论著

文章编号:1000-5404(2008)18-1686-04

贫铀长期摄入对大鼠肾脏损伤效应的研究

冷言冰,李 蓉,艾国平,徐 辉,粟永萍,程天民 (第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 研究贫铀摄入后不同时相点对大鼠肾脏的损伤效应。**方法** 雄性Wistar大鼠40只,其中20只以含有50 μg/L和70 μg/kg的贫铀饮水及饲料喂食大鼠作为摄入组。观察大鼠接触贫铀后3、6、12、18个月大鼠肾脏超微结构和病理形态学改变,肾功能检测和胶原染色,并采用免疫荧光和蛋白印记杂交检测肾脏不同时间段纤维化相关因子TGF-β1、Smad、TIMP和MMP-9表达。**结果** 大鼠摄入贫铀后不同时间段大鼠肾脏出现不同程度的病理改变,表现为肾小球固缩、后继肾小管萎缩和局部肾间质纤维组织增生以及炎性细胞浸润。纤维化程度随接触时间延长而加重。胶原染色显示胶原分布主要位于肾小管周围,且具有区域性。Western blot分析显示贫铀接触后大鼠肾脏中TGF-β1等纤维化相关因子蛋白含量均有不同程度的增加($P<0.05$)。**结论** 贫铀长时间暴露后大鼠肾脏可出现病理学及超微结构的改变,TGF-β1、Smad、TIMP和MMP-9均参与了其纤维化进程。

关键词: 贫铀;肾脏;纤维化;毒性
中图法分类号: R322.61;R692;R818.73 **文献标识码:** A

Toxic effects of depleted uranium on rat kidney after long-term ingestion

LENG Yan-bing, LI Rong, AI Guo-ping, XU Hui, SU Yong-ping, CHENG Tian-min (State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the toxic effects on rat kidney after long-term depleted uranium (DU) exposure. **Methods** Twenty rats of 40 Wistar male rats (35 – 55 g) were fed with water and feedstuff containing 50 μg/L or 70 μg/kg DU respectively as ingesting group, and another 20 rats served as control. The morphological changes of kidneys were observed by electron microscopy and microscopy after 3 –, 6 –, 12 –, 18 – month exposure. Fibrosis-correlated cytokines such as transforming growth factor beta 1 (TGF-β1), Smad, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) were analyzed by immunofluorescence and Western blotting. Kidney function and collagen staining were also detected. **Results** At different time points, DU exposure caused pathological changes of the kidneys including glomerulus pyknosis, tubule atrophy and regional renal interstitial fibrosis. The fibrosis aggravated with longer exposure. These cytokines and collagen distribution primarily located on periphery of nephric tubule, and seldom on glomerulus. TGF- 1, Smad, TIMP-1 and MMP-9 in kidneys all increased after DU exposure. **Conclusion** After long-term DU exposure, the rat kidneys showed morphological and ultrastructural changes at different levels. TGF-β1, Smad, TIMP-1 and MMP-9 all take part in the process of kidney fibrosis.

Key words: depleted uranium; kidney; fibrosis; toxicity

贫铀(depleted uranium,DU)是铀经浓缩提取了^{235}U以后所产生的副产品,因其^{235}U含量低于天然铀故而得名。贫铀既具有放射毒性,又具有化学毒性,由于其高传能线密度,特定组织器官蓄积以及半衰期长的特点,人员因嵌入、吸入或食入贫铀后,会对人体产生严重损害作用。损害作用与接触的剂量-时间以及接触者的年龄、性别、体质、饮食等有关[1]。肾脏是铀的主要蓄积器官以及排泄器官,机体接触铀后,进入机体的铀绝大部分进入肾脏并通过尿液排出体外,因此,肾脏在铀对机体的毒性危害中占有举足轻重的地位。因此,本研究拟通过大鼠长期较低剂量接触贫铀,检测肾脏功能,肾脏的超微结构和组织病理形态学观察,胶原

