DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.02.021

实验性慢性肾衰血浆及残肾脂质含量的动态观察

宋乃国 魏明竟 蒲晓允 (第三军医大学西南医院检验科) 630038

提 要 对Wistar大鼠5/6肾切除形成慢性肾衰(CRF)后的血浆脂质及残肾组织中甘油三酯(TG)、总胆固醇(T-Ch)和总磷酯(T-PL)进行了动态观察。结果显示:试验组残肾组织三种脂质在10 d均开始增高;TG、T-Ch含量在20 d开始明显高于同时相点对照组($P<0.01$、$P<0.05$);血浆TG、T-Ch水平与残肾组织TG、T-Ch增高顺序基本一致。脂质在残肾组织沉积情况经苏丹Ⅲ脂质染色被证实。揭示CRF早期在脂质代谢异常的同时残肾就开始伴随脂质沉积,沉积物以TG为主,血浆脂质水平检测有可能反映CRF早期脂质加速肾损伤的情况。

关键词 肾功能衰竭,慢性;甘油三酯类;胆甾醇;磷酸类;肾/损伤

中图法分类号 R692.5

脂质代谢异常在动脉血管粥样硬化(AS)中的作用已受到公认。慢性肾衰(CRF)病人随着透析技术的发展、肾移植的成功及新药疗效的提高,同时伴有心血管合并症的发病率也上升,显然与致AS因子有关[1,2]一些学者[3,4,5]围绕着晚期肾病的脂质代谢与心血管病并发症的关系进行了研究,但对脂质代谢与肾脏损伤的报告甚少。因此,我们对Wistar鼠5/6肾切除,CRF形成后的血脂和残肾组织脂质进行了观察,并对脂质组份在CRF早期残肾组织和血液中的分布状态及升高、降低的先后顺序,与残肾脂质损伤的发生,发展规律及相互间的关系进行了探讨。

1 材料与方法

选择雌雄比相等,体重290±3 g Wistar鼠110只(由本校动物所提供),分为5/6肾切除组为试验组(60只),假手术组对照组(50只)。血浆脂质水平动态观察共设10、20、30、40 d四个时相点,残肾组织脂质水平动观察共设10、20、40 d三个时相点,每个时相点试验组、对照组分别为雌雄相等各8、10只鼠。CRF模型制做参考Stimer和Luquita法[6,7]。试验组、对照组同时做第一次、第二次手术,试验组第一次手术切左肾2/3,在10天后第二次手术切右肾全部,对照组只做切口手术,两组其它条件一致。

1.1 样品采取

对照组10只鼠待第二次手术麻醉苏醒2 h后,从心脏抽血制备血浆及分离肾脏为零天基础对照组样品,然后待试验组和对照组第二次手术后,在以上不同时相点从心脏抽血制备血浆和获取肾脏(另外,多取试验组4只鼠残肾做为病理学监测和脂质沉积鉴定用)为不同时相点试验组和对照组样品。

每时相点试验组剩下的3只鼠,以补足试验途中死亡和手术失败的缺额。Wistar鼠全部由本校动物所提供普通大颗粒饲料喂养,每公斤饲料含蛋白质61.3 g、脂肪52.5 g、糖270 g,自由进食饮水。

1.2 肾组织脂质测定

将获得的试验组和对照组的肾脏去掉被膜,剪去肾门部位的动、静脉血管。再把对照组肾脏修切成试验组残肾大小后,天秤称量。再分别将样品置匀浆器中研磨10 min。脂质提取采用Rose法[8]甘油三酯(TG)、总胆固醇(T-Ch)和总磷脂(T-PL)测定同下面血浆测定方法。结果按每克肾组织含μmol报告(μmol/g)。

1.3 血浆脂质测定

TG、T-Ch、PL-P、尿素、Cr等各项目的试剂盒均由北京中生公司提供,操作严格按规定进行。在每批样品测定同时加入5份质控样品做批内及批间质控。

残肾组织病学监测,采用HE染色,光镜观察。脂质沉积鉴定,采用苏丹Ⅲ染色法。所用仪器,Monarch-2000全自动生等化分析仪。统计学分析,采用t检验,直线相关分析。

