DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.04.014


# 内皮素致肾脏病理变化的实验研究

孙慧勤 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 动态观察了大鼠静注内皮素(ET-1)后肾脏组织学及超微结构变化,同时检测了肾功能(BUN、Cr)及肾组织 MDA前列腺素的含量,对 ET作用下肾脏病变发生的机理进行了初步探讨。结果发现: ET可引起肾脏损伤,光镜下见肾小球毛细血管发生收缩(0.5 h)、舒张甚至扩张的变化,肾小管上皮出现局灶性水样变性、坏死,以3、24 h明显。电镜下肾小球的变化更为突出,早期可见内皮细胞肿胀、窗孔减少;脏层上皮细胞足突局部融合。后期可见细胞(内皮、系膜细胞)肥大,48 h出现系膜细胞明显增生。肾功能的变化与肾脏病理变化相平行,且肾功能的变化与肾组织 MDA的变化明显相关。表明: 本试验条件下 ET可引起肾脏损伤发生,其所致的肾脏病变尤其是肾小球的变化是肾功能降低的形态学基础,提示 ET在 ARF的发生发展中具有重要作用。此外本研究尚提示脂质过氧化增强是 ET作用下肾损伤的重要因素之一。

关键词 内皮素;肾/损伤;脂质过氧化;大鼠
中图法分类号 R692.502

在急性肾功能衰竭(Acute renal failure, ARF)及肾功能不全的发病机理中,血管活性物质在血流动力学异常上具有重要作用,但已知的缩血管物质如血管紧张素II(ATII)、前列腺素等并未能获得圆满地解释。内皮素(Endothelin, ET)是1988年发现的一种以强烈缩血管为特征的活性肽[1],能引起肾血管收缩、肾血流量及肾小球滤过率(GFR)的下降;而肾脏的多种细胞亦具有产生 ET的能力[2]。已见 ET与 ARF存在关联的报道[3~5],但其作用机理不清,目前亦缺乏有关 ET对肾脏作用的形态学研究。本实验动态观测了 ET作用下大鼠肾脏的病理损伤过程,对其发生机理进行了初步探讨,旨在认识和阐明 ET在肾功能不全及 ARF发生中的可能作用和地位,以深化 ARF发生机理的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物实验方法

健康 Wistar大鼠36只,体重180~230 g,雌雄不限,随机分为实验组与对照组,实验组自尾静脉注入 ET(ET-1, Sigma公司产品,临用前以生理盐水配制)1 nmol/kg体重,30 min后再等量注射一次(根据本研究目的,参照 Shiboata[3]、Yanggisawa[1]及 Hostetter[6]等的研究而定),于第二次注射后0.5、3、24和48 h活杀取材: 先以1%戊巴比妥纳(50 mg/kg体重)腹腔注射麻醉后,开腹,取腔静脉血2 ml(抗凝),取左肾置液氮中保存,右肾从正中剖开,一半固定于10%福尔马林液中,一半迅速分离肾皮质及皮髓交界区,取1 mm×1 mm×1 mm大小组织置于3%戊二醛磷酸缓冲液中固定,每时相点7只动物。对照组8只大鼠则以等体积生理盐水注射,以相同方法取材。

### 1.2 观测指标和方法

1.2.1 光镜与电镜观察 标本按常规制样,于光镜、透射电镜下进行观察、摄相。光镜下尚测量肾和球毛细血管丛与肾小体内径的最大直径,每例随机测量20个,每时相点共测得140个数据,求出二者之比值(d/D)。

1.2.2 肾功能的测定 将所取之抗凝血经离心分离血浆后,以二乙酰-肟法、除蛋白饱和苦味酸法分别检测血尿素氮(BUN)与肌酐(Cr)。

1.2.3 肾组织 $PGE_2$、6-keto-$PGF_{1\alpha}$、$TXB_2$的测定 按药盒(解放军总医院产品)说明取相同部位的肾组织经匀浆、酸化、提取等步骤制样并进行放免测定。结果以 pg/mg组织(湿重)表示。