基金项目:国家自然科学基金(30500144,30670625)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30500144,30670625)
作者简介:冷言冰,男,山东省烟台市人,博士,讲师,主要从环境毒理学方面的研究,发表论文6篇,现在成都医学院公共卫生学教研室。电话:(028)68289167,E-mail:lengyanbing@tom.com
收稿日期:2007-09-14;修回日期:2008-03-07

染色,Western blot 分析以及免疫组化检测,研究贫铀对大鼠肾脏可能存在的损伤效应,以及 TGF-β1 为代表的组织纤维化相关细胞因子在肾纤维化进程中所起的作用。

1　材料与方法

1.1　DU 摄入模型的建立

雄性初断乳 Wistar 大鼠 40 只,体质量 35 ~ 55 g, 由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。摄入组 20 只,以含有 50 μg/L 和 70 μg/kg 的贫铀饮水及饲料喂食大鼠。对照组大鼠 20 只,给予正常饲料和饮水,其他条件与摄入组相同。

1.2　病理组织学与超微结构观察

在大鼠摄入贫铀 1、3、6、12、18 个月后,处死大鼠,取肾脏组织分别用多聚甲醛及 2% 戊二醛溶液固定后包埋,进行病理形态学和超微结构观察。

1.3　大鼠肾功能检测

检测大鼠血液中尿素(UREA)、肌酐(CREA)以及 Na^+、K^+、Cl^- 的浓度。

1.4　胶原染色分析

肾组织石蜡切片,苦味酸 Sirus Red 染色:切片脱蜡至水,苦味酸 Sirus Red 染液浸染,苏木精复染,盐酸酒精溶液分化,脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.5　TGF-β1、Smad、TIMP-1 和 MMP-9 的 Western blot 分析检测

剪取肾组织约 100 mg,加入组织裂解液,提取肾组织总蛋白,并进行蛋白浓度测定。SDS-PAGE 电泳,PVDF 膜半干式转印,封闭液 4 ℃浸泡过夜。分别以 1∶200 稀释的一抗、1∶500 稀释的辣根过氧化物酶标记的相应二抗孵育。DAB 显色,凝胶成像分析系统分析处理。