* 军队医学人才基金班学员,北京军区255医院(063000)

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

2 结果

2.1 各时相点肾功能检测(见表1)

表1 实验性慢性肾衰鼠血浆尿素及肌酐浓度变化

Tab 1 Plasma concentration of urea and creatinine in wistar rat with 5/6 nephrectomy and sham operation

		Time (d)				
		0	10	20	30	40
Urea (mmol)	sham operation	8.59±2.95	8.74±2.37	8.43±3.14	8.67±3.00	8.44±2.94
	5/6 nephrectomy		27.94±2.47△	22.02±2.34△	18.30±4.64△	21.10±4.82△
Cr (μmol/L)	sham operation	101.54±28.43	98.34±24.32	100.00±26.14	96.47±21.33	108.47±26.46
	5/6 nephrectomy		301.85±19.65△	223.20±21.85△	195.47±22.30△	214.33±23.37△

△: $P<0.001$, *vs* Sham operation

2.2 残肾经病理组织形态学监测显示

在10 d残肾间质有单核细胞浸润;在20 d肾间质有大量的单核细胞浸润和充血;在30 d肾近区小管细胞开始脱落和变性,小管内可见透明管型间质可见纤维;在40 d肾小管扩张伴有透明管型,肾小球充血、萎缩和动脉壁膜增厚,间质明显炎症和纤维化。残肾苏丹Ⅲ脂质染色显示:在20 d肾皮质可见脂质沉积,在40 d肾髓质小管及上皮有明显脂质沉积。

2.3 试验组残肾组织TG、T－Ch和T－PL的含量(见表2)

表2 实验性慢性肾衰鼠残肾组织脂质含量变化

Tab 2 The TG, T－Ch and T－PL content of kidney in wistar rat with 5/6 enphrectomy (experment) and sham operation (control)

Time (d)	TG (μmol/g)		T－Ch (μmol/g)		T－PL (μmol/g)	
	controls	experments	controls	experments	controls	experments
0	21.07±7.41		84.14±12.93		102.40±28.57	
10	20.42±6.94	24.37±7.14	86.28±11.89	89.33±15.91	101.94±29.35	102.73±31.19
20	19.87±8.64	31.29±4.81△△	89.94±16.06	104.71±10.65△	105.15±30.94	109.00±35.50
40	23.19±6.8	243.54±6.78△△△	91.14±15.54	111.73±17.92△△	103.96±30.47	136.96±31.79△

△: $P<0.05$, △△: $P<0.01$, △△△: $P<0.001$, *vs* controls

2.4 血浆中TG、T－Ch、T－PL含量(见表3)

表3 实验性慢性肾衰鼠血浆脂质水平变化

Tab 3 Plama concentration of TG, T－Ch and PL－P in wistar rat with 5/6 nephrectomy and sham operation (mmol/L)

		Time (d)				
		0	10	20	30	40
TG	sham operation	0.84±0.54	0.85±0.41	0.83±0.34	0.81±0.47	0.81±0.44
	5/6 nephrectomy		0.97±0.34	1.18±0.27△	1.44±0.39△△	1.56±0.46△△
T－Ch	sham operation	1.97±0.49	2.00±0.35	1.99±0.40	1.94±0.34	1.96±0.56
	5/6 nephrectomy		1.94±0.31	2.35±0.40	2.41±0.54△	2.54±0.48△
T－PL－P	sham operation	1.24±0.45	1.31±0.44	1.25±0.43	1.27±0.41	1.28±0.41
	5/6 nephrectomy		1.25±0.41	1.36±0.53	1.54±0.64	1.72±0.68

