维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)02-0144-03

雷帕霉素对肾缺血再灌注大鼠肾功和肾组织超微结构的影响

郑传东[1],苟 欣[1],武 国[2],杨华安[1],蒲晓峰[1],何卫阳[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科;2. 重庆医科大学附属第一医院血管外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨雷帕霉素(Rapamycin,RPM)在大鼠肾缺血再灌注损伤时肾功能和肾组织超微结构改变中的作用。方法:30只雄性 Wistar 大鼠随机分为3组:假手术组(切除右肾,分离左肾动脉,不阻断血流,灌胃给等量生理盐水)、手术组(切除右肾,分离左肾动脉,阻断血流,缺血前灌胃给等量生理盐水)、药物组(切除右肾,分离左肾动脉,阻断血流,缺血前灌胃给 RPM(4mg/(kg·d)×3d,最后一次术前 2h 灌胃)。大鼠急性缺血性肾损伤模型为切除右肾,分离左肾动脉,阻断血流 45min,再灌注 24h,观察肾功能和肾组织超微结构改变。结果:肾缺血再灌注组血肌酐(168±37)μmol/L、血尿素氮(22±6)mmol/L,雷帕霉素组血肌酐(113±17)μmol/L、血尿素氮(13.8±2.3)mmol/L;2组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。电镜:假手术组肾小管上皮细胞超微结构正常;手术组肾小管管腔被大量坏死脱落细胞碎片堵塞,上皮细胞胞浆内脂滴堆积,细胞有凋亡迹象;药物组肾小管超微结构损害轻微。结论:雷帕霉素对大鼠肾缺血再灌注损伤时肾功能和肾组织超微结构有明显保护作用。

【关键词】再灌注损伤; 超微结构;雷帕霉素

【中国图书分类法分类号】R779.64 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-06-06

Effects of RPM on renal function and ultrastructure after ischemia-reperfusion in rats

ZHENG Chuan-dong, et al

(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To investigate the effect of rapamycin on renal function and ultrastructure changes after renal ischemia-reperfusion in rats. *Methods*: Acute ischemic renal injury model was established(right kidney ectomized, 45 min of left renal ischemia and reperfusion for 24h). Thirty male Wistar rats were randomly divided into 3 groups: sham operation group (control group or group C, without renal ischemia), renal ischemia-reperfusion group (ischemia-reperfusion group or group I, without rapamycin), renal ischemia-reperfusion and (RPM 4mg/(kg·d)×3d, reperfusion at 2h before the last operation) intravenous injection group(rapamycin group or group U). changes of renal function and renal uhrastructure were measured BUN level, serum creatinine values. *Results*: Serum creatinine(168±37)μmol/L and BUN concentration(22±6)mmol/L in group I were significantly higher than those in group U: serum creatinine(113±17)μmol/L and BUN concentration(13.8±2.3)mmol/L ($P<0.05$). under the observation of electromicrosope, the renal ultrastructure of group Cwas normal, the ultrastructure was greatly injured in group I, large quantity of apoptosis residues were stopped in the renule intracellular lipid accumulation and cell apoptotis presented meanwhile, it was obviously ameliorated in group U. *Conclusion*: Rapamycin greatly improves renal function and provides remarkable protection on renal ultrastructure after ischemia—reperfusion of kidney in rats.

【Key words】 Reperfusion injury; Uhrastructure; Rapamycin(RPM)

雷帕霉素(Rapamycin,RPM or RPA)是20世纪70年代初,由加拿大 Ayerst 研究所从放线菌培养液中分离出来的大环内酯类抗生素[1]。近年来对 RPM 的研究已证明它是一种强有力的免疫抑制剂,其免疫作用较环孢素 A 强100倍左右,并已广泛应用于肾移植中[2]。本研究通过复制大鼠肾缺血再灌注模型,研究肾脏缺血再灌注后肾功能的变化及肾组织超微结构的改变,探讨雷帕霉素对二者的影响及保护作用。

作者介绍:郑传东(1977-),男,硕士,
研究方向:肾移植的基础及临床研究。

通讯作者:苟 欣,男,教授,E-mail:goxincq@163.com。

基金项目:重庆市卫生局科研基金资助项目(05-2-186)。

1 材料和方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 试验药物

RPM 由华北制药集团新药研究开发有限责任公司提供，批准文号 2002HL0259，口服液，含 RPM 1mg/ml。

1.2 试验动物和分组

30 只雄性 Wistar 大鼠，体重 200~250g，由重庆医科大学实验动物中心提供。实验前禁食 12h，自由饮水，随机分为假手术组(C 组)、手术组(I 组)及药物组(U 组)，每组 10 只大鼠。

