

网络出版时间: 2022-06-27 16:43 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220624.1739.012.html>

维生素 D 对慢性肾脏病小鼠认知功能的影响

李梦雨¹ 张森¹ 张丽² 王德光¹

摘要 目的 探讨维生素 D 对腺嘌呤诱导的慢性肾脏病(CKD)小鼠认知功能的影响。方法 将 56 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为 5 组:对照(CON) 组、模型(CKD) 组、模型 + 低剂量干预(LVD) 组、模型 + 中剂量干预(MVD) 组、模型 + 高剂量干预(HVD) 组,采用腺嘌呤饲料喂养法诱导 CKD 动物模型。通过腹腔注射骨化三醇(20、100、500 ng/kg) 处理 3 个干预组,每周 3 次,总计 6 周。眼眶取血测定血清肌酐、尿素氮含量、超氧化物歧化酶(SOD) 活性,HE 染色、Masson 染色观察肾脏病理变化,采用 Morris 水迷宫实验评估小鼠学习和记忆能力。结果 与 CON 组相比,CKD 组小鼠血清肌酐及尿素氮水平升高($P < 0.05$),肾脏病理可见肾小球萎缩、管型、间质纤维化等改变。在 Morris 水迷宫定位航行实验中,与 CON 组相比,CKD 组小鼠逃避潜伏期延长($P < 0.05$),而 MVD、HVD 组小鼠逃避潜伏期较 CKD 组缩短($P < 0.05$);在空间探索试验中,CKD 组小鼠在原平台象限游泳时间及路程较 CON 组减少($P < 0.05$),而 MVD、HVD 组时间和路程较 CKD 组增多($P < 0.05$)。CKD 组小鼠血清 SOD 活性较 CON 组降低($P < 0.05$),LVD 及 MVD 组小鼠血清 SOD 活性较 CKD 组升高($P < 0.05$)。结论 慢性肾脏病小鼠存在认知功能减退,维生素 D 可能通过发挥抗氧化作用改善其认知。

关键词 慢性肾脏病; 维生素 D; 认知障碍

中图分类号 R 692.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)07-1083-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.07.013

近年来,慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)患者发生认知功能障碍倍受重视,据统计,约 48% 的 CKD 患者在进入透析前已出现认知功能障碍^[1],且随着肾衰竭进展,CKD 患者的认知障碍发生率逐渐增加^[2]。当出现认知功能障碍时,CKD 患者生活质量降低、依从性下降,从而影响其临床治疗效果、增加死亡风险。研究^[3-4]表明,CKD 患者血中维生素 D 水平明显低于健康人群,且随着疾病进展,维生素 D 缺乏率逐渐增加,维生素 D 水平降低与 CKD 患者认知功能减退存在关联。由于缺乏有关维生素 D 对 CKD 动物认知功能影响的报道,因此,该实验拟研究维生素 D 对腺嘌呤诱导的 CKD 小鼠学习与记忆能力的影响,以期为临床工作中改善 CKD 患者认知功能提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 56 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠购自安徽医科大学实验动物中心,体质量(17 ± 1) g,动物许可证号为: SCXK(皖)2017-001,伦理审批号: LLSC20210354。小鼠采用分笼饲养的方式,统一喂养于安徽医科大学第二附属医院科研实验中心,定期更换垫料,给予充足的饲料和饮用水,动物实验室内温度(22.0 ± 2.0) °C、湿度 50% ~ 60%,环境自然采光和通风,12 h 光照 + 12 h 黑暗。

2022-05-12 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 2008085MH244、2008085QH426); 安徽医科大学校科研基金(编号: 2019xkj140、2017xkj028); 安徽医科大学第二附属医院国家自然科学基金孵化计划项目(编号: 2020GMFY04、2019GQFY05)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院¹ 肾脏内科、² 麻醉与围术期医学安徽普通高校重点实验室,合肥 230601

