DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.01.017

5/6肾切除大鼠残肾形态演变的动态计量研究

袁发焕* 史景泉** 光丽霞△ 许平庆** 可金星△△ (第三军医大学附属新桥医院肾内科) 重庆,400037

提 要 目的:探讨慢性肾衰时残肾组织的演变规律。方法:采用形态计量等方法,动态观察5/6肾切除大鼠残肾形态和功能演变。结果:残肾肾小球毛细血管显著增生、肾单位进行性肥大与毁损并存。结论:残存肾单位的形态代偿与进行性毁损影响和制约着残存肾功能。

关键词 肾功能衰竭,慢性;肾脏;形态计量;大鼠
中图法分类号 R692.5

慢性肾功能衰竭(CRF)发病机制仍不十分清楚。大量资料表明,在不同病因引起的CRF之间存在着殊途同归的共同通道[1]。不同病因所致CRF,唯一相同的条件是大部分肾单位均已毁损,仅残存少部分肾单位超负荷地工作。研究这些残存肾单位的演变规律,弄清共同通道机制,对阐明CRF发生机制具有重要的理论意义。以往关于CRF残存肾组织的病理形态学研究,主要限于单一时相点的定性描述[2],尚乏动态的定量研究。本研究采用形态计量等方法,观察5/6肾切除所致CRF大鼠残肾形态和功能演变规律及二者的联系,以探讨CRF的共同通道机制。

1 材料与方法

雄性Wistar大鼠100只(本校实验动物中心提供),体重170±10g,随机分为A、B两组。A组45只,为假手术对照组,不切肾;B组55只,为损伤组,按我们以前建立的方法行5/6肾切除,即切除右肾皮质2/3和全部左肾[3]。大鼠术后以普通大颗粒饲料分笼喂养,限量投食,自由饮水。于术后30、60、90、120 d每组取10只大鼠观察各指标。其中,光镜和透射电镜合用5只,扫描电镜5只,其它指标与形态指标同时取标本。A组多5只、B组多15只大鼠以备其非观察期死亡。

光镜和透射电镜标本经1%戊二醛磷酸缓冲液于活体内灌注固定。尿标本经穿刺膀胱抽取,血标本自腹主动脉抽取。光镜标本同时作石蜡和塑料包埋,每蜡块切5μm片10张,HE和PAS染色各5张;每塑料块切4μm片3张,作非特异性酯酶组织化学染色(ANAE法),阳性作为识别浸润单核细胞的标志。透射电镜标本每份包埋3块,随机选1块定位后作非连续切片2张,在H-300型透射电镜下观察,每切片于肾小球区域随机摄相7~9张。肾小球毛细血管铸型采用经我们改良的ABS塑料灌注法[4],铸型在JSM-T300型扫描电镜下观察。

肾小球平均卡规直径和平均体积用HE染色切片在MAS-1计算机图像分析系统下测定;肾实质、肾小球、近曲小管和远曲小管体积密度、肾小球毛细血管长度及长度密度和面积及面积密度、肾小球有核细胞数密度、病变肾小管和肾间质体密度、硬化肾小球比率用目镜多能测试系统在HE染色切片上测定;肾小球系膜区体密度用目镜多能测试系统在PAS染色切片上测定;肾小球滤过膜厚度用照片多能测试系统在透射电镜照片上测定[5];其它指标按常规方法测定。

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示。用我校医用程序包在微机上进行方差分析、多重比较及相关性分析。

2 结果

B组术后平均动脉血压、血浆肌酐和尿素氮浓度及尿蛋白浓度显著升高,血红蛋白浓度、红细胞压积和体重增加量显著下降,个别大鼠血钾增高。两组尿糖、尿pH无显著差别。

B组大鼠右侧残肾手术切口瘢痕形成,瘢痕处内陷,其余部分外凸,形态不规则,硬度逐渐增加,未发现漏尿和感染征象,残肾多被网膜包裹,难以剥离,残肾体积较手术切肾时所留肾组织体积显著并进行性增大,到术后90 d时,已接近A组同期右肾重量(0.47±0.02 g/100 g体重,*vs* 0.49±0.01,$P>0.05$)。B组大鼠肾小球体积显著并进行性增大,肾小球占肾皮质的体密度于术后早期低于A组,术后晚期升高并超过A组;肾小管变粗,管腔逐渐扩张,上皮细胞肥大、数目增多,近曲小管占肾皮质的体密度于术后30、60、90 d显著高于A组,术后120 d降至A组水平,见表1,图1;肾间质扩展。远曲小管占肾皮质的体密度,与A组差别不显著(17.9%±2.0% *vs* 21.7%±5.1%,$P>0.05$),包括肾小球和肾小管在内的肾实质占肾皮质的体密度与A组差异不显著(58.3%±6.8% *vs* 63.5%±6.4%,$P>0.05$)。

