

• 论著 •

环孢素 A 对糖尿病大鼠晚期肾脏病理学改变的影响

徐荣慧¹, 刘彦东¹, 韩会民¹, 韩笑², 白忠民¹, 庞金奎¹, 丰蔚娟¹, 蒋晓宇¹, 邱明才³, 朱崇贵³
(1. 黑龙江大庆第四医院内分泌科, 黑龙江 大庆 163712; 2. 北京大学人民医院; 3. 天津医科大学总医院)

【摘要】 目的 研究环孢素 A (CsA) 对链脲佐菌素 (STZ) 诱导糖尿病 (DM) 大鼠晚期肾脏病理学改变的影响。方法 将 30 只 Wistar 大鼠随机均分为正常对照组 (CON 组)、DM 组、CsA 组。一次性腹腔注射 STZ 55 mg/kg 制备 DM 大鼠模型; 喂养 28 周时给予 CsA 3 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 口服 6 周, DM 组不予治疗。各组大鼠同步喂养 34 周后处死, 取肾脏观察组织病理学改变, 免疫球蛋白 IgG、IgA、IgM 沉积, 核转录因子-κB (NF-κB) 和转化生长因子-β1 (TGF-β1) 的阳性表达及半定量分析。结果 STZ 诱导的晚期 DM 大鼠肾脏存在病理学损伤和功能异常, 免疫组化染色证实晚期 DM 大鼠肾脏有较多 IgG、IgA 和少量 IgM 沉积, NF-κB 和 TGF-β1 呈阳性表达; CsA 可减少肾脏免疫球蛋白沉积和细胞因子表达。半定量分析显示, DM 组 IgA、IgG 及 NF-κB、TGF-β1 吸光度值显著高于 CON 组, CsA 组虽显著高于 CON 组, 但明显低于 DM 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 糖尿病肾病的发生发展与高血糖、免疫球蛋白沉积及细胞因子表达关系密切, CsA 对其有保护作用。

【关键词】 糖尿病; 大鼠; 肾脏; 环孢素 A; 免疫球蛋白; 转化生长因子-β1; 核转录因子-κB

中图分类号: R587.1; R256.5 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.04.011

Effects of cyclosporin A on pathological changes in rats with advanced diabetic renal disorder XU Rong-hui*, LIU Yan-dong, HAN Hui-min, HAN Xiao, BAI Zhong-min, PANG Jin-kui, CHE Wei-juan, JIANG Xiao-yu, QIU Ming-cai, ZHU Chong-gui. * Endocrinology Department, Daqing Fourth Hospital, Daqing 163712, Heilongjiang, China

【Abstract】 Objective To study the effects of cyclosporin A (CsA) on pathological changes in rats with streptozocin (STZ)-induced diabetes mellitus (DM) and advanced renal disorder. Methods Thirty Wistar rats were randomly divided into normal control group (CON group), DM group and CsA group. Intra-peritoneal injection of STZ 55 mg/kg once was performed to prepare a DM model. All the rats were fed for 28 weeks, afterwards CsA 3 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ was given orally for 6 weeks in CsA group; in the other two groups, no treatment was applied. The rats in each group were synchronously fed for 34 weeks and afterwards they were sacrificed. The kidney histopathological examination, immunoglobulin IgG, IgA, IgM depositions, nuclear factor-κB (NF-κB) and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) positive expressions and semi-quantitative analyses were performed. Results In the kidney in rats with STZ-induced DM and advanced renal disorder, there were pathological changes and functional abnormalities; the immunohistochemical staining demonstrated that a relatively large amount of IgG, IgA and less amount of IgM depositions and NF-κB and TGF-β1 positive expressions were seen; the CsA could reduce the renal immunoglobulin depositions and the expressions of cytokines. Semi-quantitative analyses revealed that IgA, IgG and NF-κB, TGF-β1 absorbance were significantly higher in DM group than those in the CON group; although in CsA group, the above items were significantly higher than those in the CON group, they were obviously lower than those in the DM group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Conclusion The occurrence and development of diabetic nephropathy is closely related to the high blood glucose, immunoglobulin deposition and the expression of cytokines; the application of CsA has a protective effect on the renal disorder.