作者简介: 李梦雨,女,硕士研究生;
王德光,男,博士,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,
E-mail: wangdeguang@ahmu.edu.cn

intervention. **Results** Compared with the sham-operated group, the ION-CCI group had a decreased mechanical pain threshold 2 days after surgery, reached the lowest observed level by day 12, and this threshold reduction lasted more than 28 days ($P < 0.05$). Compared with the sham-operated group, the ION-CCI group had a lower miR-30b expression and a higher ATF3 expression in postoperative TG ($P < 0.05$). After the overexpression of miR-30b in ION-CCI group, the mechanical pain threshold increased, and the expression of ATF3 decreased in TG ($P < 0.05$). **Conclusion** These results suggest that miR-30b may participate in the regulation of TN. miR-30b may be a potential therapeutic target for TN.

Key words Trigeminal neuralgia; infraorbital nerve-chronic constriction injury; miR-30b; ATF3

1.1.2 实验试剂与仪器 骨化三醇(货号: SC8910, 北京索莱宝科技有限公司); 肌酐测定试剂盒(货号: C011-2-1, 南京建成生物工程研究所); 尿素氮测试盒(货号: C013-2-1, 南京建成生物工程研究所); 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD) 测定试剂盒(批号: 20211104, 南京建成生物工程研究所); 苏木精染液(批号: 716092, 珠海贝索生物技术有限公司); 伊红染液(批号: 716101, 珠海贝索生物技术有限公司); Masson 三色染色液(货号: C191201, 珠海贝索生物技术有限公司)。酶标仪(型号: RT-6000, 深圳雷杜生命科学股份有限公司); 电热恒温箱(型号: DNP-9052BS-III, 上海三发科学仪器有限公司); 正置荧光显微镜(型号: Axiocam 503 Color, 德国蔡司公司); 水迷宫视频分析系统(型号: Morris, 淮北正华生物仪器设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组、模型建立及维生素 D 干预 将小鼠随机分为 5 组: 对照(CON, $n = 8$)组、模型(CKD, $n = 12$)组、模型 + 低剂量干预(LVD, $n = 12$)组、模型 + 中剂量干预(MVD, $n = 12$)组、模型 + 高剂量干预(HVD, $n = 12$)组。采用腺嘌呤饲料喂养法诱导 CKD 动物模型。小鼠分笼饲养, 适应性喂养 1 周后, CON 组继续给予基础饲料喂养, 余 4 组小鼠给予 0.2% 腺嘌呤饲料喂养 5 周, 5 周后更换为普通饲料。造模第 36 天起, 3 组干预组小鼠分别以 20、100^[5] 或 500 ng/kg 剂量腹腔注射骨化三醇, 每周 3 次, CON 组及 CKD 组小鼠腹腔注射等量 0.9% 氯化钠溶液, 连续给药 6 周。

1.2.2 Morris 水迷宫实验 在各组小鼠给药结束后, 采用 Morris 水迷宫对其认知功能进行评估。将水池分为 4 个象限, 池壁上悬挂 4 个不同形状的几何图案, 作为小鼠辨别空间位置的视觉参照物, 池内注入自来水, 以无毒无味染料染白, 水温控制在(22.0 ± 1.0) °C, 水池周围悬挂蓝色窗帘以分隔研究者和实验动物, 于第二象限中央放置平台, 位于水下 1.0 ~ 1.5 cm。实验包括: ① 定位航行实验: 选定四个入水位置, 将各组小鼠依次分别从此四处面朝池壁轻柔地放入水中, 每天入水的四个位置顺序随机, 记录小鼠找到平台所需要的时间(即为逃避潜伏期), 并允许其在平台上停留 10 ~ 15 s, 若小鼠未能在 60 s 内爬上平台, 则将该小鼠潜伏期记录为 60 s, 并用木棒将其引导至平台上, 且使之停留 10 ~ 15 s。所有小鼠每日于固定时间段训练, 每只每次训练时间间隔半小时以上, 连续训练 4 d。② 空间探索