* 袁发焕,男,40岁,副主任医师,副教授,博士
** 基础医学部病理学教研室 △ 新桥医院儿科 △△ 电镜室

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

表 1　大鼠术后肾单位和肾小球毛细血管形态参数

Tab 1　Nephron and its capillary morphometry of rats post operation

Group	Slices	Post operation (t /d)			
		30	60	90	120
The volume of glomerulus($\times 10^{4}\ \mu m^3$)					
A	25	58.3± 3.5	61.4± 3.9	71.7± 9.4	80.8± 12.7
B	25	145.4± 12.7**	187.9± 30.7**	246.7± 21.7**△	334.6± 62.7**△
The lenth of glomerular capillaries(mm)					
A	25	2.68± 0.24	2.81± 0.22	3.29± 0.36	3.89± 0.48
B	25	6.69± 0.45**	8.41± 1.20**△	10.40± 1.31**△	12.38± 1.49**△
The area of glomerular capillaries(mm^2)					
A	25	0.14± 0.01	0.15± 0.02	0.17± 0.04	0.18± 0.05
B	25	0.37± 0.06*	0.39± 0.09*	0.53± 0.12**△	0.64± 0.13**△
The density of glomerular volume(%)					
A	25	12.2± 1.5	12.1± 1.4	11.9± 1.4	12.1± 1.2
B	25	10.5± 1.1*	10.2± 1.8*	13.4± 1.2△	16.4± 3.4*△
The density of proximal tubular volume(%)					
A	25	29.7± 3.4	26.3± 8.2	27.0± 2.1	25.2± 3.9
B	25	32.5± 2.6*	35.7± 4.5*	31.3± 1.7△	25.3± 4.0△

*: $P < 0.05$,**: $P < 0.01$,***: $P < 0.001$ *vs* group A;△: $P < 0.05$,△△: $P < 0.01$ *vs* front point of this group

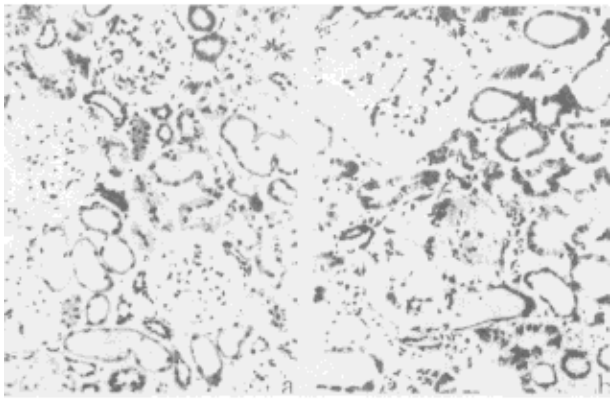


图 1　a示正常肾小球、肾小管、肾间质,A组大鼠假手术后 90 d b示肥大的肾小球发生节段性硬化;其周围肾间质有少量单个核炎性细胞浸润,间质扩展,肾小管扩张,B组大鼠 5/6肾切术后 90 d　(HE× 111)

Fig 1　a: Normal glomeruli, tubuli, and interstitium. Rat of group A. 90 days post sham operation. b: Segmental sclerosis of hypertrophied glomerulus, with filtration of a few mononuclear cells in expanded interstitium and dilated tubuli. Rat of group B. 90 days post 5/6 nephrectomy (HE× 111)