1.3 动物模型制作

参照文献方法建立肾缺血再灌注损伤模型[3,4]：大鼠腹腔内注射 10% 水合氯醛(3ml/kg)麻醉后，行腹部正中切口，切除右侧肾，分离左肾动脉，保护好输尿管，靠近肾门处用无创动脉夹夹闭肾动脉，肾脏颜色发白即可确认肾脏血流阻断。C 组分离左肾动脉后不阻断血流。进行 2 次开腹，其间隔时间约 45min。C 组、I 组于缺血前灌胃给等量生理盐水，作为阴性对照。U 组于缺血前灌胃给药 RPM[4mg/(kg·d)×3d]，最后 1 次于术前 2h 灌胃。腹腔内保留林格液 20ml/kg，关闭腹腔。缺血 45min 后，再次打开腹腔，显露肾脏，松开动脉夹，肾脏由苍白变红润可确认肾脏血流恢复，腹腔内保留林格液 20ml/kg，缝合切口。再灌注 24h 即为本试验的肾缺血再灌注损伤模型。

1.4 血肾功能测定

大鼠经心脏取血 3ml，离心后 -20℃冻存，送重庆医医科大学附属第一医院检验科行血肌酐、尿素氮检查。

1.5 肾组织超微结构观察

实验结束迅速取左肾固定于 2.5% 戊二醛磷酸缓冲液中备用，送重庆医科大学电镜室行透射电镜(EM，日立 H-7500)检查，观察肾组织超微结构的变化。

1.6 统计学分析

数据均以 $x \pm s$ 表示，利用 SPSS11.0 统计软件行 Kruskal-wallis 检验后再进行 Nemenyi 成组秩和检验，以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 血肌酐、尿素氮变化

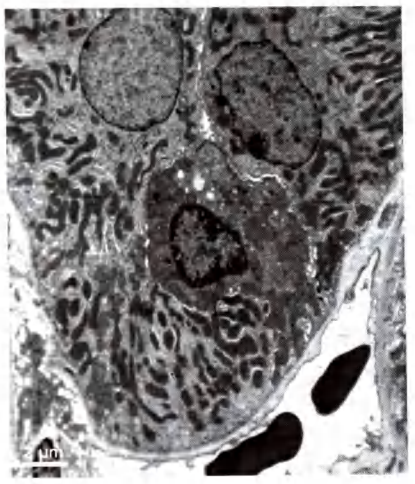
C 组血肌酐值为(65.8 ± 13)μmol/L，血尿素氮值为(4.7 ± 0.8)mmol/L；I 组血肌酐值为(168 ± 37)μmol/L，血尿素氮值为(22 ± 6)mmol/L；U 组血肌酐值为(113 ± 17)μmol/L，血尿素氮为(13.8 ± 2.3)mmol/L。U 组肌酐水平较 I 组下降，D=95；U 组尿素氮水平较 I 组下降，D=98，$P<0.05$，差异有统计学意义。肾脏缺血再灌注后可致血肌酐、尿素氮水平明显升高，雷帕霉素可抑制其升高。

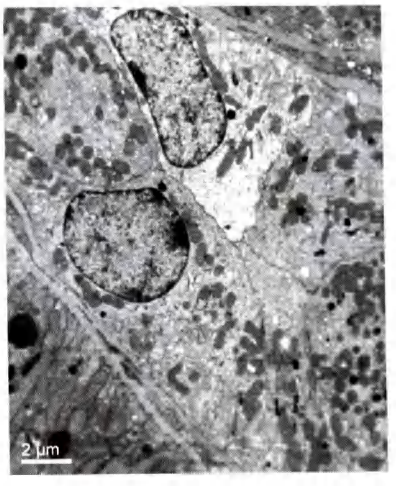
2.2 肾组织超微结构变化

C 组：肾小管上皮细胞超微结构正常(图 1,2)。I 组：近曲小管管腔被大量坏死脱落的上皮细胞线粒体等细胞碎片堵塞，近曲小管上皮细胞胞浆内脂滴堆积；围成肾小管集合管的上皮细胞有凋亡迹象(图 3,4)。U 组：肾近曲小管上皮细胞整体正常：微绒毛正常，线粒体正常，仅是胞浆内有些深色的溶酶体和一些脂滴；无任何凋亡迹象；管腔内仅有少许细胞脱落物质(图 5,6)。U 组超微结构较 I 组明显改善。

