·论著·

高胆红素血症诱导氧化应激引起的大鼠肾小球损伤

刘惠　吕琳　褚海辰　祝琳　刘爱杰　董河
青岛大学附属医院麻醉科，山东青岛 266003
通信作者：董河，Email：donghe1987@163.com

【摘要】 目的 观察高胆红素血症对模型大鼠肾小球的影响，并探讨其量效反应及机制。**方法** 将 24 只成年雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为 4 组，每组 6 只。采用每 12 h 腹腔注射 1 次胆红素、共 4 次制备高胆红素血症大鼠模型，小、中、大剂量胆红素组（分别为 LB 组、MB 组、HB 组）剂量分别为 50、100、200 mg/kg；阴性对照组（NC 组）给予不含胆红素粉末的相同溶剂。各组给药结束后收集 24 h 尿液，检测总蛋白（TP）水平；处死大鼠取心脏血，用全自动生化分析仪检测总胆红素（TBil）和直接胆红素（DBil）水平；取肾组织，过碘酸希夫（PAS）染色后光镜下观察肾小球形态，并进行肾小球损伤评分；醋酸铀-枸橼酸铅双染后，透射电镜下观察足细胞形态；采用比色法检测氧化应激指标超氧化物歧化酶（SOD）活性和丙二醛（MDA）含量；采用蛋白质免疫印迹试验（Western blotting）检测足细胞特异性标志物肾母细胞瘤蛋白 1（WT-1）的表达水平。**结果** 随着胆红素剂量增加，大鼠 24 h 尿 TP、血 TBil、血 DBil、肾组织 MDA 含量逐渐升高，肾组织 SOD 活性和 WT-1 表达量逐渐降低，LB 组、MB 组、HB 组与 NC 组比较差异均有统计学意义〔24 h 尿 TP（mg）：24.85±2.22、52.57±3.66、56.84±3.49 比 7.50±1.33，血 TBil（μmol/L）：37.75±2.19、81.37±2.13、125.13±9.96 比 5.53±0.41，血 DBil（μmol/L）：15.50±1.96、37.88±1.05、64.53±2.89 比 2.38±0.35，肾组织 MDA（μmol/g）：3.14±0.65、5.01±0.28、7.50±1.08 比 2.30±0.20，肾组织 SOD（kU/g）：95.91±10.43、57.06±15.90、37.12±11.72 比 113.91±12.16，肾组织 WT-1 蛋白（WT-1/GAPDH）：0.280±0.006、0.239±0.006、0.198±0.001 比 0.361±0.005，均 $P<0.05$〕。光镜下显示，不同剂量胆红素各组大鼠肾小球系膜和基底膜厚度不均匀，部分伴有增生、增宽表现，且肾小球损伤评分随胆红素剂量增加而逐渐升高，LB 组、MB 组、HB 组与 NC 组比较差异均有统计学意义（分：17.50±1.05、25.00±1.41、34.00±1.41 比 11.67±0.82，均 $P<0.05$）；透射电镜下显示，随着胆红素剂量的增加，肾小球足细胞损伤也逐渐加重。**结论** 高胆红素血症可造成肾小球损伤，且呈剂量依赖性，在致死量范围内，剂量越高，损伤越严重，可能与胆红素通过促进氧化应激导致肾小球足细胞损伤有关。

【关键词】 高胆红素血症；　肾小球；　氧化应激；　足细胞
基金项目：国家自然科学基金（81902001）
DOI：10.3760/cma.j.cn121430-20210819-01228

Hyperbilirubinemia induced oxidative stress resulting in glomerular injury in rats

Liu Hui, Lyu Lin, Chu Haichen, Zhu Lin, Liu Aijie, Dong He
Department of Anesthesiology, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong, China
Corresponding author: Dong He, Email: donghe1987@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of hyperbilirubinemia on glomerulus of rats, and to explore its dose-response and mechanism. **Methods** Twenty-four adult male Sprague-Dawley (SD) rats were divided into four groups according to the random number table method, with 6 rats in each group. Hyperbilirubinemia rat model was reproduced by intraperitoneal injection of bilirubin once every 12 hours for 4 times, at doses of 50, 100, and 200 mg/kg in low, medium, and high dose bilirubin group (LB group, MB group, HB group), respectively. The rats in negative control group (NC group) were given the same solvent without bilirubin powder. Urine was collected 24 hours after administration, and total protein (TP) level was detected. Then the rats were sacrificed, the blood was collected by cardiac puncture, and the total bilirubin (TBil) and direct bilirubin (DBil) levels were measured by automatic biochemical analyzer. The renal tissue was collected and stained with periodic acid-Schiff (PAS) staine, the glomerular morphology was observed under light microscope, and the glomerular injury score was performed. Podocyte morphology was observed by transmission electron microscopy after uranium acetate and lead citrate double staining. The activity of superoxide dismutase (SOD) and content of malondialdehyde (MDA) were determined by colorimetric method. The expression level of podocyte specific marker Wilms tumor protein-1 (WT-1) was determined by Western blotting. **Results** With the increase of bilirubin dose, the contents of 24-hour urine TP, blood TBil, blood DBil and MDA content in kidney tissue were gradually increased, and the SOD activity and WT-1 expression in kidney tissue were gradually decreased. The differences between LB group, MB group, HB group and NC group were statistically significant [24-hour urine TP (mg): 24.85±2.22, 52.57±3.66, 56.84±3.49 vs. 7.50±1.33; blood TBil (μmol/L): 37.75±2.19, 81.37±2.13, 125.13±9.96 vs. 5.53±0.41; blood DBil (μmol/L): 15.50±1.96, 37.88±1.05, 64.53±2.89 vs. 2.38±0.35; kidney