B组大鼠肾小球毛细血管数目增多,管腔扩大,可见巨大毛细血管腔,部分毛细血管腔内淤血。透射电镜下,在增生扩展的系膜区可见新生的毛细血管,其管腔直径小,可有完整的基底膜、内皮和上皮,内皮窗孔清晰可见,足细胞指状足突细、长、多,见图 2,少数新生毛细血管管壁大部分为系膜,仅少部分以基底膜与尿囊腔隙相隔。扫描电镜下,毛细血管分支增加,3级以上分支多见,见图 3 单个肾小球毛细血管长度和毛细血管内表面积显著并进行性升高,见表 1,肾小球毛细血管占肾小球的长度密度和面积密度与 A组差异不显著(4176.6± 138.4~ 4603.4± 266.8 mm/mm^3; 215.2± 26.2~ 256.8± 31.3 mm^2/mm^3; $P > 0.05$)。A组大鼠术后各时相点肾小球毛细血管数目无明显增多,毛细血管分支多在 3级以下。

B组大鼠肾小球有核细胞数显著增多,有核细胞占肾小球的数密度显著增高,以术后 30 d增高最明显(141.2± 23.5× 10^4个/mm^3, *vs* 24.4± 2.4× 10^4个/mm^3, $P < 0.001$)。增多的有核细胞主要为系膜细胞、内皮细胞和足细胞,AN AE染色阴性,足细胞胞浆丰富,胞浆中充满大量线粒体、粗面内质网和游离核糖体,偶见毛细血管腔内有单核细胞附壁。逐渐出现较多肾小球硬化,以节段性硬化多见,见图 1,部分呈球性硬化。球性硬化肾小球的体积显著小于同片未硬化的肾小球,周围的肾间质有严重炎症反应;节段性硬化多发生在显著肥大的肾小球,周围炎症反应相对较轻;无明显硬化的肾小球体积多大于硬化肾小球,周围少有炎症反应。部分肾小球囊壁增厚,或与肾小球硬化并存,或单独存在,术后 30~ 60 d增厚的囊壁中有较多增生的壁层上皮细胞,术后 90 d以后主要为纤维成份,偶见典型新月体形成。在典型肾小球硬化出现之前,先有肾小球系膜区扩展,系膜区内有大量细胞成份,以后细胞成份逐渐减少,纤维成

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

份逐渐增多,主要为大量扭曲折叠的基底膜样物质堆积;这些堆积的基底膜样物质与毛细血管基底膜相延续, PAS反应阳性,增多的系膜基质可沿内皮下向毛细血管壁内插入。部分内皮细胞收缩,胞体突向毛细血管腔。足细胞足突有不同程度的融合,融合严重者可沿毛细血管外形成很厚的致密膜样结构,致使滤过膜显著增厚。肾间质有大量单个核炎症细胞浸润,部分炎细胞 ANAE染色阳性,术后 60 d以后,炎症反应区域大量纤维组织形成,相应区域的肾小管萎缩塌陷;肥大扩张的肾小管内有较多蛋白沉积;小动脉管壁增生肥厚,肥厚的小动脉管壁 PAS反应阳性。肾小球系膜区占肾小球的体密度、硬化肾小球比率、肾小球毛细血管滤过膜厚度以及病变肾小管和肾间质占总肾小管和肾间质的体密度显著并进行性增高,见表 2 A组大鼠术后各时相点,未见明显病变。

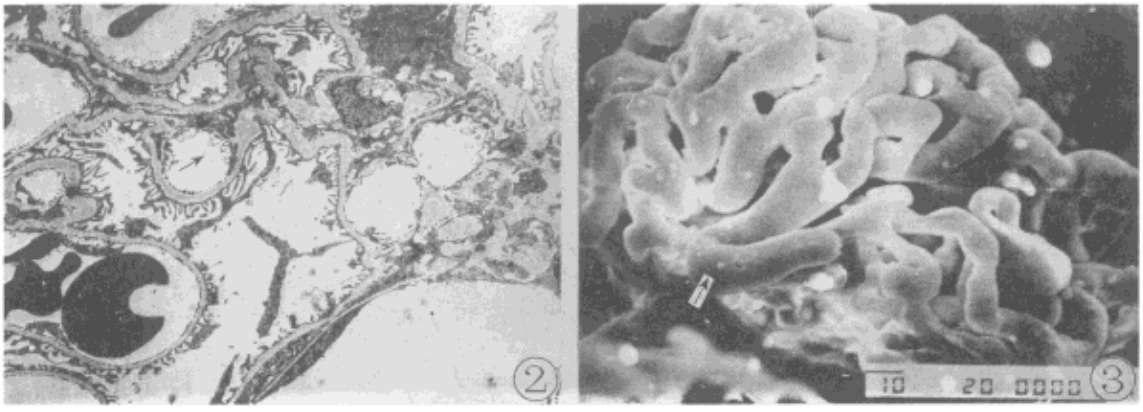


图 2 示扩张的系膜区内出现 3个新生毛细血管腔,新生毛细血管 (箭头)内皮完整,内皮窗孔清晰,足细胞足突细、长、多。B组大鼠 5/6肾切术后 60 d (TEM× 3000)

