论著

文章编号:1000-5404(2013)23-2530-06

雷帕霉素对糖尿病肾病小鼠足细胞自噬的改善作用

肖堂利,孙 蕾,管 旭,杨 可,何 婷,徐新丽,黄云剑,赵景宏 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院肾内科)

[摘要] **目的** 探讨雷帕霉素(Rapamycin)对糖尿病肾病小鼠肾小球足细胞自噬和损伤的影响,以及对糖尿病肾病的改善作用,阐明糖尿病肾病可能的发生机制。**方法** 健康雄性 Balb/c 小鼠 48 只,采用完全随机设计分组法分为柠檬酸对照组($n=12$)、雷帕霉素对照组($n=12$)、链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)组(STZ 组,$n=12$)和 STZ + 雷帕霉素组($n=12$)。采用腹腔注射 STZ 制备糖尿病动物模型,成模后即给予小鼠腹腔注射雷帕霉素 2 mg/(kg·48 h),雷帕霉素注射 0、2、4、8、12 周时分别测定各组小鼠血糖和体质量,12 周时留取 24 h 尿标本,取肾脏称质量、检测 24 h 尿蛋白和肌酐,计算尿蛋白/肌酐值(UACR)和肾质量/体质量值(KW/BW)。PAS 染色观察肾组织病理改变,透射电镜观察肾小球足细胞自噬体大小和数量、细胞器损伤情况,Western blot 检测足细胞自噬标志物 LC3 蛋白的表达变化,nephrin 免疫荧光染色观察足细胞数量。**结果** 与对照组相比,STZ 组小鼠血糖、UACR、KW/BW 明显增高($P<0.05$),PAS 染色发现肾小球基膜增厚,系膜基质增多,电镜提示足细胞足突增宽、融合,足细胞和自噬体数量减少,自噬活化标志物 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ值明显下降($P<0.01$)。与 STZ 组比,雷帕霉素处理后 STZ 小鼠肾小球病理变化有所改善,足细胞和自噬体数量增多,细胞器损伤减轻,LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ值上调,UACR 和 KW/BW 下降($P<0.05$),但血糖无统计学差异。**结论** 糖尿病小鼠腹腔注射雷帕霉素可以减轻肾小球病理改变和足细胞损伤,其作用可能与促进足细胞自噬有关,而维持足细胞自噬平衡可能是延缓糖尿病肾病进展的有效措施。

[关键词] 雷帕霉素;自噬;足细胞;糖尿病肾病
[中图法分类号] R587.2; R692; R979.5 [文献标志码] A

Rapamycin attenuates podocyte autophagy in mice with diabetic nephropathy

Xiao Tangli, Sun Lei, Guan Xu, Yang Ke, He Ting, Xu Xinli, Huang Yunjian, Zhao Jinghong (Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of rapamycin on podocyte autophagy and impairment in diabetic mice, and its ameliorative role in diabetic nephropathy. **Methods** A total of 48 healthy male Balb/c mice were randomly divided into 4 groups, that is, control group treated with citric acid (Control, $n=12$), control mice treated with rapamycin (Control + R group, $n=12$), STZ group ($n=12$), streptozotocin (STZ) mice intraperitoneal injected with rapamycin group (STZ + R group, $n=12$). Diabetic animal models were induced by intraperitoneal injection of STZ into the STZ mice. After the model establishment, mice were given rapamycin at 2 mg/(kg·48 h) through intraperitoneal injection. Serum glucose and body weight of each group were measured in 0, 2, 4, 8 and 12 weeks after treatment. At the 12th week, 24-hour urinary specimens were collected to determine albumin and creatinine levels for calculation of urinary albumin/creatinine ratio (UACR), and the kidneys were taken and weighted to calculate kidney weight/body weight ratio (KW/BW). Renal pathological changes were observed by PAS staining. Size and number of podocyte autophagy and organelles injury were investigated by transmission electron microscopy (TEM). LC3 protein, a podocyte autophagy marker, were detected by Western blotting. Podocyte count was carried through nephrin immunofluorescence staining. **Results** Compared with control group, blood glucose, UACR and KW/BW in STZ group were increased significantly ($P<0.05$). PAS staining showed thickened glomerular basement membrane and increased mesangial matrix. TEM indicated podocyte foot processes were broadened and fused, and the number of podocytes and autophagosomes were decreased. LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ protein ratio was significantly decreased

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81270290);重庆市自然科学基金重点项目(CSTC2013jjB10023)
[通信作者] 赵景宏, E-mail: zhaojh@tmmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130807.1141.003.html (2013-08-07)

($P<0.01$). Compared with STZ group, the mice from STZ + R group showed ameliorated glomerular pathological changes and increase in number of podocytes and autophagosomes after rapamycin treatment, alleviated organelles damage of podocytes, raised LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ protein ratio, and decreased UACR and KW/BW ratio ($P<0.05$), but no significant difference was seen in blood glucose. **Conclusion** Inra-peritoneal injection of rapamycin ameliorates glomerular pathological changes and podocytes injury in diabetic mice, which might be through promoting podocyte autophagy. Maintenance of podocyte autophagic balance might be effective measure to postpone the progress of diabetic nephropathy.

