碘普罗胺对大鼠肾小球脏层上皮细胞的影响

于凤侠[1],汪立杰[2],林树无[1],李子龙[3] (1. 沈阳医学院附属第二医院肾内科,辽宁 沈阳 110000;2. 中国医科大学第四附属医院心血管科,辽宁 沈阳 110000;3. 中国医科大学第一附属医院肾内科,辽宁 沈阳 110000)

[摘 要] **目的** 探讨碘普罗胺诱导的大鼠对比剂肾病(CIN)发生的机制。**方法** 24 只雌性 SD 大鼠随机分为正常对照组和对比剂肾病组(CIN 组),各 12 只。CIN 组采用尾静脉注射碘普罗胺的方法建立大鼠 CIN 模型;对照组尾静脉注射等量溶剂。所有大鼠均在注射后 24 h 处死。采用全自动生化分析仪测定 24 h 尿蛋白排泄量,免疫组化法测定肾小球上皮细胞细胞周期调控蛋白 P21、P27、TGF-β1 的阳性表达率,并用半定量评分法对各组大鼠的肾小球与肾小管间质的病理改变进行计量分析。应用 TUNEL 检测肾小球上皮细胞凋亡情况。**结果** 与对照组相比,CIN 组大鼠肾小球上皮细胞 P21、P27、TGF-β1 的阳性表达率显著增高,P21[(12.86 ± 0.98) % vs (0.46 ± 0.21) %, $P = 0.004\ 5$],P27[(21.76 ± 2.75) % vs (9.57 ± 1.86) %, $P = 0.007\ 1$]和 TGF-β1[(12.85 ± 5.54) % vs (7.63 ± 0.84) %, $P = 0.003\ 7$)];CIN 组 24 h 尿蛋白显著性增加[(23.44 ± 5.22) mg/d vs (2.13 ± 0.52) mg/d, $P = 0.007\ 0$];CIN 组大鼠肾小球上皮细胞的病理损害更加严重和凋亡率明显增高[(52.5 ± 6.4) % vs (4.2 ± 0.3) %, $P = 0.007\ 5$)],差异均有统计学意义。病理积分与 24 h 尿蛋白排泄量及 P21,P27 和 TGF-β1 的表达量呈正相关($r = 0.765$、0.701、0.842、0.651, $P < 0.01$)。**结论** 碘普罗胺可通过上调肾小球上皮细胞的 P27、TGF-β1 的表达及尿蛋白的排泄量,加重肾小球上皮细胞的病理损害及凋亡。

[关键词] 对比剂肾病;碘普罗胺;肾小球上皮细胞

[中图分类号] R322.6 +1;R361 +.3 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2016)02-0083-04

doi:10.11659/jjssx.10E015118

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81170703)

[通信作者] 于凤侠,E-mail:zhouqingshan479@163.com

[收稿日期] 2015-10-10 [修回日期] 2015-12-11

在 120 mL·kg^{-1}·min^{-1}以上。⑤大鼠存活率较高、模型重复性好。该实验动物存活率为 90%,血液指标变化显著,脏器病理显示损伤确切,因此存活率较高、重复性较好。

本实验成功建立了大鼠 CPB 脏器损伤模型,且通过大量图片展示建立体外循环的方法及过程,希望今后简化准备过程、降低操作难度,为开展更深入的研究奠定基础。

[参考文献]

[1] Gibbon JH Jr. Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery[J]. Minn Med,1954,37(3):171 - 185.

[2] Zhu B. Cardiopulmonary bypass models in rats:problems and perspectives[J]. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao,2012,34(6):629 - 632.

[3] Bennett M,Dent CL,Ma Q,et al. Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery:a prospective study[J]. Clin J Am Soc Nephrol,2008,3(3):665 - 673.

[4] Sánchez-Véliz R,Carmona MJ,Otsuki DA,et al. Impact of cardiopulmonary bypass on respiratory mucociliary function in an experimental porcine model[J]. PLoS One,2015,10(8):e0135564.

[5] Opfermann P,Derhaschnig U,Felli A,et al. A pilot study on reparixin,a CXCR1/2 antagonist,to assess safety and efficacy in attenuating ischaemia-reperfusion injury and inflammation after on-pump coronary artery bypass graft surgery[J]. Clin Exp Immunol,2015,180(1):131 - 142.