实验: 定位航行实验结束后, 将平台从水池中撤去, 依次将各组小鼠从第四象限同一入水位置放入水中, 记录 60 s 内小鼠在原平台象限的游泳时间及路程。

1.2.3 血中肌酐、尿素氮水平及 SOD 活性测定

小鼠眼眶取血, 分离血清, -20 °C 冰箱保存, 测定小鼠血清中肌酐、尿素氮含量及 SOD 活性。

1.2.4 肾组织病理 颈椎脱臼法处死小鼠, 钝性分离双侧肾脏, 肉眼观察肾脏长径、色泽的改变, 随之浸于 4% 多聚甲醛溶液中固定过夜, 常规行石蜡包埋、切片、HE 和 Masson 染色, 在显微镜下进行肾组织病理学观察。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 23.0 软件对实验数据进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠基本情况 对照组小鼠反应灵敏、毛发光泽, 模型组小鼠日渐精神不振、易脱毛、垫料潮湿严重。整个实验过程中, 无小鼠死亡。

2.2 各组小鼠血清肌酐、尿素氮含量 各组小鼠血清肌酐、尿素氮水平差异有统计学意义(*P* < 0.001)。与 CON 组相比, CKD 组小鼠肌酐及尿素氮水平升高(*P* < 0.001)。3 组干预组小鼠血清肌酐值与 CKD 组相比均无统计学差异, LVD 组小鼠尿素氮水平较 CKD 组下降(*P* < 0.001), 而 MVD 及 HVD 组尿素氮水平与 CKD 组之间差异无统计学意义。

2.3 各组小鼠肾脏组织病理 肉眼下, 对照组小鼠肾脏形态饱满, 外观红润、有光泽; 模型组及干预组小鼠肾脏体积偏小, 色泽苍白, 表面有粗糙的颗粒状物质, 见图 1。光镜下, 对照组肾小球及肾小管结构完整清晰, 肾间质未见明显胶原纤维; 模型组及干预组肾小球部分萎缩, 可见炎细胞浸润、蛋白管型、间质纤维化, 见图 2、3。

2.4 各组小鼠水迷宫实验结果 如图 4、5 所示, 在定位航行实验中, 各组小鼠逃避潜伏期差异有统计学意义(*P* < 0.01), CKD 组小鼠逃避潜伏期较 CON 组延长(*P* < 0.01), 与 CKD 组相比, MVD、HVD 组小鼠的逃避潜伏期缩短(*P* < 0.05, *P* < 0.05), 而 LVD 组小鼠逃避潜伏期与 CKD 组之间差异无统计学意义。见图 4。在空间探索实验中, 各组小鼠在原平台象限游泳时间(*P* < 0.01) 及路程(*P* < 0.01) 差异有统计学意义, CKD 组小鼠在原平台象限游泳

