

内毒素诱导新生大鼠肾脏损害及地塞米松的干预作用

吴玉斌¹, 李玉杰², 白英³

(1. 中国医科大学第二附属医院儿科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 辽宁中医学院儿科, 辽宁 沈阳 110032; 3. 沈阳市第五人民医院儿科, 辽宁 沈阳 110016)

[摘 要] **目的** 探讨新生大鼠内毒素血症时肾脏损害的部分机制及地塞米松(Dex)的干预作用。**方法** 取7日 Wistar 大鼠 150 只,随机分为 A 组(对照组);等体积生理盐水腹腔注射;B 组(LPS 组);内毒素(LPS)5 mg/kg 腹腔注射制成内毒素血症模型;C 组(治疗组);LPS 5 mg/kg+Dex 5 mg/kg 共同腹腔注射。各组于注射前(0 h)及注射后 2,4,6,24 h 分别断头处死留取肾脏。肾组织一氧化氮(NO)采用硝酸还原酶法测定,肾组织一氧化氮合酶(NOS)采用底物催化法测定,通过电镜观察肾脏超微结构变化。**结果** ①B 组 NO 于 2 h 高于 A 组同时时间点 NO 浓度(1.69±0.44 nmol/mg vs 1.20±0.36 nmol/mg),差异有显著性($P<0.05$)。于 24 h 为同时时间点 A 组的 2.3 倍(3.12±0.41 nmol/mg vs 1.35±0.38 nmol/mg),差异有显著性($P<0.01$);C 组 NO 也于 2 h 明显高于 A 组同时时间点 NO 浓度(1.63±0.27 nmol/mg vs 1.20±0.36 nmol/mg),($P<0.05$),但于 24 h 升高程度低于 B 组(2.10±0.27 nmol/mg vs 3.12±0.41 nmol/mg) ($P<0.05$);②B 组肾 NOS 于 2 h 明显高于 A 组同时时间点 NOS 浓度(0.47±0.15 U/ml vs 0.38±0.12 U/ml) ($P<0.05$),于 4 h 短暂下降后于 24 h 明显高于同时时间点 A 组 NOS 浓度(0.65±0.27 U/ml vs 0.38±0.15 U/ml) ($P<0.05$);C 组 NOS 浓度自 6 h 逐渐升高,至 24 h 均明显低于 B 组(0.51±0.07 U/ml vs 0.65±0.27 U/ml) ($P<0.05$);③电镜下 A 组肾小球基底膜(GBM)完整,上皮细胞足突清晰,肾小管上皮细胞完整,可见刷状缘。B 组 6 h 肾小球 GBM 完整,部分上皮细胞足突融合,肾小管上皮细胞线粒体空泡变性;24 h 肾小球 GBM 断裂,上皮细胞足突明显融合,系膜细胞线粒体嵴断裂,空泡变性。肾小管上皮细胞线粒体扩张成大泡。C 组 24 h 肾小球 GBM 基本正常,上皮细胞足突部分轻度融合,系膜细胞内少数线粒体空泡变性,肾小管可见刷状缘。**结论** 新生鼠内毒素血症时肾脏 NOS 产生增加,诱导合成过量的 NO 参与肾损伤。Dex 通过调节肾脏 NOS 而抑制 NO 的大量合成,具有肾脏保护作用。

[中国当代儿科杂志,2004, 6(4): 269—273]

[关 键 词] 内毒素;肾脏;一氧化氮;一氧化氮合酶;地塞米松;新生鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008—8830(2004)04—0269—05

Renal damage induced by endotoxin and the protective effect of dexamethasone on kidneys in neonatal rats