3 讨 论

肾脏缺血再灌注损伤发病机制复杂，目前认为缺血期肾脏缺血缺氧，导致能量代谢耗竭，细胞坏





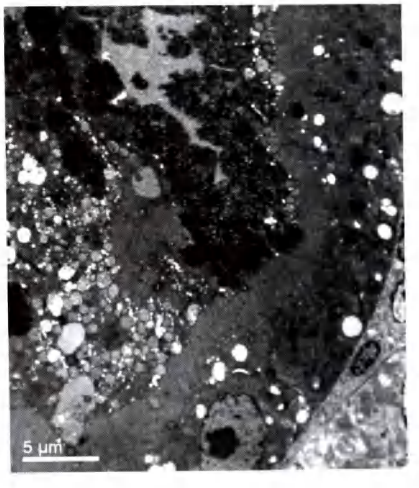
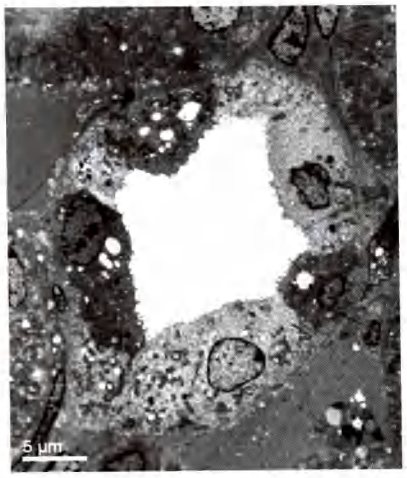


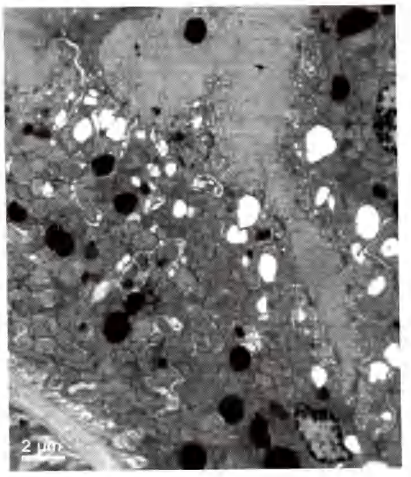
图 1 假手术组 EM×5000 肾小管上皮细胞整体正常，线粒体正常，呈小弯条状；细胞核也正常

图 2 假手术组 EM×6000 肾小管管腔(被斜切，呈缝隙状)正常，无堵塞；上皮细胞胞浆内细胞器正常，细胞核也正常

图 3 手术组 EM×3500 近曲小管管腔被大量坏死脱落的线粒体等细胞碎片堵塞，上皮细胞胞浆内脂滴堆积

维普资讯 http://www.cqvip.com





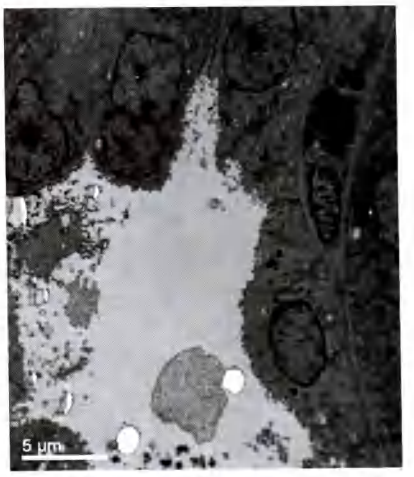


图 4 手术组 EM×3 000 围成肾小管集合管的上皮细胞中有 3 个细胞有凋亡迹象

图 5 药物组 EM×5 000 肾近曲小管上皮细胞整体正常，微绒毛、线粒体正常，仅胞浆有些深色的溶酶体和一些脂滴

图 6 药物组 EM×4 000 围成集合管的上皮细胞胞浆内细胞器正常，细胞正常，管腔内仅有少许细胞脱落物质

死；再灌注期又产生大量氧自由基，并且由于钙超载以及其他炎症介质释放，白细胞浸润，进一步产生各种损害[5]。其中氧自由基在肾脏缺血再灌注损伤的病理生理中有重要的作用：降低膜流动性，破坏蛋白质，引起线粒体、内质网、溶酶体和细胞管架系统及其功能的破坏；自由基介导的 DNA 损伤可以激发多聚 ADP 核糖转移酶的活化和 P_{53} 的积累，导致细胞凋亡[5]。过多的自由基也可直接损伤肾小球毛细血管内皮细胞，使肾小球系膜细胞和肾小管上皮细胞变性、坏死，最终肾小球滤过率下降导致肾功能衰竭[6]。

