DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.05.013

慢性肾衰大鼠血液和肾脏氧自由基指标的相关分析*

袁发焕 廖立生 (第三军医大学新桥医院肾内科) 630037

提 要 本文观察了5/6肾切除慢性肾衰大鼠血液和残肾组织氧自由基有关指标。发现氧自由基在残肾的毁损中起重要作用,抗氧化剂维生素E能保护残肾。在正常和慢性肾衰情况下,血浆脂质过氧化物和维生素E浓度及红细胞超氧化物歧化酶活力与残肾组织的相应指标相关非常显著。提示血液氧自由基有关指标可很好地反应慢性肾衰患者残肾氧自由基代谢情况。

关键词 肾功能衰竭,慢性慢性肾衰;大鼠;血液;肾;自由基

中图法分类号 R692.5

慢性肾衰患者血液氧自由基有关指标改变非常明显[1],但它们能否代表肾组织有关指标的相应改变,尚不清楚。本文在5/6肾切除大鼠慢性肾衰模型上同时观察了血液和残肾组织氧自由基有关指标的改变,进行了相关分析。

1 材料与方法

雄性Wistar大鼠144只(本校动物所提供),体重300±50 g,分成3组。Ⅰ组,假手术对照,48只,不切肾。Ⅱ组,致伤组,48只,经背切除右肾皮质2/3,1~2周后切除左肾[2]。Ⅲ组,维生素E治疗组,48只,切肾方法同Ⅱ组。Ⅰ、Ⅱ两组以我校动物所提供的普通大颗粒饲料喂养,每公斤饲料含蛋白61.3 g,脂肪52.5 g,糖270.2 g,维生素E 38.8 mg。Ⅲ组每公斤饲料含维生素E 667 mg,余同普通大颗粒饲料。全部大鼠自由进食进水。各组大鼠于术后30、60、90、120 d观察各指标。

血浆和肾组织脂质过氧化物(LPO)含量测定采用硫代巴比妥酸荧光微量法[3],血浆和肾组织维生素E含量测定采用荧光法[4],红细胞和肾组织铜锌超氧化物歧化酶(SOD)活力测定采用核黄素法[5],供扫描电镜检查用的肾小球毛细血管铸型采用ABS灌注法[6]。其它测定按常规方法。文中数据以$\bar{x}\pm s$表示,组间差异显著性用t检验,回归分析用本校数学教研室的MRA-1程序包。

2 结果

Ⅱ组术后30 d血浆尿素氮和肌酐浓度显著高于Ⅰ组,并进行性升高,Ⅱ组术后30~120 d血浆尿素氮和肌酐浓度高于Ⅰ组,但显著低于Ⅱ组(表1)。

表1 大鼠术后血浆尿素氮和肌酐浓度

Tab 1 PUN and PCr concentration of rats after operation

Group	n	Time after operation (days)			
		30	60	90	120
		PUN (mmol/L)			
Ⅰ	10	5.1±1.6	4.6±0.9	5.5±0.8	5.7±0.9
Ⅱ	10	9.8±1.5※※	20.8±4.5※※※	22.9±3.9※※※	64.6±27.3※※※
Ⅲ	10	8.4±1.3※	14.6±2.8※※△	11.3±3.2※※△△	29.7±6.6※※※△△
		PCr (μmol/L)			
Ⅰ	10	103.3±30.9	92.4±12.8	111.8±15.7	107.5±18.6
Ⅱ	10	203.2±23.6※※	316.2±41.8※※※	281.4±40.1※※※	556.5±166.8※※※
Ⅲ	10	173.1±17.1※	231.3±36.6※※△	194.8±19.7※※△	231.6±40.8※※△△

※: Compared with group Ⅰ, $P<0.05$; ※※: $P<0.01$, ※※※: $P<0.001$

△: Compared with group Ⅱ, $P<0.05$, △△: $P<0.01$.