△: $P<0.05$, △△: $P<0.01$, *vs* sham operation

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

2.5　血浆 TG、T－Ch、T－PL 批内、批间质控显示

批内CV值分别为2.47%～2.67%、1.59%～1.69%、8.14%～9.00%，批间 CV 值分别为2.68%、1.64%、8.66%。

3　讨论

自实验组鼠5/6肾切除后，血浆 Cr、尿素水平在10 d 时相点出现高峰值，然后逐渐下降，在30 d 下降最低，但仍非常显著高于同时相点对照组（$P<0.001$），在40 d 又开始升高与文献最初时相点4周开始升高相一致[9]。说明肾功能经历急性肾损伤期逐渐发展为 CRF 期的过程。本模型亦经肾功能动态监测和病理组织学动态观察确认。另外除实验组60只鼠中，中途死亡4只（占6.6%）外，其余无1例死亡或手术失败。本文批内，批间质控变异度范围 CV＝2.47%～9.00%。PL 测定变异度最大，批内质控最大变异度 CV＝9.00%，批间 CV8.66%，均在质控可行范围，说明测定方法稳定，结果准确。

早在70年代末 Imaiiy 等人[10,11]发现用高 Ch 和脂肪喂养的 Sprague－Dawley 鼠，所致的高脂血症，能使肾组织泡沫细胞增高，肾小球系膜增生，单核/巨噬细胞增高，同时有与主动脉硬化相似的多价不饱和脂肪酸及花生四烯酸下降。另外在有Ⅰ型糖尿病特征 Zucker 肥胖大鼠的研究中发现，可出现明显的进行性肾损伤和蛋白尿。其受损的肾小球主动脉和全身 AS 极为相似[11]。从而说明外源及内源性的高脂血症，均可能造成动脉和肾小球损伤。本文对 Wistar 鼠5/6肾切除 CRF 形成后，血浆脂质水平、残肾组织脂质含量均有不同成度的增高，并经苏丹Ⅲ脂质染色证实，在20 d 肾皮质可见脂质沉积；在40 d 肾髓质小管及上皮有明显脂质沉积。与上述外源性长时间致高脂血症肾损伤结果一致。从而提示，CRF 早期，由于内源性脂质代谢异常出现高脂血症的同时，伴随着脂质在残肾的沉积和加速病肾损伤。其原因，Marsh 和 Drabkin 在1960年认为因大量的蛋白丢失，肝脏反应性脂质生产增加，脂质转化酶系活性下降[9,12]等造成高脂血症再引起脂蛋白分子核心脂质转运增强等系统协同完成[13]。另经实验证实，体内出现结构和功能异常的极低密度脂蛋白（VLDL）和乳糜微粒残余物（包含胆固醇的 β－VLDL），β－VLDL 能降低载脂蛋白 B 和 E 受体增加巨噬细胞在内皮的粘附，并导致泡沫细胞形成。通常血清中 VLDL－TG 和 VLDL－Ch 增高后，血清中多数胆固醇与 VLDL 而不与 HDL 交联，这种交联后的颗粒与 β－VLDL 极为相似，它不仅能促单核/巨噬细胞聚集，泡沫细胞的形成，而且很容易渗于动脉壁内使更多的 Ch 进行动脉壁及系膜区，并和基膜发生反应，改变肾小球的功能。

残肾组织脂质与血浆脂质增高的顺序基本一致。残肾组织与血浆 TG、T－Ch 相关分析呈显著性正相关（TG $r=0.99$，T－Ch $r=0.97$）。从而表明 CRF 早期血浆脂质水平检测，能早期反应出脂质加速肾损伤情况，尤以血浆 TG 水平增高，可能成为最早反应脂质肾损伤的首选指标。从残肾组织 TG 含量与其它两种脂质比较，增高出现的最早，增高的比例最高，并远远高于血浆的增高比例中分析表明，CRF 早期脂质沉积不同于动脉以 Ch 为主体沉积物，而是以 TG 为主。

4　结　语

本文对 Wistar 鼠肾切除后，实验性 CRF 早期病肾组织及血浆脂质水平动态研究提示，CRF 早期随着脂质异常代谢，同时残肾组织伴有脂质沉积，沉积物不同于主动脉以 Ch 为主，而以 TG 为主，其原因可能是，Ch 与 VLDL 的异常交联或载质蛋白异常，泡沫细胞数量比主动壁多，而造成脂肪异常沉积的结果。血浆 TG、T－Ch 水平与残肾组织含量呈完全正相关，血浆脂质水平检测可反应出脂质肾损伤的情况，尤以血浆 TG 首先增高，有可能成为反应脂质肾损伤最早指标。