【Key words】 diabetes mellitus; rat; kidney; cyclosporin A; immunoglobulin; transforming growth factor-β1; nuclear factor-κB

糖尿病 (DM) 的慢性并发症累及人体各组织器官, 使患者的生活质量明显下降, 其中糖尿病肾病

(DN) 发生率已居终末期肾病的首位。目前国内外尚缺乏有效治疗手段来阻抑 DN 的发展, 因此, 研究 DN 的发病机制对预防和延缓 DN 的发展、降低其发病率具有重要意义。本研究中通过观察晚期 DM 大鼠肾脏病理学变化, 并使用环孢素 A (CsA) 进行干预, 探讨免疫抑制剂治疗 DN 的可行性。

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (D200832); 黑龙江大庆市科技攻关项目 (2009-094)

作者简介: 徐荣慧 (1971-), 女 (汉族), 黑龙江省人, 副主任医师, Email: yanhan512309@126.com.

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制备:选择体重(180±20)g Wistar 雄性大鼠(购自黑龙江省中医药大学实验动物科)30只。按随机数字表法分为CsA组、DM组、正常对照组(CON组)3组,每组10只。制模前禁食10h,采用一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司)55mg/kg的方法制备晚期DM大鼠模型,48h后取尾静脉血用血糖仪(美国雅培公司)测定随机血糖,2次血糖均>16.7mmol/L为制模成功。将成模大鼠长期饮水中加一定比例Na⁺、K⁺、Cl⁻、Mg²⁺,每日监测血糖指导应用优泌林70/30(美国礼来公司),将血糖控制在20~25mmol/L,防治DM大鼠出现急性并发症,使其寿命延长到最大程度,喂养24周时,按本课题组前期报告的方法检查已有明显白内障及神经、血管病变^[1-2]。CsA组于28周给予CsA(华北制药集团新药研发有限责任公司,国药准字H10940007)3mg·kg⁻¹·d⁻¹口服6周;DM组不给予其他治疗。饲养34周后处死各组大鼠,取肾脏组织备检。

1.2 组织病理学观察:经股动脉放血处死大鼠,迅速取部分肾组织以中性甲醛水溶液固定,常规脱水、包埋。分别进行:①苏木素-伊红(HE)染色:细胞核呈蓝色,细胞质呈淡红色。②Masson染色:肾脏组织胶原纤维呈绿色,胞核呈蓝色,红细胞呈橘红色。③PAS染色:切片经脱蜡、高碘酸氧化、洗涤、封片,肾小球及肾小管基底膜、糖原呈品红色,胞核呈蓝色。④免疫组化IgG、IgA、IgM及核转录因子-κB(NF-κB)、转化生长因子-β1(TGF-β1)染色:采用卵白素-生物素复合技术;肾组织IgG、IgA、IgM稀释比例分别为1:100、1:150、1:50;肾组织NF-κB、TGF-β1稀释比例分别为1:100、1:500;3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,Harris明矾苏木素复染,浸泡、脱水、封片。阳性反应结果为有免疫球蛋白沉积处的细胞以及细胞间质呈棕黄色,背景、胞质、胞核无棕黄色。每种免疫组化均设不加抗体的阴性对照,进行半定量分析,采用Image-Pro Plus 6.0软件对输入图像中的阳性反应部位进行吸光度(A)值分析,A值越高表明免疫组化信号越强。

1.3 统计学方法:应用SPSS 16.0统计软件,实验数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析和直线相关性分析,用LSD法进行各组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DM大鼠制模情况:全部大鼠符合DM标准,

