资助项目(No. 930211003)。

\* 通讯作者。 Tel: 86-10-65295905; Fax: 86-10-65124876; E-mail: lused@cdm.imicams.ac.cn

LTR 和“ 3'LTR ”分别表示逆转录病毒的 5'和 3'长末端重复序列；“ Neo ”示新霉素抗性基因。表达载体 pLHY19 和空载体 pLNCX 的质粒 DNA 经 PEG 法纯化后备用<sup>[7]</sup>。

1.4 大鼠肾病模型的建立<sup>[4]</sup>

雄性 Wistar 大鼠购回后适应环境 1 周。随机选出 8 只,不做任何处理而作为正常对照组。其余动物则用于制备肾病模型:腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 (45 mg/kg 体重)麻醉动物,然后按 7.5 mg/kg 体重的剂量经尾静脉注射溶于生理盐水的阿霉素 (2 mg/mL) 1 次。每周定时称量体重、收集 6 h 尿液和测定尿蛋白浓度等指标。

1.5 心钠素基因经肌肉或静脉导入肾病动物体内<sup>[2 5 6]</sup>

1.5.1 动物分组:将体重增长速度明显降低、尿量明显减少和尿蛋白浓度明显升高的肾病动物分为 4 组,即经静脉注射心钠素基因表达载体 pLHY19 的静脉治疗组 (hANP/iv) 和经静脉注射空载体 pLNCX 的静脉对照组 (NG/iv),经肌肉注射 pLHY19 的肌肉治疗组 (hANP/im) 和经肌肉注射空载体的肌肉对照组 (NG/im)。另外 8 只未经任何处理的动物为正常对照组 (Normal)。

1.5.2 心钠素基因表达载体的导入:采用裸 DNA 静脉内或肌肉内直接注射法。首先将心钠素基因表达载体 pLHY19 和空载体 pLNCX 溶于生理盐水,使成 0.5 mg/mL 的溶液。腹腔注射戊巴比妥钠 (25 mg/kg 体重)麻醉动物后,按 5 mg/kg 体重的剂量将 DNA 溶液从尾静脉或两后肢的股四头肌处注入。

1.6 生理指标的检测

每周定时称量体重、收集尿液、测定尿蛋白和尿液中的钾、钠离子浓度,眼眶取血分离血浆,用放免法检测血浆中的心钠素浓度,具体操作按试剂盒所附说明书进行。

1.7 统计学处理

数据以 mean ± s 表示,对组间差异进行 t 检验分析。

2 结 果

2.1 大鼠肾病模型的建立

与正常对照组动物相比,阿霉素注射 1 周后大鼠体重的增长速度就开始减缓,第 2 周时更明显: 213 ± 15.8 vs 175 ± 16.3 g (t = 6.00, P < 0.001) (图 1)。阿霉素使大鼠的尿量/体重比明显降低,第 2 周为 35.9 ± 2.78 vs 16.4 ± 3.24 mL/kg.6h (t = 15.75,

P < 0.001) (图 2)。另外,阿霉素还使大鼠的尿蛋白浓度明显升高,第 1 周的结果即为 23.5 ± 4.26 vs 59.8 ± 5.13 mg% (t = 18.60, P < 0.001) (图 3)。

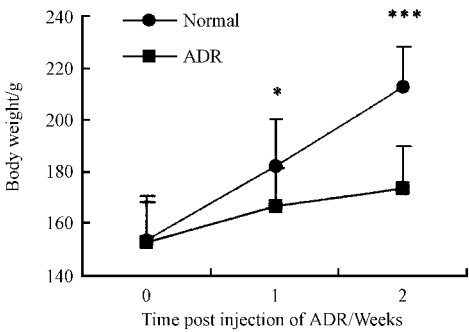


图 1 静脉注射阿霉素对动物体重的影响  
Fig.1 Effect of adriamycin on body weight  
\* P < 0.05, \*\*\* P < 0.001 vs normal