[**Key words**] rapamycin; autophagy; podocytes; diabetic nephropathy

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81270290) and the Key Program of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2013jjB10023). Corresponding author: Zhao Jinghong, E-mail: zhaojh@tmmu.edu.cn

糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DN)是糖尿病最严重的并发症之一,是导致终末期肾病的主要原因[1-2]。大量研究发现肾小球足细胞损伤和缺失是DN发生的关键环节[3]。足细胞损伤和缺失会严重影响肾小球滤过屏障的完整性,引发蛋白尿,最终导致肾小球硬化[4]。所以,维持足细胞的功能和数量是DN救治的关键靶点。自噬是细胞清除受损物质,避免发生凋亡和坏死的重要自身保护机制[5],自噬同样也是足细胞对抗损伤和维持数量稳定的一种极其重要的保护机制[6]。已经证实足细胞自噬缺陷是导致蛋白尿和肾小球硬化的重要触发点[7],但糖尿病肾病时足细胞自噬活性的变化并未完全明确。新近研究表明,低剂量雷帕霉素可以改善糖尿病肾病,抑制足细胞凋亡[8-10],但其机制是否与调控足细胞自噬能力有关尚待阐明。本实验拟明确DN时足细胞损伤和足细胞自噬现象的变化,进一步观察雷帕霉素是否可以通过调控足细胞自噬改善DN早期病变。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

Balb/c小鼠[SCXK(京)2009-0007]购自北京华阜康生物科技股份有限公司,链尿佐菌素(streptozotocin,STZ)、LC3多克隆抗体购自美国Sigma公司,雷帕霉素购自美国LC laboratories公司,尿白蛋白、尿肌酐测定试剂盒和T-PER组织裂解液分别购自美国Exocell和Pierce公司,BCA蛋白定量试剂盒、β-actin抗体为碧云天生物技术研究所产品,Nephrin抗体为美国R&D公司产品,驴抗羊Alexa Fluor 488标记的IgG为美国invitrogen公司产品。

1.2 方法

1.2.1 制备动物模型 选取体质量为20 g左右8周龄雄性Balb/c小鼠48只,适应性喂养1周后,采取完全随机法选取24只小鼠进行STZ诱导,制备糖尿病模型。在禁食不禁水12 h后,给予连续腹腔注射55 mg/kg STZ(STZ由0.1 mol/L,pH 4.2柠檬酸缓冲液配置)5 d;24只正常对照小鼠腹腔注射等体积的柠檬酸缓冲液。STZ注射后1周尾静脉针刺取血检测空腹血糖,了解糖尿病模型制备情况,血糖≥13.8 mmol/L的小鼠确定为糖尿病模型制备成功。

1.2.2 注射雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)抑制剂雷帕霉素 在成功制备糖尿病模型的基础上,将上述正常对照小鼠和糖尿病模型小鼠分别再次分组:柠檬酸对照组(C组,$n=12$)、雷帕霉素对照组(C+R组,$n=12$)和STZ组(STZ组,$n=12$)、STZ+雷帕霉素组(STZ+R组,$n=12$)。其中C组和STZ组小鼠每48 h腹腔注射等体积柠檬酸缓冲液,C+R和STZ+R组腹腔注射2 mg/(kg·48 h)的雷帕霉素(溶解于柠檬酸缓冲液),连续注射12周。

1.2.3 标本的采集与处理 各组小鼠在雷帕霉素腹腔注射0、2、4、8、12周分别称体质量,尾静脉取血检测血糖,12周时用代谢笼收集24 h尿液,记录24 h尿量,1 400 r/min离心5 min,收集上清,尿微量蛋白和尿肌酐检测试剂盒测定尿微量蛋白和肌酐水平(具体操作按照试剂盒说明书进行),计算尿白蛋白排泄率(urinary albumin creatinine,UACR)。12周时用2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠,颈椎离断处死后取肾脏,置冰台上去除被膜,滤纸吸干血迹后称质量。部分小鼠肾脏处理如下:取少量左肾上极皮质固定于预冷的2.5%戊二醛中,用于电镜检测;其余肾脏纵向切开,1/4置于10%中性福尔马林中固定,然后进行PAS染色,另外1/4肾脏进行冰冻切片。部分小鼠肾脏用于分离肾小球。

