DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.02.012

中性粒细胞在内毒素血症的大鼠肾损伤中的作用

郭德玉 陈意生 谯怡然 (第三军医大学基础部病理学教研室) 重庆,630038

提 要 目的: 探讨实验性内毒素血症的大鼠肾损伤的机理,特别是中性粒细胞在其中的作用。方法: 大鼠尾静脉一次性注射内毒素(LPS),或先注入盐酸氮芥,再注射 LPS 250 μg·kg⁻¹体重后 1、3、5、12、24、48和 72 h检测肾脏功能、形态(光、电镜)及肾组织匀浆中丙二醛含量。结果:① 一次性大鼠尾静脉注射 LPS 250 μg·kg⁻¹体重后可出现一过性肾功能损害;② 从形态学上来看,肾小球病变是 LPS血症时肾损伤的重要环节;③ 氧自由基是 LPS血症时肾损伤的重要致伤因素;④ 肾小球内中性粒细胞是氧自由基的主要来源。结论: 中性粒细胞在 LPS血症的大鼠肾损伤中有重要作用。

关键词 内毒素;中性粒细胞;肾 损伤;氧自由基
中图法分类号 R692

内毒素(脂多糖, Lipopolysaccharide, LPS)血症是临床上严重创伤、感染后的常见并发症[1],且与急性肾衰以及多器官衰竭密切相关。本实验旨在探讨 LPS血症时急性肾损伤的机理,特别是中性粒细胞(PMN)在其中的作用,为临床防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验方法

健康 Wistar大鼠 113只,雌雄各半,体重为(210± 30) g,随机分成 3组即 LPS组(L组)、氮芥+ LPS组(简称 NL组)和生理盐水对照组,前二组设 7个时相点,即注射 LPS后 1、3、5、12、24、48和 72 h,每时相点大鼠数分别为 L组 8只、NL组 6只,对照组 15只相同动物作总体对照。L组自大鼠尾静脉缓慢注入 LPS(E. coli O111: B4, Sigma) 250 μg·kg⁻¹体重,于注射后上述各时相点活杀动物取材(血和肾脏),NL组自大鼠尾静脉注入 LPS前 72 h,先自尾静脉注入盐酸氮芥(上海海普制药厂) 1.5 mg·kg⁻¹体重,使注射 LPS时外周血白细胞计数最低,为(2~3)× 10³个·mm⁻³[正常对照为(23~26)× 10³个·mm⁻³],余同 L组。对照组以等量生理盐水代替 LPS,于注射后 5 h活杀动物取材。因预实验时发现单独注射氮芥除外周血白细胞减少外,未发现有肾功能及形态改变,且与单独注射生理盐水的对照组结果相似,故本实验未专门设单独氮芥组。

1.2 检测指标

1.2.1 肾功能检测 所取静脉血经抗凝、离心后分别用尿素酶法、除蛋白饱和苦味酸法检测血浆中尿素氮(BUN)和肌酐(Cr)含量。

1.2.2 肾脏光镜观察 标本按常规制样、观察,并用 CMSD测微目镜数显打印仪测定皮质肾小球毛细血管丛直径(d)与肾小球最大内径(D)的百分比和对肾小球内 PMN进行计数。测量时随机取样,每只大鼠测 20个皮质肾小球,每时相点测 5只大鼠。

1.2.3 肾脏电镜观察 标本按常规制样,在 H-300型透射电镜下观察、摄像。

1.2.4 肾组织匀浆中丙二醛(MDA)含量测定 采用王光亚等[2]的方法进行检测。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示,采用 PDA-2程序进行检验,$P\leq 0.05$为差异显著。

2 结果

2.1 肾功能的变化

与对照组相比,L组、NL组大鼠血浆中 BUN、Cr开始显著升高时间分别为注射 LPS后 1、5 h,高峰时间分别为 5、12 h,至 48 h基本恢复。两组大鼠肾功能障碍程度不一,NL组明显轻于 L组,见表 1。

表 1 血浆 BUN、Cr的含量

Tab 1 Contents of plasma BUN, Cr

After injection of LPS(t/h)	BUN(C_B/mmol·L⁻¹)		Cr(C_B/μmol·L⁻¹)	
	L group(n = 8)	NL group(n = 6)	L group(n = 8)	NL group(n = 6)
1	10.89± 2.81**	5.34± 0.70	75.00± 12.00	57.30± 0.08
3	14.32± 6.82*	6.58± 1.73	108.60± 22.69**	60.99± 11.16
5	21.42± 14.45**	13.03± 3.44**	113.40± 27.36**	71.21± 5.11**
12	11.93± 1.88**	15.23± 4.13**++	86.60± 27.83*	76.94± 14.38**++
24	8.93± 2.40**	7.82± 2.44*	84.46± 7.57*	68.95± 6.57**
48	6.20± 0.95	6.18± 1.77	76.20± 28.07	57.98± 13.28
72	5.80± 2.18	5.88± 1.38	71.20± 15.62	50.39± 6.87
Control	4.47± 1.23	4.47± 1.23	50.55± 7.30	50.55± 7.30

