

一氧化氮合酶对早期内毒素休克猕猴肾脏的影响

马明 朱晓云 王立蓉 顾小军 殷国庆

【摘要】 目的 探讨早期内毒素休克肾脏损伤的发病机制。方法 猕猴 11 只,随机分成两组:对照组 5 只静脉注射生理盐水;实验组 6 只,静脉注射脂多糖(LPS)2.8 mg/kg。LPS 攻击后 120 min,处死动物,取肾脏标本,用免疫组化方法[卵白素-生物素-过氧化物酶法(ABC 法)]进行内皮型一氧化氮合酶(eNOS)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)染色,观察 eNOS 和 iNOS 在早期猕猴内毒素休克肾脏中的表达,同时观察肾脏超微结构的改变、酸性磷酸酶(ACP)活性变化。结果 LPS 攻击后 120 min,可见肾脏组织超微结构明显破坏和细胞内溶酶体数量增加。实验组 iNOS 在肾小球血管内皮、肾小管上皮、肾小球血管内和肾小管周围均有表达,对照组无表达。eNOS 在实验组和对照组的肾小球血管内皮及周围血管内皮细胞均有表达。结论 一氧化氮在猕猴内毒素休克早期肾脏损伤中发挥了重要作用。

【关键词】 休克,内毒素; 猕猴; 肾脏; 一氧化氮合酶; 酸性磷酸酶

Effects of nitric oxide synthases on kidney in early phase of endotoxic shock in macaque MA Ming, ZHU Xiao-yun, WANG Li-rong, GU Xiao-jun, YIN Guo-qing. Department of Medicine, The Second Hospital of Nanjing, Medical College, South-East University, Nanjing 210003, Jiangsu, China
Corresponding author: YIN Guo-qing

【Abstract】 Objective To study the pathogenesis of kidney injury in early-phase of endotoxic shock. **Methods** Eleven macaques were anesthetized and randomly divided into two groups: an experimental group ($n=6$), receiving a dose of 2.8 mg/kg lipopolysaccharides (LPS) by intravenous injection, and a control group ($n=5$), injected with normal saline of 1 ml/kg. The animals were sacrificed 120 minutes following endotoxin injection. With immunohistochemical technique endothelium nitric oxide synthases (eNOS) and inducible nitric oxide synthases (iNOS) protein of the renal tissue were determined. The ultrastructure was studied with electron microscope. Acid phosphatase (ACP) was also assayed. **Results** One hundred and twenty minutes after LPS challenge, damages to the glomerulus and renal tubules were found, and lysosomes were increased in the renal cells. iNOS was positively expressed in vascular endothelium of glomerulus and epithelium of renal tubules in the experimental group, but not in the control group. eNOS was positively expressed in vascular endothelium of glomerulus and peri-vascular region in both groups. **Conclusion** The present findings indicate that NO contributed to the pathogenesis of renal injury in the early phase of endotoxic shock in primates.

【Key words】 endotoxic shock; macaque; kidney; nitric oxide synthase; acid phosphatase

目前大量研究表明,内毒素休克时多种细胞因子及炎症介质参与了全身炎症反应引起的细胞自身破坏。一氧化氮(NO)是炎症介质“瀑布”样连锁反应的介质之一,同时又是血管活性物质,其过量释放在内毒素休克病理生理过程中起十分重要的作用,是导致器官功能衰竭的重要因素。近来,我们使用脂多糖(LPS)攻击建立早期内毒素休克猕猴动物模型,研究发现,内毒素休克早期表现为心功能下降、前炎性细胞因子表达增加^[1,2];在内毒素休克早期,

选择素介导的血管损伤在肺及肾脏损伤中发挥了重要作用^[3,4]。本研究是在以往实验基础之上,通过免疫组化方法观察内皮型一氧化氮合酶(eNOS)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)在早期内毒素休克猕猴肾脏中的表达,同时观察肾脏超微结构改变和酸性磷酸酶(ACP)活性变化,探讨 eNOS、iNOS 在早期内毒素休克肾脏损伤中的作用及发生机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料:实验用猕猴 11 只,年龄 5~8 岁,体重 4.8~9.2 kg,由中国科学院上海实验动物中心提供。LPS 由大肠杆菌 O127:B8 菌株产生并通过酚提取, Sigma 公司产品 (Lot: 63214010)。