[6] Liguori GR,Kanas AF,Moreira LF. Managing the inflammatory response after cardiopulmonary bypass:review of the studies in animal models[J]. Rev Bras Cir Cardiovasc,2014,29(1):93 - 102.

[7] 陈劲进,肖颖彬,陈柏成,等. 395 例体外循环下冠状动脉旁路移植术临床分析[J]. 局解手术学杂志,2014,23(2):168 - 169.

[8] 姚俊红,陈劲进,孙国林,等. Bentall 手术和分叉支架植入术治疗 Stanford A 型夹层动脉瘤[J]. 局解手术学杂志,2014,23(4):385 - 387.

[9] Popovic P,Horecky J,Popovic VP. Instrumental responses in rats after hypothermic cardiopulmonary by-pass[J]. Proc Soc Exp Biol Med,1967,126(1):225 - 228.

[10] Jungwirth B,Lange F. Animal models of cardiopulmonary bypass:development,applications,and impact[J]. Semin Cardiothorac Vasc Anesth,2010,14(2):136 - 140.

[11] Gourlay T,Modine T. The influence of cannulation technique on blood flow to the brain in rats undergoing cardiopulmonary bypass:a cautionary "tail"[J]. Artif Organs,2010,34(6):498 - 503.

[12] Samarska IV,Henning RH,Buikema H,et al. Troubleshooting the rat model of cardiopulmonary bypass:effects of avoiding blood transfusion on long-term survival,inflammation and organ damage[J]. J Pharmacol Toxicol Methods,2013,67(2):82 - 90.

[13] Kim WG,Choi SH,Kim JH. Temperature control using a heat exchanger of a cardioplegic system in cardiopulmonary bypass model for rats[J]. Artif Organs,2008,32(12):993 - 998.

[14] Lebreton G,Tamion F,Bessou JP,et al. Cardiopulmonary bypass model in the rat:a new minimal invasive model with a low flow volume[J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg,2012,14(5):642 - 644.

(编辑:左艳芳)

Effect of iopromide on glomerular visceral epithelium cells

YU Feng-xia[1], WANG Li-jie[2], LIN Shu-wu[1], LI Zi-long[3] (1. Department of Nephrology, the Second Affiliated Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang Liaoning 110000, China; 2. Department of Cardiovascular, the Forth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang Liaoning 110000, China; 3. Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang Liaoning 110000, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of contrast-induced nephropathy (CIN) caused by Iopromide. **Methods** Two-four female SD rats were randomly divided into two groups which were control group and CIN group. The rats in CIN group were injected Iopromide via caudal vein, the rats in control group were injected the equal amount of solvent. After 24 hours, all the rats were euthanized and tested. The excretion of 24 h urinary protein was detected using biochemistry assay. The expression of related cell cycle regulatory protein such as P21, P27 and TGF-β1 in glomerular visceral epithelium cells were measured using immunohistochemical technique. A semiquantitative score was used to evaluate the injure degree of glomerular and tubulointerstitium. Renal glomerular cell apoptosis was evaluated by TUNEL. **Results** Compared with control group, CIN group rat glomerular epithelial cells of P21, P27 and TGF beta 1 positive expression rate significantly increased, [(12.86 ± 0.98) % vs (0.46 ± 0.21)%, $P = 0.004\ 5$], [(21.76 ± 2.75)% vs (9.57 ± 1.86)%, $P = 0.007\ 1$], [(12.85 ± 5.54) vs (7.63 ± 0.84), $P = 0.003\ 7$)] respectively, 24 h urine protein significantly increase [(23.44 ± 5.22) mg/d vs (2.13 ± 0.52) mg/d, $P = 0.007\ 0$], CIN pathological damage of rat glomerular epithelial cells and apoptotic rate significantly more serious [(52.5 ± 6.4)% vs (4.2 ± 0.3) %, $P = 0.007\ 5$]. In addition, the renal pathologic scores were positively correlated with the excretion of 24hr urinary protein and the expression of P21, P27, and TGF-β1 ($r = 0.765, 0.701, 0.842, 0.651$, $P < 0.01$). **Conclusion** Iodine amine via increased glomerular epithelial cells P27 and TGF-beta 1expression and urinary protein excretion, aggravating pathological damage and apoptosis.