1.2.4 肾脏组织PAS染色 将固定好的肾脏标本进行脱水、透明、包埋、切片、PAS染色后光镜下观察肾小球病理变化。并从各组肾组织中选取30个肾小球,用Image J软件定量分析PAS-阳性区系膜基质面积(μm^2)。

1.2.5 透射电镜观察足细胞情况 肾皮质取材后立即浸入预冷的2.5%戊二醛,在固定液中将组织切成约1 mm^3大小,固定完成后进行脱水、包埋、固化、切片、染色,在透射电镜下观察足细胞足突和细胞器情况,计数每10个同等放大倍数电镜视野下足细胞自噬体数量。

1.2.6 Western blot分析 LC3(Light chain 3)是公认的自噬体标记蛋白。LC3有两种形式:LC3-Ⅰ和LC3-Ⅱ,未发生自噬时,细胞内合成的LC3经过加工,成为胞质溶性Ⅰ型LC3,常规表达。当自体吞噬发生时,Ⅰ型LC3经泛素样加工修饰过程,形成Ⅱ型LC3。LC3-Ⅱ结合并始终位于胞内自噬体膜上,其含量与自噬泡数量成正比,因此常用LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ值估计自噬水平的高低。

特异性敲除小鼠足细胞自噬基因,分离肾小球进行West-

ern blot分析发现肾小球Atg5完全缺乏、LC3-Ⅰ蛋白聚积,因此认为肾小球高水平的自噬来源于足细胞[6]。因此,本实验用分离肾小球进行Western blot检测来代表足细胞自噬蛋白LC3的表达变化。

肾皮质剪碎后在70目不锈钢筛网上研磨,预冷生理盐水冲洗,再依次经100、200目不锈钢筛网过滤,网上收集肾小球,然后用生理盐水冲洗,4 ℃、2 000 r/min离心10 min,所得沉淀物经光镜观察确定95%以上为肾小球。加入T-PER裂解液,混匀后冰上静置15 min,4 ℃、12 000 r/min离心15 min,取上清为组织总蛋白。BCA法进行蛋白定量。总蛋白上样50 μg,聚丙烯酰胺凝胶电泳后转印至0.22 μm PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭1 h,加入用5%脱脂奶粉稀释的LC3(1∶1 000)及标准内参β-actin(1∶1 000),4 ℃孵育过夜。一抗孵育后用TBST洗膜,15 min×3次,再用5%脱脂奶粉稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体(1∶2 000)、羊抗兔抗体(1∶1 000),37 ℃孵育1 h;TBST洗膜15 min×3次,洗膜后加ECL试剂,于Bio-Rad ChemiDoc MP多功能成像系统显影,用该系统软件对Western blot条带进行定量分析,读取灰度值,目的蛋白条带的灰度值除以内参条带的灰度值作为最终结果进行统计分析。

1.2.7 免疫荧光染色 肾组织包埋后冰冻切片,厚度7 μm。切片晾干后用4%多聚甲醛固定15 min。0.1 mol/L甘氨酸(PBS配制)洗涤15 min×3次,再PBS洗涤5 min,0.5% Triton X-100作用5 min,PBS洗涤5 min。10%马血清室温封闭1 h,加入用封闭液稀释的一抗nephrin(1∶20)置于湿盒内4 ℃孵育过夜。一抗孵育后用含0.02% Triton X-100的PBS洗涤15 min×3次,加入驴抗羊Alexa Fluor 488标记的IgG(1∶500),室温避光孵育30 min,用含0.02% Triton X-100的PBS洗涤10 min×3次,洗涤后加入DAPI封片。在激光共聚焦显微镜下观察足细胞nephrin表达情况。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 16.0统计软件进行单因素方差分析,多重比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验。