1.2 猕猴内毒素休克模型制备及实验动物分组:将猕猴称重后仰卧固定,氯胺酮(15 mg/kg)肌肉注射后行气管插管,人工呼吸机通气。用 γ -羟丁酸和芬太尼静脉复合麻醉,实验过程中维持呼吸机参数

基金项目:江苏省卫生厅课题(TS9904);南京市医学科技发展专项基金资助项目(ZKG9809)

作者单位:210003 南京,东南大学医学院附属南京市第二医院内科

通讯作者:殷国庆,硕士研究生导师,教授,主任医师

作者简介:马明(1971-),男(汉族),四川西充人,硕士研究生,主治医师(Email:maming_1971@yahoo.com.cn)。

和给药滴数稳定不变。颈静脉内放置肺动脉漂浮导管(Swan-Ganz 导管,美国 Arrow Inc 公司提供),检测血流动力学参数;经皮朝腹主动脉方向做股动脉插管用于检测血压;经股静脉行静脉插管用于输液,具体方法见文献[1]的报道。实验组 6 只动物给予 LPS 2.8 mg/kg 静脉注射,60 min 后,平均动脉压(MAP)从 130 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)降至 85 mm Hg,予以生理盐水 5 ml/kg,继续观察到 120 min。对照组 5 只动物给予生理盐水 1 ml/kg 静脉注射,60 min 后再给予生理盐水 5 ml/kg,继续观察到 120 min。观察两组动物血流动力学、动脉血气和血尿素氮(BUN)的变化。

1.3 标本采集及检测方法:在 120 min 时处死动物,取各组猕猴动脉血和肾脏组织备用。

1.3.1 免疫组化方法〔卵白素-生物素-过氧化物酶法(ABC 法)]:标本用体积分数为 10%的甲醛固定,低温石蜡包埋,切片行苏木素-伊红(HE)染色,光镜观察。石蜡切片经二甲苯脱蜡,乙醇脱水,蒸馏水洗。以质量分数为 25%的胰酶消化 30 min,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,过氧化氢预处理 30 min,PBS 再洗,正常猕猴血清封闭 20 min,加入特异性一抗(鼠抗人 eNOS 和 iNOS 抗体),PBS 洗后加入二抗,PBS 洗,加 ABC 作用 30 min,清洗后 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,封片。玻片上棕黄色颗粒/斑块为阳性产物。

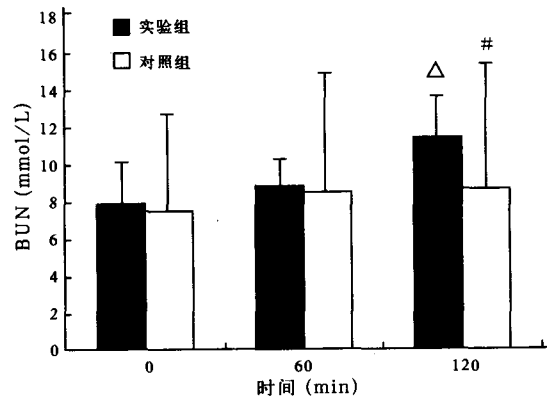
1.3.2 超微结构观察:肾脏标本固定于体积分数为 2.5%的戊二醛溶液中,按电镜常规制备标本,半薄切片定位后行超薄切片,醋酸铀-枸橼酸铅双染,用日产 H-600 电子显微镜观察。

1.3.3 ACP 细胞组化染色:①预固定:肾脏标本固定在 2%戊二醛溶液中。②漂洗:质量分数为 5%的蔗糖和 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.1)漂洗 1 h。③制作切片:用超薄切片机制作切片,厚度不超过 40 μm。④孵育反应:孵育液中含 40 mmol/L 三羟基甲基氨基甲烷(Tris,pH 5.2),8 mmol/L β-甘油酸钠和 2.4 mmol/L 枸橼酸铅,在室温孵育 60 min。⑤漂洗:用上述漂洗液漂洗数次,以除去样品中孵育液。⑥电镜观察:孵育后,固定于体积分数为 1%的锇酸中 10 min,环氧树脂包埋,超薄切片,不行染色,直接电镜观察。⑦阴性对照:为了证实检测的特异性,每个样本都设阴性对照,其所含 ACP 抑制剂为 10 mmol/L 氟化钠。

