论著

文章编号:1000-5404(2006)08-0788-04

梗阻性黄疸肾脏损伤机制实验研究

刘祥德,何振平 (第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨大鼠梗阻性黄疸时肾脏损伤机制及凋亡相关蛋白表达变化。**方法** 36只Wistar大鼠分为正常对照组6只和实验组30只,观察梗阻性黄疸(胆总管结扎法)发生后1、3、6、10、14 d肾脏病理变化(HE染色)、细胞凋亡率(TUNEL法)、survivin和bax表达(SABC法)、血浆内毒素含量(鲎法)、SOD活性(黄嘌呤氧化酶法)、MDA含量(硫代巴比妥法)变化。**结果** 实验组肾小管上皮细胞坏死、脱落和细胞聚集现象明显,大鼠肾脏细胞凋亡率显著升高,术后14 d最高(25.2±2.8)%;survivin表达显著下降、bax表达显著上升。正常对照组血浆SOD活性和MDA含量分别为(193.6±23.5)U/L和(10.7±1.2)nmol/L,实验组分别呈显著下降和上升趋势。正常对照组血浆内毒素含量为(0.12±0.02)U/ml,实验组显著上升。**结论** 细胞凋亡是梗阻性黄疸时肾功能损伤发生机制之一,保护性凋亡相关蛋白表达下降及促凋亡蛋白表达增高可能是细胞凋亡发生的直接生物学因素,自由基和内毒素水平的增加是肾脏损伤发生的重要血源性因素。

关键词: 梗阻性黄疸;凋亡;肾脏;自由基;内毒素

中图法分类号: R-332;R575.06;R692.02 **文献标识码:** A

Mechanism of kidney lesion in rats suffered from obstructive jaundice

LIU Xiang-de, HE Zhen-ping (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the lesion mechanism and the apoptosis related protein changes of kidney in rat suffered from obstructive jaundice. Methods Choledocho-ligation methods was used to create rat obstructive jaundice model. Six rats in the normal control group and thirty rats of experiment group were observed at day 1, 3, 6, 10 and 14 after rat model establishment. HE staining for kidney pathological changes, TUNEL staining for cell apoptosis, SABC for apoptotic related proteins of survivin and bax, xanthine oxidase method for SOD activity and thiobarbiturate method for MAD content were carried out. Results Renal tubular epithelial cell necrosis, cell shedding and aggregation were the main pathological changes in the experiment group. In the experiment group, the apoptosis ratio increased significantly, and reached the peak of (25.2±2.8)% on postoperative day 14. The relative gray value of survivin in the experiment group decreased significantly and of bax increased significantly. The plasma SOD activity in the normal group was (193.6±23.5) U/L, but it in the experiment group decreased significantly. The plasma MDA content and the endotoxin level in the experiment group increased significantly. Conclusion Cell apoptosis is one of the lesion mechanisms of kidney in rats suffered from obstructive jaundice. The down-regulation of survivin and the up-regulation of bax may be the biological factor in the occurrence of apoptosis. The increasing of free radical and endotoxin are important factors in the kidney lesion.

Key words: obstructive jaundice; apoptosis; kidney; free radical; endotoxin

梗阻性黄疸发生时很多其他脏器常常发生不同程度的损害,特别是以肾功能损害最明显和常见[1,2]。梗阻性黄疸发生后,胆红素的升高及全身血液动力学的改变对肾脏损害较大[3],但目前关于黄疸发生后肾脏本身的损伤机制及继发性变化则没有较深入研究,本研究从光镜病理观察、组织免疫病理、TUNEL原位杂交、血液生化因子检测等几个角度探讨大鼠梗阻性黄疸发生后肾脏损害的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

试剂:Bax和survivin兔抗多克隆抗体,美国santa cruz公

作者简介:刘祥德(1969-),男,山西省临汾市人,博士,主治医师,主要从事梗阻性黄疸肾功能损害方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68753779