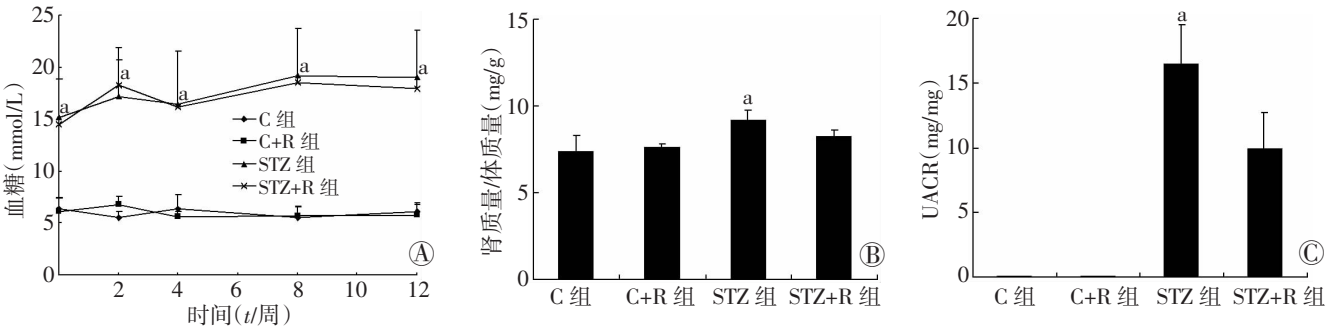
2 结果

2.1 雷帕霉素对STZ小鼠血糖、KW/BW、UACR的影响

成模后STZ组小鼠逐渐出现多食、多饮、多尿、精神萎靡、反应迟钝、毛发稀疏无光泽等。与C组和C+R组小鼠比较,STZ组和STZ+R组小鼠血糖在各时相点均明显上升($P<0.01$,图1A),但2组之间无显著性差异;STZ组小鼠KW/BW值明显比C组和C+R组小鼠高($P<0.05$),给予雷帕霉素处理后,其比值降低($P<0.05$,图1B);与C组和C+R比较,STZ组UACR明显增高($P<0.01$),给予雷帕霉素处理后,UACR降低($P<0.01$,图1C)。表明雷帕霉素腹腔注射可以显著降低糖尿病小鼠尿蛋白排泄,提示雷帕霉素对肾小球滤过膜损伤有改善作用,并且不通过调节血糖实现。

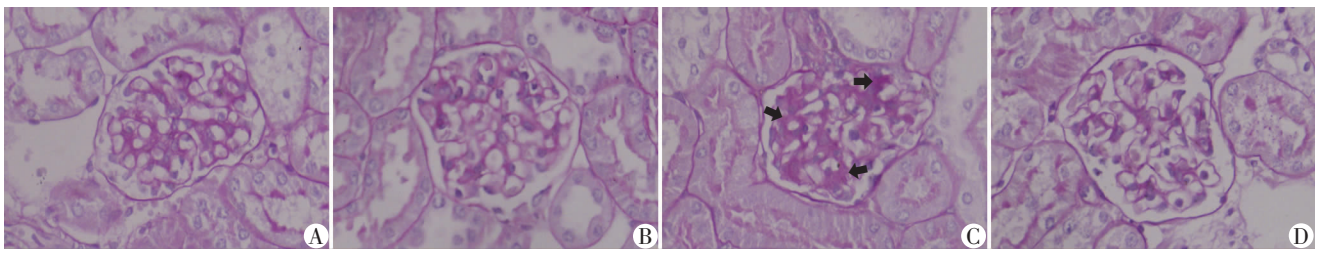
2.2 肾脏组织PAS染色

在光镜下观察,STZ组小鼠肾小球系膜基质[(1160.3±155.5)μm²]较C组[(340.2±46.8)μm²]及C+R组[(341.1±42.5)μm²]明显增多($P<0.05$),STZ+R组[(719.3±63.8)μm²]较STZ组明显减少($P<0.05$,图2),提示腹腔注射雷帕霉素可改善糖尿病小鼠肾脏的病理损伤。



A:血糖情况 a:$P<0.01$,与C组和C+R组比较;B:肾质量/体质量 a:$P<0.05$,与C组、C+R组及STZ组比较;C:尿白蛋白排泄率 a:$P<0.01$,与C组、C+R组及STZ组比较

图1 各组小鼠血糖、肾质量/体质量、尿白蛋白排泄率情况比较



A:C组;B:C+R组;C:STZ组(箭头示系膜基质);D:STZ+R组

图2 PAS染色观察各组小鼠肾组织病理学变化 (×400)

2.3 透射电镜观察足细胞情况

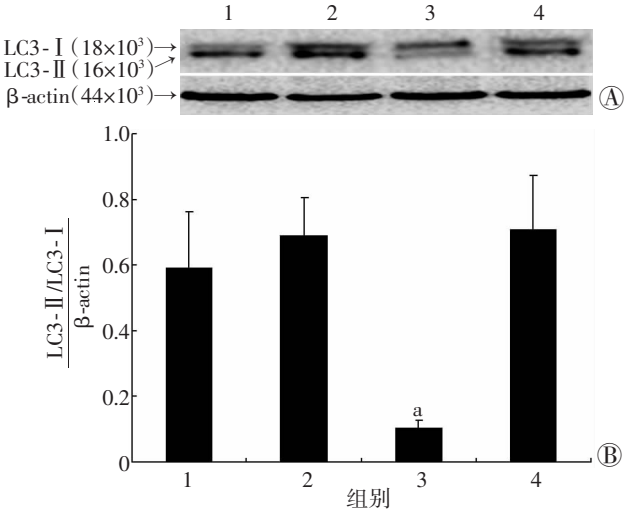
在透射电镜下观察肾小球足细胞,可见 C 组和 C + R 组足突正常,STZ 组足突明显融合,STZ + R 组较 STZ 组足突融合明显减轻(图 3);C 组和 C + R 组足细胞内每电镜视野下自噬体数量分别为(2.20 ± 1.08)、(2.20 ± 0.86)个,线粒体和内质网结构正常,STZ 组足细胞内自噬体明显减少,为(0.60 ± 0.83)个,内质网明显异常,呈空泡样变化;STZ + R 组自噬体数量较 STZ 组增多,为(1.40 ± 0.63)个,内质网损伤有所减轻(图 4、5)。表明雷帕霉素腹腔注射可以改善糖尿病小鼠肾小球足细胞损伤和自噬水平。

