

学校编码: 10384
学 号: 24520131153473

分类号密级

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

盐酸西那卡塞对尿毒症大鼠继发性甲状旁腺功能亢进及肾脏损伤的影响

Effects of Cinacalcet HCl on Secondary

Hyperparathyroidism and Renal Injury in the Uremic Rat

孙青宜

指导教师姓名: 张燕林

专 业 名 称: 内科学

论文提交日期: 2016年5月

论文答辩日期: 2016年5月

学位授予日期 2016年 月

答辩委员会主席:

评阅人:

2016年5月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

目的

慢性肾脏病患者随着肾脏功能的逐渐减退,早期即可出现钙磷失衡、维生素D缺乏、甲状旁腺激素以及成纤维生长因子FGF23的升高,而这种矿物质代谢紊乱又可促使患者出现继发性甲状旁腺功能亢进以及加重肾脏损伤。目前CaSR激动剂作为有效抑制甲状旁腺增生的临床药物,适用于已发生SHPT的透析患者,为探究其是否也能防治继发性甲状旁腺亢进、矿物质代谢紊乱及肾脏损伤,本研究通过5/6肾大部切除术结合高磷饮食建立尿毒症大鼠模型,分别在造模成功早期预防性给予大鼠西那卡塞干预以及在大鼠慢性肾衰确立后给予盐酸西那卡塞干预,从两个时期观察分析盐酸西那卡塞是否可以缓解尿毒症大鼠继发性甲状旁腺亢进及肾脏的损伤。

方法

根据实验目的将48只大鼠随机分为两组,其中每组又分为三小组:

1) 预防性西那卡塞干预组:假手术组(Sham组, n=8)、5/6肾切除大鼠对照组(Nx组, n=8)、西那卡塞干预组(Cina组, n=8),于肾大部分切除术后1周内给予西那卡塞干预。

2) 西那卡塞干预组:假手术组(Sham组, n=8)、5/6肾切除大鼠对照组(Nx组, n=8)、西那卡塞干预组(Cina组, n=8),于肾大部分切除术4周眼球采血后检测肾功能后再给予西那卡塞干预。

术后对各小组均给予高磷饮食加重SHPT,其中给药组均给予西那卡塞(10mg/Kg/天)干预6周,并于最后一天继续予西那卡塞干预4小时后处死所有实验大鼠,取肾脏、甲状旁腺组织,HE、Masson、PAS染色观察肾脏组织的病理形态和胶原纤维沉积情况进行病理积分,并应用免疫组化技术分析各组甲状旁腺组织中细胞核增长因子PCNA的表达情况,并分别对比各组甲状旁腺组织中PCNA表达强度的差异。

结果

1) 各Nx组大鼠iPTH均较各Sham组明显升高(P 均 <0.05),西那卡塞干预

组较 Nx 组 iPTH 均降低 (P 均 <0.05)。

- 2) 免疫组化结果显示, 西那卡塞干预组 PCNA 表达均较 Nx 组表达降低 (P 均 <0.05), 而西那卡塞干预组较 Nx 组表达降低 (P 均 <0.05)。
- 3) 各 Nx 组大鼠 Scr、Urea 同 sham 组相比, 肾功能下降明显 (P 均 <0.05), 而西那卡塞干预组较 Nx 组肾功能可明显改善 (P 均 <0.05)。
- 4) 各 Nx 组大鼠 GSI 和 TIS 评分同 sham 组相比 (P 均 <0.05), 其中实验一中 Cina 组同 Nx 组相比 TIS 评分下降 (P 均 <0.05), 实验二中同 Nx 组相比, Cina 组 GSI 和 TIS 评分下降 (P 均 <0.05)。
- 5) 各 Nx 组大鼠 FGF23 均较各 Sham 组明显升高 (P 均 <0.05), 西那卡塞干预组 FGF23 较 Nx 组均降低 (P 均 <0.05)。

结论

高磷饮食可以加重 5/6 大鼠继发性甲状旁腺功能亢进; 盐酸西那卡塞可以缓解 5/6 肾切除大鼠继发性甲状旁腺功能亢进、肾脏损伤及降低 FGF23 的升高。

关键词: 盐酸西那卡塞; 继发性甲旁亢进; 钙敏感受体激动剂

Abstract

Background

With the development of chronic kidney disease (CKD), the CKD patients can show the imbalance of calcium and phosphate, deficiency of vitamin D, the rise of parathyroid hormone and fibroblast growth factor 23 in the early stage of kidney injury. However, those above mentioned factors will result in secondary hyperparathyroidism and kidney damage. Parathyroid hyperplasia can be prevented by calcium-sensing receptor (CaSR) activation which is applied to patients in dialysis. In order to study whether cinacalcet can prevent the development of secondary hyperparathyroidism, mineral metabolic disorder and kidney injury, we established a rat model with 5/6 renal resection combining with high phosphorus diet, then gave cinacalcet before and after the rat renal failure, and then observe the effect of this drug preventing and controlling secondary hyperparathyroidism and kidney injury in the uremic rat.