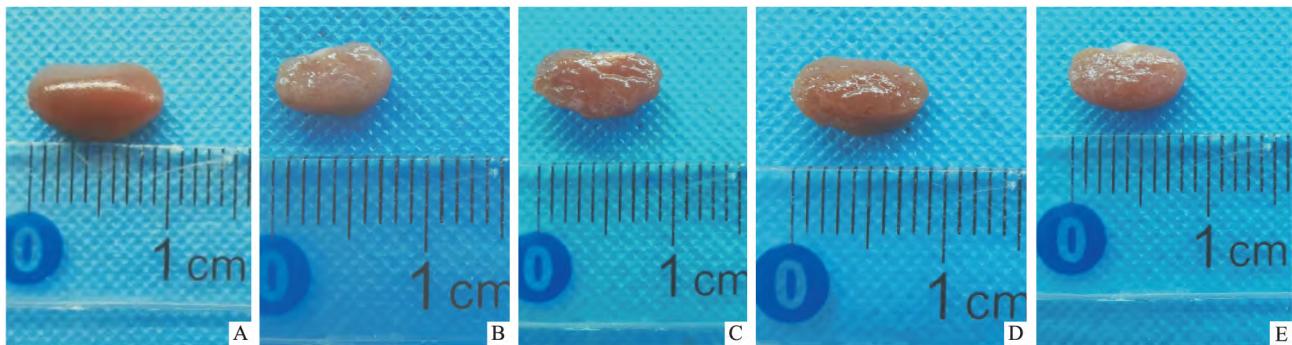


图1 各组小鼠肾脏肉眼观
A: CON组; B: CKD组; C: LVD组; D: MVD组; E: HVD组

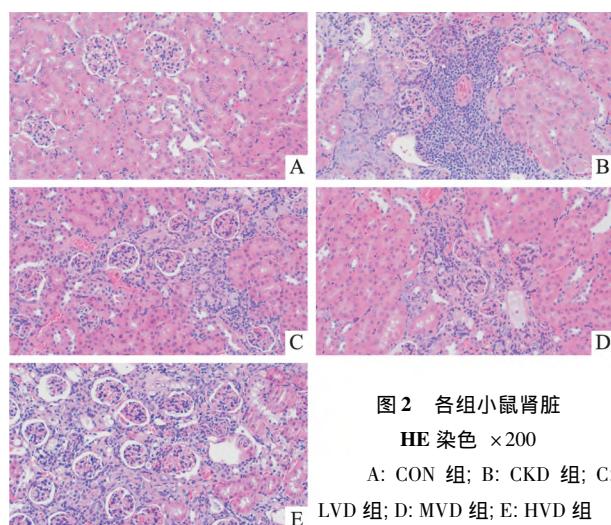


图2 各组小鼠肾脏
HE染色 $\times 200$

A: CON组; B: CKD组; C:
LVD组; D: MVD组; E: HVD组

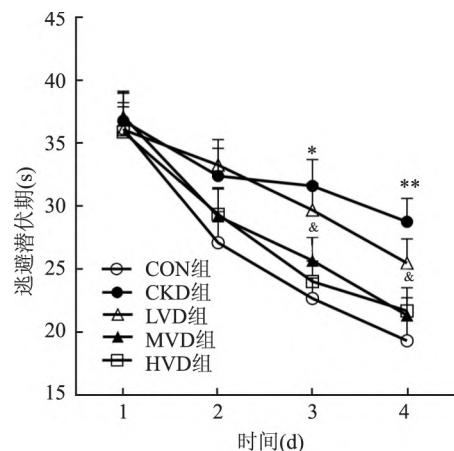


图4 定位航行实验中各组小鼠逃避潜伏期的比较
与 CON 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 CKD 组比较: & $P < 0.05$