2.4 Western blot 检测足细胞 LC3 表达变化

Western blot 检测显示,与 C 组和 C + R 组相比,STZ 组 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ值明显降低,说明自噬体形成受到抑制;而 STZ + R 组与 STZ 组比较,LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ值明显上升($P < 0.01$,图 6),提示自噬体形成增多。表明雷帕霉素腹腔注射可以显著提高糖尿病小鼠肾小球足细胞的自噬水平。

2.5 nephrin 免疫荧光染色观察足细胞数量

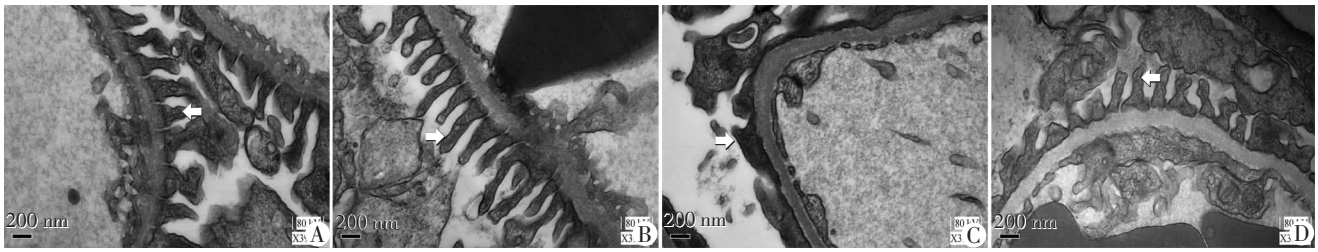
在激光共聚焦显微镜下观察(图 7),可见 STZ 组足细胞标志物 nephrin 表达明显比 C 组和 C + R 组弱,说明糖尿病肾病时足细胞数量减少;STZ + R 组与 STZ 组相比,其 nephrin 表达上调,证明雷帕霉素腹腔注射可以在一定程度上改善糖尿病肾病时足细胞的减少和缺失。



1:C 组;2:C + R 组;3:STZ 组;4:STZ + R 组

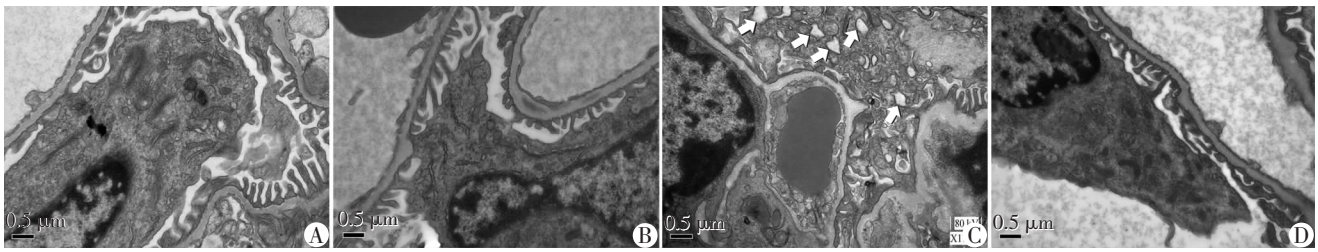
A:Western blot 检测;B:LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ值分析 a:$P < 0.01$,与 C 组、C + R 组及 STZ + R 组比较

图 6 Western blot 检测各组小鼠肾小球足细胞 LC3 的表达变化



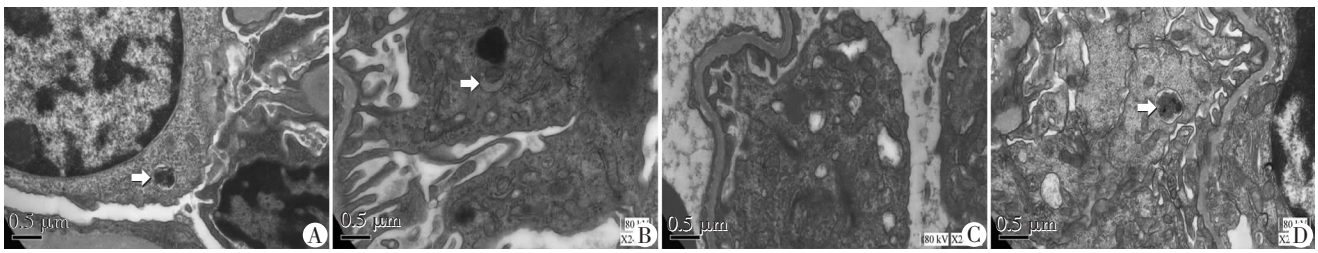
A:C 组;B:C + R 组;C:STZ 组;D:STZ + R 组;箭头示足细胞足突