收稿日期:2005-09-19;修回日期:2005-12-15

司；SABC 免疫组化试剂盒、TUNEL 试剂盒，博士德生物工程有限公司；SOD、MDA 试剂盒，南京建成生物工程研究所；内毒素试剂盒，上海医学科研所。

仪器：显微照相系统，Olympus BX50；752 型紫外可见分光光度计，上海第三分析仪器厂。

1.2　实验动物及分组

健康 Wistar 大鼠 36 只，由第三军医大学实验动物中心提供，体质量 200～250 g，雌雄不拘，分为 2 组：正常对照组 6 只；实验组（梗阻性黄疸组）30 只，实验组观察时相点为造模术后 1、3、6、10、14 d，每时相点 6 只动物。

1.3　模型建立

乙醚吸入麻醉后用碘酒、酒精消毒腹部，中上腹正中切口 3～4 cm，无菌操作打开腹腔，分离胆总管，分别于肝门部和其远端双重结扎后从中间剪断，建立完全性梗阻性黄疸模型。

1.4　标本采集

将动物过量麻醉处死，腹主动脉取血 4 ml，注入普通肝素抗凝管中，低温下离心取血浆，－70 ℃保存待测。切取动物左肾，4% 多聚甲醛固定，常规方法制备 5 μm 病理切片。

1.5　指标检测

1.5.1　光镜观察　　光学显微镜下观察肾脏病理变化。

1.5.2　免疫组织化学染色　　肾脏标本脱蜡水化，按试剂盒说明书进行操作，DAB 显色，苏木精复染，中性树胶封片。以 PBS 液代替一抗设立阴性对照。各组每时相点 6 个标本各 1 张切片，在 400 倍视野下随机选择背景和阳性组织区域各 3 处，MIG2000 图像分析软件测其灰度值并取均值，计算阳性组织相对灰度值（阳性组织灰度值/背景灰度值）。

1.5.3　TUNEL 法测定细胞凋亡　　按试剂盒说明书进行操作，每批检测均包括阴性对照（只加标记液），以卵巢阳性片作阳性对照。400 倍高倍视野下进行阳性细胞计数分析。每张切片任选 5 个视野进行摄像分析，测量每个视野内阳性细胞数和总细胞数，计算平均阳性细胞数。

1.5.4　血浆生化指标检测　　黄嘌呤氧化酶法检测血浆 SOD 活性，硫代巴比妥法检测 MDA 含量，鲎法检测内毒素含量，采集标本用的空针、针头、试管经清洗消毒后用 ^{60}Co 照射去热原。

1.6　统计学处理

所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 软件进行方差分析。

2　结果

2.1　一般情况

实验组大鼠胆管结扎 1 d 后即可观察到小便颜色明显加深，3 d 时见耳尖及鼠尾出现黄染现象，随术后时间延长，黄疸加深。

2.2　肾脏组织学改变

实验组胆总管结扎 1 d 后肾脏光镜下无显著变化，3 d 时肾近曲小管上皮细胞浊肿、肾小球肿胀、肾小球囊腔狭窄、肾小管上皮细胞刷状缘丢失；6 d 时肾脏近曲小管上皮细胞积水变性和肾小球囊腔狭窄明显加重，肾小管上皮细胞出现坏死、脱落和细胞聚集现象，10 d 时肾小管上皮细胞坏死、脱落和细胞聚集现象更明显；14 d 时可见部分坏死灶。见图 1。