制模成功,在制模及以后的饲养过程中,DM组死亡1只,CsA组死亡2只。

2.2 肾脏组织病理学观察

2.2.1 HE染色:光镜下CON组肾脏组织正常。DM组肾小球体积明显增大,系膜细胞及基质增生,可见弥漫性肾小球硬化和结节性肾小球硬化。偶见K-W结节,部分肾小球已明显萎缩,肾小管细胞破碎,刷状缘脱落,并可见空泡变性,肾小动脉管壁增厚,管腔狭窄。CsA组上述改变明显减轻。

2.2.2 Masson染色:CON组肾脏组织正常。DM组肾小球内绿色范围明显增多,呈纤维化趋势,鲍曼囊及肾小管外膜明显增厚;肾间质增厚,呈绿色,表明纤维化,肾小动脉平滑肌层显示出相似表现。

2.2.3 PAS染色:CON组肾脏组织正常。DM组肾小球内有明显糖原颗粒沉积,呈品红色,肾小球毛细血管壁、鲍曼囊及肾小管外膜明显增厚,肾小球毛细血管扩张。

2.2.4 肾脏免疫球蛋白免疫组化:CON组大鼠肾小球、肾小管上皮细胞和小管间质无阳性着色或着色很淡。DM组、CsA组大鼠肾小球、肾小管上皮细胞和肾小管间质均有明显的阳性沉积物,但较DM组有一定程度的减轻。表1显示,DM组和CsA组免疫球蛋白IgG、IgA的沉积均显著高于CON组(P 均<0.01),CsA组则明显低于DM组(P 均<0.01)。各组IgM仅有微量表达。

表1 各组大鼠肾脏免疫球蛋白及NF-κB、TGF-β1的免疫组化结果比较($\bar{x} \pm s$) A值

组别	动物数	IgA($\times 10^3$)	IgG($\times 10^3$)	NF-κB($\times 10^3$)	TGF-β1($\times 10^3$)
CON组	10	13.59±2.13	19.62±2.35	23.88±2.44	18.29±9.13
DM组	9	56.20±15.53 ^b	65.56±16.62 ^b	55.19±3.58 ^b	52.21±7.29 ^b
CsA组	8	37.30±8.34 ^{bc}	36.52±12.31 ^{bc}	27.76±2.62 ^{ac}	32.42±1.17 ^{ac}

注:与CON组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与DM组比较,^c $P < 0.01$

2.2.5 肾脏NF-κB、TGF-β1免疫组化:CON组大鼠肾小球、肾小管上皮细胞和小管间质无阳性着色或着色很淡。在TGF-β1免疫组化中,DM组、CsA组大鼠的肾小球、肾小管上皮细胞和间质均有明显的阳性棕色沉积物;而在NF-κB免疫组化染色中主要以肾小管表达为主,肾小球表达较低。表1显示,DM组和CsA组NF-κB、TGF-β1的沉积均显著高于CON组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但CsA组沉积处棕黄色较DM组明显减轻(P 均<0.01)。

2.3 肾脏免疫球蛋白沉积和细胞因子表达的相关性分析:直线相关分析显示,IgG与IgA沉积无显著

正相关($r=0.355, P>0.05$); 细胞因子 NF- κ B 与 TGF- β 1 表达无显著正相关($r=0.341, P>0.05$)。

3 讨论

肾脏是 DM 最常见的损伤器官之一, DN 经典的病理学改变为肾小球基底膜增厚和结节性肾小球硬化。随着肾脏活检的开展, 发现经典的 DN 病理学改变有一定的局限性, 2007 年美国国立肾脏病基金发表的《DM 及慢性肾脏病临床实践指南及专家建议》提出, 糖尿病肾脏疾病(DKD)替代 DM。DKD 包括传统的 DN 和非糖尿病肾病(NDRD), 如 IgA 肾病、系膜增生性肾小球肾炎、局灶节段性肾小球硬化、膜性肾病等。在本实验中发现, DM 大鼠肾脏病理学切片中不仅有肾小球硬化, 偶见典型的 K-W 结节, 也可见到系膜细胞增生、肾小管空泡样变性, 部分大鼠可见单核细胞、巨噬细胞、T 淋巴细胞及成纤维细胞等炎性细胞浸润。综合国内外 DM 肾活检病理学改变, 认为从病理学角度来说 DM 肾损害应分为 DN、DM 合并 NDRD 以及 DN 合并 NDRD。