1.6　TGF-β1、Smad、TIMP-1 和 MMP-9 的免疫组化染色

按照博士德免疫组化试剂盒操作说明进行。

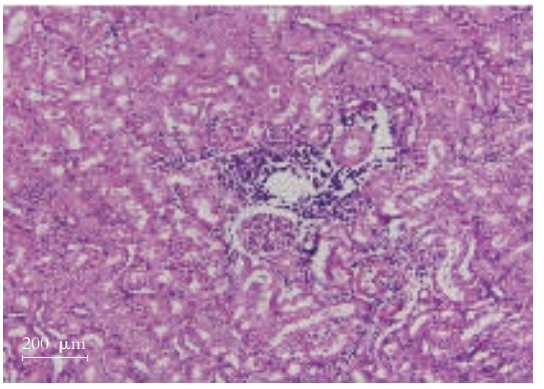
1.7　统计学处理

数据分析采用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析。

2　结果

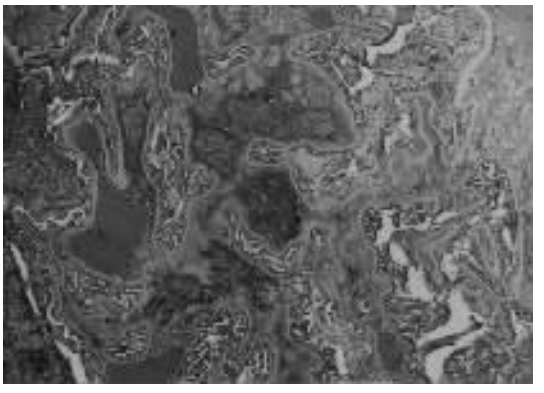
2.1　病理组织学与超微结构观察

病理组织学观察:摄入组大鼠肾脏在贫铀接触 3 个月后肾脏散在肾单位破坏,炎细胞浸润;6 个月后出现较明显的局部灶性肾小球和肾小管坏死,可见部分肾单位的代偿性肥大;12 个月后, 见点灶状肾单位坏死,肾大部未见明显异常,见图 1。18 个月后可见少量肾单位萎缩纤维化,大部分形态正常。超微结构观察: 3 个月后,大鼠肾脏可见肾小球毛细血管内皮细胞增生,管腔狭窄,甚至闭塞。基底膜局部肿胀,增厚,密度不均匀,局部基底膜皱褶明显。肾小管近端上皮细胞可见致密颗粒沉积,可见萎缩肾小管。间质纤维母细胞胞浆内可见致密颗粒沉积。见图 2。6 个月后,肾小球毛细血管袢节段性内皮细胞和足细胞坏死,有的基底膜厚薄不一,疏松肿胀,可见致密颗粒沉积,足突融合,系膜明显增生,另见毛细血管节段性闭塞硬化,球囊腔可见许多蛋白性物质。12 个月后,可见肾小球毛细血管内皮细胞增生,胞浆内有沉积颗粒,腔内可见血栓形成,管腔闭塞,甚至整条毛细血管闭塞,基底膜多增厚皱褶。足细胞内可见吞噬的致密物质。18 个月后超微结构变化与 12 个月大致相同,另可见肾小管上皮细胞内有较多致密颗粒沉积。



可见点状坏死灶,炎性细胞浸润

图 1　摄入贫铀 12 个月后肾脏的病理组织学观察　(HE ×1 000)



肾小球内毛细血管内皮细胞增生,基底膜皱折,毛细血管腔塌陷闭塞

图 2　摄入贫铀 3 个月肾脏的超微结构观察　(TEM ×2 000)

2.2　贫铀接触后各组大鼠肾脏功能的变化

贫铀接触后不同时相点大鼠肾脏功能变化见表 1。在摄入组大鼠,血液中反应大鼠肾功的 UREA 和 CREA 均有不同程度的影响,均在接触贫铀第 6 个月后有所增加,在第 12 个月恢复到正常水平。而 Na^+、K^+、Cl^- 的浓度则基本保持不变。

表 1　摄入组大鼠肾脏功能的变化(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	UREA	CREA	Na^+	K^+	Cl^-
对照组	7.7 ±0.7	34.4 ±3.6	144.4 ±1.3	6.5 ±0.2	106.0 ±1.0
摄入组 3 个月	6.9 ±0.4	25.4 ±3.6	143.2 ±1.2	6.4 ±1.5	110.0 ±1.8
6 个月	17.7 ±6.6	70.6 ±6.8	151.0 ±3.0	5.9 ±1.1	114.7 ±3.8
12 个月	6.4 ±0.4	41.2 ±5.0	141.6 ±2.5	4.9 ±0.6	102.0 ±2.5

2.3　胶原染色

对各组大鼠肾脏不同时相点石蜡切片进行胶原染色,经天狼星红染色,偏振光显微镜下可见Ⅰ型胶原显示很强的双折光性,为红色或黄色的纤维,Ⅲ型胶原显示为弱的双折光性,为绿色纤维。实验组大鼠肾脏中肾小管部分区域以及小动脉周围胶原染色呈阳性,染色强度及染色区域均高于对照组,随接触

时间的延长染色强度和染色区域均增加,且多为Ⅰ型胶原。对照组胶原染色未见明显染色阳性区域,折光强度弱,呈弥散性分布,但随大鼠年龄增加染色逐渐加深。摄入组18个月大鼠肾脏与对照组18个月比较胶原染色呈强阳性,染色区域多,折光强度高。

2.4 Western blot检测各细胞因子在肾脏中的表达

Western blot结果显示大鼠接触贫铀后肾脏中TGF-β1、Smad、TIMP-1和MMP-9的表达均有所增加,而且摄入组1、6、18个月的蛋白量高于对照组1、6、18个月的蛋白量($P<0.05$)。但实验组各个时相点间未见明显增加或减少,见表2。