2.3　肾脏凋亡检测结果

正常对照组凋亡率为（12.4 ± 2.5）%，实验组凋亡率显著上升，并随时间延长呈上升趋势。见表 1 和图 2。

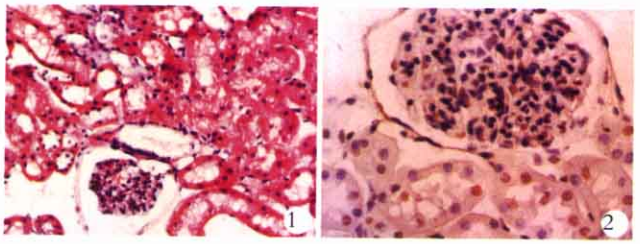


图 1　实验组 10 d 肾脏病理变化　（HE ×400）

图 2　实验组 14 d 肾脏皮质 TUNEL 染色结果　（ ×400）

表 1　肾脏细胞凋亡率凋亡蛋白免疫组化染色结果

组别	细胞凋亡率（%，$\bar{x} \pm s$）	survivin 表达相对灰度值	bax 表达相对灰度值
正常对照组	12.4 ± 2.5	1.415 ± 0.152	1.202 ± 0.088
实验组 1 d	13.7 ± 2.8	1.401 ± 0.131	1.297 ± 0.104
实验组 3 d	18.8 ± 3.1[b]	1.335 ± 0.134[a]	1.413 ± 0.114[b]
实验组 6 d	19.6 ± 3.2[b]	1.247 ± 0.094[b]	1.524 ± 0.108[b]
实验组 10 d	21.3 ± 3.1[b]	1.197 ± 0.109[b]	1.577 ± 0.155[b]
实验组 14 d	25.2 ± 2.8[b]	1.157 ± 0.085[b]	1.484 ± 0.148[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常对照组比较

2.4　肾脏凋亡相关蛋白表达变化

正常组 survivin 表达相对灰度值为（1.415 ± 0.152），bax 表达相对灰度值为（1.202 ± 0.088），实验组 survivin 和 bax 表达分别呈下降和上升趋势。结果见表 1 和图 3、4。

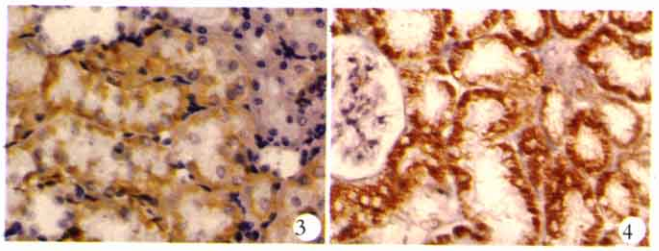


图 3　实验组 14 d survivin 表达　（SABC ×400）

图 4　实验组 14 d bax 表达　（SABC ×400）

2.5　血浆生化指标检测结果

正常组 SOD 活性为（193.6 ± 23.5）U/L，MDA 含量为（10.7 ± 1.2）nmol/L，实验组两种分别显著下降和上升。正常组内毒素含量为（0.12 ± 0.02）U/ml，实验组显著上升。结果见表 2。

表 2　大鼠血浆 MDA SOD 内毒素含量检测结果

组别	SOD（U/L）	MDA（nmol/L）	内毒素（U/ml）
正常对照组	193.6 ± 23.5	10.7 ± 1.2	0.21 ± 0.03
实验组 1 d	171.3 ± 16.2[a]	12.4 ± 1.3[a]	0.44 ± 0.05[b]
实验组 3 d	155.4 ± 13.4[b]	15.5 ± 1.7[b]	0.57 ± 0.08[b]
实验组 6 d	136.5 ± 10.8[b]	18.6 ± 1.9[b]	0.66 ± 0.11[b]
实验组 10 d	110.5 ± 9.4[b]	21.7 ± 2.1[b]	0.74 ± 0.21[b]
实验组 14 d	90.2 ± 8.3[b]	25.4 ± 2.3[b]	0.85 ± 0.18[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常对照组比较

2.6 相关性检测结果

肾脏细胞凋亡发生与血浆 MDA 含量($r=0.658$, $P<0.01$)、内毒素含量($r=0.712$, $P<0.01$)变化显著正相关,与血浆 SOD 活性变化显著负相关($r=-0.547$, $P<0.01$)。