MDA (μmol/g): 3.14±0.65, 5.01±0.28, 7.50±1.08 vs. 2.30±0.20; kidney SOD (kU/g): 95.91±10.43, 57.06±15.90, 37.12±11.72 vs. 113.91±12.16; kidney WT-1 protein (WT-1/GAPDH): 0.280±0.006, 0.239±0.006, 0.198±0.001 vs. 0.361±0.005; all $P < 0.05$]. It was shown under light microscope that uneven thickness of mesangial membrane and basement membrane of the glomerulus, and some of them were accompanied by hyperplasia and widening. The glomerular injury score increased with the increase in bilirubin dose. The differences between LB group, MB group, HB group and NC group were statistically significant (17.50±1.05, 25.00±1.41, 34.00±1.41 vs. 11.67±0.82, all $P < 0.05$). Transmission electron microscopy showed that with the increase of bilirubin dose, the damage of glomerular podocytes was aggravated. **Conclusions** Hyperbilirubinemia induced damage to glomerulus in a dose-dependent manner. In the lethal dose range, the higher the dose, the stronger the damage, which might be related to the oxidative stress promoted by bilirubin and the damage of glomerular podocytes.

【Key words】 Hyperbilirubinemia; Glomerulus; Oxidative stress; Podocyte
Fund program: National Natural Science Foundation of China (81902001)
DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210819-01228

高胆红素血症是危重病的一种常见症状，脓毒症诱导的胆汁淤积[1]、体外膜肺氧合（extracorporeal membrane oxygenation，ECMO）引起的溶血[2]、肝脏低灌注[3]、病毒性肝炎[4]等均会导致高胆红素血症。既往研究者大多观察胆红素对已有基础肾损伤患者肾功能的影响，然而有关胆红素对正常肾脏影响的研究则较少。有研究者发现，轻微升高的胆红素〔13.6～20.4 μmol/L（0.8～1.2 mg/dL）〕存在抗氧化性，对肾脏具有保护作用[5]；如胆红素水平较高则会增加氧化应激，破坏 DNA 链的完整性，诱导细胞凋亡。本课题组前期研究也表明，高胆红素血症具有促凋亡作用，并可加重肾脏缺血/再灌注损伤[6]。已有研究显示，严重高胆红素血症时，肾小球与肾小管均会受到不同程度损伤[7]。然而，目前对高胆红素血症引起肾小球损伤的机制仍不清楚。本实验旨在观察高胆红素血症对大鼠肾小球的影响，并探讨其量效反应及作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物：健康雄性成年 SPF 级 SD 大鼠 24 只，体质量 200～250 g，合格证号：SYXK（鲁）2015-0003，饲养于青岛大学中心实验室实验动物房，保持温度 20～25 ℃，正常饮食饮水，昼夜节律 12 h/12 h。本实验中所有操作均符合实验动物福利伦理原则，并通过青岛大学附属医院实验动物福利伦理委员会批准（审批号：AHQU-MAL20201117）。

1.2 主要药物、试剂及仪器：胆红素（纯度＞98%）购自美国 Sigma 公司；超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）比色法测试盒购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司；肾母细胞瘤蛋白 1（Wilms tumor protein-1，WT-1）抗体购自美国 Santa Cruz 公司；常规正置显微镜购自德国 Leica 公司；透射电镜购自日本 JEOL 公司；显影仪购自法国 Viber Lourmat 公司。

1.3 实验分组及模型制备：将 24 只大鼠按照随机数字表法分为阴性对照（negative control，NC）组、小剂量胆红素（low-dose bilirubin，LB）组、中剂量胆红素（medium-dose bilirubin，MB）组、大剂量胆红素（high-dose bilirubin，HB）组，每组 6 只。将胆红素粉末溶解在 0.5 mol/L NaOH 和 dH_2O 中，充分溶解至没有析出，并使用 0.5 mol/L HCl 将溶液 pH 值调整至 8.5[8]，胆红素溶液的最终浓度为 25 g/L。LB 组、MB 组和 HB 组每 12 h 腹腔注射 1 次胆红素，剂量分别为 50、100、200 mg/kg，共注射 4 次；NC 组腹腔注射不含胆红素粉末的相同溶剂。