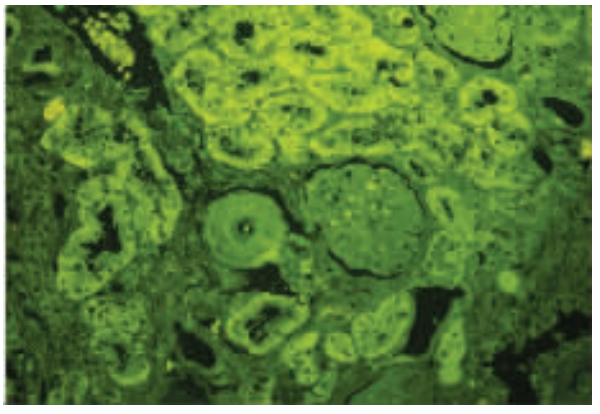
表2 两组大鼠肾脏纤维化相关细胞因子的表达 ($\mathrm{Int}\times\mathrm{mm}^2$, $n=4$, $\bar{x}\pm s$)

组别	TGF-β1	Smad	TIMP-1	MMP-9
对照组1个月	9.6±2.5	8.9±1.9	10.2±3.5	7.1±4.8
6个月	11.2±2.4	7.6±1.7	6.8±4.3	6.2±2.5
18个月	10.3±3.6	11.9±7.8	10.2±1.7	10.7±3.2
摄入组1个月	17.9±4.2[a]	21.0±3.2[a]	19.9±2.2[a]	18.5±4.4[a]
3个月	18.8±3.5	19.4±8.5	18.9±4.0	18.9±1.8
6个月	17.8±4.6[b]	22.3±7.2[b]	17.7±2.9[b]	18.4±2.5[b]
12个月	17.2±2.9	19.1±9.1	16.4±4.8	16.9±4.7
18个月	19.8±5.1[c]	24.0±6.1[c]	19.3±4.2[c]	16.1±3.7[c]

a: $P<0.05$, 与对照组1个月比较;b: $P<0.05$, 与对照组6个月比较;c: $P<0.05$, 与对照组18个月比较

2.5 免疫组化检测各细胞因子在肾脏中的表达

对TGF-β1、Smad、TIMP-1和MMP-9在肾脏组织中的表达进行DAB染色,以及SABC和FITC染色验证,发现在贫铀接触后大鼠肾脏中TGF-β1、Smad、TIMP-1和MMP-9的表达均增加,染色阳性部位主要集中于肾小管周围,且具有区域性。各个细胞因子在肾小球表达阴性或弱阳性。见图3。



肾小管及其周围组织为阳性区域

图3 摄入贫铀6个月肾脏TIMP-1免疫荧光染色 (FITC×400)

3 讨论

肾脏是铀的主要蓄积器官及排泄器官。研究表明[2],仅仅是从放射毒理学角度考虑在低剂量接触的情况下贫铀对人体产生的危害是不够的,其重金属化学毒性也应加以考虑。本研究中摄入组大鼠每日通过饮食接触长期反复接触贫铀,所以机体对贫铀的耐受性和肾脏的代偿功能可能将对贫铀引起的毒性作用产生良性作用。通过肾功能检测[3]、肾脏的病理组织学及超微结构观察可对低剂量贫铀引起的毒性损伤进行客观评价。

铀接触所造成的近曲小管损伤并没有明确的阈值,即使是低剂量的铀接触都可能造成肾脏的毒性作用[4]。本研究中反应肾功的尿素氮和肌酐以及Na^+、K^+、Cl^-的检测结果表明大鼠肾脏近曲小管的代偿功能完好。摄入组大鼠长期低剂量反复接触贫铀将导致肾脏上皮细胞耐受性的改变。摄入组大鼠在第6个月血中肌酐和尿素氮浓度达到高峰,但其后又恢复正常,这说明肾脏的耐受性提高以及代偿能力恢复。本研究中摄入组各指标的升降趋势可以验证及推测在高于本研究中染毒剂量条件下贫铀对机体的毒性作用。