3 讨论

梗阻性黄疸后机体发生了一系列病理变化,其中低血压、低血容量、内毒素血症、高胆红素血症、肾血管纤维素沉积、全身及肾血流动力学改变等均对肾脏功能产生一定的影响[4-6],除发现肾脏血管收缩、肾细胞能量代谢障碍、肾功能衰竭外,对肾脏本身的损伤及机制缺乏进一步的报道。本实验结果显示,梗阻性黄疸时大鼠肾功能受到损害,肾小管上皮细胞可见变性、坏死、脱落,细胞聚集,肾小球扩张充血与缺血萎缩并存,肾脏肾小球细胞可见显著溶解现象,肾小管上皮细胞可见显著脱落现象。可见"细胞坏死"是梗阻性黄疸后大鼠肾脏细胞死亡的方式之一。TUNEL 染色结果显示,"细胞凋亡"也是梗阻性黄疸后大鼠肾脏细胞死亡的方式之一,正常情况下,肾脏细胞保持一定的凋亡数量和比例,是一种正常的细胞更替方式,在机体受到病理性伤害时,凋亡也是细胞的死亡方式之一。实验组 10、14 d 时细胞凋亡率高达(21.3±3.1)%和(25.2±2.8)%,说明,细胞凋亡是梗阻性黄疸后肾脏细胞死亡的主要方式。

受损细胞发生凋亡时,其凋亡相关蛋白的表达必定发生一定的变化,有的具有始动作用,有的是继发性变化,凋亡抑制蛋白和凋亡促进蛋白的表达比率决定了凋亡是否发生[7,8]。本研究选择了 survivin 和 bax 作为凋亡相关蛋白变化趋势研究对象。survivin 是一种凋亡抑制蛋白,基因全长 15 kb,位于 17q25,含有 4 个外显子和 3 个内含子,基因编码产生一含 142 个氨基酸的蛋白,是迄今最小的 hIAP 蛋白,survivin 的主要生理作用时抗凋亡和促细胞增殖[9,10]。survivin 抗凋亡机制比较复杂,比较明确的途径是 survivin 直接通过抑制 caspase 家族成员 caspase3 和 caspase7 的活性发挥抗凋亡作用[11]。survivin 蛋白表达在增殖强烈的组织中(瘢痕及肿瘤组织)有广泛表达,这恰与组织较强的增殖特性相应。

肾脏组织小管上皮细胞本身也处于一种较强的增殖状态,因此,正常肾组织的免疫组化染色可以观察到有一定水平的 survivin 表达,但是在梗阻性黄疸发生后,肾脏组织 survivin 表达水平限制降低。实验组 14d 时大鼠肾脏 survivin 表达相对灰度值为(1.157±0.085),显著低于正常组的(1.415±0.152),而且统计结果也说明,细胞凋亡的发生与,survivin 的变化趋势有相关关系,说明 survivin 在梗阻性黄疸的细胞凋亡发生中起一定作用。Bax 蛋白是一种促进凋亡发生的因子,在梗阻性黄疸发生后,bax 水平显著上升,与凋亡发生趋势相同,具相关关系,一方面是损害因素的作用促进了其表达,另一方面,保护性因素的表达降低也可能导致 bax 的表达上调。

实验组大鼠血浆 MDA 含量显著上升,说明大鼠血浆自由基水平随黄疸进行性加重而上升,统计结果显示 MDA 含量变化与细胞凋亡发生显著相关,与此相反的是 SOD 活性与细胞凋亡发生显著负相关,多种研究结果也支持自由基水平增加与细胞凋亡发生有关[12,13]。本研究证实,梗阻性黄疸发生后,血浆内毒素水平显著升高,相关性统计也证实,凋亡发生与内毒素水平变化呈显著的正相关关系,推测内毒素是导致肾脏细胞发生凋亡和坏死的直接因素。梗阻性黄疸发生后,各种损伤因素导致内毒素水平升高,高水平的内毒素除直接对肾细胞造成损害外,更主要的是通过激活机体各种炎性细胞释放促炎介质,包括 TNF-α、白细胞介素-1、白三烯、血小板激活因子等,介导肾脏损害,尤其是 TNF-α 被视为内毒素所致脏器病理、生理过程的关键性促炎介质[14]。