1.2.4 肾组织丙二醛(MDA)的测定 取相同部位肾组织适量、匀浆,用 Ohkawa[7]法测定 MDA,结果以 nmol/mg protein表示。

### 1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,用本校数学教研室编辑的"SPMR"程序包中的"PDA-2"、"MRA-1"进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 肾脏的形态学变化

注入 ET后,大鼠肾脏出现了一系列病理变化。0.5 h,光镜下肾小球毛细血管丛缩小,毛细血管管腔不易辨认,肾小球球囊腔明显增大(图1);肾小管尤其是近曲小管上皮细胞出现不同程度的空泡变性,以被膜下、皮髓交界区为明显、电镜下肾小球毛细血管内皮细胞肿胀、窗孔减少;脏层上皮细胞足突局部融合变平坦;系膜区显著缩小;球囊腔增大。近曲小管上皮细胞散在的线粒体肿胀、基质电子密度降低,胞质内溶酶体增大、增多。3 h,肾小球毛细血管已舒张,但肾小管空泡变性更趋严重,范围扩大,髓放线区也出现明显的变性,并可见部分细胞局部胞浆的脱落、溶解。电镜下,细胞多有肿胀并有髓鞘样结构形成;近曲小管上皮微绒毛肿胀粘连、质膜大泡形成,细胞顶部吞噬泡增多,溶酶体增多增大,常成片聚集于核旁(图2)。24 h时,肾小管上皮细胞的损伤更为明显,在前述的变性区域内出现较多细胞的胞浆溶解、脱落,部分细胞呈溶解性坏死。电镜下,肾

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

小球内皮细胞胞浆肿胀,甚至可阻塞管腔,同时一些内皮细胞则表现细胞浆丰富,核肥大呈不规则形(图 3),系膜细胞也表现细胞器发达,核肥大呈哑铃、分叶状等变化。48 h,肾小球、间质毛细血管扩张充血;肾小球系膜区扩大,系膜细胞增多,其胞浆丰富,胞核多呈不规则形(图 4),细胞坏死等变化依然可见。整个实验过程中多见白细胞与血小板滞留现象。