Yu-Bin WU, Yu-Jie LI, Ying BAI. Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Email:wybywxm@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study the mechanism of the kidney injury and the protective effect of dexamethasone (Dex) on kidneys in neonatal rats with endotoxemia. **Methods** One hundred and fifty 7-day-old newborn Wistar rats were randomly assigned into 3 groups: a LPS group, a Dex group and a Control group. The LPS group was injected intraperitoneally by a single bolus of lipopolysaccharide (LPS, 5 mg/kg). The Dex group received an injection with LPS 5 mg/kg plus Dex 5 mg/kg. The Control group received the same volume of 0.9% sodium chloride as the other two groups. The rats were sacrificed at 0, 2, 4, 6, 24 hrs of post-infection (10 rats each). The nitric oxide (NO) levels in kidneys were measured by colorimetric analysis. The nitric oxide synthase (NOS) concentrations of the kidney were measured by the biochemical method. The superstructure of the kidney was

[收稿日期] 2003—08—15; [修回日期] 2004—02—10
[基金项目] 教育部科学技术研究重点项目基金资助, (课题号:03031)。
[作者简介] 吴玉斌(1958—),女,博士,教授。主攻方向:新生儿急救。
[通讯作者] 吴玉斌,辽宁省沈阳市和平区三好街 36 号,中国医科大学附属第二医院儿科,邮编:110004。

observed under the electron microscope. **Results** The NO levels of the kidneys in the LPS group were higher than those of the Control group at 2 hrs of post-injection (1.69 ± 0.44 nmol/mg vs 1.20 ± 0.36 nmol/mg; $P < 0.05$), increasing to be 2.3 times greater than the Control group at 24 hrs (3.12 ± 0.41 nmol/mg vs 1.35 ± 0.38 nmol/mg; $P < 0.01$). The NO levels of the Dex group (1.63 ± 0.27 nmol/mg) were also higher than those of the Control group at 2 hrs ($P < 0.05$), while they were lower than those of the LPS group at 24 hrs (2.10 ± 0.27 nmol/mg; $P < 0.05$). The NOS contents of the kidneys at 2 hrs of post-injection (0.47 ± 0.15 U/ml) and at 24 hrs (0.65 ± 0.27 U/ml) in the LPS group were both higher than those of the Control group (0.38 ± 0.12 U/ml and 0.38 ± 0.15 U/ml; both $P < 0.05$). The NOS content elevated at 6 hrs in the Dex group compared with that of the Control group, but it was lower than that of the LPS group at 24 hrs (0.51 ± 0.07 U/ml vs 0.65 ± 0.27 U/ml; $P < 0.05$). Under the electron microscope, the complete renal glomerulus GBM and clear epithelial cell foot processes were found, and the complete renal tubule epithelial cells and brush border were also found in the Control group. In the LPS group, renal glomerulus GBM was fractured, epithelial cell foot processes had obvious confluence, a great quantity of mesangial cells mitochondria presented vacuolation, and renal tubules epithelial cell mitochondria were expanded to bubbles at 24 hrs of post-injection. In the Dex group, renal glomerulus GBM almost recovered to normal, partial epithelial cell foot processes were slightly fused, and a small quantity of mitochondria vacuolation in mesangial cells and the brush border in renal tubules were found at 24 hrs of post-injection. **Conclusions** LPS can stimulate the kidneys to produce more NOS which induces to synthesize excessive NO in neonatal rats. Dex can protect kidneys from NO damage by inhibiting the NOS production and yielding a decrease of the NO level.

[Chin J Contemp Pediatr, 2004, 6(4): 269—273]

Key words: Endotoxin; Kidney; Nitric oxide; Nitric oxide synthase; Dexamethasone; Rat, newborn

新生儿败血症是引起新生儿死亡的重要原因之一,危重病例可发展至感染性休克,甚至出现多器官功能障碍综合征。当合并肾功能损伤甚至衰竭时,则难以救治。目前,对成人和成年动物的研究报道表明,内毒素血症时多种细胞因子及炎症介质参与全身炎症反应引起细胞自身破坏。一氧化氮(NO)是炎症介质“瀑布”样连锁反应的最终介质之一,同时又是血管活性物质,过量产生的NO是导致器官功能衰竭的重要因素。因此,NO抑制剂的治疗价值受到普遍关注。糖皮质激素是儿科应用较广泛的类固醇药物,具有抗炎反应的作用。本文通过测定内毒素血症新生大鼠肾脏NO、一氧化氮合酶(NOS)水平及肾脏超微结构改变,探讨内毒素血症新生大鼠肾脏损害的部分发生机制及地塞米松(Dex)对肾脏是否有保护作用,为临床应用糖皮质激素提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和模型制作