1.4 样本采集：大鼠处死前 24 h 转入实验代谢笼，不禁食水，收集 24 h 尿液；用戊巴比妥钠麻醉大鼠后取心脏血，离心取上清液；取双侧肾脏，–80 ℃保存备用。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 肾功能测定：用实验代谢笼收集 24 h 尿液，记录总尿量后离心取上清液，用全自动生化分析仪检测尿总蛋白（total protein，TP）含量。按 40 mg/kg 的剂量腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉大鼠，取心脏血 4～5 mL，离心取上清液，应用全自动生化分析仪检测血总胆红素（total bilirubin，TBil）和直接胆红素（direct bilirubin，DBil）水平。

1.5.2 肾组织形态学观察：大鼠取血后迅速开腹取双侧肾脏，取一侧肾脏皮质脱水、固定、石蜡切片，过碘酸希夫（periodic acid-Schiff，PAS）染色，光镜下观察肾小球形态；每个切片随机选取 25 个肾小球进行评分，包括系膜基质扩张（无＝0 分，存在＝1 分），系膜血管溶解（无＝0 分，存在＝1 分）和系膜增生（每个系膜面积＞3 个细胞；无＝0 分，存在＝1 分），3 项评分总和即为肾小球损伤评分[9]。取另一侧肾

脏皮质用电镜固定液固定，醋酸铀-枸橼酸铅双染，透射电镜下观察足细胞形态；其余肾脏分装后于深低温冰箱保存。

1.5.3 氧化应激指标检测：取部分肾组织，加入磷酸盐缓冲液（phosphate buffer saline，PBS），匀浆 60 s，随后离心 10 min 取上清液，按试剂盒说明书测定 SOD 活性和 MDA 含量。

1.5.4 蛋白质免疫印迹试验（Western blotting）测定 WT-1 蛋白表达：取部分肾组织，提取总蛋白，使用 BCA 法测定蛋白浓度，确定上样量。使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE），选择恒压模式，电压为 100 V，电泳 90 min，使目的蛋白分离；通过转膜系统将目的蛋白转移至聚偏氟乙烯（polyvinylidene fluoride，PVDF）膜上，选择恒流模式，电流为 290 mA，转膜 90 min；转膜完毕后用封闭液封闭 2 h，洗膜，分别用兔抗鼠 WT-1 抗体（1∶500）和 3-磷酸甘油醛脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH；1∶5 000）孵育过夜；洗膜，用羊抗兔二抗（1∶8 000）室温孵育 1.5 h；洗膜后使用显影仪显影，用 Image J 分析软件分析条带，将目的蛋白灰度值与内参蛋白 GAPDH 灰度值进行对比，得出 WT-1 表达量。

1.6 统计学方法：应用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析。连续变量均符合正态分布，以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用单因素方差分析和 LSD-t 检验；双侧 $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结　果

2.1 各组大鼠肾功能生化指标比较（表 1）：在 48 h 内 4 次腹腔注射剂量分别为 50、100、200 mg/kg 的胆红素均可以成功制备高胆红素血症大鼠模型，且大鼠血中胆红素水平随注射剂量梯度升高。与 NC 组相比，LB 组、MB 组、HB 组大鼠的 24 h 尿 TP 含量及血 TBil、DBil 水平均随胆红素剂量增加而呈逐渐升高趋势，差异均有统计学意义（均 $P<0.05$），提示高胆红素血症大鼠模型制备成功，且呈现出一定的量效反应。

2.2 各组大鼠肾组织形态学比较

2.2.1 各组大鼠肾小球形态学改变及肾小球损伤评分比较：光镜下显示（图 1），NC 组大鼠肾小球系膜较完整，且基底膜厚度均一，未见明显病理损伤。与 NC 组相比，LB 组、MB 组、HB 组大鼠肾小球系膜和基底膜厚度不均匀，部分伴有增生、增宽表现，结合肾小球损伤评分结果（图 2），表明高胆红素血症各组大鼠肾小球均有不同程度损伤，且胆红素剂量越大，肾小球损伤越严重。

表 1　各组大鼠 24 h 尿 TP 含量及血 TBil、DBil 水平比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	动物数（只）	24 h 尿 TP（mg）	血 TBil（μmol/L）	血 DBil（μmol/L）
NC 组	6	7.50±1.33	5.53±0.41	2.38±0.35
LB 组	6	24.85±2.22^{a}	37.75±2.19^{a}	15.50±1.96^{a}
MB 组	6	52.57±3.66^{ab}	81.37±2.13^{ab}	37.88±1.05^{ab}
HB 组	6	56.84±3.49^{abc}	125.13±9.96^{abc}	64.53±2.89^{abc}