本实验中 DM 组肾小球上皮细胞、肾小球系膜细胞、肾小管细胞以及肾间质中均有 IgG 和 IgA 沉积, 偶有少量 IgM 沉积; 免疫球蛋白沉积均显著高于 CON 组。Mekori 等^[3]报道 12 例以明显蛋白尿为主要表现的 DM 患者肾活检中, 9 例在肾动脉壁上有颗粒状 C3 沉积, 5 例发现 IgM, 1 例出现 IgA, 1 例出现 IgG 沉积; 并发现在肾小球基底膜、系膜细胞上以及肾小管基底膜有免疫球蛋白以及 C3 沉积。Miller 等^[4]研究发现, STZ 诱导 DM 大鼠血浆 IgA、sIgA 和循环免疫复合物 C3-IgA-CIC 水平明显增高, 且肾脏免疫荧光病理发现大量 IgA 沉积。Bohle 等^[5]报道 DN 患者肾小管间质中存在单核细胞、巨噬细胞、T 淋巴细胞及成纤维细胞。因此可以认为, 无论是体液免疫还是细胞免疫, DKD 应该是一类具有高血糖特征的免疫性肾病。

过去认为 DN 是一种与免疫炎症无关的疾病。随着基础和临床研究的深入, 证实 DN 与炎症关系密切。Dalla Vestra 等^[6]研究了一组 2 型 DN 患者, 发现不同时期 C-反应蛋白(CRP)、血浆淀粉样物质 A(SAA)、白细胞介素-6(IL-6)均明显升高。本实验中也发现, DM 组 NF- κ B 在肾组织中尤其在肾小管中的表达明显高于 CON 组, 与肾脏纤维化程度及肾脏损伤程度呈平行关系。NF- κ B 被称为前炎症介质转录因子, 其参与 DN 发生发展的可能机制为: ①DM 肾组织内 NF- κ B 参与各种炎症细胞因子、黏附分子、趋化因子的表达, 可促进单核细胞和中性粒

细胞与血管内皮细胞的黏附, 并诱导单核细胞趋化和激活单核细胞释放各种细胞因子, 加重炎症过程和肾脏损伤^[7-9]。②NF- κ B 可通过调节基质金属蛋白酶(MMP)促进肾小管基底膜增厚, 使肾小球硬化。③高血糖状态下, 肾素-血管紧张素系统(RAS)被激活, 使血管紧张素 I (Ang I) 增加, 继而激活 NF- κ B 发挥其致炎作用^[9]。

在本实验中, DM 组肾组织中 TGF- β 1 表达明显高于 CON 组, 且与 Masson 染色所表现的纤维化程度呈平行关系, 说明 TGF- β 1 在肾小球以及间质纤维化中起到了重要的促进作用。赖雄等^[10]通过对 2 型 DM 患者尿液 TGF- β 1 进行检测发现, DM 组 TGF- β 1 明显高于正常组, 并且随着尿蛋白阳性程度的增加而升高。Korpinen 等^[11]在 1 型 DM 患者尿液中也有相似的发现。TGF- β 1 参与 DN 发生发展的可能机制是: ①TGF- β 1 通过调节细胞周期, 促进肾小球细胞、上皮细胞、内皮细胞及近曲小管上皮细胞的 mRNA 及蛋白表达, 从而促进肾细胞肥大^[12]。②TGF- β 1 能促进肾脏细胞外基质的合成、积聚及沉积, 促进肾脏纤维化^[13-17]。③细胞凋亡在 DN 的发生中起重要作用, TGF- β 1 可通过丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)途径和 smad 途径诱导肾脏细胞的凋亡^[18]。④TGF- β 1 还可促进成纤维细胞和单核细胞的趋化, 介导炎性细胞在肾组织中的浸润, 导致间质纤维化, 从而促进肾小管间质病变的发生。