肾脏的病理组织学结构可见部分肾单位发生固缩坏死,肾间质纤维组织增生,但代偿增生的肾单位则结构尚完整。这也是前面所述肾脏功能完好的物质基础。超微结构观察发现肾小球基底膜皱折,皱褶的基底膜进而与肾小球壁层上皮细胞粘连,造成细胞增生、损伤和细胞外基质成分的沉积,最终形成肾小球硬化。肾小管上皮细胞和成纤维细胞也受到不同程度的损伤。超微结构观察还显示了巨噬细胞参与了肾脏对贫铀的摄取。机体对贫铀的摄取与吞噬细胞的吞噬功能密不可分,巨噬细胞随时间延长摄入贫铀量不断增加[5]。激活的巨噬细胞能分泌不同的炎性因子[6],从而促进脏器组织的纤维化进程。前期研究中表明大鼠肾脏贫铀含量随接触时间延长而逐渐增加,胶原染色、病理组织学改变及超微结构观察也证实了贫铀对肾脏的损伤呈上升趋势。

肾小管间质纤维化(tubulointerstitial fibrosis, TIF)与肾小球疾病的长期预后及肾功能改变密切相关。胶原染色和病理诊断均发现大鼠肾纤维化的主要部位位于肾小管周围,可见肾小管损伤是TIF的主要启动因素。铀酰离子进入肾小管上皮细胞并在细胞中沉积,受外来化合物刺激后肾小管上皮细胞可产生间质蛋白和炎性因子,如趋化因子IL-8等。这些趋化因子能促进单细胞层的间质渗漏,从而释放炎性介质,刺激成纤维细胞的增殖和间质蛋白的生成。而释放的炎性介质还可促进上皮细胞转分化为成纤维细胞样细胞,从而释放更多的间质成分。本研究的超微结构观察发现肾间质纤维化的位于肾小管周围,而肾小管上皮细胞超微结构显示贫铀沉积,并可见成纤维细胞的大量聚积,说明肾小管上皮细胞在贫铀所致大鼠肾纤维化进程中具有重要致病作用。

TGF-β1能够促进间质中的成纤维细胞增殖并大量产生细胞外基质(extracellular matrix, ECM)。Smad

蛋白是TGF-β1细胞内最重要的信号转导分子。Smad蛋白激活的转录因子又可引起肾小管上皮细胞的增殖及Ⅰ型胶原的表达[7]。经Western blot分析可见贫铀暴露所致的大鼠肾脏其表达TGF-β1和Smad均增加，且两者的免疫组化染色均定位于肾小管间质发生纤维化部位。在代偿增生的肾小管附近则呈弱阳性或阴性表达。说明TGF-β1和Smad均参与了贫铀所致大鼠肾纤维化进程。

ECM降解减少、生成增多是导致肾脏纤维化的直接原因。MMPs活性越低，细胞间质聚集越多，则肾小球硬化越明显。MMPs和TIMP-1之间的调控紊乱导致的细胞基质降解减少。TIMP增加使将MMP活性受限，ECM降解减少。摄入组大鼠免疫组化染色TIMP-1与MMP-9染色部位与TGF-β1相同，蛋白含量均增加，说明MMP/TIMP-1失衡是贫铀所致肾纤维化进展的重要因素。在MMP-9和TIMP-1含量均增加的情况下，TIMP-1含量的增加在肾纤维化进程中起决定性作用。由此可见，TGF-β1、Smad、MMP-1和TIMP-1均参与了贫铀导致的大鼠肾脏纤维化进程。