注：NC 组为阴性对照组，LB 组、MB 组、HB 组分别为小剂量（50 mg/kg）、中剂量（100 mg/kg）、大剂量（200 mg/kg）胆红素组；TP 为总蛋白，TBil 为总胆红素，DBil 为直接胆红素；与 NC 组比较，$^{a}P<0.05$；与 LB 组比较，$^{b}P<0.05$；与 MB 组比较，$^{c}P<0.05$

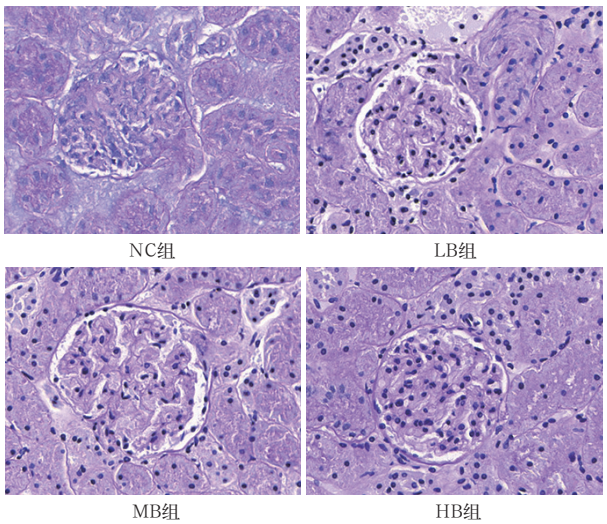
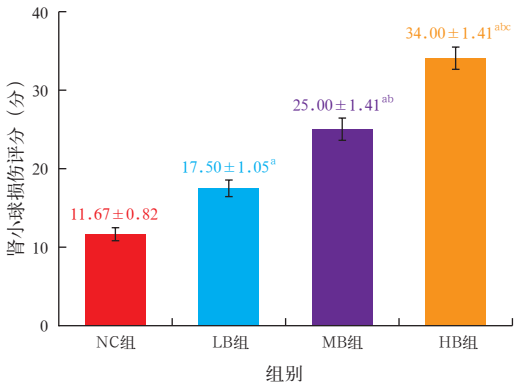


图 1 光镜下观察各组大鼠肾小球形态学改变　阴性对照组（NC 组）大鼠肾小球系膜较完整，且基底膜厚度均一；小剂量（50 mg/kg）胆红素组（LB 组）肾小球基底膜轻度皱缩；中剂量（100 mg/kg）胆红素组（MB 组）肾小球基底膜皱缩，系膜基质扩张；大剂量（200 mg/kg）胆红素组（HB 组）肾小球基底膜固缩，毛细血管袢压缩，系膜增生明显　PAS 染色　中倍放大



注：NC 组为阴性对照组，LB 组、MB 组、HB 组分别为小剂量（50 mg/kg）、中剂量（100 mg/kg）、大剂量（200 mg/kg）胆红素组；与 NC 组比较，$^{a}P<0.05$；与 LB 组比较，$^{b}P<0.05$；与 MB 组比较，$^{c}P<0.05$

图 2　各组大鼠肾小球损伤评分比较

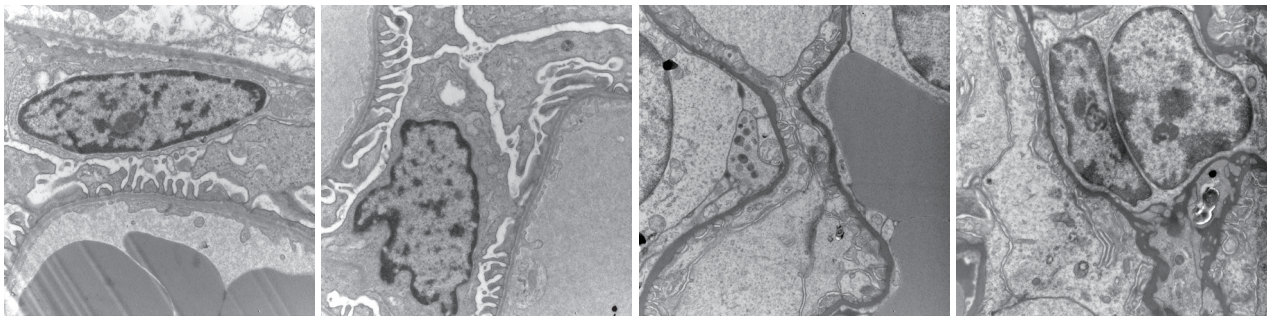
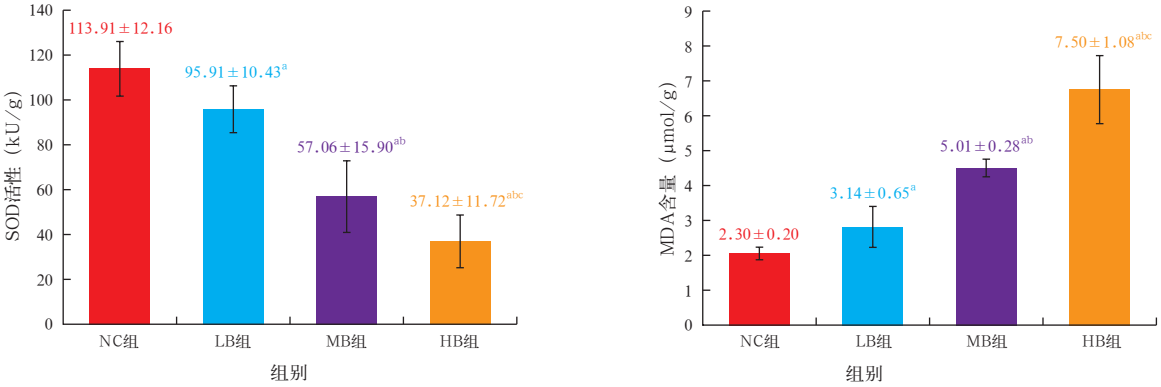