2 结果

2.1 两组动物 BUN 比较(图 1):实验前两组 BUN

差异无显著性;随着时间的延长,实验组动物 BUN 逐渐增高,120 min 时与 0 时比较差异有显著性。两组动物同时间点比较,实验组动物 120 min 时的 BUN 较对照组显著增高。



注:与同组 0 时比较:△ $P < 0.05$;与实验组同时间点比较: # $P < 0.05$

图 1 两组动物 BUN 比较

Figure 1 Comparison of BUN between two groups

2.2 肾脏 eNOS 免疫组化:实验组肾小球及周围血管内皮细胞存在表达很强的黄色阳性物(彩色插页图 2)。对照组肾小球及周围血管内皮细胞亦存在黄色阳性物表达(彩色插页图 3)。

2.3 肾脏 iNOS 免疫组化:实验组肾小球和肾小管上皮细胞呈强阳性,肾小球血管内和肾小管周围均存在表达很强的黄色阳性物(彩色插页图 4)。对照组未发现异常(彩色插页图 5)。

2.4 电镜下肾脏超微结构:实验组肾小球血管内皮细胞损伤,细胞渗出到球囊腔中,中性粒细胞与血管内皮黏附,上皮细胞发生足突变性,呈现高电子密度不均匀体,细胞器结构消失(彩色插页图 6)。对照组肾小球血管内皮细胞窗孔结构正常,上皮细胞足突结构正常,肾小球基底膜完整(彩色插页图 7)。

2.5 电镜下 ACP 细胞组化染色:实验组肾小管上皮细胞内有大量溶酶体,少数溶酶体破裂,进入细胞器内(彩色插页图 8)。对照组肾小管上皮细胞内溶酶体正常(彩色插页图 9)。

3 讨论

以往的内毒素休克研究多用大鼠、家兔为模型,以猴为模型报道很少。本研究中以猕猴为对象,静脉注射 LPS 制成内毒素休克模型。猕猴属灵长类动物,其实验结果能最大程度地反映人类的生理状态。

本研究结果表明:LPS 攻击后 120 min 动物血浆 BUN 增高;超微结构显示,猕猴肾脏肾小球血管内皮细胞损伤,中性粒细胞与血管内皮黏附,上皮细胞发生足突变性;而对照组受手术打击却无任何肾

脏损伤。表明在内毒素攻击猕猴后 120 min 肾脏就已发生超微结构可见的损伤,并已影响肾脏功能。

ACP 是众多溶酶体酶的一种,负责清除异体大分子和自身变性物质,为溶酶体酶的标志酶。生理情况下,溶酶体酶位于溶酶体内,不释放入胞浆。但在缺血、缺氧、酸中毒和细胞死亡时,溶酶体膜脆性和通透性增加,引起溶酶体酶释放,造成周围组织结构损伤。ACP 细胞组化染色是研究溶酶体最常用的方法。在家兔感染性休克和大鼠内毒素血症中,内毒素攻击后 120 min,心肌 ACP 阳性的溶酶体数量显著增加,溶酶体破坏^[5,6]。本研究中观察到,内毒素攻击后 120 min 猕猴肾小管细胞内 ACP 活性增强,少数溶酶体破裂,进入细胞器内。因此可以认为,灵长类动物肾小管细胞内溶酶体异常发生在脓毒症早期。