健康7日龄Wistar大鼠150只,平均体重(17 ± 3)g,雌雄不限,由中国医科大学第二附属医院实验动物中心提供。新生大鼠内毒素血症模型参照Wright^[1]的方法。随机分成3组,每组50只。A组(对照组):腹腔注射0.1 ml 0.9%氯化钠溶液;B组(LPS组):腹腔注射LPS(*E. coli* o. 55:B5;Sigma公司提供)5 mg/kg;C组(Dex组):腹腔注射LPS

5 mg/kg+Dex 5 mg/kg。各组于注射前(0 h)、注射后2,4,6,24 h每次断头处死10只大鼠留取肾脏置液态氮中备用。

1.2 检测方法

1.2.1 肾组织NO和NOS的测定 将肾组织制成10%的匀浆液,取上清液用硝酸还原酶法测定NO浓度(试剂盒由南京建成生物工程研究所提供),用底物催化法测定上清液中NOS含量。

1.2.2 肾脏超微结构观察 每组各时间点取3块约1 mm×1 mm×1 mm大小肾组织,经戊二醛及锇酸固定后,丙酮逐级脱水,树脂包埋,LKB型切片机作超薄切片,切片厚度为50 nm,醋酸铀和柠檬酸双重染色后,H-600型透射电镜(日本HITACHI公司)观察并照相。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS统计软件,各组间比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 肾组织NO的动态变化

B组NO在实验后逐渐升高,于2 h明显高于A组同时间点NO浓度。于24 h为同时间点A组的2.3倍,差异有显著性($P < 0.01$);C组NO也于2 h高于A组同时间点NO浓度, ($P < 0.05$),但于24 h升高程度明显低于B组,差异有显著性

($P<0.05$),见表 1。

2.2 肾组织 NOS 的动态变化

B 组肾 NOS 实验后逐渐升高,于 2 h 明显高于 A 组同时间点 NOS 浓度,于 4 h 短暂下降后于 24 h

明显高于同时间点 A 组,差异有显著性($P<0.05$);C 组 NOS 于 6 h 略升高,明显低于 B 组同时时间点的水平, ($P<0.05$),至 24 h 仍明显低于 B 组,差异有显著性($P<0.05$),见表 2。

表 1 3 组新生大鼠肾组织 NO 浓度的动态变化
Table 1 NO levels in kidneys of three groups (n=10, $\bar{x}\pm s$, nmol/mg)

组别	0 hr	2 hrs	4 hrs	6 hrs	24 hrs
A 组	1.16±0.08	1.20±0.36	1.19±0.32	1.25±0.34	1.35±0.38
B 组	1.16±0.08	1.69±0.44 ^a	1.66±0.27 ^a	2.69±0.27 ^a	3.12±0.41 ^a
C 组	1.16±0.08	1.63±0.27 ^a	1.52±0.34 ^a	1.94±0.34 ^{a,b}	2.10±0.27 ^{a,b}

注: a 与同时时间点 A 组相比 $P<0.05$; b 与同时时间点 B 组相比 $P<0.05$

表 2 3 组新生大鼠肾组织 NOS 浓度的动态变化
Table 2 NOS levels in kidneys of three groups (n=10, $\bar{x}\pm s$, U/ml)

组别	0 hr	2 hrs	4 hrs	6 hrs	24 hrs
A 组	0.37±0.11	0.38±0.12	0.37±0.04	0.39±0.05	0.38±0.15
B 组	0.37±0.11	0.47±0.15 ^a	0.33±0.06	0.53±0.14 ^a	0.65±0.27 ^a
C 组	0.37±0.11	0.39±0.03	0.34±0.11	0.41±0.18 ^b	0.51±0.07 ^{a,b}