图 3 透射电镜下观察各组大鼠肾小球足细胞形态学改变 阴性对照组（NC 组）大鼠肾小球足细胞结构正常，足突完整、未见融合；小剂量（50 mg/kg）胆红素组（LB 组）肾小球基底膜轻度皱缩，足细胞足突阶段性融合；中剂量（100 mg/kg）胆红素组（MB 组）肾小球内皮细胞肿胀，足细胞足突融合；大剂量（200 mg/kg）胆红素组（HB 组）肾小球基底膜增厚，足细胞足突融合甚至部分消失 醋酸钠-枸橼酸铅双染 ×15 000



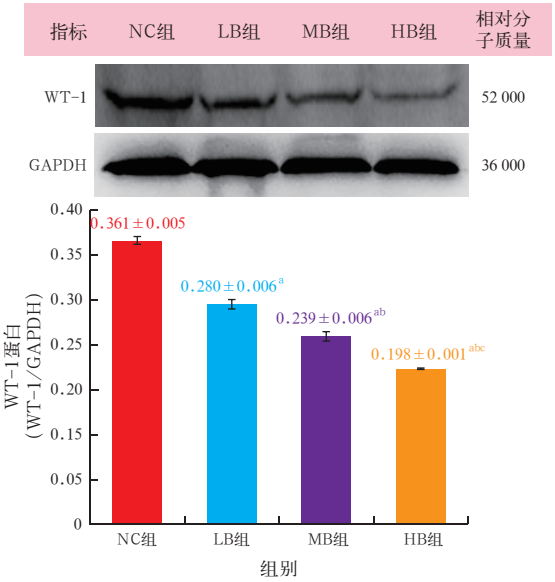
注：NC 组为阴性对照组，LB 组、MB 组、HB 组分别为小剂量（50 mg/kg）、中剂量（100 mg/kg）、大剂量（200 mg/kg）胆红素组；SOD 为超氧化物歧化酶，MDA 为丙二醛；与 NC 组比较，$^{a}P<0.05$；与 LB 组比较，$^{b}P<0.05$；与 MB 组比较，$^{c}P<0.05$

图 4 各组大鼠肾组织 SOD 活性（左）和 MDA 含量（右）比较

2.2.2 各组大鼠肾小球足细胞形态学比较（图 3）：透射电镜下显示，NC 组大鼠肾小球足细胞结构正常，足突完整、未见融合或消失。与 NC 组相比，LB 组、MB 组、HB 组大鼠足细胞均有不同程度损伤，且足突结构受损，出现足突融合、消失，线粒体水肿、出现空泡样变性，且胆红素剂量越大，足细胞损伤程度越严重。

2.3 各组大鼠肾组织中 SOD 活性及 MDA 含量比较（图 4）：与 NC 组相比，不同剂量胆红素组大鼠肾组织 SOD 活性均明显降低，MDA 含量均明显升高，且随着胆红素剂量增加，SOD 活性呈逐渐降低趋势，而 MDA 含量则呈逐渐升高趋势，差异均有统计学意义（均 $P<0.05$）。

2.4 各组大鼠肾组织 WT-1 蛋白表达量比较（图 5）：Western blotting 检测结果显示，与 NC 组相比，LB 组、MB 组、HB 组大鼠肾组织中 WT-1 蛋白条带逐渐变浅；定量分析结果显示，不同剂量胆红素各组 WT-1 表达量均较 NC 组明显降低，且随胆红素剂量增加逐渐降低，差异均有统计学意义（均 $P<0.05$）。