哺乳动物细胞内有 3 种一氧化氮合酶(NOS),分别为神经元型一氧化氮合酶(nNOS)、eNOS 及 iNOS。在生理状态下,eNOS 持续合成低浓度 NO (nmol 水平),通过抑制血小板聚集、中性粒细胞黏附以及调节微循环血管张力等,对机体产生保护作用^[7,8]。然而,近年来研究证实,eNOS 密切参与感染性休克病理生理过程。Szabo 等^[9,10]研究指出,在感染性休克中后期,eNOS 表达显著下调。生理状态下,未经诱导的细胞内 iNOS 表达水平很低,甚至不表达。在内毒素、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ -干扰素(IFN- γ)、白细胞介素-1(IL-1)等细胞因子刺激下,巨噬细胞、中性粒细胞、血管平滑肌及肝细胞等组织细胞内 iNOS 表达显著增高,释放大量 NO^[11,12],由此生成过量的 NO 是导致休克及组织损伤等病理过程的重要介质,且激活后除受 NO 产物抑制和底物可利用程度的限制外,几乎无其他调节机制。nNOS 来源于神经细胞,释放的 NO 主要作为神经递质调节神经细胞生物学功能,目前尚未证实与感染性休克有密切关系。

内毒素通过 NO 影响实验动物的血流动力学,过量的 NO 直接损伤肾脏^[13]。其肾损伤的可能机制是高浓度的 NO 与超氧化物反应,形成细胞毒性物质——过氧化氮(NO₂)自由基^[14]:①可溶性鸟苷酸环化酶在血管平滑肌大量释放,使血管麻痹过度扩张,导致低血压及对血管活性物质的低反应性;②引起血管通透性的增加,使得有效血容量进一步减少;③NO 促使淋巴细胞合成细胞因子,从而引起组织损伤;④与线粒体酶相互作用,具有细胞毒性;⑤引起 DNA 片段的断裂等。与 iNOS 作用不同,eNOS 被认为对机体具有保护作用。eNOS 的适量表达具

有调节血管张力、清除氧自由基、维持血管内皮功能及内环境稳定的作用。然而,NO 半衰期极短,要检测到特定组织内 NO 浓度十分困难。因此,研究者们通过观察组织内 eNOS、iNOS 表达情况,来间接推断 NO 反应量,探讨 NO 在器官损伤中的作用^[14-18]。在内毒素休克早期肾脏损伤的研究中,观察肾脏内的 eNOS 和 iNOS 蛋白表达有重要意义。

免疫组化定位研究显示,eNOS 蛋白主要在肾小球毛细血管、入球和出球小动脉、肾内动脉和肾髓质直血管的内皮细胞中^[15]。我们发现在 LPS 攻击猕猴前及攻击后 120 min,肾小球及周围血管内皮细胞均存在较强 eNOS 表达。提示在内毒素休克早期并未出现 eNOS 表达下降。我们曾报道过糖尿病酮症酸中毒家兔脑内 iNOS 的作用^[16],而对 iNOS 在肾脏的存在部位争论则较大。虽然啮齿类动物正常肾组织中有 iNOS 表达^[17],但先后有两位作者报道在人类正常肾组织中几乎无 iNOS 表达^[18]。Buttery 等^[19]报道,内毒素攻击后 3 h,大鼠许多组织内的 iNOS 免疫产物增加,包括心、肺、肾。我们在对照组猕猴肾脏中也未见到 iNOS 表达;而 LPS 攻击后 120 min 即见到猕猴肾脏肾小球和肾小管上皮细胞、肾小球血管内和肾小管周围有 iNOS 强表达。因此我们认为,iNOS 在 LPS 攻击猕猴后 120 min 所出现的早期肾脏损伤中发挥了重要作用。最近的研究也表明 NOS 与肾脏病变密切相关^[20,21]。Kashem 等^[18]报道,在患者肾脏内 iNOS 表达增高的同时,可以发现肾脏内实质细胞和血管损伤,iNOS 表达与肾脏损伤密切相关。本研究中发现,LPS 攻击猕猴 120 min 后肾脏中 iNOS 和 eNOS 表达增加,此时肾脏内溶酶体增多、破坏,肾实质细胞和肾小球血管超微结构损伤。因此我们推测:iNOS 表达增加引起 NO 大量合成,导致肾脏实质细胞、肾小球血管损伤,NO 和细胞内溶酶体异常共同参与内毒素休克早期的肾脏损伤。

参考文献:

- 1 Yin G Q, Qiu H B, Du K H, et al. Endotoxic shock model with fluid resuscitation in Macaca mulatta [J]. Lab Anim, 2005, 39: 269-279.
- 2 Ji X H, Sun K Y, Feng Y H, et al. Changes of inflammation-associated cytokine expressions during early phase of experimental endotoxic shock in macaques [J]. World J Gastroenterol 2004, 10: 3026-3033.
- 3 冯艳红,黄茂萍,吴玉祥,等.内毒素休克猕猴早期肺损伤选择素的改变及意义[J].中国危重病急救医学,2005,17:752-755.
- 4 季红,朱小云,殷国庆.猕猴早期内毒素血症肾脏内选择素的变化[J].东南大学学报(医学版),2005,24:25-27.
- 5 Yin G Q, Du K H, Zhong B, et al. Membranous structure and

lysosomal changes of myocardium in rabbits infected with meningococcus through blood stream [J]. China J Pathophys, 1998, 14: 669 - 672.

- 6 Okada T, Zinchuk V S, Seguchi H. Lipopolysaccharide administration increases acid and alkaline phosphatase reactivity in the cardiac muscle [J]. Microsc Res Tech, 2002, 58: 421 - 426.
- 7 Denninger J W, Marletta M A. Guanylate cyclase and NO/cGMP signaling pathway [J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1411: 334 - 350.
- 8 Nathan C, Xie Q W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls [J]. Cell, 1994, 78: 915 - 918.
- 9 Szabo C, Mitchell J A, Thiemermann C, et al. Nitric oxide-mediated hyporeactivity to noradrenaline precedes the induction of nitric oxide synthase in endotoxin shock [J]. Br J Pharmacol, 1993, 108: 786 - 792.
- 10 Feihl F, Waeber B, Liaudet L. Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock [J]? Pharmacol Ther, 2001, 91: 179 - 213.
- 11 Andrew P J, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases [J]. Cardiovasc Res, 1999, 43: 521 - 531.
- 12 Gecejer M, Cattaruzza M, Wagner A H. Regulation of inducible nitric oxide synthases gene expression in vascular smooth muscle cells [J]. Gen Pharmacol, 1999, 1411: 334 - 350.
- 13 Albertini M, Lafortuna C L, Clement M G, et al. Effect of NO synthase inhibition on cardiovascular and pulmonary dysfunction in a porcine short-term model of endotoxic shock [J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2002, 67: 365 - 372.
- 14 郝刚. 内毒素休克兔血浆 NO 和 ET-1 水平的变化及相互关系 [J]. 中国病理生理杂志, 1998, 14: 23 - 25.
- 15 Bachmann S, Bosse H M, Mundel P. Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney [J]. Am J Physiol, 1995, 268: F885 - 898.
- 16 朱晓云, 顾小军, 常家宝, 等. 糖尿病酮症酸中毒兔血-脑脊液屏障的变化 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 175 - 178.
- 17 Morrissey J J, Mc Cracken R, Kaneto H, et al. Location of an inducible nitric oxide synthase mRNA in the normal kidney [J]. Kidney Int, 1994, 45: 998 - 1005.
- 18 Kashem A, Endoh M, Yano N, et al. Expression of inducible-NOS in human glomerulonephritis: the possible source is infiltrating monocytes/macrophages [J]. Kidney Int, 1996, 50: 392 - 399.
- 19 Buttery L D, Evans T J, Springall D R, et al. Immunochemical localization of inducible nitric oxide synthase in endotoxin-treated rats [J]. Lab Invest, 1994, 71: 755 - 764.
- 20 Baylis C. Nitric oxide deficiency in chronic renal disease [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2006, 62 Suppl 13: 123 - 130.
- 21 Wilcox C S. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005, 289: R913 - 935.

(收稿日期: 2005 - 12 - 08 修回日期: 2006 - 06 - 27)
(本文编辑: 李银平)