Keywords: contrast-induced nephropathy iopromide; iopromide; glomerular visceral epithelium cells

对比剂肾病(contrast-induced nephropathy, CIN)在医院内获得性急性肾功能衰竭的病因中,居第 3 位,其发病率在糖尿病伴有慢性肾功能不全的患者人群中高达 50%[1]。对于 CIN 患者,其再入院率和死亡率显著增加,且目前尚缺乏明确有效的预防和治疗手段。因此,对于 CIN 的发病机制和防治方法的研究正受到医学界广泛的关注。碘普罗胺是一种低渗非离子型造影剂,近年临床研究发现高剂量的碘普罗胺能够对患者的肾功能造成一定的影响,而肾小球上皮细胞参与该发病过程,体外实验证实一定剂量的低渗对比剂可以诱导近端小管上皮细胞出现不同程度的细胞凋亡,且存在剂量依赖性[2-3],高浓度的对比剂保持较高的黏滞度增加了肾小管内液体的黏度,导致肾间质压力增高,降低肾皮质血流量及肾小球率过滤,最终增加了 CIN 的发生率。Yokomaku 等[4]于 2008 年首次成功复制了 CIN 动物模型,是迄今为止最为成功和准确的 CIN 动物模型,也是目前研究 CIN 的主要模型。目前碘普罗胺造成 CIN 的发病机制尚未完全阐明,本研究拟通过建立 CIN 模型来探讨碘普罗胺对于肾小球上皮细胞的影响,旨在进一步揭示 CIN 的发病机理,以期为临床防治 CIN 提供一些新的思路和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 级雌性 SD 大鼠 12 只,购自沈阳医学院实验动物中心[许可证号:SCXK(辽) 20100001]。P21、P27、TGF-β1 免疫组化检测试剂盒,购自武汉博士德生物工程有限公司。TUNEL 染色细胞凋亡试剂盒,购自美国 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠对比剂肾病模型的建立 SPF 级雌性 SD 大鼠 12 只,按照文献[4]的方法建立大鼠 CIN 模型,大鼠进行适应性饲养 7 d 后,实验第 1 天 2 组大鼠采用戊巴比妥麻醉后,采血 2 mL 备用,CIN 组经尾静脉注射 12 mL/kg 碘普罗胺注射液。对照组大鼠采用尾静脉注射等量生理盐水。根据注射碘普罗胺 48 h 或 72 h 后血肌酐(Scr)较基础值升高 25% 定义为建模成功。

1.2.2 标本收集 收集各组大鼠注射 24 h 后的尿液用于尿蛋白定量检测。注射碘普罗胺后 72 h 处死大鼠。打开大鼠的腹腔,剥离肾包膜,然后分别从肾盂部分离和剪断双侧输尿管,收集大鼠的双侧肾组织以待实验室检测。

1.2.3 肾常规病理检查 大鼠肾组织行石蜡包埋,切片,常规 HE 染色,然后参照文献[5]的方法,每个标本分别选取肾小囊、肾小体、近曲小管、远曲小管、肾间质 5 个部位进行观察和计数。每个部位随机观察和计数 5 个区域,计数其坏死细胞和淤血区域的百分率,并取其平均值。对肾小球上皮细胞坏死率和肾髓质淤血率进行评分。

1.2.4　免疫组化检测 P21、P27、TGF-β1 蛋白的表达　采用手工免疫染色的方法[6]。石蜡组织切片，常规脱蜡和水化。浸入 3% 的盐酸/甲醇/过氧化氢溶液 30 min，洗涤，微波抗原修复 10 min，加入牛血清白蛋白封闭 30 min，洗涤，依次加入一抗，二抗，孵育 30 min 后，用 DAB 显色 30 ~ 45 s，树胶封片。用 PBS 代替一抗作阴性对照，已知阳性片作阳性对照。每张切片选取 5 个高倍视野，计数其阳性细胞百分率，并取其平均值。