* 全军青年基金资助课题

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

Ⅱ组术后 30 d，残肾组织 LPO 含量显著高于Ⅰ组，以后持续在高水平，血浆 LPO 浓度也显著高于Ⅰ组，并进行性升高。Ⅱ组术后肾组织和血浆 LPO 无显著增高，显著低于Ⅱ组同期水平(表 2)。血浆 LPO 浓度与肾组织 LPO 含量呈显著正相关，回归方程为：$y=2.86+1.61x$（y，血浆 LPO 浓度，μmol/L；x，肾组织LPO含量，μmol/g蛋白；$n=120$；$r=0.87$；$P<0.001$）。

表 2　大鼠术后肾组织和血浆 LPO 含量

Tab 2　Plasma and renal tissue LPO content of rats after operation

Group	n	Time after operation (days)			
		30	60	90	120
		Renal tissue LPO (μmol/g protein)			
Ⅰ	10	1.37±0.23	1.34±0.19	1.52±0.21	1.49±0.21
Ⅱ	10	4.14±0.73※※※	3.52±0.41※※※	3.88±0.39※※※	4.35±0.75※※※
Ⅲ	10	0.75±0.14※△△△	0.84±0.10※△△△	0.83±0.21※※△△△	1.55±0.71△△△
		Plasma LPO (μmol/L)			
Ⅰ	10	4.31±0.48	4.38±0.44	4.50±0.34	4.48±0.58
Ⅱ	10	6.73±0.76※	8.62±0.73※※	10.44±0.78※※※	11.56±1.84※※※
Ⅲ	10	4.05±0.53△	5.07±±0.68△	5.50±0.76△△	6.08±0.76※△△

※：Compared with group Ⅰ，$P<0.05$；※※：$P<0.01$，※※※：$P<0.001$

△：Compared with group Ⅱ，$P<0.05$，△△：$P<0.01$，△△△：$P<0.001$.

Ⅱ组术后 30 d，残肾组织和血浆维生素 E 含量显著低于Ⅰ组，以后持续在低水平。Ⅱ组术后各时相点肾组织和血浆维生素 E 含量显著高于Ⅰ组和Ⅱ组同期水平(表 3)。血浆维生素 E 浓度与肾组织维生素 E 含量呈显著正相关，回归方程为：$y=10.64x-0.81$（y，血浆维生素 E 浓度，μmol/L；x，肾组织维生素 E 含量，μmol/g 蛋白；$n=120$；$r=0.95$；$P<0.001$）。

表 3　大鼠术后肾组织和血浆维生素 E 含量

Tab 3　Plasma and renal tissue vit E content of rats after operation

Group	n	Time after operation (days)			
		30	60	90	120
		Renal tissue vit E (μmol/g protein)			
Ⅰ	10	0.78±0.08	0.77±0.06	0.74±0.11	0.74±0.10
Ⅱ	10	0.54±0.08※	0.52±0.05※	0.52±0.11※	0.48±0.08※
Ⅲ	10	1.23±0.19※△△	1.06±0.11※△	1.01±0.12※△	0.84±0.13△
		Plasma vit E (μmol/L)			
Ⅰ	10	7.34±0.48	7.27±0.39	7.33±0.62	7.30±0.73
Ⅱ	10	4.36±0.53※	4.05±0.36※	4.57±0.57※	4.39±1.06※
Ⅲ	10	11.59±1.15※△△	10.43±0.81※△△	9.40±0.83△△	10.41±1.93※△△

※：Compared with group Ⅰ，$P<0.05$；△：Compared with group Ⅱ，$P<0.05$，△△：$P<0.01$.

Ⅱ组术后 60 d，残肾组织和红细胞 SOD 活力显著低于Ⅰ组，以后进一步降低。Ⅱ组术后各时相点，残肾组织和红细胞 SOD 活力与Ⅰ组无显著差别，显著高于Ⅱ组同期水平(表 4)。红细胞 SOD 活力与肾组织 SOD 活力呈显著正相关，回归方程为：$y=599+219.9x$（y，红细胞 SOD 活力，kU/g 血红蛋白；x，肾组织SOD活力，kU/g蛋白；$n=120$；$r=0.91$；$P<0.001$）。