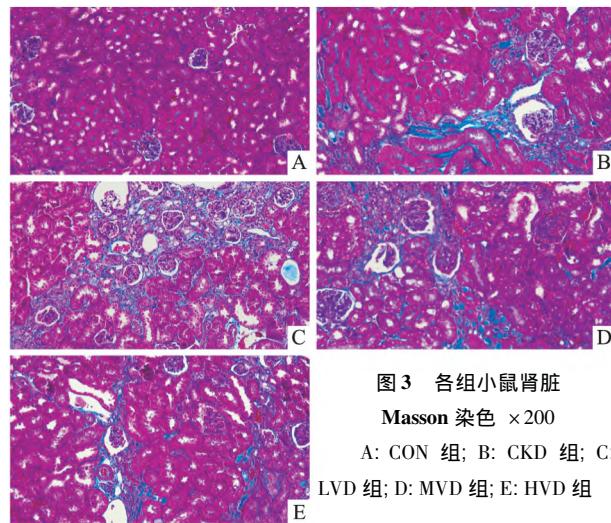


图3 各组小鼠肾脏
Masson染色 $\times 200$

A: CON组; B: CKD组; C:
LVD组; D: MVD组; E: HVD组

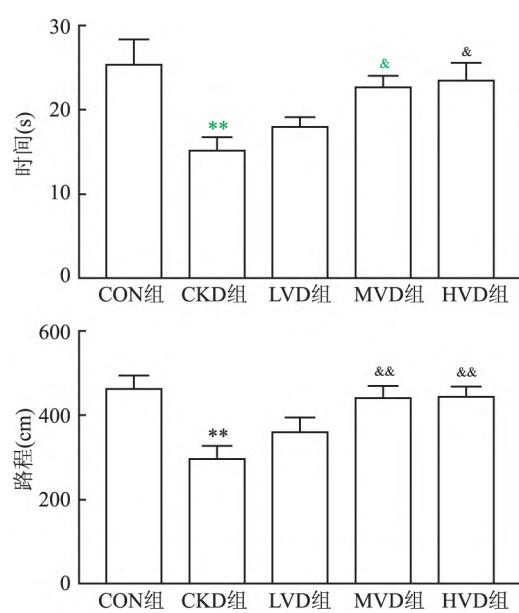


图5 空间探索实验中各组小鼠在原平台象限
游泳时间及路程的比较

与 CON 组比较: ** $P < 0.01$; 与 CKD 组比较: & $P < 0.05$, && $P < 0.01$

时间($P < 0.01$) 及路程($P < 0.01$) 较 CON 组减少, MVD、HVD 组目标象限游泳时间($P < 0.05$, $P < 0.05$) 和路程($P < 0.05$, $P < 0.01$) 较 CKD 组增加, 而 LVD 组与 CKD 组之间上述两项指标差异无统计学意义, 见图 5。

2.5 各组小鼠血清 SOD 活性 各组小鼠血清 SOD 活性差异有统计学意义 ($F = 32.42, P < 0.001$) , 与 CON 组相比 , CKD 组 SOD 活性降低 ($P < 0.001$) , 与 CKD 组相比 , LVD 及 MVD 组 SOD 活性升高 ($P < 0.001$) , 见图 6。

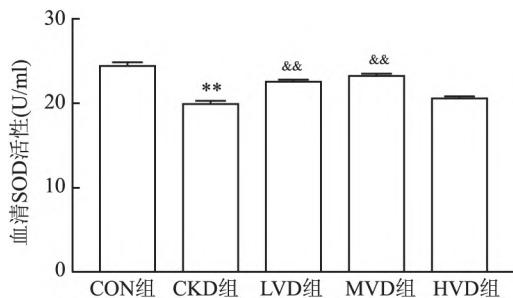


图 6 各组小鼠血清 SOD 活性的比较

与 CON 组比较: ** $P < 0.01$; 与 CKD 组比较: && $P < 0.01$

3 讨论

认知功能障碍是慢性肾脏病神经系统并发症之一 , 是 CKD 患者死亡的独立危险因素^[6-7] , 肾脏替代治疗、营养干预等均和认知功能有关联。维生素 D 作为一种多功能类固醇激素 , 除参与调节钙磷代谢外 , 对大脑功能的调节亦产生影响。多项动物实验证实 , 给予维生素 D 可显著提高阿尔兹海默病^[8] 、糖尿病^[9] 等疾病动物模型的学习和记忆能力 , 但尚缺乏关于维生素 D 对 CKD 小鼠认知功能的影响的研究。故本实验通过腺嘌呤饲料喂养法诱导 CKD 动物模型 , 观察维生素 D 对 CKD 小鼠认知功能的影响。