1.2.5　TUNEL 染色检测肾小球上皮细胞凋亡　按照试剂盒说明书提供的方法进行检测。肾组织病理切片常规脱蜡，蛋白酶 K 室温孵育 30 min，平衡液室温孵育 10 min。加入 100 μl 脱氧核糖核苷酸末端转移酶，在 37 ℃温箱中孵育 60 min。加入过氧化氢终止反应，然后加入 Streptavidin HRP，室温孵育 30 min。DAB 显色 30 ~ 45 s，凋亡细胞核为黄褐色。计算肾小球上皮细胞凋亡率（凋亡阳性细胞数/总细胞数 ×100%）。

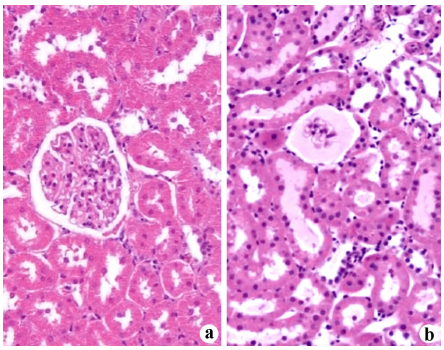
1.3　统计学分析

采用 SPSS 12.0 统计软件进行统计学处理。所有资料均采用平均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，2 组资料间采用 One-Way ANOVA 分析；对有相关趋势的变量采用 Pearson 相关分析；$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　形态学观察

光镜观察结果显示，对照组的大鼠肾小球球囊结构完整，肾小管结构清晰，肾间质无炎性细胞浸润（图 1a）。而 CIN 组大鼠肾小球上皮细胞肿胀脱落，形成大量的腔隙（图 1b 黑色箭头所示），肾小球球囊结构明显破坏（图 1b 黄色箭头所示），肾小球体积明显缩小（图 1b）。



a：对照组；b：CIN 组

图 1　2 组大鼠肾组织病理变化（HE ×400）

2.2　2 组大鼠 24 h 尿蛋白的排泄量

实验前，2 组大鼠尿排泄量无明显差别，而 CIN 组实验后大鼠 24 h 尿蛋白排泄较对照组和实验前均明显增高，差异有统计学意义（$P = 0.007$、0.005），见表 1。

表 1　2 组大鼠实验前及实验后 24 h 尿蛋白定量（$\bar{x} \pm s$，mg/d）

组别	n	实验前	实验后
对照组	12	2.10 ± 0.21	2.13 ± 0.52 *
CIN 组	12	1.87 ± 0.34 *	23.44 ± 5.22

*：与 CIN 组实验后比较，$P < 0.05$

2.3　2 组大鼠肾小球上皮细胞中 P21、P27、TGF-β1 的阳性细胞表达率及病理积分

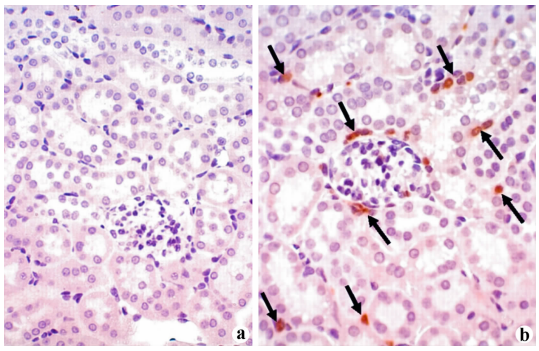
注射碘普罗胺或者等量溶剂后，CIN 组较对照组肾小球上皮细胞 P21、P27、TGF-β1 的表达明显增高（$P = 0.004\ 5$、$0.007\ 1$、0.037）。从病理损害程度即病理积分的角度来看，CIN 组大鼠肾受损程度较对照组明显更加严重，见表 2。经 Pearson 相关分析显示，病理积分与注射后 24 h 尿蛋白排泄量及肾小球上皮细胞 P21、P27、TGF-β1 的表达呈显著性正相关（$r = 0.765$、0.701、0.842、0.651，$P < 0.05$）。

表 2　2 组大鼠肾小球上皮细胞 P21、P27、TGF-β1 和 PCNA 上皮细胞阳性表达率及病理积分（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	P21（%）	P27（%）	TGF-β1（%）	病理积分（分）
对照组	12	0.46 ± 0.21	9.57 ± 1.86	7.63 ± 0.84	1.86 ± 0.57
CIN 组	12	12.86 ± 0.98	21.76 ± 2.75	12.85 ± 5.54	8.24 ± 0.34
t		12.36	9.17	5.26	6.08
P		0.004 5	0.007 1	0.037 0	0.026 0