NC 组为阴性对照组，LB 组、MB 组、HB 组分别为小剂量（50 mg/kg）、中剂量（100 mg/kg）、大剂量（200 mg/kg）胆红素组；Western blotting 为蛋白质免疫印迹试验，WT-1 为肾母细胞瘤蛋白 1；与 NC 组比较，$^{a}P<0.05$；与 LB 组比较，$^{b}P<0.05$；与 MB 组比较，$^{c}P<0.05$

图 5 Western blotting 检测各组大鼠肾组织中 WT-1 的蛋白表达

3 讨 论

胆红素是血液中红细胞的血红素分解代谢的最终产物[10]，通过肝脏处理后，大部分形成胆汁排出体外。人体正常血清 TBil 水平为 1.7～17.1 μmol/L。正常情况下，体内少量的胆红素不会对机体造成损伤；当血清 TBil 水平超过正常参考值时，则诊断为高胆红素血症。

高水平的胆红素具有细胞毒性，可促进细胞凋亡[11-12]。凋亡细胞在分子水平发生一系列变化，包括 DNA 的片段化、细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻、线粒体膜电位下降和线粒体通透性增加、激活天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3（caspase-3）级联反应等。胆红素通过与线粒体膜的物理相互作用诱导线粒体去极化和凋亡相关蛋白 Bax 移位，诱导暴露于胆红素的神经元的线粒体凋亡途径[13]。游离胆红素通过其脂溶性沉积在神经细胞的脂质双分子层，从而引起神经元凋亡[14]。未结合胆红素由于其亲脂的特性，极易透过血脑屏障作用于脑细胞而引起脑损伤[15]。胆红素不仅表现出神经毒性，而且还表现出其他类型的细胞毒性[16]，如高水平胆红素能够通过诱导肺泡上皮细胞凋亡而引起肺损伤[17]。

关于胆红素对肾脏的影响，不同研究者持有不同的观点。有研究表明，胆红素通过抗氧化作用，可在一定程度上减轻肾损伤[18]。但也有研究者发现，高水平的胆红素能导致肾损伤，且肾损伤的病理严重程度与血清胆红素水平呈正相关[19]。另外，高胆红素血症是接受 CT 扫描后对比剂诱导急性肾损伤的独立危险因素[20]。本课题组前期研究也表明，高胆红素血症能引起肾小管上皮细胞凋亡增加[6]。

本研究中肾组织 PAS 染色结果显示，随着胆红素剂量的增加，肾小球损伤逐渐加重，表明高胆红素血症时，胆红素对肾小球造成了损伤。肾小球主要通过肾小球滤过膜发挥作用。足细胞是肾小球滤过膜的重要组成部分，起着维持肾小球滤过屏障的重要作用[21]。足细胞损伤时，裂孔孔径增大，容易导致蛋白尿的形成[22]。本研究中尿 TP 检测结果显示，随着胆红素剂量的增加，大鼠尿 TP 含量不断增加，且透射电镜下显示，肾小球足细胞的足突融合消失，表明高胆红素血症时胆红素造成大鼠肾小球损伤，可能与足细胞损伤有关。研究表明，WT-1 是足细胞的标志性基因，肾脏成熟后，WT-1 只在肾脏足细胞中表达[22]。WT-1 的减少可以从某些方面反映出肾脏足细胞的损伤，从而提示肾小球受损。本研究中 WT-1 表达量检测结果显示，不同剂量胆红素组大鼠肾组织 WT-1 表达量均明显低于 NC 组，且胆红素剂量越大，WT-1 表达量越低，表明高胆红素血症时胆红素很有可能降低了足细胞中 WT-1 的表达，从而证实胆红素造成肾小球损伤可能与足细胞损伤相关。

高胆红素血症是如何通过损伤足细胞从而对大鼠肾小球造成损伤的呢？有研究报道，高胆红素血症时，体内高水平胆红素抑制了抗氧化酶的活性，使细胞中谷胱甘肽减少，导致脂质过氧化、蛋白质氧化等[23]，从而引起机体氧化应激反应。氧化应激可以通过激活 p38 丝裂素活化蛋白激酶（p38 mitogen-activated protein kinase，p38MAPK）、caspase-3 等促进足细胞凋亡，从而导致足细胞损伤；足细胞突起减少，裂孔孔径增大，导致血浆蛋白渗出至原尿中形成蛋白尿[22]。本实验结果显示，不同剂量胆红素组大鼠 24 h 尿 TP 含量明显高于 NC 组，且注射胆红素后，大鼠肾组织 SOD 活性降低、MDA 含量升高，表明体内过量的胆红素可能通过增加氧化应激损伤足细胞，从而造成肾小球损伤，这与其他有关胆红素增加氧化应激水平的研究结果一致[17]，但具体调节机制还需要深入探究。

综上所述，高胆红素血症可引起肾小球损伤，且随胆红素剂量增加，损伤程度逐渐加重，其作用机制可能与诱导氧化应激进而损伤肾小球足细胞有关。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 马晓春 . 应提高对脓毒症肝损伤的认识 [J]. 中华危重病急救医学 , 2013, 25 (4): 198-200. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.04.003.