注: a 与同时时间点 A 组相比 $P<0.05$; b 与同时时间点 B 组相比 $P<0.05$

2.3 肾组织超微结构改变

电镜下,A 组肾小球基底膜(GBM)完整,上皮细胞足突清晰,肾小管上皮细胞完整,可见刷状缘。B 组 6 h 肾小球 GBM 完整,部分上皮细胞足突融合,肾小管上皮细胞线粒体空泡变性;于 24 h 肾小球 GBM 断裂,上皮细胞足突明显融合,系膜细胞线粒体嵴断裂,空泡变性。肾小管上皮细胞线粒体扩张成大泡。C 组 24 h 肾小球 GBM 基本正常,上皮细胞足突部分轻度融合,系膜细胞内少数线粒体空泡变性,肾小管可见刷状缘。见图 1—10。

3 讨论

新生儿败血症可引起多器官系统功能衰竭,由于有效循环血量减少,肾脏血液灌流障碍,早期表现为肾前性肾功能损伤。随着病情的发展,肾小管变性坏死,出现器质性肾衰竭,致尿量减少或无尿,最终导致死亡。其肾脏损伤的机制尚不十分清楚。

生理条件下,肾组织中存在 3 种形式的 NOS,即诱导型(iNOS)、结构型(cNOS)和内皮型(eNOS),cNOS 定位于致密斑和包曼氏囊,eNOS 在肾小球毛细血管、入球、出球小动脉和髓质内小管的内皮细胞,iNOS 主要在近曲小管和肾小球系膜细

胞。NOS 在髓质活性为皮质的 3 倍,在入球小动脉大于出球小动脉,因此影响肾脏的血流分布、肾小球滤过率及肾血管对血管紧张素的收缩反应^[2]。生理状态下持续少量产生的 NO 对血管弹性和钠分泌的调节起重要作用。以往的研究显示,LPS 刺激后动物血清及心肌组织合成大量的 NO,引起心肌损害和持续的血管扩张,导致顽固性低血压^[3~5]。在肾脏可见肾小球系膜细胞,毛细血管上皮细胞及系膜细胞有新的 iNOS 表达^[6]。本实验发现,新生大鼠注射 LPS 后,肾组织持续产生大量 NO,实验后早期(6 h)肾小球仅部分上皮细胞足突融合,肾小管上皮细胞线粒体空泡变性;随着 NO 浓度的增加,肾脏的变性坏死越来越严重,于 24 h 肾小球 GBM 断裂,上皮细胞足突明显融合,系膜细胞和肾小管上皮细胞线粒体空泡变性。提示 LPS 可能通过肾脏产生 NO 直接损伤肾脏。其肾损伤的可能机制是高浓度 NO 与超氧化物反应,形成细胞毒性物质 OONO⁻^[7]:①可溶性鸟苷酸环化酶在血管平滑肌大量释放,使血管麻痹过度扩张,导致低血压及对血管活性物质的低反应性;②引起血管通透性的增加,使有效血容量进一步减少;③NO 促使淋巴细胞合成细胞因子,引起组织损伤;④与线粒体酶相互作用,具有细胞毒性;⑤引起 DNA 片段的断裂等。本实验发现,LPS 组肾组织 NO 持续上升,而 NOS 于试验后 2 h 升

高,于 4 h 下降后 6 h 再次升高,这可能是在 LPS 刺激后的早期 cNOS 和 eNOS 升高(此时 iNOS 尚未合成),催化产生较小剂量 NO,这可能为机体的一种代偿机制,具有保护作用^[8]。

图 1 各组新生大鼠肾脏电镜图(×8 000)

Figure 1 Renal electron microscpic photographs of various groups (×8 000)