• 启事 •

第 13 届中国科技论文统计结果

2004 年中国科技期刊影响因子前 100 位中的医药学类期刊

排序	期刊名称	排序	期刊名称	排序	期刊名称	排序	期刊名称
4	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	41	中华内科杂志	58	中国实用护理杂志	85	中华精神科杂志
8	中华结核和呼吸杂志	43	中华放射学杂志	59	中华心血管病杂志	86	中国实用外科杂志
14	世界华人消化杂志	44	中华医院管理杂志	63	中华内分泌代谢杂志	89	中国肾脏病杂志
21	中华创伤骨科杂志	49	中华烧伤杂志	66	中华病理学杂志	90	中华医学杂志
25	中华护理杂志	50	中华妇产科杂志	67	中国危重病急救医学	91	中华糖尿病杂志
32	中华医院感染学杂志	51	中华检验医学杂志	68	中华肿瘤杂志	93	中国动脉硬化杂志
38	中华消化杂志	53	中华传染病杂志	69	遗传学报	94	中华外科杂志
39	中华儿科杂志	55	中华骨科杂志	80	中华神经外科疾病研究杂志	95	中国脊柱脊髓杂志
40	中华肝脏病杂志	56	中国呼吸与危重监护杂志	83	中华流行病学杂志		
		57	中华神经科杂志	84	中华耳鼻咽喉科杂志		

2004 年第 4 届百种中国杰出学术期刊

根据《中国科学技术期刊综合评价指标体系》，采用分层分析法，由专家打分确定了重要指标的权重，对各学科的每种期刊进行了综合评定，评出了第四届“中国百种杰出学术期刊”，其中，医药卫生类期刊有 22 种，分别为：北京大学学报医学报、中国危重病急救医学、中国药理学报、中国中西医结合杂志、中华病理学杂志、中华儿科杂志、中华耳鼻咽喉科杂志、中华放射学杂志、中华骨科杂志、中华护理杂志、中华检验医学杂志、中华结核和呼吸杂志、中华口腔医学杂志、中华内科杂志、中华神经科杂志、中华外科杂志、中华医学杂志、中华肿瘤杂志、WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY、中草药、中华流行病学杂志、中华医院感染学杂志。

一氧化氮合酶对早期内毒素休克猕猴肾脏的影响

(正文见421页)



图2 实验组肾脏中eNOS表达(免疫组化, ×400)
Figure 2 Expression of eNOS in kidney
in experiment group (immunohistochemistry, ×400)

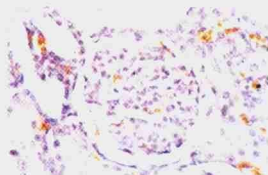


图3 对照组肾脏中eNOS表达(免疫组化, ×400)
Figure 3 Expression of eNOS in kidney
in control group (immunohistochemistry, ×400)



图4 实验组肾脏中iNOS表达(免疫组化, ×400)
Figure 4 Expression of iNOS in kidney
in experiment group (immunohistochemistry, ×400)

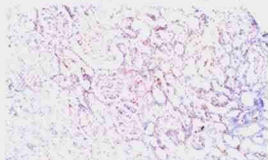


图5 对照组肾脏中iNOS表达(免疫组化, ×100)
Figure 5 Expression of iNOS in kidney
in control group (immunohistochemistry, ×100)



图6 实验组电镜下肾脏超微结构(醋酸铀-枸橼酸铅, ×4 000)
Figure 6 Ultrastructure of kidney by electron microscopy
in experiment group(uranyl acetate-lead citrate, ×4 000)

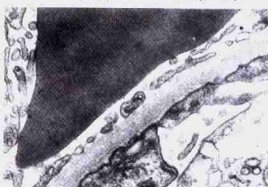


图7 对照组电镜下肾脏超微结构(醋酸铀-枸橼酸铅, ×6 000)
Figure 7 Ultrastructure of kidney by electron microscopy
in control group(uranyl acetate-lead citrate, ×6 000)

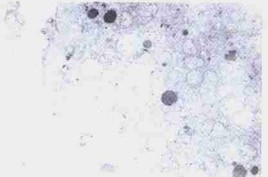


图8 实验组电镜下ACP活性变化(细胞组化, ×8 000)
Figure 8 Activity of ACP in kidney by electron microscopy
in experiment group(cytohistochemistry, ×8 000)

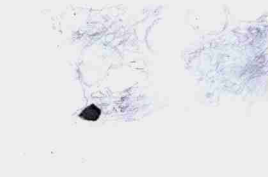


图9 对照组电镜下ACP活性变化(细胞组化, ×10 000)
Figure 9 Activity of ACP in kidney by electron microscopy
in control group(cytohistochemistry, ×10 000)