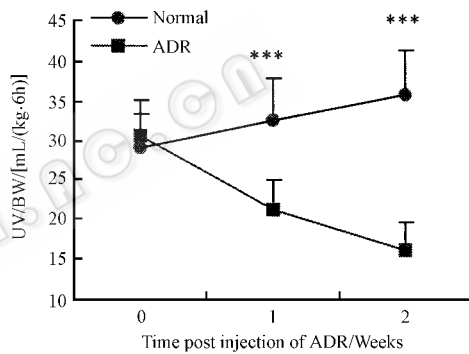


图 2 静脉注射阿霉素对动物“尿量/体重比”的影响  
Fig.2 Effect of adriamycin on the ratio of urine volume to body weight  
\*\*\* P < 0.001 vs normal

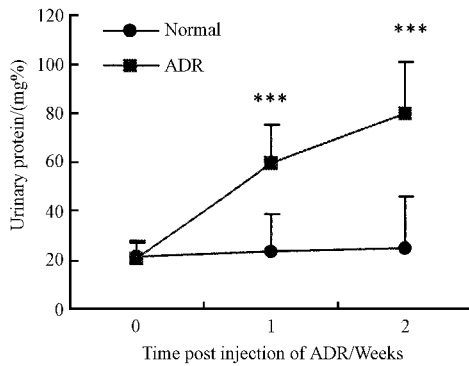


图 3 静脉注射阿霉素对动物尿蛋白浓度的影响  
Fig.3 Effect of adriamycin on concentration of urinary protein  
\*\*\* P < 0.001 vs normal

2.2 人心钠素基因转移对肾病动物泌尿功能的影响

无论是肌肉注射,还是静脉注射,从心钠素基因

转移后的第 5 天起 ,治疗组动物的尿量/体重比就明显高于注射空载体的阴性对照组 ,而阴性对照组动物的尿量/体重比在整个试验期间都呈下降趋势(表 1)。说明外源心钠素基因在肾病动物体内的表达可促进其受损肾脏泌尿功能的改善 ,肌肉注射和静脉注射两种基因转移途径在利尿作用的时间和强度方面无明显差异。

表 1 静脉或肌肉注射心钠素基因对肾病动物“尿量/体重比”的影响

Table 1 Effects of naked DNA delivery intramuscularly or intravenously on the ratio of urine volume to body weight of rats with experimental nephropathy

Group	No.	Pre-treatment	Post-treatment/mL·kg <sup>-1</sup> ·6h <sup>-1</sup>		
			Day 5	Day 10	Day15
Normal	8	35.9±2.78	30.6±2.17	24.1±2.73	27.4±3.52
NG/i. m	6	16.7±2.48	14.3±1.71	11.7±1.64	9.24±2.57
hANP/i. m	6	15.9±2.83	17.6±1.25***	19.2±2.77***	21.1±2.23***
NG/i. v	6	17.3±2.28	14.8±1.74	12.8±2.57	11.6±3.72
hANP/i. v	6	16.1±2.97	17.7±2.54*	19.8±2.37***	22.4±3.25***

Abbreviation : NG , negative group  
\* p < 0.05 , \*\*p < 0.01 , \*\*\*p < 0.001 vs NG/i. m or NG/i. v ;  
hANP/im vs NG/im : t<sub>5</sub> = 3.82 , P < 0.01 ; t<sub>10</sub> = 5.71 , P < 0.001 ; t<sub>15</sub> = 8.54 , P < 0.001 .  
hANP/iv vs NG/iv : t<sub>5</sub> = 2.31 , P < 0.05 ; t<sub>10</sub> = 4.91 , P < 0.001 ; t<sub>15</sub> = 5.36 , P < 0.001 .