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; +: $P<0.05$, ++: $P<0.01$ *vs* Lmax

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 肾脏光镜观察

2.2.1 肾小球毛细血管丛的变化 L组和 NL组大鼠肾小球毛细血管丛分别于注射 LPS后 1、5 h非常显著收缩,球囊腔扩大,d/D百分比非常显著缩小,以后血管渐扩张,d/D百分比渐恢复,见表 2

表 2 肾小球 d/D百分比值及中性粒细胞数

Tab 2 Percentage of d/D and number of PMNs in glomeruli

After injection of LPS(t /h)	d/D× 100		PMNs	
	L group(n = 5)	NL group(n = 5)	L group(n = 5)	NL group(n = 5)
1	71.65± 8.32**	75.19± 8.35	5.93± 2.14**	2.56± 1.09
3	77.06± 6.60	72.72± 6.74**	8.51± 3.10**	4.12± 1.49*
5	79.03± 5.26	68.89± 7.77**	6.84± 2.23**	5.09± 1.93*
12	79.50± 5.69	75.78± 6.21	6.55± 1.93**	6.56± 2.68**++
24	79.86± 6.35	76.62± 5.59	3.90± 1.64*	4.84± 2.20*
48	77.81± 8.10	79.45± 6.02	4.01± 1.62*	3.53± 1.49*
72	79.94± 6.00	80.11± 4.56	2.90± 1.22+	2.63± 0.94
Control	78.49± 5.98	78.49± 5.98	2.04± 1.05	2.04± 1.05

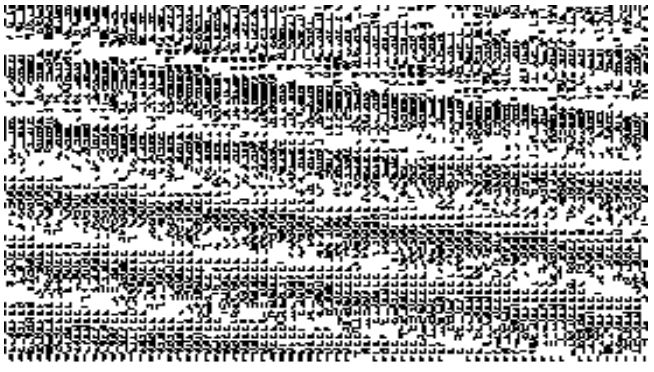
*: P < 0.05,**: P < 0.01 *vs* control;+: P < 0.05,++: P < 0.01 *vs* Lmax

2.2.2 肾小球内 PMN数的变化 L组和 NL组大鼠肾小球内 PMN数分别于注射 LPS后 1、3 h显著增多,高峰时间分别为 3、12 h,至 72 h L组仍高于对照组,见表 2

2.2.3 肾小管的变化 两组大鼠肾小管改变相似,各时相点均可见肾小管上皮细胞浊肿、空泡变性及少量坏死、脱落等。

2.3 肾脏电镜观察

2.3.1 肾小球 L组大鼠肾小球于注射 LPS后出现内皮细胞肿胀,胞体增大突向管腔,部分胞突抵达对侧管壁形成架桥,见附图;系膜细胞胞突增多,细胞器丰富,晚期(72 h)有系膜细胞增生;足细胞足突增粗,局部融合及膜泡形态;毛细血管内有 PMN、血小板聚集;基底膜局部增厚等变化,上述改变以注射 LPS后 3、5 h最明显。NL组大鼠肾小球改变与上相似,但发现较晚(以 12 h最明显),且程度较轻。



附图 内皮细胞横跨血管腔,形成架桥 注射 LPS后 5 h (TEM× 7000)

Fig Bridge-like formation of endothelial cells acrossing the cavity of blood vessel 5 h after injection of LPS (TEM× 7000)

2.3.2 肾小管 两组大鼠各时相点肾小管改变相似,见肾小管上皮细胞微绒毛数目减少,排列紊乱,胞浆中线粒体肿胀,髓鞘样结构形成。

2.4 肾组织匀浆中 MDA含量的测定

与对照组相比,L组、NL组大鼠肾组织匀浆中 MDA含量于注射 LPS后 3、5 h显著升高,高峰时间分别为 5、12 h,72 h基本恢复,与肾小球内 PMN数的变化趋势相一致,相关分析表明两者相关显著。肾组织匀浆中 MDA含量变化与肾功能障碍的发生时间亦相一致,且相关分析结果表明两者相关显著,见表 3

表 3 肾组织匀浆中 MDA的含量

Tab 3 Contents of MDA in the homogenate of renal tissues

After injection of LPS(t /h)	MDA(C_B /μmol· mg^{-1})	
	L group(n = 8)	NL group(n = 6)
1	1.38± 0.17	1.32± 0.18
3	1.62± 0.11**	1.42± 0.19
5	2.08± 0.18**	1.50± 0.16*
12	1.92± 0.28**	1.75± 0.18*++
24	1.74± 0.15**	1.65± 0.15**
48	1.51± 0.12+	1.52± 0.17+
72	1.36± 0.12	1.31± 0.16
Contorl	1.29± 0.18	1.29± 0.18