RPM 分子式为 $C_{51}H_{79}NO_{13}$，其相对分子量为 914.2ku，在结构上与另一种免疫抑制药 FK506 极为相似，二者均属大环内酯类，但 RPM 具有与 FK506 不同的作用机制。FK506 为与环孢素（CsA）作用机制相似的钙调神经素抑制剂类（CNI）免疫抑制剂，而 RPM 为具有不同作用机制的增殖信号抑制剂（Proliferation signal inhibitors，PSI）类免疫抑制剂[7]。研究发现 RPM 可能通过非直接通路使激活的 T 细胞凋亡，阻止了树突状细胞（DC）的抗原呈递，并抑制其成熟，减少细胞因子的分泌[8,9]。阻止 DC 在肾组织迁移聚集，可以明显减轻和改善大鼠缺血再灌注肾组织的病理损伤及肾功能[10]。RPM 不局限于对免疫系统的细胞产生作用，它亦能抑制平滑肌细胞、内皮细胞和成纤维细胞等的增殖[11]。动物实验和多年的临床应用结果显示，RPM 几乎未见肾脏毒性，肝毒性较低[12]。

采用 Wistar 大鼠建立肾脏缺血再灌注损伤模型，结果发现，Ⅰ组再灌注 24h 后血肌酐尿素氮水平较 C 组明显升高，U 组血肌酐尿素氮值较Ⅰ组明显下降，差异有统计学意义（$P<0.05$）。透射电镜观察肾小管超微结构发现，Ⅰ组肾小管细胞核、线粒体、粗面内质网、微绒毛等均遭受严重破坏，应用 RPM 后，肾小管超微结构的损伤得到显著改善，表明 RPM 能对抗肾脏缺血再灌注损伤，有利于肾功能恢复。

RPM 对大鼠急性肾缺血再灌注损伤保护作用的确切分子机制还不清楚。其机制可能与以下因素有关：（1）抑制 T 细胞和 T 细胞依赖性 B 细胞的活性[13]；（2）阻止树突状细胞在肾组织迁移聚集，抑制它的抗原呈递，并抑制其成熟，减少细胞因子的分泌；（3）抑制炎症介质释放，减少自由基的生成，增加肾小球和肾小管细胞的细胞膜及线粒体、内质网、溶酶体等细胞器的稳定性，减轻自由基对肾组织损伤等因素；（4）通过增加溶酶体膜的稳定性，抑制细胞自溶；（5）通过增加线粒体的稳定性，改善细胞能量代谢。由此解释本实验结果：肾小管超微结构的损伤得到显著改善。RPM 还能减轻自由基引起的肾组织的直接损伤；抑制平滑肌细胞、内皮细胞和成纤维细胞等的增殖，改善肾脏微循环，使代表肾小球滤过功能的指标血肌酐、尿素氮水平明显下降。此外，RPM 可抑制 FasL mRNA 表达，抑制细胞凋亡[14]；还可减少自由基介导 DNA 损伤，抑制细胞凋亡。

总之，RPM 可以明显抑制肾缺血再灌注损伤后血肌酐、尿素氮水平升高，并对肾小管超微结构产

（下转第 151 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

[1] Li AC,Brown KK,Silvestre MJ,et al. Peroxisome proliferators activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice[J]. J Clin Invest,2000;106 (4):523-531.

[2] Chen Z,Tshibashi S,Perry S,et al. Troglitazone inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice:pleiotropic effects on CD36 expression and HDL[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2001;21(3):327-372.

[3] Koshiyama H, Shimono D, Kuwamura N,et al. Rapid communication: inhibitory effect of pioglitazone on carotid arterial wall thickness in type 2 diabetes[J]. J Clin Endocrinol Metab,2001;86 (7):3452-3456.

[4] Stitt AW, Jenkins AJ, Cooper ME. Advanced glycation end products and diabetic complications[J]. Expert Opin Investig Drugs,2002;11(9):1205-1223.

[5] Garay-Sevila ME,Regalado JC,Malacara JM,et al. Advanced glycosylation end products in skin, serum, saliva and urine and its association with complications of patients with type 2 diabetes mellitus[J]. J Endocrinol Invest,2005;28(3):223-230.

[6] Yamagishi S,Matsui T,Nakamura K. Kinetics, role and therapeutic implications of endogenous soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in diabetes [J]. Curr Drug Targets,2007;8(10):1138-1143.

[7] Forbes JM,Yee LT,Thallas V,et al. Advanced glycation end product interventions reduce diabetes accelerated atherosclerosis [J]. Diabetes,2004;53(7):1813-1823.