Methods

According to the aim of this experiment, animals were averagely placed into one of the following six groups at random and two separate experiments were performed with cinacalcet.

- (1) Prophylactic treatment with cinacalcet: Sham-operated group (Sham group, n=8) ; 5/6-nephrectomized group (Nx group, n=8) ; cinacalcet group (Cina group, n=8) .
- (2) Cinacalcet treatment with established CKD: Sham-operated group (Sham group, n=8) ; 5/6-nephrectomized group (Nx group, n=8) ; cinacalcet group (Cina group, n=8) .

All the animals had high phosphorus diet after operation and the treatment groups (i.e. cinacalcet groups) were supplied with cinacalcet 10mg/Kg/day for six weeks. Meanwhile, their blood samples were taken at 4th, 6th and 10th weeks after operation (Cina group were taken 4 h post-treatment at the times) to determine blood chemistries [PTH, Urea, creatinine, fibroblast growth factor (FGF23),

25(OH)D₃, phosphorus and calcium]. Parathyroid proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and the renal histopathological changes were determined in tissue samples obtained at sacrifice.

Results

- (1) The level of serum iPTH in Nx groups were significantly increased than in Sham group ($P < 0.05$), Cinacalcet decreased serum iPTH levels ($P < 0.05$).
- (2) immunohistochemical results show that PCNA expression in the parathyroid gland of Nx group were significantly increased than in the Sham group ($P < 0.05$), while the Cinacalcet group lower than the Nx group ($P < 0.05$).
- (3) The level of Urea, Scr were in Nx groups significantly increased than in Sham group ($P < 0.05$), Cinacalcet decreased serum Scr, Urea ($P < 0.05$).
- (4) The score of GSI and TIS in Nx groups were significantly increased than in Sham group ($P < 0.05$), In the first experiment, the score of TIS in the cinacalcet treatment group lower than the Nx group ($P < 0.05$). In the second experiment, both of score in the cinacalcet treatment group lower than the Nx group ($P < 0.05$).
- (5) The level of serum FGF23 in Nx groups were significantly increased than in Sham group ($P < 0.05$), Cinacalcet decreased serum FGF23 levels ($P < 0.05$).

Conclusion

High phosphorus diet can aggravate the secondary hyperparathyroidism of 5/6-nephrectomized rats. Cinacalcet HCl can prevent and reverse the development of secondary hyperparathyroidism, renal injury and the rise of FGF23 in the 5/6-nephrectomized rodent model.

Key Words : HCl-cinacalcet; Secondary Hyperparathyroidism; Calcium-sensing receptor

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
英文缩略词中英对照表.....	IX
第一章 绪论.....	1
第二章 理论基础.....	4
2.1 继发性甲状旁腺亢进的概念.....	4
2.2 SHPT 的发病机制.....	4
2.2.1 高血磷.....	4
2.2.2 维生素 D 缺乏.....	5
2.2.3 FGF23.....	6
2.3 SHPT 的药物治疗.....	7
2.3.1 磷结合剂.....	7
2.3.2 维生素 D 补充.....	8
2.3.3 钙敏感受体激动剂.....	9
第三章 实验研究.....	14
3.1 技术路线.....	14
3.2 材料和仪器.....	14
3.2.1 实验材料.....	14
3.2.2 主要实验设备.....	16
3.3 实验方法.....	16
3.3.1 动物模型的建立.....	16
3.3.2 实验动物的分组.....	16
3.3.3 给药方法.....	17
3.3.4 标本的留取.....	17

3.3.5 酶联免疫吸附试验 (ELISA)	17
3.3.6 肾脏病理染色	18
3.3.7 免疫组化	21
3.4 统计分析	22
第四章 实验结果	23
4.1 各组大鼠一般情况	23
4.2 肾功能	25
4.3 血清钙、磷、25 (OH) D ₃	26
4.4 血清 iPTH、FGF23	29
4.5 肾脏组织学改变	30
4.6 甲状旁腺的大体观察	37
4.7 各组大鼠甲状旁腺 PCNA 的表达	38
第五章 讨论	40
第六章 结论	42
参考文献	43
致 谢	51

Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English.....	III
Table of abbreviations.....	IX
Chapter 1 Introduction.....	1
Chapter 2 Theoretical basis.....	4
2.1 Concept of SHPT.....	4
2.2 Pathogenesis of SHPT.....	4
2.2.1 Hyperphosphatemia.....	4
2.2.2 Deficiency of vitamin D.....	5
2.2.3 FGF23.....	6
2.3 Therapeutic of SHPT.....	7
2.3.1 Phosphate binder.....	7
2.3.2 Supplement of vitamin D.....	8
2.3.3 Calcium-sensing receptor agonist.....	9
Chapter 3 Experiment.....	14
3.1 Technical route.....	14
3.2 Material and instrument.....	14
3.2.1 Experimental materials.....	14
3.2.2 Major experimental equipments.....	16
3.3 Experimental method.....	16
3.3.1 Establish of the rat model.....	16
3.3.2 Grouping of the rats.....	16
3.3.3 Medication.....	17
3.3.4 Sample collecting.....	17

3.3.5 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	17
3.3.6 Pathological staining of renal.....	18
3.3.8 Immunohistochemistry	21
3.4 Statistical analysis	22
Chapter 4 Results	23
4.1 General situation of the mice.....	23
4.1.1 Survival status	27
4.1.2 General situation and weight	27
4.2 Renal function	25
4.3 Calcium、 phosphorus and 25(OH)D ₃ in serum	26
4.4 iPTH and FGF23 in serum.....	29
4.5 Histological change of renal	30
4.6 Observation of parathyroid gland	37
4.7 PCNA expression in parathyroid gland of the mice	38
Chapter 5 Discussion.....	40
Chapter 6 Conclusion and prospect.....	42
Reference.....	43
Acknowledgement	51

英文缩略词中英对照表

英文缩写	全称	中文名称
CKD	Chronic kidney disease	慢性肾脏病
ESRD	End stage renal disease	终末期肾病
SHPT	Secondary hyperparathyroidism	继发性甲状旁腺功能亢进
PTH	Parathyroid hormone	甲状旁腺激素
FGF23	Fibroblast growth factor 23	成纤维生长因子
PG	Parathyroid gland	甲状旁腺
CaSR	Calcium-sensing receptor	钙敏感受体
CVD	CKD-associated cardiovascular disease	慢性肾脏病相关心血管疾病
DBP	Vitamin D binding protein	维生素 D 结合蛋白
EMT	Epithelial-mesenchymal transition	上皮-间充质细胞转化
VSMC	vascular smooth muscle cell	血管平滑肌细胞
VC	Vascular calcification	血管钙化
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
DAB	Diaminobenzidine	二氨基联苯胺
SCr	Serum creatinine	血肌酐
BUN	Urea nitrogen	尿素氮
TRPV5	Transient receptor potential vanilloid	瞬时性受体电位香草精受体 5
Cina	Cinacalcet	西那卡塞
GFR	Glomerular filtration rate	肾小球滤过率
GSI	Glomerulosclerosis index	肾小球硬化指数
TIS	tubulointerstitial injury score	肾小管-间质损伤评分

英文缩略词对照表

PCNA	proliferating cell nuclear antigen	增殖细胞核抗原
RANKL	Receptor Activator for Nuclear Factor- κ B Ligand	核因子 κ B 受体活化因子配体
PLC	phospholipase C	磷酸酯酶 C

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 绪论

慢性肾脏病 (Chronic kidney disease, CKD) 指各种原因引起的肾脏损伤, 病人出现尿液及血液指标异常, 肾脏病理和影像学异常或肾小球滤过率 (glomerular filtration rate, GFR) < 60ml/min/1.73m² 时间超过三个月。CKD 作为一类威胁人类健康的重大疾病, 在全球范围内, 随着患糖尿病、肥胖、高血压等代谢综合征患者人数的增加, 其发病率也在逐年上升。在美国, 成年人罹患 CKD 的发病率高达 11% (1900 万)^[1]; 而在我国成年人 CKD 的发病率也已达到 10.8%^[2], 这与发达国家调查数据基本相似。CKD 除了发病率的逐年上升, 还出现了患病年龄年轻化的趋势, 20 岁至 30 岁人群患病人数增多。各种原因导致的 CKD 除了发展至终末期肾脏病 (End-Stage Renal Disease, ERSD), 其在早期还可以引起一系列包括钙、磷、维生素 D 以及甲状旁腺激素等矿物质代谢紊乱, 这是造成 CKD 患者发生诸如继发性甲状旁腺功能亢进 (Secondary hyperparathyroidism, SHPT)、肾性骨营养不良 (Renal Osteodystrophy) 和慢性肾脏病相关心血管疾病 (CKD-associated cardiovascular disease, CVD) 等继发性疾病的主要原因, 也是给 CKD 患者的治疗带来的困难及挑战。