梗阻性黄疸发生后,血液中胆红素含量的持续增加、继发性多种有害炎性因子水平增加和自由基水平的升高可能是造成凋亡相关蛋白和内毒素含量变化的重要原因,而且这些因素相互作用,形成恶性循环,加重了肾脏的损伤,其相互作用关系也有待进一步的深入研究。

总之,梗阻性黄疸发生后肾功能损伤表现为细胞凋亡和坏死的进行性增加,保护性凋亡相关蛋白表达下降及促凋亡蛋白的表达增加可能是细胞凋亡发生的生物学因素,自由基和内毒素水平的增加是肾脏损伤发生的重要血源性因素。

参考文献:

[1] 刘祥德, 李 卫, 何振平, 等. NO 与梗阻性黄疸时肾功能损害的关系[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(7): 795-796.

[2] USLU A, CAYCI M, NART A, *et al*. Renal failure in obstructive jaundice[J]. Hepatogastroenterology, 2005, 52(61): 52-54.

[3] KALER B, KARRAM T, MORGAN W A, *et al*. Are bile acids involved in the renal dysfunction of obstructive jaundice? An experimental study in bile duct ligated rats [J]. Ren Fail, 2004, 26(5): 507-516.

[4] UTKAN Z N, UTKAN T, SARIOGLU Y, *et al*. Effects of experimental obstructive jaundice on contractile responses of dog isolated blood vessels: role of endothelium and duration of bile duct ligation[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2000, 27(5-6): 339-344.

[5] PAPAKOSTAS C, BEZIRTOGLOU E, PITIAKOUDIS M, *et al*. Endotoxinemia in the portal and the systemic circulation in obstructive jaundice[J]. Clin Exp Med, 2003, 3(2): 124-128.

[6] TANAKA Y, KOBAYASHI Y, GABAZZA E C, *et al*. Increased renal expression of bilirubin glucuronide transporters in a rat model of obstructive jaundice [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 282(4): G656 - G662.
[7] MIZUNO S, NAKAMURA T. Prevention of neutrophil extravasation by hepatocyte growth factor leads to attenuations of tubular apoptosis and renal dysfunction in mouse ischemic kidneys [J]. Am J Pathol, 2005, 166(6): 1895 - 1905.
[8] XIE Q, LIN T, ZHANG Y, *et al*. Molecular cloning and characterization of a human AIF-like gene with ability to induce apoptosis[J]. J Biol Chem, 2005, 280(20): 19673 - 19681.
[9] CONTE E, STAGNO F, GUGLIELMO P, *et al*. Survivin expression in chronic myeloid leukemia[J]. Cancer Lett, 2005, 225(1): 105 - 110.
[10] LO-MUZIO L, FARINA A, RUBINI C, *et al*. Survivin as prognostic factor in squamous cell carcinoma of the oral cavity[J]. Cancer Lett, 2005, 225(1): 27 - 33.
[11] STUCKI J W, SIMON H U. Mathematical modeling of the regulation of caspase-3 activation and degradation[J]. J Theor Biol, 2005, 234(1): 123 - 131.
[12] CAGLIKULEKCI M, PATA C, APA D D, *et al*. The effect of N-acetylcysteine (NAC) on liver and renal tissue inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tissue lipid peroxidation in obstructive jaundice stimulated by lipopolysaccharide (LPS)[J]. Pharmacol Res, 2004, 49(3): 227 - 238.
[13] KUCUK C, SOZUER E, IKIZCELI I, *et al*. Role of oxygen free radical scavengers in acute renal failure complicating obstructive jaundice [J]. Eur Surg Res, 2003, 35(3): 143 - 147.
[14] CAGLIKULEKCI M, BESIROV E, OZKAN H, *et al*. The effect of granulocyte colony stimulating factor on the immune parameters in experimental obstructive jaundice[J]. Hepatogastroenterology, 2001, 48(37): 220 - 223.