2.4　2 组大鼠肾小球上皮细胞凋亡率比较

光镜观察结果显示，对照组仅可见极少量的细胞凋亡现象。而 CIN 组可见肾小球上皮细胞大量凋亡。凋亡细胞的细胞核被染成黄褐色（如图 2b 黑色箭头所示）。经计算，CIN 组大鼠肾小球上皮细胞凋亡率（52.5 ± 6.4）%，而对照组为（4.2 ± 0.3）%，2 组比较差异有统计学意义（$P = 0.007\ 5$）。



a：对照组；b：CIN 组

图 2　2 组大鼠肾小球上皮细胞凋亡情况（TUNEL ×400）

3　讨论

CIN 是医院内获得性急性肾功能衰竭的重要原因之一。迄今为止，CIN 的确切发病机制尚未完全阐明。但是，大量的临床和基础研究都显示，CIN 往往伴有肾小球上皮细胞的损伤和坏死[7-8]。CIN 大鼠的病理变

化主要出现在髓质区,主要包括肾小管上皮细胞的脱落、坏死及炎性浸润的出现,在尾静脉注射碘普罗胺后 24 h,大鼠肾出现明显的淤血和坏死,出现肾小球上皮细胞脱落、坏死及空泡样改变,部分管腔出现蛋白管型甚至细胞管型[9]。体外研究显示,在肾小管细胞株加入对比剂后出现明显的线粒体膜电位改变及线粒体酶活性改变,引起线粒体损伤,通透性改变最终导致肾小球上皮细胞凋亡[10]。此外,对比剂的黏度可使肾小球率过滤降低,增加对肾小管上皮细胞的作用时间[11],从而增加 CIN 发生的风险。

大量蛋白尿是肾功能受损的主要临床表现之一,而肾小球上皮细胞的损害是引起蛋白尿的主要发病机制之一。本研究发现,在注射碘普罗胺之后,CIN 组大鼠 24 h 尿蛋白排泄量明显高于对照组。另外,与注射前比较,CIN 组大鼠的24 h尿蛋白排泄量在注射后显著增高,提示碘普罗胺造成了大鼠肾小球上皮细胞的直接损害。Lee 等[12]发现,注射含碘对比剂后,大鼠的24 h尿蛋白排泄量明显高于对照组,与本研究结果一致。

有研究发现,细胞周期素激酶抑制物包括 P21、P27,两者具有协同作用,能够与 cyclin/cdk 形成复合物,使细胞周期停滞在 G1/S 期,从而抑制肾小球上皮细胞增殖及促进肾小球上皮细胞凋亡[13-14]。Park 等[13]发现,TGF-β1 能够通过上调 P21 表达,从而抑制肾小球上皮细胞的增殖。本研究发现,CIN 组大鼠肾小球上皮细胞的 P21、P27 和 TGF-β1 表达较对照组明显增高,提示碘普罗胺可能通过通过上调 P21、P27 和 TGF-β1 的表达,而抑制肾小球上皮细胞的增殖,与国外的最新的研究结果是相符合的[15-16]。

从病理损害的程度来看,CIN 组的病理积分和肾小球上皮细胞凋亡率明显高于对照组。提示在 CIN 发生的时候,肾小球上皮细胞发生了坏死和凋亡。这与国外 Romano 等[17]和国内段丙军等[18]认为的细胞凋亡是对比剂肾病的主要发病机制是一致的。Pearson 相关分析表明,病理积分与注射后 24 h 尿蛋白的排泄量及肾小球上皮细胞 P21、P27 和 TGF-β1 的表达呈正相关,提示碘普罗胺可能通过抑制肾小球上皮细胞增殖和造成肾小球上皮细胞损伤而导致肾功能受损。

综上所述,碘普罗胺可通过上调肾小球上皮细胞的 P27、TGF-β1 的表达及尿蛋白的排泄量,加重肾小球上皮细胞的病理损害及凋亡。

[参考文献]

[1] Fa P, Davaa O, Chen CY, et al. Quantitative evaluation of contrast-induced-nephropathy in vascular post-angiography patients: Feasibility study of a semi-empirical model[J]. Biomed Mater Eng, 2015, 26(Suppl 1): S851 – 860.