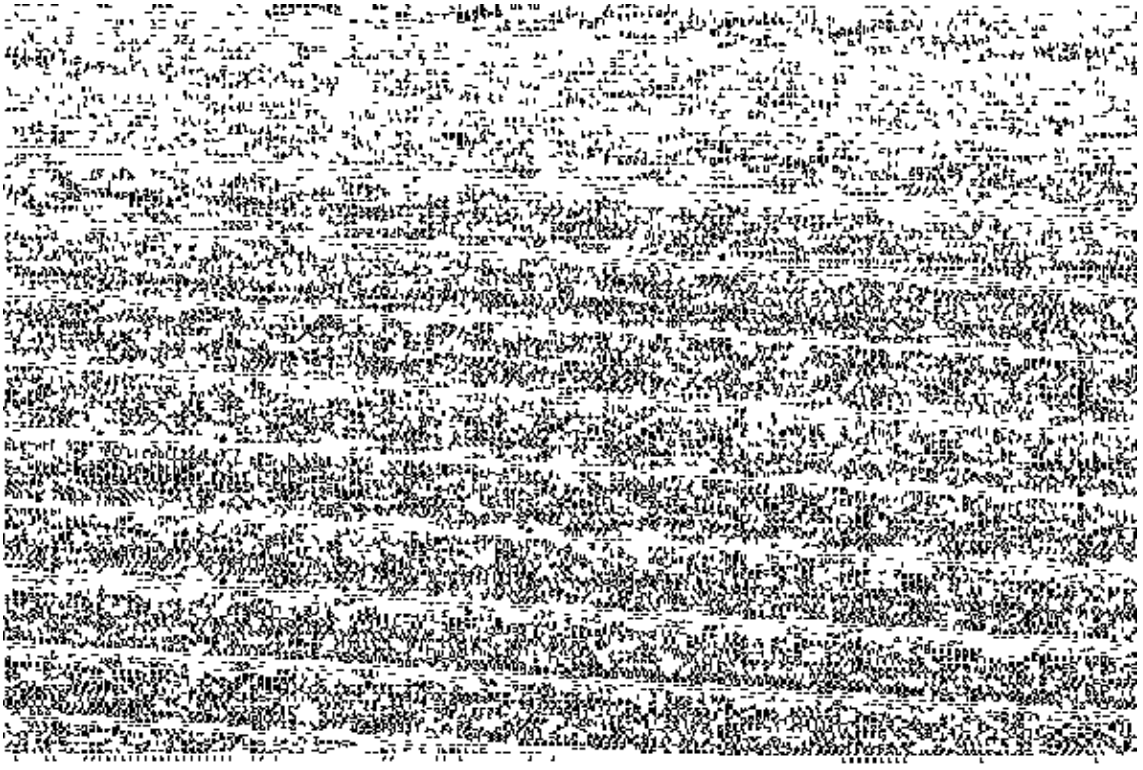


图 1　给 ET后 0.5 h,肾小球毛细血管收缩,毛细血管丛体积减小,肾小体球囊腔增大　(HE× 480)

**Fig 1　The constricted glomerular capillaries with the volume of capillary tuft decreased and the Boman′s space expanded at 0.5 h after ET injection**　(HE stain× 400)

图 2　给 ET后 3 h,肾近曲小管上皮细胞内溶酶体增多、增大,成片聚集于核旁　(TEM× 10000)

**Fig 2　Increased lysosomes aggregated near the nucleus in proximal convoluted tubule epithelial cell at 3 h after ET injection**　(TEM× 10000)

图 3　给 ET后 24 h,肾小球内皮细胞核肥大;丰富的细胞浆及内质网　(TEM× 15000)

**Fig 3　Endothelial cells of glomerular capillary showed enlarged irregular nuclei rich cytoplasm and hypertrophy of rough endoplasmic reticulum (RER) at 24 h after ET injection**　(TEM× 15000)

图 4　给 ET后 48 h,肾小球系膜区增宽,系膜细胞增多　(TEM× 6000)

**Fig 4　The extended mesangium and proliferated mesangial cells (MC) at 48 h after ET injection**　(TEM× 6000)

d/D值测定结果为注入 ET后 0.5 h显著减小($P < 0.01$),48 h增大($P < 0.05$),如表 1示。

表 1　肾小球毛细血管丛与肾小体内径最大直径的比值(%)

**Tab 1　The ratio of the maximum diameter of glomerulus (d) and that of renal corpuscle (D) (%)**

| | Control | Experimental (h) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 0.5 | 3 | 24 | 48 |
| d/D | 83.88± 0.93 | 80.65± 0.69** | 83.88± 0.03 | 84.78± 0.86 | 85.17± 0.71* |

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ *vs* control

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

### 2.2 肾功能的变化

给 ET后各时相点 BUN均高于对照组,差异非常显著( $P<0.01$),其中以 3 h点升高最为明显;各时相点 Cr亦升高,与对照组比较,差异显著( $P<0.05$)。如图 5示。

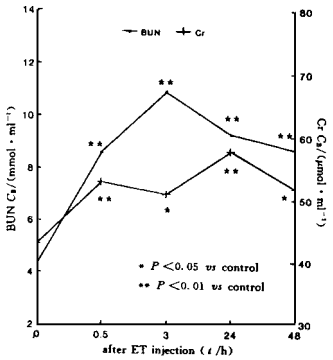



图 5 注射 ET后 BUN和 Cr的变化

**Fig 5 The changes of BUN and Cr after ET injection**

### 2.3 肾组织 $PGE_2$、6-keto-$PGF_{1\alpha}$、$TXB_2$含量测定

各时相点上述各物质含量均有升高趋势,与对照组比较,以 0.5、48 h差异最为显著( $P<0.01$)见表 2。

表 2 肾组织 $PGE_2$、6-keto-$PGF_{1\alpha}$、$TXB_2$的含量(pg/mg组织)