[8] Nomura S,Shouzu A,Omoto S,et al. Activated platelet and oxidized LDL induce endothelial membrane vesiculatin:clinical significance of endothelial cell-derived microparticles in patients with type 2 diabetes[J]. Clin Appl Thromb Hemost,2004;10(3):205-215.

[9] Shimada K,Mokuno H,Miyazaki T,et al. Predictive value of circulating oxidized IDL for cardiac events in type 2 diabetic patients with coronary artery disease[J]. Diabetes Care, 2004;27 (3):843-844.

[10] Argmann CA,Sawyez CG,McNeil CJ,et al. Activation of peroxisome proliferator 2 activated receptor gamma and retinoid X receptor results in net depletion of cellular cho lesteryl esters in macrophages exposed to oxidized lipoproteins[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003;23(3):475-482.

[11] Malerod L,Sporstol M,J uvet LK,et al. Hepatic scavenger receptor class B,type I is stimulated by peroxisome proliferators-activated receptor gamma and hepatocyte nuclear factor-alpha [J]. Biochem Biophys Res Commun,2003;305(3):557-565.

(责任编辑:关蕴良)

(上接第 146 页)

生保护作用。器官移植也存在缺血再灌注现象,RPM 除了抗排斥反应外,还起到了预防和减轻缺血再灌注损伤的作用。RPM 已广泛应用于临床:器官移植中抗急、慢性排斥反应,预防心血管内再狭窄,抗肿瘤,抗病毒等。实验结果表明,RPM 还对缺血再灌注造成的肾组织损伤有明确的保护作用,是预防和减轻肾缺血再灌注损伤的有效方法之一。但其确切分子机制还不清楚,尚待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Sehgal SN,Baker H,Vezina,et al. Rapamycin (AY-22,989),a new antifungal antibiotic.1I. Fermentation,isolation and characterization[J].J Antibiot,1975;28(10):727-732.

[2] Kuypers DR. Benefit-risk assessment of sirolimus in renal transplantation[J]. Drug Saf,2005;28(2):153-181.

[3] 陈聪聪,周 燕,柳子明,等.乌司他丁对肾缺血再灌注大鼠肾组织超微结构的影响[J]. 中华外科杂志,2004;42(14):877-880.

[4] 张世卿,苟 欣,李云祥,等.FK506 对缺血再灌注肾 TNF-α,p38MAPK 蛋白表达的影响[J]. 医学临床研究,2006;23(4):465-467.

[5] 吴其夏,余应年,卢 建,主编.病理生理学[M].第 2 版.北京:中国协和医科大学出版社,2003.271-296.

[6] 苏泽轩,主编.现代移植学[M]. 北京:人民卫生出版社,1998.266-277.

[7] Lehmkuhl H,Ross H,Eisen H,et al. Everolimus (certican)in heart transplantation:optimizing renal function through minimizing cyclosporine exposure[J]. Transplant Proc,2005;37(10):4145.

[8] Hackstein H,Taner T,Logar AJL,et al. Rapamycin inhibits macropinocytosis and mannose receptor-mediated endocytosis by bone marrow-derived dendritic cells[J]. Blood,2002;100(3):1084-1087.

[9] Monti P,MercalIi A,Leone BE,et al. Rapamycin impairs antigen uptake of human dendritic cells[J]. Transplantation,2003;75(1):137-145.

[10] 周 同,孙桂芝,张玉梅,等.黏附分子与树突状细胞在大鼠肝和肾缺血-再灌注损伤中作用及抗黏附干预的影响[J].中国微循环,2004;8(5):315-318.

[11] Pham SM,Shears LL,Kawaharada N,et al. High local production of nitric oxide as a possible mechanism by which rapamycin prevents transplant arteriosclerosis[J]. Transplant Proc,1998;30(4):953-954.

[12] 黄赤兵,张银甫.雷帕霉素作用机制研究及在肾移植中的应用进展[J]. 中国药房,2006;17(7):547-549.

[13] Groth CG,Backman L,Morles JM,et al. Sirolimus(rapamycin)-based therapy in human renal transplantation:similar efficacy and different toxicity compared with cyclosporine. Sirolimus European Renal Transplant Study Group[J]. Transplant,1999;67(7):1036-1042.

[13] 何小玲,逯 宁,刘 彤,等.雷帕霉素和中药百令胶囊对大鼠小肠移植后细胞凋亡和 FasL mRNA 表达作用[J]. 中国中西医结合外科杂志,2001;7(2):102-105.

(责任编辑:冉明会)