Fig 2 In the expanded mesangium, there are 3 hyperplastic capillaries (arrow), which have perfect endothelium and epithelium. Rat of group B. 60 days post 5/6 nephrectomy (TEM× 3000)

图 3 示肥大的肾小球毛细血管分支增多,其中一支毛细血管可见 5级分支 (箭头)。 3/6丁酮 3/6丙酮 ABS溶液灌注。B组大鼠 5/6肾切术后 60 d (SEM× 700)

Fig 3 The increased capillary branches of a hypertrophied glomerulus. There are 5 level branches of a main capillary(arrow). ABS casting. Rat of group B. 60 days after 5/6 nephrectomy (SEM× 700)

表 2 大鼠术后肾脏损伤程度

Tab 2 The renal injury degree of rats post operation

Group	Slices	Post operation (*t* /d)			
		30	60	90	120
The density of glomerular mesangium(%)					
A	25	16.4± 1.6	17.9± 1.8	18.7± 1.7	18.8± 1.5
B	25	22.5± 1.8**	28.4± 1.7**△	31.2± 1.4**	33.6± 3.9**△
The percentage of sclerotic glomeruli(%)					
A	25	0.1± 0.3	0.2± 0.4	0.2± 0.4	0.3± 0.6
B	25	5.1± 1.1**	17.9± 1.8**△△△	24.1± 2.9**△	35.8± 2.5**△
The thickness of filtration membrane(nm)					
A	25	158.1± 18.5	158.7± 14.8	159.8± 14.3	161.3± 13.4
B	25	208.5± 13.4**	291.5± 29.1**△	342.3± 24.5**	402.3± 45.3**△
The density of damaged tubule- interstitium(%)					
A	25	0.3± 0.5	0.3± 0.6	0.5± 0.8	1.1± 0.9
B	25	17.4± 2.5**	27.9± 2.1**△	31.0± 2.9**△	37.5± 3.4**△

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ *vs* group A; △: $P < 0.05$ △△△: $P < 0.001$ *vs* front point of this group

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

多元线性回归分析表明,肾小球系膜区体密度、硬化肾小球比率、肾小球毛细血管基底膜厚度、病变肾小管和肾间质体密度四项形态损伤程度指标均与血浆肌酐浓度显著正相关,逐步回归分析表明硬化肾小球比率与血浆肌酐浓度相关最显著。

3　讨论

大鼠5/6肾切除术后,残存肾组织体积显著并进行性增大,与文献[6]报道相符。而残肾体积增大由哪些成份肥大或增生形成?它们之间的比例关系是否协调?文献中尚乏深入探讨。本研究表明,肾小球肥大、肾小管扩张和肾间质增宽均参与了残肾体积增大的形成;残肾实质与间质保持了大致成比例的增长,这种成比例的增长可能是增大的残肾具有相应代偿功能的重要形态学基础。

Nyengard用光镜观察单肾切除术后120 d的大鼠残肾,发现肾小球毛细血管数量、长度和面积均显著增加,从而推测残肾肾小球毛细血管有增生,但未能提供毛细血管增生的直接形态学证据[7]。本研究 B组大鼠术后单个肾小球毛细血管长度和面积成倍增长,与Nyengard的观察结果性质类似,但增加程度更明显,可能与本研究所切肾组织更多有关。我们在透射电镜下于 B组大鼠肾小球增宽的系膜区内发现了新生毛细血管,扫描电镜下发现肾小球毛细血管数目显著增多,毛细血管分支级数显著增加,提供了残存肾小球毛细血管增生、分支的直接形态学证据。尽管肾小球毛细血管显著增生,但肾小球毛细血管占肾小球的长度密度和面积密度却无显著改变,说明毛细血管的增生分支程度大致上与肾小球肥大程度相一致。这种大致成比例的增长,有利于增生的毛细血管发挥其相应的滤过功能。