**Tab 2 The contents of $PGE_2$, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$, $TXB_2$ in renal tissue**

| | Control | Experimental (h) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 0.5 | 3 | 24 | 48 |
| $PGE_2$ | 1629 | 8683 | 5056 | 4750 | 7273 |
| | ± 954 | ± 4531** | ± 1979* | ± 2109* | ± 2153** |
| 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ | 218 | 501 | 371 | 429 | 489 |
| | ± 78 | ± 129** | ± 102* | ± 174** | ± 160** |
| $TXB_2$ | 141 | 1009 | 289 | 245 | 656 |
| | ± 73 | ± 352** | ± 231 | ± 107 | ± 391** |

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

### 2.4 肾组织 MDA的变化

ET注入后 3、24和 48 h,肾组织匀浆 MDA含量均显著高于对照( $P<0.01$),以 3 h点升高最为明显,图 6示。

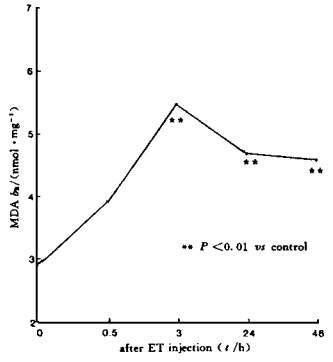



图 6 注射 ET后 MDA含量的变化

**Fig 6 The changes of MDA contest aftetr ET injection**

### 2.5 肾功能与肾组织 MDA含量的相关分析

就 MDA含量与 BUN、Cr分别进行相关分析,得出相关系数各为 0.96、0.66,表明肾功能与 MDA的变化具有明显的线性相关关系。

## 3 讨论

ET具有强烈的缩血管作用,本实验 ET的肾血管收缩作用至少可维持 0.5 h,支持 ET缩血管效应的长而强特点。在 ET的作用下,肾脏亦发生了一系列的病理变化。光镜下主要见肾小管,尤其是近曲小管上皮的水样变性、坏死,这些病变在实验早期即有发生,随实验时程的进展而有加重趋势;电镜下肾小球的病变则更为突出,早期(0.5 h)便可见内皮细胞肿胀、窗孔减少,进一步肿胀的内皮甚至可导致肾小球毛细血管腔的阻塞;脏层上皮也有肿胀、足突部分融合。这些均可直接影响肾小球的滤过。在肾小球病变中,值得一提的是系膜细胞(Mesangial cell, MC)的变化,关于 MC,近年已认识到其在肾小球疾病中的中心地位,在 ARF的发生发展中,其病变亦具有重要作用,如 MC的收缩,可引起与之相连的毛细血管腔缩小,减少肾小球的有效滤过面积,导致单个肾小球滤过率(SNGFR)的降低; MC的增殖,既可通过增多的细胞对毛细血管腔的机械压迫作用,引起血流减缓和下降,又可因系膜基质等物质的增多导致肾小球硬化的发生而引起肾功能的下降。本实验在早期,可见毛细血管收缩及系膜区缩小,而在后期(48 h)则出现 MC的明显增生。我们在离体条件下,亦观察到了 ET引起 MC的收缩与增殖作用[8],提示 MC对 ET作用的敏感性。已有的研究多见 ET引起 RBF、GFR明显降低的报道[3],且 GFR下降的程度较其它缩血管物质如 ATⅡ引起的为甚[3,9]。本文认为, ET引起的这些肾小球病变尤其是内皮肿胀、MC的变化等可能是肾功损伤、GFR明显降低的形态学基础,这些病变亦与 ARF中的有很大相似之处,提示 ET与 ARF有密切关系。

本实验发现,给 ET后 0.5 h,肾小球毛细血管收缩; 3 h后已舒张;至 48 h甚至表现扩张。d/D值也说明肾小球毛细血管经历了收缩——舒张甚至扩张的反应过程,伴随此过程出现的细胞损伤变化并非在血管收缩期(0.5 h左右),而是在收缩期后,以 3、24 h最为明显。而肾组织 MDA的含量,亦从 3 h后明显升高,以 3 h点升高尤甚。相关分析表明 BUN、Cr与 MDA含量之间具有明显的线性正相关,提示形态学上所见之损伤性变化,肾功能的降低与 MDA有密切关系。因