继发性甲状旁腺功能亢进 (secondary hyper-parathyroidism, SHPT) CKD 患者体内各种矿物质代谢紊乱会刺激甲状旁腺分泌过多的 PTH 并形成甲状旁腺增生/腺瘤, 即发生了 SHPT。随着肾小球滤过率 (glomerular filtration rate, GFR) 的下降, SHPT 的发生率会逐渐升高。在 GFR 为 60~90ml/min/1.73m² 时, 慢性肾脏病患者 SHPT 发生率为 17%, 而当 GFR 降至 20ml/min/1.73m² 以下时, SHPT 发生率会增加至 85%^[3]。甲状旁腺增生的病理最初表现为弥漫性增生, 病变后期可由多克隆性增生转变为更严重的单克隆性增生, 细胞增殖标记物增多。然而随病变进展, 尽管有持续升高的 PTH 以及增生的甲状旁腺组织, 甲状旁腺对钙磷以及骨化三醇的调节不再敏感, 这是因为过量的 PTH 使体内适应性地产生异常表型的成骨细胞与骨细胞, 而这两种异型的细胞可以产生比正常细胞少的 I 型胶原纤维蛋白及较多的 RANKL 配合基。这给临床治疗 SHPT 造成困难^[4]。在临床上, SHPT 患者 PTH 的水平同死亡率及预后相关。以 150-300 pg/mL 范围内的

PTH 为基准, 301-450 pg/mL 的 PTH 显示出较高的全因死亡率, 而达到 600pg/mL 者死亡率则更高, 超过 600pg/mL 者心血管的死亡的风险和心血管的住院率增加, 且低水平 PTH 的患者也显示出不良的预后^[5], 研究显示 SHPT 还可引起 40%-87% CKD 病人在刚进行透析时发生骨代谢疾病, 这些骨代谢疾病包括可引起骨痛、骨折和改变骨量的高转化性骨病以及软组织和血管钙化等骨外表现^[6], 而以血管钙化为代表的心血管事件是终末肾脏病患者主要的死亡因素, 因此早期控制 SHPT 的进展尤为重要。由于 SHPT 患者以分泌过多 PTH 及甲状旁腺的增生为特征, 因此在控制钙磷代谢紊乱的同时有效降低 PTH 水平、阻止甲状旁腺细胞增殖与腺体体积增大被视为成功干预 SHPT 的手段^[7]。

盐酸西那卡塞属于第二代 II 型钙敏感受体激动剂, 它通过有效的变构调节甲状旁腺以及其他组织的钙敏感受体 (calcium-sensing receptor, CaSR), 参与调节机体内钙离子的平衡以及 PTH 的水平。西那卡塞降低甲状旁腺激素 (Parathyroid hormone, PTH) 的作用机制与 Ca^{2+} 不同。西那卡塞是通过结合至甲状旁腺细胞表面钙敏感受体的跨膜域并转移拟钙信号至细胞中, 抑制 PTH 分泌; 而 Ca^{2+} 则是通过结合甲状旁腺钙受体细胞外结构域, 负反馈于甲状旁腺, 抑制甲状旁腺功能, 从而抑制 PTH 分泌。目前, CaSR 已被证实不仅仅只表达于甲状旁腺, 还表达于诸如肾脏、心血管、骨、肠道等多种器官与组织^[8]; 且由于 CaSR 是一种膜蛋白受体, 它可以同许多配体结合, 导致配体发生不同构像的改变, 从而启动各种各样的信号通路。因此盐酸西那卡塞可以在 SHPT 患者体内可发挥多种作用。

5/6 肾切除大鼠是目前公认的较好的慢性肾衰竭大鼠模型, 该模型术后 1 周即出现一过性的血浆及尿素氮的升高, 此时期称为急性肾衰竭或急性失代偿期; 术后 2-3 周由于肾脏处于代偿期, 血浆尿素氮和肌酐会逐渐恢复。术后 4 周后大鼠肾脏失代偿, 开始进入慢性肾衰竭期, 表现为血尿素氮、血肌酐及尿蛋白的持续升高, 肾小球肥大以及系膜增生等。本课题组在先前的试验中也曾得出相同的结果。高磷作为 SHPT 发生以及甲状旁腺增生重要的因素, 大量研究已证实在大鼠 5/6 肾切除术后给予其高磷饮食会加重 SHPT^[9], 研究表明给予 5/6 肾切除大鼠加高磷饮食 2 周后即可出现甲状旁腺增生, 表现为甲状旁腺体重量与大鼠体积的比值为正常的 2 倍^[10], 1 个月后甲状旁腺激素明显升高, 体积出现明显增

大^[11]，2 个月后即可达正常的 4-6 倍^[12]。故本实验使用 5/6 肾切除大鼠模型结合高磷饮食，从两个不同给药时期观察分析盐酸西那卡塞缓解尿毒症大鼠继发性甲状旁腺功能亢进及肾脏损伤的作用。

厦门大学博硕士论文摘要库

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.