[2] Azzalini L, Spagnoli V, Ly HQ. Contrast-induced nephropathy: from pathophysiology to preventive strategies[J]. Can J Cardiol, 2015. doi: 10.1016/j.cjca.2015.05.013.

[3] Au TH, Bruckner A, Mohiuddin SM, et al. The prevention ofcontrast-inducednephropathy[J]. Ann Pharmacother, 2014, 48(10): 1332 – 1342.

[4] Yokomaku Y, Sugimoto T, Kume S, et al. Asialoerythropoietin prevents contrast-induced nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(2): 321 – 328.

[5] Seifert M, Stolk M, Plenz D, et al. Detrimental effects of rat mesenchymal stromal cell pre-treatment in a model of acute kidney rejection[J]. Front Immuno, 2012, 23(3): 202 – 216.

[6] 余 琦,李 宁,杨江辉,等. 全自动免疫组化染色仪与手工免疫染色的比较[J]. 局解手术学杂志,2010,19(2):83 – 85.

[7] Ozcan OU, Adanir Er H, Candemir B, et al. Impact of metabolic syndrome on development of contrast-induced nephropathy after elective percutaneous coronary intervention among nondiabetic patients[J]. Clin Cardiol, 2015, 38(3): 150 – 156.

[8] Liu T, Fang Y, Liu S, et al. Limb ischemic preconditioning protects against contrast-induced acute kidney injury in rats via phosphorylation of GSK-3β[J]. Free Radic Biol Med, 2015, 81: 170 – 182.

[9] Zhao Y, Tao Z, Xu Z, et al. Toxic effects of a high dose of non-ionic iodinated contrast media on renal glomerular and aortic endothelial cells in aged rats in vivo[J]. Toxicol Lett, 2011, 202(3): 253 – 260.

[10] Shuvy M, Nyska A, Beeri R, et al. Histopathology and apoptosis in an animal model of reversible renal injury[J]. Exp Toxicol Pathol, 2011, 63(4): 303 – 306.

[11] Nie JY, Lu LJ, Gong X, et al. Delineating the vascular territory (perforasome) of a perforator in the lower extremity of the rabbit with four-dimensional computed tomographic angiography[J]. Plast Reconstr Surg, 2013, 131(3): 565 – 571.

[12] Lee HC, Chang JG, Yen HW, et al. Ionic contrast media induced more apoptosis in diabetic kidney than nonionic contrast media[J]. J Nephrol, 2011, 24(3): 376 – 380.

[13] Park JW, Cho JW, Joo SY, et al. Paricalcitol prevents cisplatin-induced renal injury by suppressing apoptosis and proliferation[J]. Eur J Pharmacol, 2012, 683(1-3): 301 – 309.

[14] Kitada K, Nakano D, Ohsaki H, et al. Hyperglycemia causes cellular senescence via a SGLT2- and p21-dependentpathway in proximal tubules in the early stage of diabeticnephropathy[J]. J Diabetes Complications, 2014, 28(5): 604 – 611.

[15] Kwasniewska A, Stupak A, Krzyzanowski A, et al. Cesarean scar pregnancy: uterine artery embolization combined with a hysterectomy at 13 weeks' gestation--a case report and review of the literature[J]. Ginekol Pol, 2014, 85(12): 961 – 967.

[16] Rolls AE, Riga CV, Bicknell CD, et al. Robot-assisted uterine artery embolization: a first-in-woman safety evaluation of the Magellan System[J]. J Vasc Interv Radiol, 2014, 25(12): 1841 – 1842.

[17] Romano PB, Briguori C, Quintavallc C, et al. Contrast agents and renal cell apoptosis[J]. Eur Heart J, 2008, 29(20): 2569 – 2576.

[18] 段丙军,黄 乐,丁 红,等. 姜黄素诱导血红素氧合酶 I 表达防治对比剂肾病的实验研究[J]. 中华心血管病杂志,2013,41(2):116 – 122.

(编辑:刘 艺)