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

此,我们认为 ET可引起肾脏发生缺血—— 再灌注的病理过程,缺血、缺氧及继之发生的再灌流导致的肾内氧自由基生成增加、膜脂质过氧化作用加强是本实验细胞损伤的主要原因,也是 ET缩血管作用停止后,肾功及细胞损伤未能恢复的原因之一。

另外,我们尚观测到 ET作用下肾组织前列腺素有增加的变化,以 0.5~48 h最为明显,48 h所见之毛细血管扩张可能与 $PGE_2$、$PGI_2$的增多、扩血管作用加强有关。 ET在引起血管收缩的同时可激活磷酯酶 $A_2$引起前列腺素的合成与释放,这种作用对调节血管舒缩状态,改善肾功具有一定意义,其机理及影响尚有待进一步探讨。

可以推测,机体在创伤、休克、缺氧等情况下,可激活内皮、MC等细胞 ET的合成与释放,血浆和/或肾组织内升高的 ET可通过影响肾小球、肾小管的功能、形态而使肾功下降,进而导致或影响 ARF的发生、发展。而且,组织缺血可增加 ET缩血管的毒性作用,任何以低灌注为特征的紊乱都将激活和/或增强 ET的病理作用。当然,ARF的发生并非只决定于单一因素,而是多种因素作用的综合结果,但 ET的作用将不可忽视。应用预防 ET的合成与释放、拮抗其效应及氧自由基清除剂等方法将有助于 ARF的防治。

## 参考文献


1 Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S *et al*. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature, 1988; 332(31): 411

2 Perico N, Pemuzzi G. Role of endothelin in glomerular injury. kidney Int, 1993; 43(S39): S76

3 Shibouta Y, Suzuki N, Shino A *et al*. Pathophysiological role of endothelin in acute renal failure. Life Sci; 1990; 46(22): 1611

4 林善锬,张 平,王艺华等.内皮素与急性肾功能衰竭的关系及其可能机理的研究.中华医学杂志,1992; 72(4): 201

5 Nambi P, Pullen M, Jugus M *et al*. Rat kidney endothelin receptors in ischemia-induced acute renal failure. J Pharmacol Exp Ther, 1993; 264(1): 345

6 Hostetter TH, Brenner BM *et al*. The pathophysiology of acute renal failure. In: Berenner BM, ed. Acute renal failure. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone Inc. 1988: 3~7

7 Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem, 1979; 91: 351

8 孙慧勤,谯怡然.肾小球系膜细胞的培养及内皮素对其作用的观察.第三军医大学学报,1994; 16(4): 282

9 Schulz E, Ruschitzka F, Lueders *et al*. Effect of endothelin on hemo-dynamics, prostaglandins, blood coagulation and renal function. Kidney Int, 1995; 47(3): 795


(收稿: 1995-09-08;修回: 1996-05-15)

(编辑 张大春)

# Effects of endothelin on renal pathological changes in rats

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

**Abstract** After an intravenous injection of endothelin-1 (ET-1) to rats, the renal histological and ultrastructural changes were continuously observed and the renal function and the contents of MDA and protastaglandins in renal tissues were determined. Meanwhile, the pathogenetic mechanisms of the renal diseases induced by ET were discussed. It was found that ET caused renal damages. Under optical microscope, the glomerular capillaries showed a course of contraction-to-dilatation accompanied with lytic hydropic degeneration and necrosis which were more severe 3h and 24h after the injection of ET-1. Under electron microscope, the glomeruli displayed more obvious pathological changes including glomerular capillary contraction, mesangial regional shrinking, capillary endothelial cell swelling with reduced fenestrae and the local fusion of the podocytic processes of visceral epithelial cells in the early stage (3 h) and hypertrophy of endothelial and mesangial cells in the late stage after the injection. Mitochondrial swelling and mylinefigure were seen during the experiment. The changes of renal function were paralell to the renal pathological changes and stronly correlative to those of MDA content in the renal tissues. Our findings suggest that ET play an important role in the genesis and development of acute renal failure and the enhancement of lipid peroxidation is one of the important factors in the induction of renal injury by ET.

**Key words** endothelin; pathology; kidney; lipid peroxidation; rat

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