正常新生大鼠肾小球 GBM 完整,上皮细胞足突清晰;肾小管上皮细胞完整,可见刷状缘。LPS 组 24 h 时肾小球 GBM 断裂,上皮细胞足突明显融合,系膜细胞线粒体大量空泡变性;肾小管上皮细胞线粒体扩张成大泡。Dex 组 24 h 时肾小球 GBM 基本正常,上皮细胞足突部分轻度融合,系膜细胞内少数线粒体空泡变性;肾小管可见刷状缘,上皮细胞内空泡变性较 LPS 组减少。

由于 cNOS 和 eNOS 灭活快,其活性很快减低。LPS 刺激后 4 h iNOS mRNA 出现强阳性表达^[3],产生 iNOS 蛋白^[9],而 iNOS 一经诱导生成,其活性保持数天。因此,实验后期增加的 NOS 主要是由 iNOS 升高所致,由 iNOS 催化合成大量的 NO 引起肾脏的损伤。

由于 Dex 可以抑制抗原抗体的结合,干扰内毒素激活补体及抑制炎症介质和细胞因子的作用,可以稳定细胞膜和溶酶体膜,保护组织细胞。研究表明,Dex 为 iNOS 选择性抑制剂,可抑制 iNOS 的基因表达,使 NO 的生成减少^[10],从而抑制炎症反应用于治疗严重感染。本实验结果显示,C 组于 24 h

时 NOS 明显低于 B 组的水平。与之相应的改变是 C 组 NO 于 24 h 也明显低于 B 组,C 组 24 h 时肾小球仅有部分上皮细胞足突轻度融合,少数线粒体空泡变性。此结果提示 Dex 可通过抑制肾组织产生 NOS 而减少 NO 的合成,从而对肾脏起保护作用。

[参 考 文 献]

[1] Wright CE,Rees DD,Moncada S. Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock [J]. Cardio Res, 1992, 26(1): 48—57.

[2] Tsao CM, Ho ST, Chen A, Wang JJ, Ii CY, Tsai SK, et al. Low-dose dexamethasone ameliorates circulatory failure and renal dysfunction in conscious rats with endotoxemia [J]. Shock, 2004, 21(5): 481—491.

[3] 杜秀华,吴玉斌,贾学宗,李军,潘丽丽,韩玉昆. 地塞米松对内毒素休克新生大鼠心肌损害的保护作用 [J]. 中华儿科杂志, 2002, 40(12): 756—757.

[4] Salerno L, Sorrenti V, Di Giacomo C, Romeo G, Siracusa MA. Progress in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors [J]. Curr Pharm Des, 2002, 8(3): 177—200.

[5] Suzuki S, Togari H, Yamaguchi N, Haas KM. Nitric oxide inhalation and nitric oxide synthase inhibitor supplement for endotoxin-induced hypotension [J]. Pediatr Int, 2001, 43(4): 343—349.

[6] Morrissey JJ, McCracken R, Kaneto H, Vehaskari M, Montani D, Klahr S. Location of an inducible nitric oxide synthase mRNA in the normal kidney [J]. Kidney Int, 1994, 45(4): 998—1005.

[7] 郝刚. 内毒素休克兔血浆 NO 和 ET-1 水平的变化及相互关系 [J]. 中国病理生理杂志,1998, 14(4): 23—25.

[8] Thiemermann C. Nitric oxide and septic shock [J]. Gen Pharmacol, 1997, 29(2): 159—166.

[9] Hom GJ, Grant SK, Wolfe G, Bach TJ, MacIntyre DE, Hutchinson NI. Lipopolysaccharide-induced hypotension and vascular hyporeactivity in the rat: tissue analysis of nitric oxide synthase mRNA and protein expression in the presence and absence of dexamethasone, NG-monomethyl-L-arginine or indomethacin [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1995, 272(1): 452—459.

[10] Szabo C, Thiemermann C, Wu CC, Perretti M, Vane JR. Attenuation of the induction of nitric oxide synthase by endogenous glucocorticoids accounts for endotoxin tolerance in vivo [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 4, 91(1): 271—275.

(本文编辑:吉耕中)