2.3 人心钠素基因转移对肾病动物体重的影响

从表 2 中的数据可以看出 ,在心钠素基因转移 5 d 后 ,两种给药途径的治疗组动物体重的增长速度即明显加快 ,到第 10 和 15 天时 ,治疗组与相应的阴性对照组相比 ,体重增加明显 ,差异有统计学意义 (P < 0.05)。

表 2 静脉或肌肉注射心钠素基因对肾病动物体重的影响  
Table 2 Effects of naked DNA delivery intramuscularly or intravenously on body weight of rats with experimental renal nephropathy

Group	No.	Pre-treatment	Body weight/g		
			Day 5	Day 10	Day 15
Normal	8	213±15.8	241±13.9	279±14.7	317±22.3
NG/i. m	6	173±14.6	172±13.2	161±13.8	153±17.5
hANP/i. m	6	175±16.4	189±12.7*	197±14.6**	223±15.1***
NG/i. v	6	174±17.3	170±12.8	158±15.2	154±13.7
hANP/i. v	6	173±16.8	191±14.7*	213±15.1***	235±15.6***

Abbreviation : NG , negative group  
\* p < 0.05 , \*\*p < 0.01 , \*\*\*p < 0.001 vs NG/i. m or NG/i. v ;  
hANP/im vs NG/im : t<sub>5</sub> = 2.27 , P < 0.05 ; t<sub>10</sub> = 4.39 , P < 0.01 ; t<sub>15</sub> = 7.42 , P < 0.001 .  
hANP/iv vs NG/iv : t<sub>5</sub> = 2.64 , P < 0.05 ; t<sub>10</sub> = 6.29 , P < 0.001 ; t<sub>15</sub> = 9.56 , P < 0.001 .

性对照组动物之间的差异更明显。说明外源心钠素基因在肾病动物体内的表达能够促进其体重的增长 ,并且两种基因转移途径的效果无明显差异。

2.4 人心钠素基因转移对肾病动物尿蛋白浓度的影响

由表 3 可以看出 ,不管是肌肉注射 ,还是静脉注射 ,也不管是治疗组 ,还是注射空载体的阴性对照组 ,所有肾病动物的尿蛋白浓度在整个试验期间均有所升高。说明肾病动物的尿蛋白浓度的变化与外源心钠素基因的导入与否和导入途径无关。

表 3 静脉或肌肉注射心钠素基因对肾病动物尿蛋白浓度的影响

Table 3 Effects of naked DNA delivery intramuscularly or intravenously on the concentration of urinary proteins of rats with experimental renal nephropathy

Group	No.	Pre-treatment	Urinary protein/mg%		
			Day 5	Day 10	Day 15
Normal	8	25.2±2.35	28.1±3.94	32.7±4.75	37.4±2.36
NG/i. m	6	78.4±5.71	87.3±6.92	106.4±15.8	134.5±17.3
hANP/i. m	6	79.8±7.24	86.9±8.75	92.7±17.6	122.3±15.1
NG/i. v	6	77.5±8.16	90.4±9.27	110.3±18.4	133.8±17.7
hANP/i. v	6	80.2±5.38	92.4±11.7	115.7±22.3	124.2±21.7

Abbreviation : NG , negative group

2.5 心钠素基因转移对肾病动物其它指标的影响

放免法检测结果表明 ,在人心钠素基因导入肾病动物体内 5 d 后 ,动物血浆中的心钠素浓度明显升高 ,肌肉治疗组(113±8.6 pg/mL)明显高于肌肉对照组(87±7.1 pg/mL , t = 5.71 , P < 0.001) ;静脉治疗组(115±7.8 pg/mL)明显高于静脉对照组(90±7.4 pg/mL , t = 5.70 , P < 0.001) 。而正常对照组动物的血浆心钠素水平(62±6.3 pg/mL)则明显低于其它各组。注射空载体的肌肉对照组和静脉对照组动物的血浆心钠素水平明显高于正常对照组的结果提示 ,在肾功能因为阿霉素而受损并因此而出现尿量明显减少的情况时 ,为维持机体原有的水盐代谢平衡 ,动物的血浆心钠素水平可能会出现代偿性升高。而肌肉治疗组和静脉治疗组动物的血浆心钠素水平和尿量/体重比均明显高于空载体组的结果却说明 ,外源心钠素基因经肌肉和静脉注射法导入体内后 ,不仅可以表达 ,其表达产物可以进入血循环 ,而且还可改善阿霉素肾病动物的泌尿功能。