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

表4 大鼠术后肾组织和红细胞SOD活力

Tab 4 Erythrocyte and renal tissue SOD activity of rats after operation

Group	n	Time after operation (days)			
		30	60	90	120
		Renal tissue SOD (kU/g protein)			
Ⅰ	10	14.38±2.18	14.62±1.60	12.91±0.80	12.78±0.98
Ⅱ	10	14.19±1.32	8.91±0.68※	7.02±0.83※	5.44±0.82※※
Ⅲ	10	14.77±1.49	12.78±1.29△	12.33±2.02△	12.30±1.86△△
		Erythrocyte SOD (kU/g Hb)			
Ⅰ	10	3731.0±221.9	3656.8±272.9	3799.8±174.9	3677.1±329.9
Ⅱ	10	3423.4±268.5	2290.6±305.2※	1981.3±186.9※※	1992.7±541.9※※
Ⅲ	10	3887.8±210.5	3673.7±152.1△	3339.9±262.1△	3054.4±586.4△

※: Compared with group Ⅰ, $P<0.05$, ※※: $P<0.01$; △: Compared with group Ⅱ, $P<0.05$, △△: $P<0.01$.

光镜下，Ⅱ组术后30 d，残肾有大量单个核炎性细胞浸润；术后60 d，肾小球肥大，肾小管扩张；术后120 d，肾小球高度肥大，实变，纤维化，肾小管高度扩张，管腔内有蛋白沉积，肾间质纤维化。Ⅲ组术后，残肾炎性细胞浸润不明显，残肾纤维化程度显著轻于Ⅱ组。透射电镜下，Ⅱ组术后120 d，残肾肾小球滤过膜增厚，足细胞足突融合。Ⅲ组术后无类似表现。扫描电镜下，Ⅱ组术后120 d，肾小球肥大，肾小球毛细血管失去正常自然曲度，有充盈缺损。Ⅲ组术后肾小球毛细血管形态规则，无充盈缺损。

3 讨论

本文Ⅱ组术后30 d，残肾有显著炎性细胞浸润，血浆尿素氮和肌酐浓度显著升高，并逐渐出现肾小球肥大、实变、纤维化，肾小管扩张，肾间质纤维化等病变，残肾逐渐毁损，残肾功能逐渐恶化，与文献报道一致[7]。

本文Ⅱ组术后在残肾形态和功能损害逐渐加重的同时，伴有残肾组织LPO含量逐渐升高，维生素E含量和SOD活性逐渐降低。LPO是氧自由基作用于细胞膜性结构多不饱和脂肪酸的代谢产物，残肾组织LPO含量增多，说明残肾增多的氧自由基已对残肾组织细胞产生了破坏作用[8]。维生素E是一种重要的抗氧化物质，能从多个环节发挥抗氧自由基的作用[9]。SOD是一种重要的抗氧化酶类，能将超氧阴离子(O_2^-)变成过氧化氢(H_2O_2)，后者在过氧化氢酶的作用下变成氧和水[8]。残肾维生素E含量和SOD活力下降使残肾氧自由基的降解减少，氧自由基含量更高，损伤更严重。本文Ⅲ组大鼠饲以高维生素E后，残肾维生素E含量和SOD活力显著高于Ⅱ组，残肾LPO含量显著低于Ⅱ组，同时残肾形态和功能损害也显著轻于Ⅱ组，说明氧自由基在残肾的毁损中起重要作用，而抗氧化剂能防止氧自由基引起的残肾毁损。

由此可见，探明慢性肾衰患者残肾的氧自由基反应状况对这类患者使用抗氧化剂治疗有指导意义。但目前，在患者身上取肾组织来作生化检查，几乎是不可能的。本研究表明，Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ三组大鼠的血浆LPO和维生素E浓度及红细胞SOD活力与肾组织LPO和维生素E含量及SOD活力呈显著的正相关，相关系数r达0.87～0.95，说明无论是在正常，还是在慢性肾衰有或无抗氧化剂治疗情况下，血浆LPO和维生素E浓度及红细胞SOD活力都能很好地反应残肾组织相应指标的变化。为临床上用血液氧自由基有关指标来估计慢性肾衰患者肾组织氧自由基代谢状况，指导抗氧化剂的应用提供了实验依据。