参考文献

- [1] 刘阳, 韩会民, 徐荣慧, 等. 中药解毒生肌膏对大鼠糖尿病足溃疡肌肉中细胞因子影响的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16(1): 49-51.
- [2] 吕雅丽, 梁龙彦, 刘阳, 等. 中药解毒生肌膏治疗大鼠糖尿病足的实验研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(4): 233-235.
- [3] Mekori YA, Steiner P, Farkash R, et al. Deposits of immunoglobulins and C3 in the walls of human renal arteries[J]. Clin Exp Immunol, 1981, 43(2): 254-259.
- [4] Miller LL, Izzo MJ, Wemett D, et al. Increased plasma IgA, sIgA, and C3-and IgA-containing immune complexes with renal glomerular deposits in diabetic rats[J]. Diabetes, 1988, 37(2): 185-193.
- [5] Bohle A, Wehrmann M, Bogenschutz O, et al. The pathogenesis of chronic renal failure in diabetic nephropathy; investigation of 488 cases of diabetic glomerulosclerosis[J]. Pathol Res Pract, 1991, 187(2-3): 251-259.
- [6] Dalla Vestra M, Mussap M, Gallina P, et al. Acute-phase markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(Suppl 1): S78-82.
- [7] Ha H, Yu MR, Choi YJ, et al. Role of high glucose-induced nuclear factor- κ B activation in monocyte chemoattractant protein-1 expression by mesangial cells[J]. J Am Soc Nephrol,

- 2002, 13(4), 894-902.
- [8] 王蜀鄂, 李竞, 甘佩珍, 等. 抑制核转录因子- κ B 活性对糖尿病大鼠肾组织血管内皮生长因子表达的影响[J]. 实用医学杂志, 2007, 23(4), 479-481.
- [9] 马强, 张勤. 肾素-血管紧张素系统致炎机制及其在 DN 发病中的作用[J]. 华南国防医学杂志, 2005, 19(6), 18-21, 42.
- [10] 赖雄, 余岸松. TGF- β 1 测定在 2 型糖尿病肾病早期诊断中的应用价值[J]. 中国热带医学, 2007, 7(4), 543-544.
- [11] Korpinen E, Teppo AM, Hukkanen L, et al. Urinary transforming growth factor-beta1 and alpha1-microglobulin in children and adolescents with type 1 diabetes [J]. Diabetes Care, 2000, 23(5), 664-668.
- [12] Wolf G, Ziyadeh FN. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy[J]. Kidney Int, 1999, 56(2), 393-405.
- [13] Wogensen L, Nielsen CB, Hjorth P, et al. Under control of the Ren-1c promoter, locally produced transforming growth factor-beta1 induces accumulation of glomerular extracellular matrix in transgenic mice[J]. Diabetes, 1999, 48(1), 182-192.
- [14] Chen S, Cohen MP, Lautenslager GT, et al. Glycated albumin stimulates TGF-beta 1 production and protein kinase C activity in glomerular endothelial cells [J]. Kidney Int, 2001, 59(2), 673-681.
- [15] McLennan SV, Martell SY, Yue DK. High glucose concentration inhibits the expression of membrane type metalloproteinase by mesangial cells; possible role in mesangium accumulation [J]. Diabetologia, 2000, 43(5), 642-648.
- [16] Suzuki D, Miyazaki M, Jinde K, et al. In situ hybridization studies of matrix metalloproteinase-3, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and type N collagen in diabetic nephropathy [J]. Kidney Int, 1997, 52(1), 111-119.
- [17] Brown RA, Sethi KK, Gwanmesia I, et al. Enhanced fibroblast contraction of 3D collagen lattices and integrin expression by TGF-beta1 and-beta3; mechanoregulatory growth factors [J]? Exp Cell Res, 2002, 274(2), 310-22.
- [18] Khera T, Martin J, Riley S, et al. Glucose enhances mesangial cell apoptosis [J]. Lab Invest, 2006, 86(6), 566-577.