图 3 透射电镜观察各组小鼠肾小球足细胞足突情况



A:C 组;B:C + R 组;C:STZ 组(箭头示足细胞内损伤的内质网,呈空泡样改变);D:STZ + R 组

图 4 透射电镜观察各组小鼠肾小球足细胞细胞器情况



A:C 组;B:C + R 组;C:STZ 组;D:STZ + R 组;箭头示足细胞内的自噬体

图 5 透射电镜观察各组小鼠肾小球足细胞自噬体

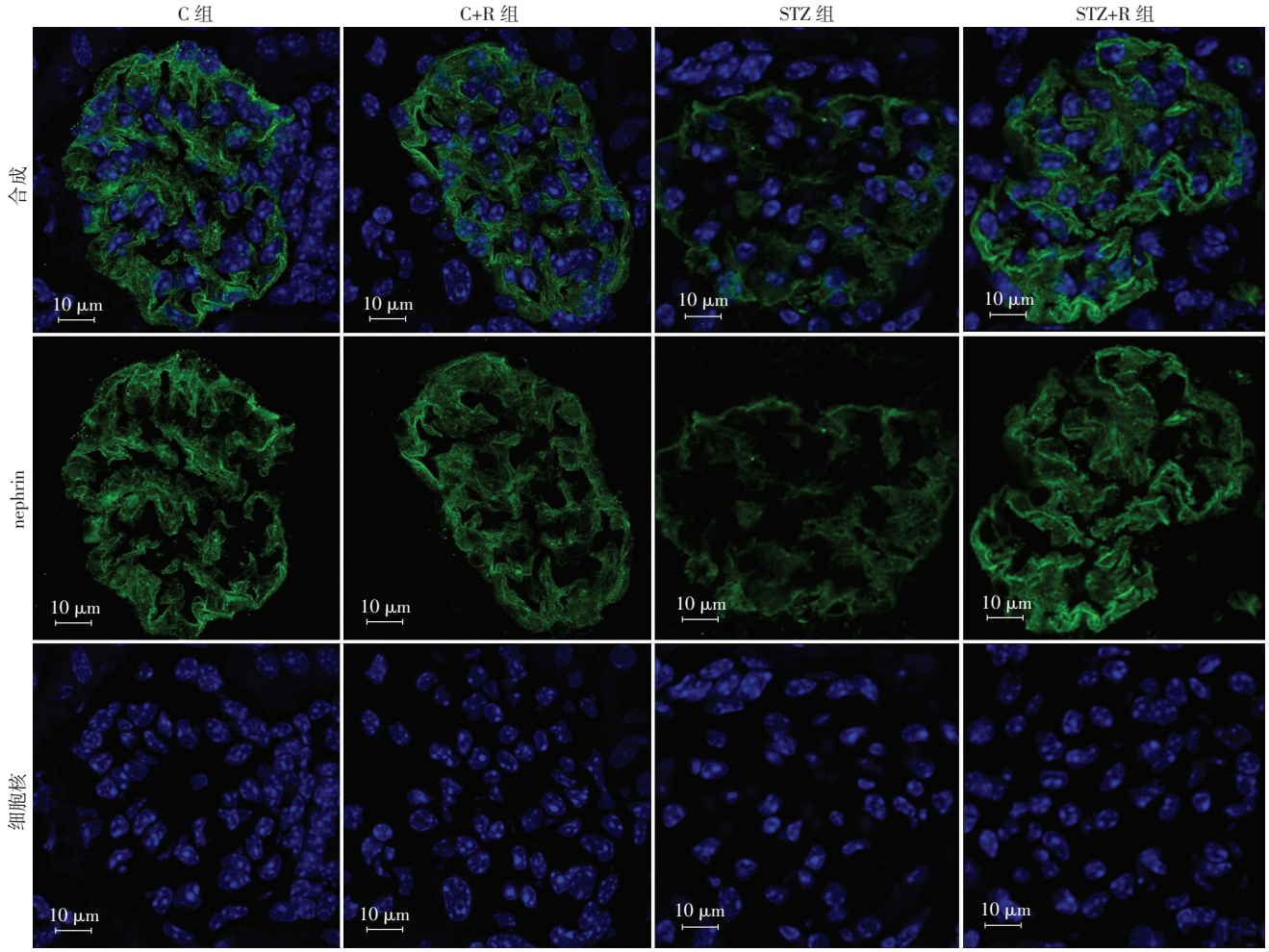


图7 各组小鼠肾组织 nephrin 免疫荧光染色

3 讨论

DN 病理机制复杂，一旦发生持续性的蛋白尿，往往无法逆转，并最终发展成为终末期肾功能衰竭。目前很多研究表明，足细胞对维持滤过屏障有着非常重要的作用，足细胞损伤和缺失与 DN 蛋白尿的产生、进展以及肾小球硬化密切相关[4]。足细胞再生能力非常有限，糖尿病等应激因素往往会导致细胞内受损的蛋白和细胞器积聚，产生细胞毒性，若不能及时清除就会诱发细胞凋亡或坏死，引起不可逆性的足细胞损伤和缺失。但在 DN 发展进程中，足细胞损伤的发生机制并未完全明确。

近年研究发现，自噬能够通过细胞内的溶酶体有效清除这些物质，受损物质首先在细胞质内被包裹形成自噬体，之后溶酶体会与自噬体融合并降解自噬体内的成分，降解产物送至细胞质再利用。所以，自噬对维持细胞内环境稳态和细胞生存至关重要[11]。在一些疾病动物模型中，自噬是心脏、肾脏、神经系统等器官的重要保护机制[12-13]。正常情况下足细胞具有较高的自噬活性，足细胞自噬缺陷小鼠在高龄时会出现明显的足突融合、蛋白尿和肾小球硬化，注射腺嘌呤或阿霉素可以快速诱导这种小鼠出现蛋白尿和肾小球硬化[6]。这说明足细胞自噬缺陷是导致蛋白尿和肾小球硬化的重要触发点。