[2] 李宏亮 , 孟超 , 朱曦 , 等 . 体外膜肺氧合应用于危重症患者的初步探讨 [J]. 中国危重病急救医学 , 2012, 24 (2): 86-89. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.02.008.

[3] 吕琳 , 姚婧鑫 , 高国栋 , 等 . 成人体外膜肺氧合支持过程中高胆红素血症的发生率、危险因素及结局 [J]. 实用临床医药杂志 , 2017, 21 (13): 56-60. DOI: 10.7619/jcmp.201713015.

[4] 车龙 , 牛殿吉 , 金福东 , 等 . 血浆吸附治疗高胆红素血症临床观察 [J]. 中国危重病急救医学 , 2006, 18 (1): 12. DOI: 10.3760/j.issn:1003-0603.2006.01.017.

[5] Park S, Kim DH, Hwang JH, et al. Elevated bilirubin levels are associated with a better renal prognosis and ameliorate kidney fibrosis [J]. PLoS One, 2017, 12 (2): e0172434. DOI: 10.1371/journal.pone.0172434.

[6] Yuan L, Liao PP, Song HC, et al. Hyperbilirubinemia induces pro-apoptotic effects and aggravates renal ischemia reperfusion injury [J]. Nephron, 2019, 142 (1): 40-50. DOI: 10.1159/000496066.

[7] 尹红 , 邝玉子 , 殷思纯 , 等 . 52 例新生儿高胆红素血症的肾功能改变 [J]. 中国医师杂志 , 2006, 8 (1): 110-111. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1008-1372.2006.01.057.

[8] 贾晓君 , 阴怀清 , 曹芳芳 , 等 . 高胆红素血症及胆红素脑病新生大鼠模型的建立与评价 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志 , 2018, 16 (15): 2142-2145. DOI: 10.12102/j.issn.1672-1349.2018.15.009.

[9] Uil M, Scantlebery AML, Butter LM, et al. Combining streptozotocin and unilateral nephrectomy is an effective method for inducing

experimental diabetic nephropathy in the 'resistant' C57Bl/6J mouse strain [J]. Sci Rep, 2018, 8 (1): 5542. DOI: 10.1038/s41598-018-23839-9.
[10] Demirogullari B, Ekingen G, Guz G, et al. A comparative study of the effects of hemin and bilirubin on bilateral renal ischemia reperfusion injury [J]. Nephron Exp Nephrol, 2006, 103 (1): e1-5. DOI: 10.1159/000090113.
[11] Rodrigues CM, Solá S, Silva R, et al. Bilirubin and amyloid-beta peptide induce cytochrome c release through mitochondrial membrane permeabilization [J]. Mol Med, 2000, 6 (11): 936-946. DOI: 10.1007/BF03401828.
[12] Grojean S, Koziel V, Vert P, et al. Bilirubin induces apoptosis via activation of NMDA receptors in developing rat brain neurons [J]. Exp Neurol, 2000, 166 (2): 334-341. DOI: 10.1006/exnr.2000.7518.
[13] Rodrigues CM, Solá S, Brites D. Bilirubin induces apoptosis via the mitochondrial pathway in developing rat brain neurons [J]. Hepatology, 2002, 35 (5): 1186-1195. DOI: 10.1053/jhep.2002.32967.
[14] Hankø E, Hansen TW, Almaas R, et al. Bilirubin induces apoptosis and necrosis in human NT2-N neurons [J]. Pediatr Res, 2005, 57 (2): 179-184. DOI: 10.1203/01.PDR.0000148711.11519.A5.
[15] Jiang ZD, Wilkinson AR. Impaired function of the auditory brainstem in term neonates with hyperbilirubinemia [J]. Brain Dev, 2014, 36 (3): 212-218. DOI: 10.1016/j.braindev.2013.03.003.
[16] Fujiwara R, Haag M, Schaeffeler E, et al. Systemic regulation of bilirubin homeostasis: potential benefits of hyperbilirubinemia [J]. Hepatology, 2018, 67 (4): 1609-1619. DOI: 10.1002/hep.29599.
[17] Cui J, Zhao HL, Yi B, et al. Dexmedetomidine attenuates bilirubin-induced lung alveolar epithelial cell death *in vitro* and *in vivo* [J]. Crit Care Med, 2015, 43 (9): e356-368. DOI: 10.1097/CCM.0000000000001035.
[18] 李静, 李洛华, 蒋红樱, 等. 胆红素在慢性肾脏病中的研究进展 [J]. 医学综述, 2020, 26 (4): 712-716, 722. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2020.04.017.
[19] 张新利, 肖昕. 新生儿高胆红素血症与脏器损害 [J]. 中国新生儿科杂志, 2007, 22 (4): 254-256. DOI: 10.3969/j.issn.1673-6710.2007.04.027.
[20] Wu YH, Wu CY, Cheng CY, et al. Severe hyperbilirubinemia is associated with higher risk of contrast-related acute kidney injury following contrast-enhanced computed tomography [J]. PLoS One, 2020, 15 (4): e0231264. DOI: 10.1371/journal.pone.0231264.
[21] Nicholas SB, Basgen JM, Sinha S. Using stereologic techniques for podocyte counting in the mouse: shifting the paradigm [J]. Am J Nephrol, 2011, 33 Suppl 1 (Suppl 1): 1-7. DOI: 10.1159/000327564.
[22] Liu F, Zong M, Wen XF, et al. Silencing of histone deacetylase 9 expression in podocytes attenuates kidney injury in diabetic nephropathy [J]. Sci Rep, 2016, 6: 33676. DOI: 10.1038/srep33676.
[23] 李涛. 全基因组 DNA 甲基化修饰在高胆红素血症致小鼠大脑损伤中的作用初探 [D]. 兰州: 兰州大学, 2020.