(收稿日期: 2009-05-23)
(本文编辑: 李银平)

• 经验交流 •

连续性血液灌流救治百草枯中毒 31 例

胡瑞霞, 张青云, 李月兰, 李 静

(济宁医学院附属医院血液净化中心, 山东 济南 272029)

【关键词】 百草枯; 中毒; 血液灌流

中图分类号: R595.4 文献标识码: B DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.04.012

用血液灌流(HP)救治百草枯中毒 31 例, 报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料: 31 例均为急诊科抢救后住院患者, 有明确口服百草枯中毒史。男 10 例, 女 21 例; 平均年龄 24.5 岁; 口服量 5~40 ml; 中毒时间 1~12 h, 接诊时患者均清醒。

1.2 抢救方法: 在常规洗胃、利尿、保护心肝等重要脏器、抑制炎症、预防上消化道出血等对症治疗基础上进行 HP 治疗, 选用廊坊爱尔 ZX-260 型树脂吸附血液灌流器, 每 12~24 h 灌流 1 次, 每次 2 h, 连续 5 次。HP 前注意与患者或家属签订 HP 治疗协议书, 取得配合和理解; 常规检查血常规、血型、出凝血时间、肝肾功能等; 用肝素盐水冲洗管路。采用直接动静脉穿刺法建立临时性血管通路, 穿刺困难者可用股静脉留置双腔中心静脉导管。全身肝素化抗凝, 最好根据

试管法凝血时间调节肝素用量, 使体外循环凝血时间保持在 45~60 min。灌流开始时常规给予葡萄糖酸钙、葡萄糖、地塞米松, 以防灌流器吸附血液中的糖和钙而发生抽搐。根据患者血压和血管通路的情况, 灌流初始时血流量从 50 ml/min 逐步增至 150~200 ml/min。灌流过程中密切观察患者的生命体征、意识变化、瞳孔反应等, 保持呼吸道通畅, 观察血管路与灌流器有无疑血, 并随时做好各种记录。灌流结束后用空气回血, 以免被吸附的物质重新进入血液, 血流速减慢至 100 ml/min, 回血时应集中注意力, 以免发生空气栓塞。

1.3 结果: 31 例患者共进行 HP 治疗 155 例次; 治愈 30 例(96.8%), 自动出院 1 例; 均无任何不良反应发生。

2 讨论

百草枯经皮肤、胃肠道吸收后主要蓄积于肺组织, 通过产生氧自由基引起细胞膜脂质过氧化和细胞坏死, 导致多器官损害, 是引起中毒患者 3 d 内早期

死亡的主要原因, 晚期主要是由于肺纤维化引起呼吸衰竭而死亡。百草枯吸入血后对组织器官产生毒性的作用较晚, 如能迅速清除, 可最大限度避免组织损伤^[1]。我们采用连续性 HP 治疗, 每次 2 h, 连续 5 次就能有效清除已吸收到血液和组织中的百草枯。HP 还可清除分子量较大的毒素及炎症细胞因子, 尽快解除中毒症状, 提高中毒患者抢救成功率^[2]。因此, 对百草枯中毒应尽早行 HP 治疗, 重复实施可尽快去除体内毒物, 减少毒物再吸收, 使肺组织中毒物浓度维持在较低水平, 减轻了肺纤维化的发生发展, 提高了抢救成功率。

参考文献

- [1] 杜捷夫. 中毒与药物过量临床表现及救治(Internet 网上病例讨论)[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(7): 445-447.
- [2] 刘生. 血液灌流治疗百草枯中毒 16 例临床观察[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(6): 349.

(收稿日期: 2009-05-24)
(本文编辑: 李银平)

作者简介: 胡瑞霞(1966-), 女(汉族), 山东省人, 主管护师。