参考文献

1 袁发焕，廖立生. 慢性肾衰患者血浆LPO观察. 医师进修杂志，1990，(5)：14

2 Stemer G, Wennberg A. Partial nephrectomy and chronic renal failure. The "adult" rat model. Contr Nephrol，1988，60：39

3 余嘉丽. 血清过氧化脂质硫代巴比妥酸微量测定法的标化. 中华医学检验杂志，1987，10：24

4 侯少范，朱振源. 生物材料中生育酚的荧光测定法. 分析化学，1982，10：535

5 汪义军，庄一义. 血清锰和铜锌超氧化物歧化酶活力测定和初步临床观察. 中华医学检验杂志，1991，14：71

6 张朝佑. 器官内微血管铸型扫描电镜图谱. 北京：科学出版社，1988：11～13

7 Waldhere R, Gretz N. Nature course of the development of

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

histological lesions after 5/6 nephrectomy. Contr Nephrol, 1988,60:64

8 袁发焕,廖立生.氧自由基与肾脏疾病.国外医学:泌尿系统分册,1989,9:117

9 袁发焕,廖立生.维生素E抗氧化作用的研究进展.国外医学:临床生物化学与检验学分册,1990,11:18

(收稿:1993-05-31;修回:1994-09-20)

Correlation of oxygen free radical items between blood and kidney of chronic renal failure rat

Yuan Fahuan, Liao Lisheng (Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630037)

Abstract The correlation of oxygen free radical items between blood and kidney of 5/6 nephrectomy-induced chronic renal failure rats was studied. It was found that oxygen free radicals played an important role in the impairment of remnant kidney, and antioxidant vitamin E could protect remnant kidney from the impairment caused by oxygen free radicals, and that, both in normal and chronic renal failure conditions, plasma lipid peroxides and vitamin E concentration and superoxide dismutase activity of red blood cells correlated very well with corresponding items of remnant kidney. These results suggested that blood oxygen free radical items could reflect renal oxygen free radical metabolic status in chronic renal failure patients.

Key words kidney failure, chronic; rat; blood; kidney; free radicals

抗内毒素类脂A单克隆和基因工程单链抗体的研究*

Study on monoclonal and antibody of genetic engineering single chain against lipid A of bacterio-endotoxin

府伟灵 肖光夏 (第三军医大学烧伤研究所) 630038

本研究用J5突变株免疫BALB/C小鼠经细胞融合技术获得了一株分泌抗LPS类脂A的单克隆的杂交瘤细胞系,命名为9G6 MAb。Ig亚类分析证明其属IgM抗体。体内外的一系列实验证实9G6单克隆抗体对革兰氏阴性杆菌的菌体和LPS具有广谱和高效价中和能力。在小鼠体内可抵抗多种革兰氏阴性杆菌的菌体和LPS对小鼠的攻击,表现了良好的保护活性,临床的初步应用研究表明抗LPS类脂A抗体,可以明显降低严重烧伤病人血中内毒素水平,同时降低由LPS入血而引起的体内炎症细胞因子和介质的高水平表达,显示了初步的治疗效果。

在此基础上,本文应用基因工程技术从分泌9G6单克隆抗体的杂交瘤细胞中提取mRNA后反转录成cDNA第一链。用特异性轻、重链引物扩增反应产物,获得重链(340 bp)和轻链(320 bp)基因片段,经纯化后将V_H和V_L基因用一多肽连接物连接,构成单链抗体基因。单链抗体基因经再次扩增并加入酶切位点后克隆于pCANTAB5噬菌粒中再转化于感受态的TG_1细菌中,在援助噬菌体KO7的救援下产生可表达ScFv抗体的重组噬菌体。通过噬菌体抗体库技术筛选重组噬菌体,最后在E. Coli TG_1中表达了9G6单链抗体基因。ELISA阻断试验初步证明了该单链抗体能特异性阻断其9G6 MAb对LPS的结合,表明具有较好的抗原结合活性。

关键词 灼伤;感染;内毒素;类脂A;抗体,单克隆;细胞因子;单链抗体;分子克隆;基因表达

中图法分类号 R392.11

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39290700

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