（编辑 龙 亮）

文章编号：1000-5404(2006)08-0791-01

个案与短篇

针对老年腹腔镜胆囊切除术并存疾病患者的围手术期护理

谭 平，段 敏 （第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所，重庆 400038）

腹腔镜胆囊切除术(laparoscopic cholecystectomy, LC)，是目前治疗单纯胆囊疾病的主要手术方式之一。随着人口老龄化的进一步加重，老年胆道疾病患者的比例逐渐增加。由于老年患者有其独特的生理特点，常伴有其他生理系统的疾病，围手术期护理不当，可发生严重并发症。因此，针对老年腹腔镜胆囊切除术并存其他疾病围手术期的护理值得进一步研究。现总结388例60岁以上并存疾病的老年LC患者护理经验，报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

我院2001年4月至2005年4月共实施LC手术6738例，其中60岁以上并存疾病388例，其中男性157例，女性231例。116例有其他各种手术史。

1.2 原有基础疾病情况

其中慢性胆囊炎192例，急性胆囊炎97例，胆囊息肉99例，术前均行B超等检查。12例患者术前行逆行胰胆管造影检查。

1.3 并存疾病情况

其中心血管系统疾病包括高血压病、冠心病、房室传导阻滞等145例；糖尿病128例；呼吸系统疾病包括慢性支气管炎、肺气肿等137例；其他35例。合并2种以上疾病57例。

作者简介：谭 平(1979 -)，女，重庆市人，护师，主要从事肝胆外科临床护理方面的研究。电话：(023)68754171

收稿日期：2005-10-27；修回日期：2006-02-20

2 护理

2.1 术前护理

2.1.1 合并心血管疾病 合并心脏疾病的患者手术耐受力较低，加上CO_2气腹作用，对呼吸、循环有一定影响，术中牵拉胆囊，引起迷走神经兴奋，易出现心动过缓，这些均给LC带来较大危险。对于择期手术的高血压患者，如果术前收缩压 > 170 ~ 180 mmHg，舒张压 > 100 ~ 110 mmHg，必须尽早服用降压药物治疗血压控制稳定后方能进行手术；半年内发生急性心肌梗死的患者不宜施行LC；对于不稳定心绞痛和/心功能不全的患者，NYHA Ⅲ级者经积极治疗后达到Ⅱ级可以手术。

2.1.2 合并呼吸系统疾病 长期吸烟、患慢性阻塞性肺病者手术耐受性差。因此，除行常规胸片检查外，需进行肺功能检查，正确评估肺功能情况，制定正确的治疗方案。手术前督促患者戒烟，训练床上咳嗽、咳痰和深呼吸，配合雾化吸入促使痰液排出。

2.1.3 合并糖尿病 胰岛素的绝对不足或相对不足导致糖代谢的紊乱，并可由此带来各种严重并发症，极大地增加手术风险。因此LC手术前应详细询问病史和用药史，及时了解病情。特别是部分患者术前并不知道患有糖尿病，因此手术前均应作血糖/尿糖监测，合理应用胰岛素控制血糖。

2.2 术后护理

2.2.1 常规护理 本组有9例患者在术后24 ~ 48 h出现精神异常，3例表现为嗜睡，睡眠时间延长，6例表现为躁动兴奋，与患者对手术紧张、焦虑；麻醉及老年人脑组织退行性变，大脑功能承受力降低等因素有关，因此老年患者需加强对神志变化

（下转794页）