mTOR 是细胞自噬的负调控因子，其活化可以抑制自噬体形成，许多因素对自噬的影响都与 mTOR 的活性变化有关[14-15]。雷帕霉素是大家熟知的免疫抑制药，也是 mTOR 信号通路特异性的负调控因子。新近研究表明低剂量雷帕霉素可以改善糖尿病肾病，那么其机制是否与维持足细胞自噬能力有关尚待明确。

本研究在制备Ⅰ型糖尿病小鼠模型的基础上，首先明确 DN 进展过程中足细胞损伤、凋亡和自噬情况，然后观察低剂量雷帕霉素腹腔注射是否可以通过调控足细胞自噬改善 DN 进展，从而进一步揭示 DN 的发病机制。本研究结果表明，55 mg/kg STZ 腹腔连续注射 5 d 可以成功制备糖尿病小鼠动物模型，小鼠血糖一直维持在较高水平，12 周时小鼠 UACR 明显增高，PAS 染色提示早期糖尿病肾病病理改变。电镜检测发现 STZ 小鼠足细胞出现明显的足突增宽、融合，基膜增厚，线粒体扩张，内质网呈空泡样变，自噬体数量较

正常小鼠明显减少,标志自噬体形成的LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ值显著降低,免疫荧光检测亦发现STZ小鼠足细胞数量有所减少。这说明在DN进展过程中,足细胞出现了明显的损伤和凋亡,其机制可能与足细胞自噬受到抑制有关。而给予雷帕霉素处理后,肾小球和足细胞的上述病变明显减轻,足细胞自噬体数量增加,Western blot结果也显示自噬标志物LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ值明显增高,足细胞数量也较STZ组增多,并且肾小球病变减轻,UACR显著降低。提示雷帕霉素腹腔注射可以提高足细胞自噬水平,减轻足细胞损伤和缺失,并改善肾脏损害。

综上所述,低剂量雷帕霉素腹腔注射可以通过促进糖尿病小鼠足细胞自噬减轻足细胞损伤,维持一定的足细胞数量和肾小球滤过膜的完整性,从而减少尿蛋白的丢失,延缓糖尿病肾病进展。

参考文献:

[1] Lasaridis A N, Sarafidis P A. Diabetic nephropathy and antihypertensive treatment: what are the lessons from clinical trials? [J]. Am J Hypertens, 2003, 16(8): 689-697.
[2] Molitch M E, DeFronzo R A, Franz M J, *et al*. Nephropathy in diabetes[J]. Diabetes Care, 2004, 27(Suppl 1): S79-S83.
[3] Stitt-Cavanagh E, MacLeod L, Kennedy C. The podocyte in diabetic kidney disease [J]. ScientificWorldJournal, 2009, 9: 1127-1139.
[4] Ziyadeh F N, Wolf G. Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy[J]. Curr Diabetes Rev, 2008, 4(1): 39-45.
[5] Meijer A J, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(12): 2445-2462.
[6] Hartleben B, Godel M, Meyer-Schwesinger C, *et al*. Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice[J]. J Clin Invest, 2010, 120(4): 1084-1096.
[7] Tanaka Y, Kume S, Kitada M, *et al*. Autophagy as a therapeutic target in diabetic nephropathy[J]. Exp Diabetes Res, 2012, 2012: 628978.
[8] Mori H, Inoki K, Masutani K, *et al*. The mTOR pathway is highly activated in diabetic nephropathy and rapamycin has a strong therapeutic potential[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 384(4): 471-475.
[9] Yang Y, Wang J, Qin L, *et al*. Rapamycin prevents early steps of the development of diabetic nephropathy in rats[J]. Am J Nephrol, 2007, 27(5): 495-502.
[10] Lloberas N, Cruzado J M, Franquesa M, *et al*. Mammalian target of rapamycin pathway blockade slows progression of diabetic kidney disease in rats[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(5): 1395-1404.
[11] Rubinsztein D C, Marino G, Kroemer G. Autophagy and aging[J]. Cell, 2011, 146(5): 682-695.
[12] Mizushima N, Levine B, Cuervo A M, *et al*. Autophagy fights disease through cellular self-digestion[J]. Nature, 2008, 451(7182): 1069-1075.
[13] Madeo F, Tavernarakis N, Kroemer G. Can autophagy promote longevity? [J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(9): 842-846.
[14] Korolchuk V I, Saiki S, Lichtenberg M, *et al*. Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(4): 453-460.
[15] Pous C, Codogno P. Lysosome positioning coordinates mTORC1 activity and autophagy[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(4): 342-344.

(**收稿**:2013-06-19;**修回**:2013-07-22)
(编辑 龙 亮)

(上接2529页)

金属丝与颈管相连,剪断颈管内金属头,至膀胱取出环,顺利,微乔线缝合切口,术后予保留尿管,术后4 d带尿管出院,半月后返院取出尿管,小便正常,随访患者目前无不适,尿路刺激症状消失。

2 讨论

放置IUD最严重的并发症之一是IUD异位于子宫外,发生率为(0.05~1.3)/1 000[1],宫内节育器异位腹腔并不少见,节育环异位入膀胱也有报道[2-3]。子宫穿孔是节育环较严重的并发症,宫内节育器外移多位于腹腔内、阔韧带内或子宫直肠陷窝区,而节育器外移到膀胱内并结石实属少见,分析原因可能有以下几点:①患者在置环时可能未排空膀胱,膀胱充盈时可凸向盆腔甚至腹腔,故在上环时易导致膀胱损伤。②节育环偏大或子宫软,本患者为引产后安环,不排除颈管未完全修复,而导致环至薄弱处穿出。③操作者技术不熟练及经验不足,用力不当,对子宫位置未查清楚,而将节育器直接穿入膀胱内。④IUD下移,变形,质量不佳而断裂,"V"型环一端穿透宫颈管。⑤断端锐利部分容易嵌入肌层,当节育环入膀胱后长时间炎症刺激,结石便以节育环部位为中心呈同心圆逐层生长,膀胱结石的产生和炎症反应长期存在会导致下尿路刺激症状的出现。

膀胱内节育器异位诊断一般情况下并不困难,通过盆腔X线平片[4]、膀胱B超及膀胱镜检查便能明确诊断。本例患者未能充分分析节育环异位的各种可能性,相关检查欠缺,术中发现环异位膀胱。笔者认为可以有以下教训吸取:①熟练掌握安环技能;②当患者常规取环未能取出,B超提示节育环嵌顿,膀胱B超提示结石或患者既往有结石病史,平素有尿路刺激症状,应考虑节育环异位膀胱可能,不能仅考虑膀胱的原发结石,要进一步行相关检查;③一定要详细询问患者既往史,并完善相关检查,明确结石产生的原因,行膀胱镜检查,以明确诊断,也可在膀胱镜下取环。

本例患者上环10年,因"膀胱结石"反复治疗多次,均未能取出结石,给患者身心造成痛苦。实践证明,上环手术虽小,但对患者影响较大,医疗诊治过程中也常因安取环问题引起医疗纠纷,所以,应提高认识,改进医疗技术,避免节育手术并发症的发生,疾病诊治时,应当全面考虑,慎重处置。

参考文献:

[1] 杨婷. 宫内节育器异位的诊治研究[J]. 中国现代医生, 2008, 46(14): 37-38.
[2] 张鲲,闫明. 宫内节育环异位致膀胱结石2例诊治体会[J]. 中国医学工程, 2011, 19(3): 178, 181.
[3] 廖春招. 节育环膀胱内异位并结石1例报告[J]. 现代医药卫生, 2012, 28(3): 480.
[4] Dar L A, Khan P S, Mushtaque M. Giant calculus formation after migration of an intrauterine device into the urinary bladder[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2011, 113(3): 243.

(**收稿**:2013-07-04;**修回**:2013-10-10)
(编辑 吴培红)