尽管肌肉和静脉治疗组动物的血浆心钠素浓度明显升高 ,尿量也明显增加了 ,但是 ,其尿中的 K<sup>+</sup> 和 Na<sup>+</sup> 浓度却只有降低和升高的趋势 ,而无显著性

变化。另外还观察到,在心钠素基因导入后,两个治疗组动物的毛色和精神状态明显改善,食欲也有所增强。

### 3 讨 论

体内外试验都证实心钠素多肽具有明显的利尿、舒张血管、降低血压和提高肾小球滤过率等广泛的生理作用,这些作用在消除肾病的水钠潴留等症状、改善肾功能、防治心力衰竭和高血压等并发症方面具有非常重要的意义。但由于心钠素多肽有半衰期短和需要连续点滴等缺点,尤其是在肾功能受损的情况下短期静脉滴注时往往无法实现其利尿利钠作用,以致于人们对其治疗肾病的能力产生了怀疑<sup>[3]</sup>。所以,本工作所获结果对于心钠素基因应用潜力的进一步开发和肾病等疾病的基因治疗研究工作的开展来说是一个良好的开端。

在本工作中,无论是肌肉注射还是静脉注射,当心钠素基因被导入肾病动物体内并有效表达后,均可实现血浆心钠素浓度明显升高、长达 15 d 以上的利尿作用、体重增长速度明显加快以及动物的精神状态好转等多种效应。说明即便是在肾功能受损的情况下,心钠素仍然具有的明显的利尿作用,而且这种作用是通过心钠素的持续性供应和作用来实现的,正因为如此,与心钠素多肽相比,在肾病等疾病的治疗方面心钠素基因具有明显的优势。需要指出的是,尽管肌肉和静脉注射这两种转移心钠素基因的方式同样有效,但从实用的角度来说前者更可取。

由于在肾病动物模型建成之后和外源基因导入之前未对动物的血浆心钠素水平进行检测,故只能对肌肉和静脉空载体组动物的血浆心钠素水平明显高于未接受任何处理的正常对照组的现象进行一些推测。首先,由于空载体组动物所接受的是不含心钠素基因的空载体,所以,其血浆心钠素水平的升高是外源基因导入的结果的可能性不大。另一方面,由于心钠素具有利尿利钠等调节水盐代谢平衡的作用,故认为肾病动物血浆心钠素浓度的升高可能是动物在肾功能受损后为维持机体原有平衡而出现的一种代偿性反应。可能是由于其上升的幅度还不足以抵消阿霉素所至的肾损伤的缘故,空载体组动物的尿量在整个试验期间呈递减的趋势。而对于导入心钠素基因的治疗组动物,可能是由于其血浆的心钠素水平较之空载体组动物有更大程度的提高,使肌肉治疗组( $21.1 \pm 2.23 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot 6\text{h}^{-1}$ )和静脉治疗组( $22.4 \pm 3.25 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot 6\text{h}^{-1}$ )动物的尿量/

体重比分别恢复到了正常对照组( $27.4 \pm 3.52 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot 6\text{h}^{-1}$ )的 77.0% 和 81.8%。

有证据表明,在给肾病综合征患者使用心钠素多肽后可以使其尿蛋白浓度明显升高<sup>[4]</sup>,但本工作的结果却不支持这一结论,因为在导入心钠素基因后,尽管治疗组动物的尿蛋白浓度于试验期间在不断升高,然而其上升幅度并不比阴性对照组动物的高。推测出现这种差异的原因可能与疾病的诱因、严重程度、药物形式(如多肽药物或 DNA 药物)和药物剂量等因素有关<sup>[8]</sup>。具体机制有待于进一步研究。

将心钠素多肽以静脉点滴的方式用于动物或人体时,由于其强大的利尿利钠作用而可使受试对象尿中的  $\text{Na}^+$  浓度明显升高<sup>[8]</sup>,但在本工作中却未曾观察到这种变化。这种现象同样存在于心钠素基因的转基因小鼠中<sup>[9]</sup>。其具体机制尚不清楚,推测认为,在有外源心钠素基因长期存在或自身的心钠素基因部分失活的情况下,动物可能动员了心钠素系统以外的水盐代谢系统,经长期适应而实现了新的平衡<sup>[9]</sup>。