参考文献

1 Hughes TA, Gaber AO, Amiri HS et al. Lipoprotein composition in insulin－dependent diabetes mellitus with chronic renal failure: effect of kidney and pancreas transplatation. Metabolism, 1994 Mar; 43(3): 333～347

2 Samuelsson O, Aurell M, Knight Gibson C. Apolipoprotein－B－Containig lipoproteins and the progression of renal in sufficience. Nephron, 1993; 63(3): 279～285

3 Chan MK. Lipid metablin in renal faibure. Clin Biochem, 1990; 23: 61～65

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

4 野浩司,山口洋.冠动脉疾患,にポけみリポ蛋白(a)の动脉硬化形成.医学のあゆわ,1994;3(12):999～1002

5 Bargagallo CM, Averna MR. Sparacino V et al. Lipoprotein (a) levels in end－stage renal failure and renal transplantation. Nephron,1993;64(4):560～564

6 Stemer G, Wennberg A. Poartal nphrectony and chronic renal failure. the "adult" rat model. Contr Nephrol,1988;60:39

7 Lupuita A, Dominighini A, Rasia R et al. Erythrocyte rheology in standarized expermental chronic renal failure. Clinical Hemorhcology,1994:169～199

8 Bertram H, Lubin frans A. Analysis of red cell membranelipids. Stephen B, shohet narla mohandas, eds Red cell Membranes, New York,1988:169～199

9 Bagdade JD, Yee E, Wllson DE et al. Hyperlyceride production, and tissue lipoprotein lipase in chronycally uremic rat model. J Lab Clin Med,1978:Jan 176～186

10 Imai Y, Matsumura H. Serum and tissue lipids and glomerulonephritis in the spontaneously hypercholesteolemic (shc) rat with a note on the offects of conadectomy.

11 Peric－Golia L, Peric－golia M. Aortic and renal lesions in Hypercholesterolemic adult, male, virgin Sprague－Dawley Rats. Atherosclerosis,1983;46:57～65

12 Appel GB, Valeria Appel AS. The hyperlipidmia of the nephrotic syndrone. Am J Med,1989;87(5):45～51

13 Eisenberg S, Heiss G, Friedlander Y. Comparison of plama lipids lipoprotein and dyslipoproteinemia in Israel and the Vnited State Atherosclerosis,1986;59:63

(收稿:1994-10-05;修回:1995-02-28)

The dynamic observation of lipid contents in plasma and residual kidney of experimental chronic renal failure

Song Naiguo, Wei Minjing, Pu Xiaoyong (Central Lab, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The abnormalities of lipid metabolism were observed in the early stage of chronic renal failure in rats which had been inflicted with the resection of 5/6 of the kidneys. It was found that levels of triglyceride (TG), total cholesterol (T－Ch) and total phospholipid (T－PL) of the residual renal tissue began to increase on the 10th day after subtotal nephrectomy and TG and T－Ch levels were significantly higher in the nephrectomized rats than in the control ($P<0.01$ and $P<0.05$ respectively) on the 20th day and T－PL level was significantly higher in the nephrectomized rats than in the control ($P<0.05$) on the 40th day. The increase of the plasma levels of TG, T－Ch and T－PL was similar to that of the residual renal tissue. Meanwhile, Sudan Ⅲ staining revealed there was accumulation of lipids in the residual renal tissue. These findings suggest that in the early stage of chronic renal failure, abnormal lipid metabolism is accompanied with the accumulation of lipids in the residual kidney particularly the accumulation of TG. It is believed that the determination of plasma levels of lipids can reflect the severity of renal damages resulting from the accumulation of lipids.

Key words kidney failure, chronic; triglycerides; cholesterol; phospholipids; kidney/IN

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