*: P < 0.05,**: P < 0.01 *vs* control;
+: P < 0.05,++: P < 0.01 *vs* Lmax

3 讨论

本实验中,一次性大鼠尾静脉注射 LPS 250μg· kg^{-1}体重后,血浆 BUN、Cr于注射后 1 h即升高,5 h

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

达高峰,48 h基本恢复,证明短暂的 LPS血症能够引起一过性肾功能损害,并出现一系列肾脏形态学改变,包括肾小球早期毛细血管丛收缩,随后扩张,PMN滞留或浸润,内皮细胞以及系膜细胞肿胀,基底膜局部增厚和肾小管上皮细胞浊肿、空泡变性等,且形态上肾小球病变程度与肾功能异常的发生发展相对应,而肾小管病变程度与肾功能异常的发生发展缺乏相关性,显然,从形态学上来看,肾小球病变是 LPS血症时肾功能损害发生的重要环节。

在肾小球病变中,除肾小球固有成分发生变化外,尚见较多的 PMN滞留或浸润,且肾小球内 PMN数的变化与肾功能损害表现趋势基本一致。此外,用氮芥致周围血液中白细胞计数减少后,再注射 LPS,肾小球内 PMN数少于 L组,与此同时,肾功能异常的发生明显推迟且程度较 L组轻,因素,推测 PMN在 LPS血症的肾损害中具有重要作用。

有关 LPS血症时 PMN在肾小球内滞留的机理尚不清楚,可能与 PMN表面粘附分子的改变及细胞本身机械性质的变化有关[3]。PMN激活后,可释放溶酶体内蛋白水解酶和产生超氧化离子引起局部组织细胞的损伤[4],也可激活磷脂酶 A_2 引起花生四烯酸代谢产物的合成和释放,调节局部血管阻力和血流量[5]。本实验中,L组、NL组大鼠注射 LPS后肾组织匀浆中 MDA含量均显著升高,且其含量的变化与肾功能损害之间相关显著。MDA是脂质过氧化代谢产物,其含量升高,提示肾组织内氧自由基生成增多,氧自由基增多可引起肾脏固有成分的损伤,导致肾功能异常。因此,氧自由基可能是 LPS血症时肾脏损伤的重要致伤因素之一。本实验还发现,注射 LPS后 L组、NL组大鼠肾组织匀浆中 MDA含量的变化与肾小球内 PMN数的变化趋势相一致,且相关分析结果表明两者相关显著,因此推测肾小球内 PMN可能是氧自由基的主要来源。

总之,PMN在 LPS血症的肾损伤中有重要作用,其激活产生的氧自由基是肾损伤的重要致伤之一。

参考文献

1 Rush B F, Sori A J, Murphy T F *et al*. Endotoxemia and bacteremia during hemorrhagic shock. The link between trauma and sepsis. Ann Surg, 1988; 207(5): 549

2 王光亚,李文仙,杨光圻.人和动物血清及组织中脂质过氧化的测定方法.卫生研究, 1980; 9(2): 73

3 Erzurum S C, Downey G P, Doherty D E *et al*. Mechanisms of lipopolysaccharide-induced neutrophil retention. Relative contributions of adhesive and cellular mechanical properties. J Immunol, 1992; 149(2): 154

4 Linas S L, Whittenburg D, Repine J E. Role of neutrophil derived oxidants and elastase in lipopolysaccharide-mediated renal injury. Kidney Int, 1991; 39(3): 618

5 郭德玉,谯怡然,陈意生.前列环素、血栓素在内毒素介导的肾损伤中的作用.第三军医大学学报, 1995; 17(5): 421

(收稿: 1996-12-17;修回: 1997-01-24)

(编辑　刘　鹏)

Role of polymorphonuclear neutrophils in renal damages during endotoxemia in rats

Guo Deyu, Chen Yisheng, Qiao Yiran (Department of Pathology, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Objective: To explore the mechanism of renal damages during endotoxemia, especially the role of ploymorphonuclear neutrophils (PMNs) in it. Methods: Renal dysfunction was induced with the injection of lipopolysaccharide (LPS) at a dose of 250 ($\mu g/kg^{-1}$ bw into the rats. The renal morphology, function and content of malondialdehyde (MDA) in the homogenate of renal tissues were determined at 1st, 3rd, 5th, 12th, 24th, 48th and 72nd hour after the injection of LPS. Results: ① Transcient renal dysfunction was found after the injection of LPS; ② According to the renal morphological changes, glomerular lesion was one of the important renal damages during endotoxemia; ③ Oxygen free radical was one of the important factors that caused renal damages during endotoxemia; 4) Oxygen free radical mainly originated from PMNs in glomeruli. Conclusion: PMNs play an important role in renal damages during endotoxemia.

Key words endotoxin; neutrophil; kidney; oxygen free radical; rat.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net