（收稿日期：2021-08-19）

· 科研新闻速递 ·

同种异体多能成体祖细胞治疗急性呼吸窘迫综合征：

一项多中心、随机、双盲、安慰剂对照的 1/2 期试验

近期，有学者进行了一项多中心临床研究，旨在了解同种异体多能成体祖细胞治疗急性呼吸窘迫综合征（acute respiratory distress syndrome，ARDS）的安全性和有效性。这是一项在英国和美国 12 个中心进行的 1/2 期临床试验。该研究共有 3 个研究队列，队列 1 和队列 2 分别评估 3 例 ARDS 受试者接受 3 亿个或 9 亿个同种异体多能成体祖细胞治疗后的早期安全性；队列 3 是一项随机、双盲、安慰剂对照的平行试验，受试者在 96 h 内分别输注 9 亿个同种异体多能成体祖细胞（n=20）或安慰剂（n=10）。主要评价指标为患者的安全性和耐受性；次要评价指标包括患者临床结局、生活质量（quality of life，QoL）和血浆生物标志物。结果显示：在 3 个队列中均未出现与细胞疗法相关的过敏或严重不良反应。在队列 3 的研究中，细胞治疗组患者 28 d 病死率为 25%，而安慰剂组则为 45%。细胞治疗组与安慰剂组的 28 d 无重症监护病房（intensive care unit，ICU）住院天数的中位数分别为 12.5（0，18.5）d 和 4.5（0，16.8）d，无机械通气天数的中位数分别为 18.5（0，22.0）d 和 6.5（0，18.3）d。细胞治疗组患者第 365 天 QoL 评分更高。研究人员据此得出结论：同种异体多能成体祖细胞治疗 ARDS 是安全的，但还需要开展更大规模的试验来评估其治疗效果和最佳的患者人群。

罗红敏，编译自《Intensive Care Med》，2022，48（1）：36-44

危重病幸存者的有氧运动能力：一项队列研究的二期分析

为了解重症监护病房（intensive care unit，ICU）幸存者的有氧运动能力及 ICU 患者器官衰竭严重程度与有氧运动能力之间的关系，比利时学者进行了相关研究。该研究是对一项队列研究（EPaNIC 队列）的二次数据分析。研究对象为 ICU 出院 1～5 年进行过心肺功能运动试验（cardiopulmonary exercise testing，CPET）的患者。研究人员将 ICU 存活患者（n=361）5 年的运动能力与历史定居人群进行比较，并进一步与人口学资料匹配的非 ICU 患者（对照组）进行比较。在进行过 CPET 的 ICU 幸存者中，运动能力异常被定义为峰值耗氧量（peak oxygen consumption，VO_2peak）＜85% 基于历史定居人群的预测峰值耗氧量。该研究还分析了影响患者有氧运动能力的相关因素。同时，研究人员建立了一个线性混合模型来分析患者器官衰竭严重程度〔ICU 住院期间最大序贯器官衰竭评分（maximal sequential organ failure assessment，SOFAmax）〕与有氧运动能力（VO_2peak）之间的关系。结果显示：37.7% 的 ICU 幸存者存在运动能力异常，明显高于对照组的 2.1%（P＜0.01）。ICU 幸存者的有氧运动能力低于对照组〔VO_2peak（mL·min^{-1}·kg^{-1}）：24.0±9.7 比 31.7±8.4，P＜0.01〕。肌肉问题是导致患者运动能力下降的主要因素（60.2%）。在整个随访过程中，SOFAmax 与 VO_2peak 独立相关。研究人员据此得出结论：危重病幸存者很容易出现有氧运动能力异常，而且往往与肌肉问题相关；患者 ICU 住院期间器官衰竭的严重程度与有氧运动能力下降独立相关。

罗红敏，编译自《Intensive Care Med》，2021，47（12）：1462-1471