综上所述,心钠素基因经体细胞转移可以克服心钠素多肽半衰期短和需连续滴注等缺点,对肾病具有良好的治疗作用,并且可能在与水盐代谢紊乱有关的其它疾病的防治中发挥作用,值得深入研究。

### REFERENCES (参考文献)

- [1] Yoshimura M, Yasue H, Ogawa H. Pathophysiological significance and clinical application of ANP and BNP in patients with heart failure. *Can J Physiol Pharmacol*, 2001, **79**: 730 ~ 735
- [2] Murakami H, Yayama K, Chao J *et al.* Atrial natriuretic peptide gene delivery attenuates gentamycin-induced nephrotoxicity in rats. *Nephrol Dial Transplant*. 1999, **14**: 1376 ~ 1384
- [3] Jespersen B. Regulation of renal sodium and water excretion in the nephrotic syndrome and cirrhosis of the liver. *Dan Med Bull*, 1997, **44**: 191 ~ 207
- [4] Jespersen B, Eiskjaer H, Mogensen CE *et al.* Reduced natriuretic effect of atrial natriuretic peptide in nephrotic syndrome: a possible role of decreased cyclic guanosine monophosphate. *Nephron*, 1995, **71**: 44 ~ 53
- [5] Wolff JA, Malone RW, Williams P *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*, 1990, **247**(4949 Pt 1): 1465 ~ 1468
- [6] Chao J, Jin L, Chen LM *et al.* Systemic and portal vein delivery of human kallikrein gene reduces blood pressure in hypertensive rats. *Hum Gene Ther*, 1996, **7**: 901 ~ 911
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

- [ 8 ] Eiskjaer H , Schmiegelow M , Jespersen B *et al.* Renal and hormonal effects and tolerance of an ANP analogue in healthy man. *Eur J Clin Pharmacol* , 1991 , **41** :547 ~ 554

- [ 9 ] Veress AT , Chong CK , Field LJ *et al.* Blood pressure and fluid-electrolyte balance in ANF-transgenic mice on high- and low-salt diets. *AM J Physiol* , 1995 , **269** :R186 ~ R192

## Comparative Analysis of Diuretic Activities of Human ANP Gene Injected Intramuscularly and Intravenously in Adriamycin-induced Nephrotic Rats

LI Tao LIANG Hong-Yan YAN Feng LU Sheng-Dong\*

( National Laboratory of Medical Molecular Biology , Institute of Basic Medical Sciences , CAMS and PUMC , Beijing 100005 ,China )

**Abstract** In order to explore the feasibility of gene therapy strategy based on the human atrial natriuretic peptide ( hANP ) gene delivery for the treatment of nephropathy and compare the diuretic activities of the hANP gene injected intramuscularly ( im ) and intravenously ( iv ) , the naked retroviral vector DNA harboring the hANP cDNA under the control of retroviral 5' long terminal repeat at a dose of 5 mg/kg body weight was injected im or iv into the nephrotic model rats induced with adriamycin ( ADR ) injected iv at a dose of 7.5 mg/kg body weight. A single injection of the hANP gene resulted in a marked elevation in plasma level of hANP 5 days after gene delivery and a significant increase in the ratio of urine volume to body weight and the diuretic effect continued for more than 15 days. In addition , there was a significant rise in the body weight of treatment groups as compared with that of negative control group and no difference in the concentrations of electrolytes in urine between groups. There was no significant differences in total effects resulted from the two routes of gene delivery and the way of gene delivery through the skeletal muscle is simpler and easier. These results suggest that somatic gene delivery of the hANP gene could enhance the renal functions in nephrotic rats significantly and would be a potential strategy for the treatment of renal disorders.

**Key words** ANP gene , gene therapy , retroviral vector , nephropathy

Received : 04-11-2002

This work was supported by Grant from Pandeng Program ( No.930211003 ).

\* Corresponding author. Tel : 86-10-65295905 ; Fax : 86-10-65124876 ; E-mail : lused@cdm.imicams.ac.cn