目前 , CKD 动物模型的制备方法包括药物、外科手术等。本研究采用 0.2% 腺嘌呤饲料喂养小鼠诱导 CKD 动物模型 , 从最终的生化数据看 , 模型组小鼠血清肌酐及尿素氮水平较对照组上升 , 且模型组肾脏与对照组相比在肉眼观及组织学上均有所变化 和临床实际情况较为吻合 , 与前人研究相比 , 本实验所测得尿素氮值较高 , 且干预组和模型组之间肌酐、尿素氮差别不大 , 这可能与饲料配比蛋白质含量较高有关。Morris 水迷宫是用于评价啮齿类动物空间学习记忆功能的行为学实验方法之一 , 它利用动物逃避水环境的特性 , 通过视频分析系统对动物入水后寻找隐匿于水下的平台所需要的时间、搜索策略进行观察和记录 , 借此推断动物的认知功能。本研究结果显示 , 与 CON 组相比 , CKD 组小鼠逃避

潜伏期延长 , 且在原平台象限游泳时间及路程减少 , 提示 CKD 小鼠学习记忆能力下降 , 这与 Tang et al^[10] 的研究结果一致 , 说明在慢性肾脏病疾病状态下存在认知功能障碍。而经维生素 D 干预后 , CKD 小鼠认知功能得到改善 , 主要表现为 MVD 及 HVD 组小鼠逃避潜伏期较 CKD 组缩短 , 且在原平台象限停留时间及路程增加 , 提示维生素 D 可在一定程度上缓解 CKD 认知障碍。有研究指出^[11] , 过高剂量维生素 D 存在致死作用 , 但本研究过程中无实验小鼠死亡 , 但未对维生素 D 有无肝脏、骨骼等器官功能障碍进行进一步研究 , 维生素 D 发挥不同生物学效应的安全剂量范围仍需进一步探索。

既往研究表明 , 维生素 D 具有抗炎、抗氧化特性 , 它通过增加核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2 , Nrf2) 表达、维持正常线粒体功能等途径降低氧化应激^[12]。氧化应激是指体内氧化与抗氧化作用失衡的一种状态 , 随之可造成机体组织不同程度的损伤 , 从而引起多种疾病的发生。慢性肾脏病疾病进展过程中存在严重的氧化应激^[13] , 在 CKD 早期阶段 , 即可发生某些氧化应激相关标志物 (如: 氧化型谷胱甘肽、丙二醛、8-羟基鸟嘌呤脱氧核苷等) 水平的改变^[14]。SOD 是一种能够清除氧自由基的抗氧化酶 , 本研究观察到 CKD 组小鼠血清 SOD 活性较 CON 组下降 , 而与 CKD 组相比 , LVD 及 MVD 组小鼠 SOD 活性增高 , 提示维生素 D 可能通过发挥抗氧化作用改善 CKD 认知功能。

综上所述 , CKD 小鼠存在认知功能减退 , 维生素 D 或可通过抗氧化特性改善其认知 , 这为临幊上防治 CKD 认知功能障碍提供了理论依据 , 需要更多的研究以进一步探索慢性肾脏病认知功能障碍的发病机制和防治措施。

参考文献

- [1] Burns C M , Knopman D S , Tupper D E , et al. Prevalence and risk of severe cognitive impairment in advanced chronic kidney disease [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* , 2018 , 73(3) : 393-9.
- [2] 钱玉珺, 郑可, 李雪梅. 慢性肾脏病患者认知功能研究现状及进展 [J]. 中国血液净化 , 2019 , 18(7) : 495-8.
- [3] 王菊, 王海燕, 张桂霞, 等. 慢性肾脏病患者血清 25-羟维生素 D 水平及其影响因素分析 [J]. 安徽医科大学学报 , 2016 , 51(1) : 106-9.
- [4] Cheng Z , Lin J , Qian Q. Role of vitamin D in cognitive function in chronic kidney disease [J]. *Nutrients* , 2016 , 8(5) : 291.
- [5] Liu W , Zhang S , Zhao D , et al. Vitamin D supplementation enhances the fixation of titanium implants in chronic kidney disease

mice [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e95689.