以往认为,大鼠部分肾切除术后肾小球增多的有核细胞主要是增生的系膜细胞和浸润的单核细胞[8]。本研究通过光镜、电镜和 ANAE酶组化染色证实,除了增生的系膜细胞外,还有增生的内皮细胞和足细胞,偶见毛细血管内有单核细胞附壁,而肾小球系膜区内极少见单核细胞浸润。随着肾小球固有细胞增生,肾小球系膜基质增多,逐渐发展为肾小球硬化,提示肾小球固有细胞增生在残肾的进行性毁损中起有重要作用。另一方面,伴随着肾小球固有细胞增生和系膜区基底膜样物质增多,系膜区有毛细血管增生,从二者在时间和空间上的联系,有理由推测固有细胞增生和系膜基质增多对毛细血管的增生和分支可能具有诱导作用,因而具有一定的促进代偿的积极意义。

本研究 B组大鼠术后硬化肾小球比率逐渐上升,术后120天时高达35.8%±2.5%;与 Orisio报道的结果接近[9],低于 Nakamura[10]报道的结果。不同报道之间硬化肾小球比率的差异,可能与所用动物、模型不同有关。本研究 B组大鼠肾小球球囊壁层上皮细胞增生、囊壁增厚,甚至典型新月体形成,这种病变在有关部分肾切除动物模型文献中尚未见报道。

B组大鼠术后肾小球上皮细胞足突融合的发生是否与肾小球毛细血管通透性、滤过率和滤过分数增加致原尿中蛋白增加,损害足细胞有关[11,12],有待进一步研究。由于足突融合和增多的系膜基质沿内皮下向毛细血管壁内"插入",使肾小球滤过膜显著增厚,滤过率下降。所谓"插入",原意为本来无系膜的地方,现在有系膜伸进来了。近年用超高分辨滤扫描电镜检查发现,正常情况下基底膜内也有系膜基质存在[13],所谓系膜"插入",事实上只是基底膜内系膜基质增多而已。我们认为将此类病变描述为基底膜内系膜基质增多似较"插入"更为合理。

B组大鼠球性硬化肾小球周围肾小管、肾间质炎性细胞浸润和纤维化最重,节段性硬化肾小球周围病变相对较轻,无硬化的肾小球周围很少有病变,提示肾小管、肾间质病变与肾小球硬化之间可能存在着某种内在联系[14],详细机制尚不清楚。

本研究提示:当肾脏损伤到一定程度时,残存肾单位一方面有肥大和肾小球毛细血管增生以尽量代偿失去的肾功能,另一方面又不断地进行性地毁损,残肾的功能状况受二者的影响和制约,最大限度地减缓或阻断残存肾单位的毁损应是 CRF防治的主要目标之一。

参考文献

1 Remuzzi G. Glomerular hypertrophy and progression: Summary and concluding remarks. Kidney Int, 1994; 45(suppl 45): s30

2 Strauch M, Gretz N. Animal models to induce renal failure: A historical survey. Contr Nephrol, 1988; 60: 1

3 袁发焕,廖立生.慢性肾衰大鼠残肾血流量和氧自由基改变及其意义.中华肾脏病杂志,1995; 11(3): 144

4 袁发焕,史景泉,光丽霞等.不同溶剂 ABS液用于大鼠肾血管铸型的对比研究.中华物理医学杂志,1995; 17(3): 139

5 申　洪,沈忠英.实用生物体视学技术.广州:中山大学出版社,1991: 26~216

6 Miller S B, Rogers S A, Estes C E *et al*. Increased distal nephron EGF content and altered distribution of peptide in compensatory renal hypertrophy. Am J Physiol, 1992; 262(6