参考文献：

[1] Milacic S, Petrovic D, Jovicic D, *et al*. Examination of the health status of populations from depleted-uranium-contaminated regions [J]. Environ Res, 2004, 95(1): 2-10.
[2] Ellender M, Harrison J D, Pottinger H, *et al*. Induction of osteosarcoma and acute myeloid leukaemia in CBA/H mice by the alpha-emitting nuclides, uranium-233, plutonium-239 and amercium-241 [J]. Int J Radiat Biol, 2001, 77(1): 41-52.
[3] McDiarmid M A, engelhardt S, Oliver M, *et al*. Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans: a 10-year follow-up[J]. J Toxicol Environ Health(A), 2004, 67(4): 277-296.
[4] Kurttio P, Auvinen A, Salonen L, *et al*. Renal effects of uranium in drinking water[J]. Environ Health Perspect, 2002, 110(4): 337-342.
[5] Kalinich J F, Ramakrishnan N, Villa V, *et al*. Depleted uranium-uranyl chloride induces apoptosis in mouse J774 macrophages[J] Toxicology, 2002, 179(1-2): 105-114.
[6] Driscoll K E. TNFalpha and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress[J]. Toxicol Lett, 2002, 112-113: 177-183.
[7] Hayashida T, Decaestecker M, Schnaper H W. Cross-talk between ERK MAP kinase and Smad signaling pathways enhances TGF beta dependent responses in human mesangial cells [J]. FASEB J, 2003, 17(11): 1576-1578.

（编辑 邓强庭）

文章编号：1000-5404(2008)18-1689-01

个案与短篇

不同通气方法在无痛苦纤维支气管镜诊疗技术中的应用

张 微，孙成华，冉 婷 （重庆市涪陵中心医院麻醉科，重庆 涪陵 408000）

本研究对比了纤维支气管镜（简称纤支镜）检查时3种不同通气方式，旨在探索纤支镜检查麻醉的可行之道。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择我院2007年1-9月接受纤支镜检查或治疗、ASA Ⅱ~Ⅲ级、无麻醉禁忌证患者共78例，排除吸氧后SPO_2仍低于95%、年龄>75岁者。分为3组：Ⅰ组31例，Ⅱ组24例，Ⅲ组23例。其中男性43例，女性35例，年龄(50.24±14.23)岁；纤支镜检查45例，治疗33例。术前合并有高血压17例，呼吸功能不全11例。

1.2 术前准备与麻醉

所有患者术前禁食、禁饮，术前0.5 h肌注阿托品0.5 mg，2%利多卡因咽喉部充分表面麻醉2次，开放静脉通道，持续心电监护。

3组患者麻醉方法：芬太尼1.5~2.0 μg/kg、异丙酚1.5~2.5 mg/kg静脉缓慢推注至受检者睫毛反射消失，术中予异丙酚0.1~0.2 mg·kg^{-1}·min^{-1}持续泵注，体动明显或血压升高超过基础值20%，酌情追加异丙酚10~20 mg。

1.3 通气方法

Ⅰ组：鼻导管给氧法：保留自主呼吸，鼻导管持续吸氧4 L/min。呼吸频率(RR)<10次/min或SPO_2<93%以下时暂停检查，面罩加压吸氧。

Ⅱ组：气管插管通气法：麻醉诱导后进行气管插管。

Ⅲ组：喉罩通气法：麻醉诱导后置入喉罩，纤支镜通过吸痰孔、喉罩进入气道检查。

1.4 观察指标

连续监测并记录麻醉前、后（术中5、15 min）及完全清醒时的ECG、BP、RR、HR和SPO_2，术中、术后不良反应，以及受检者的感受。

1.5 统计学方法

采用PEMS 3.1统计软件对资料进行分析，数据用$\bar{x}\pm s$表示，样本比较用单因素方差分析，两两比较用q检验。

（下转1701页）

作者简介：张 微，女，重庆市涪陵区人，主治医师，主要从事麻醉及疼痛治疗方面的研究。电话：(023)72229308，E-mail：zhangw415@163.com

收稿日期：2007-12-04；修回日期：2008-07-17