[6] Soraci L, Corica F, Corsonello A, et al. Prognostic interplay of kidney function with sarcopenia, anemia, disability and cognitive impairment. The GLISTEN study [J]. *Eur J Intern Med*, 2021, 93: 57–63.

[7] Bai K, Pan Y, Lu F, et al. Cognitive function and 3-year mortality in the very elderly Chinese population with chronic kidney disease [J]. *Clin Interv Aging*, 2018, 13: 2055–60.

[8] Mehri N, Haddadi R, Ganji M, et al. Effects of vitamin D in an animal model of Alzheimer's disease: behavioral assessment with biochemical investigation of hippocampus and serum [J]. *Metab Brain Dis*, 2020, 35(2): 263–74.

[9] Alrefaei Z, Alhayani A. Vitamin D(3) improves decline in cognitive function and cholinergic transmission in prefrontal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 287: 156–62.

[10] Tang Q, Ke H, Wu C, et al. Aqueous extract from You-Gui-Yin ameliorates cognitive impairment of chronic renal failure mice through targeting hippocampal CaMK II α /CREB/BDNF and EPO/EPOR pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 239: 111925.

[11] Chavhan S G, Brar R S, Banga H S, et al. Clinicopathological studies on vitamin D(3) toxicity and therapeutic evaluation of aloe vera in rats [J]. *Toxicol Int*, 2011, 18(1): 35–43.

[12] Wimalawansa S J. Vitamin D deficiency: effects on oxidative stress, epigenetics, gene regulation, and aging [J]. *Biology (Basel)*, 2019, 8(2): 30.

[13] Wang D, Jin M, Zhao X, et al. FGF1 Δ HBS ameliorates chronic kidney disease via PI3K/AKT mediated suppression of oxidative stress and inflammation [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(6): 464.

[14] Tomas-Simo P, D'Marco L, Romero-Parra M, et al. Oxidative stress in non-dialysis-dependent chronic kidney disease patients [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2021, 18(15): 7806.

Effect of vitamin D on cognitive function in mice with chronic kidney disease

Li Mengyu¹, Zhang Sen¹, Zhang Li², Wang Deguang¹

(¹Dept of Nephrology, ²Key Laboratory of Anesthesiology and Perioperative Medicine of Anhui Higher Education Institutes, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract **Objective** To investigate the effect of vitamin D on cognitive function in mice with chronic kidney disease(CKD) induced by adenine. **Methods** Fifty-six male C57BL/6J mice were randomly divided into five groups: control(CON) , model(CKD) , and low , medium and high vitamin D(LVD , MVD and HVD) supplement. The renal failure was induced in mice by chronic dietary adenine intake. Mice in the vitamin D-treated groups were injected with calcitriol(20 , 100 , 500 ng/kg) three times a week for six weeks. Then , blood samples were collected from the orbit , and serum creatinine , urea nitrogen and the activity of superoxide dismutase(SOD) were detected. Pathological changes were observed using HE and Masson staining. The cognitive function was assessed using the Morris water maze. **Results** Compared with CON group , serum creatinine and urea nitrogen increased in CKD group($P < 0.05$) . Kidney damage such as glomerular atrophy , renal interstitial fibrosis could be observed in CKD group. In the probe trial testing , compared to CON group , the escape latency of mice in CKD group was longer ($P < 0.05$) . And the escape latency of MVD and HVD group was shorter than that in CKD group ($P < 0.05$) . In the hidden-platform trial , time and travel distance spent in the goal quadrant in CKD group was lower than that in CON group($P < 0.05$) , and the time and distance in MVD and HVD group was higher than that in CKD group($P < 0.05$) . The activity of SOD decreased in CKD group compared to CON group($P < 0.05$) , and increased in LVD and MVD group compared to CKD group($P < 0.05$) . **Conclusion** The cognitive function of CKD mice descends. Vitamin D can improve cognition in CKD mice through its antioxidant function.

Key words chronic kidney disease; vitamin D; cognition disorders