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

pt 2): F1032
7 Nyengard J R. Number and dimensions of rat glomerular capillaries in normal development and after nephrectomy. Kidney Int, 1993; 43(5): 1049
8 Floege J, Burns M W, Alpers C E *et al*. Glomerular cell proliferation and PDGF expression precede glomerulosclerosis in the remnant kidney model. Kidney Int, 1992; 41(2): 297
9 Orisio S, Benigni A, Bruzzi I *et al*. Renal endothelin gene expression is increased in remnant kidney and correlates with disease progression. Kidney Int, 1993; 43(2): 354
10 Nakamura T, Ebihara I, Fukui M *et al*. Altered glomerular steady-state levels of tumor necrosis factor-alpha mRNA during nephrotic and sclerotic phase of puromycin aminonucleoside nephrosis in rats. Clin Sci, 1993; 84(3): 349
11 Mayer G, Lafayette R A, Oliver J *et al*. Effects of angiotensin II receptor blockade on remnant glomerular perm selectivity. Kidney Int, 1993; 43(2): 346
12 Pavenstad H. The podocyte a neglected player in glomerular injury. Nephrol Dial Transplat, 1995; 10(2): 147
13 袁发焕,史景泉,王仁鹏.超高分辨率扫描电镜在肾小球基底膜研究中的应用.中华物理医学杂志, 1994; 16(2): 124
14 Neilson E G. Tubulointerstitial injury and its role in progressive renal damage. summary and concluding remarks. Kidney Int, 1994; 45(suppl 45): S116

(收稿: 1997-02-15;修回: 1997-07-25)
(编辑 冷怀明)

Quantitative study of morphological evolution of remnant kidney after 5/6 nephrectomy in rats

Yuan Fahuan, Shi Jingquan, Guang Lixia, Xu Pingqing, Ke Jinxing (Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

Abstract Objective: To clarify the evolution rule of remnant kidney during chronic renal failure. Methods: After the rats were undergone 5/6 nephrectomy, the morphological and functional evolution of the remnant kidneys were dynamically observed with morphometry. Results: Remarkable proliferation of the glomerular capillary and the progressive hypertrophy and destruction of the nephron were seen in the remnant kidneys. Conclusion: The morphological compensation and progressive destruction of the remnant nephrons affect the function of the remnant kidneys.

Key words renal failure, chronic; kidney; morphometry; rat

(上接20页)

中,有其它生长因子参与;BMP诱导成骨过程中可刺激其它生长因子的合成及分泌。所以,我们认为 BMP的诱导成骨实际上是一个由多因子参与和协同的复杂生物过程。

(2) TGFβ1可以明显增强 BMP的诱导成骨能力,TGFβ1主要通过促进间充质细胞分裂增殖为 BMP提供丰富的靶细胞;促进软骨细胞、骨细胞的分裂增殖;促进骨细胞产生 I型胶原、抑制软骨细胞产生II 型胶原;抑制破骨细胞生成以及金属蛋白酶活性以减少组织的破坏;促进骨连接素、骨桥素及碱性磷酸酶的合成以增强基质钙化等作用而使 BMP诱导成骨能力增强。同时,我们还发现 TGFβ1可以改变 BMP的软骨内成骨方式。

(3)宿主对异种 BMP是存在免疫排斥反应的,本实验发现兔对牛 BMP的植入产生了明显的免疫排斥反应,表现为植入局部有大量的炎细胞浸润,血清中产生了抗 BMP的抗体,抗体的效价于异种 BMP植入后第3、4周达最高,以后逐渐下降。而 TGFβ1可以通过抑制 T、B淋巴细胞的分裂增殖、直接抑制抗体产生、抑制淋巴因子激活的杀伤细胞及 T淋巴细胞的传代、拮抗其它炎性介质的作用而有效地降低异种 BMP的免疫排斥反应。

(4)本实验探讨了 PLA作为 BMP载体的可行性及成骨效果观察,我们认为一定分子量及一定孔径的 PLA可以用作 BMP的载体,虽然本实验所用分子量为4.2×10⁴的 PLA作为 BMP的载体,其成骨效果尚不如用牛松质骨载体,但我们认为 PLA载体主要有以下优点:可以在骨缺损修复过程中逐渐释放 BMP,使骨损伤局部 BMP维持在有效浓度;PLA能随骨缺损的修复而逐渐降解,从而对骨损伤起到弹性固定的目的;可以根据骨损伤的性质及类型采用不同强度的 PLA及将其制成不同的形状以满足固定及载体的双重需要等。因此,我们认为对其有作进一步研究的必要。

关键词 骨形态发生蛋白;诱导成骨;免疫反应;载体
中图法分类号 R336; R68
(收稿: 1997-10-10;修回: 1997-11-14)
(编辑 冷怀明)

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