

[文章编号] 1000-4718(2006)11-2142-04

一氧化氮在肾缺血再灌注肾小球损伤中的作用

王新良¹, 王新颖², 王佩薇¹, 李洪娟¹, 黄善生³(¹河北医科大学第二医院儿科, 河北 石家庄 050000; ²河北医科大学沧州分校, 河北 沧州 061001;³河北医科大学病理生理学教研室, 河北 石家庄 050017)

[摘要] 目的: 探讨一氧化氮(NO)对肾缺血再灌注(ischemia-reperfusion injury, I-RI)时大鼠肾小球超微结构及负电荷位点的影响。方法: SD大鼠15只, 建立肾缺血再灌注模型, 动物随机分为5组: (1)假手术(sham)组($n=6$); (2)I-RI组($n=6$), 缺血前20 min舌静脉注入生理盐水0.3 mL; (3)SNP+I-RI组($n=6$), 缺血前20 min舌静脉注入2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 硝普钠(SNP); (4)AG+I-RI组($n=6$), 缺血前20 min舌静脉注入10 mg/kg 氨基胍(AG); (5)L-NNA+I-RI组($n=6$), 缺血前20 min舌静脉注入10 mg/kg L-硝基精氨酸(L-NNA)。以聚乙烯亚胺(PEI)为阳离子探针标记肾小球滤过膜负电荷位点, 透射电镜观察肾I-RI对大鼠肾小球超微结构及负电荷位点的影响。结果: (1) sham组电镜下见肾小球结构正常, 肾小球基底膜(GBM)外透明层负电荷位点(AS)清晰, 呈连续的规则点线状排列[(19.3 \pm 1.7)个/1 000 nm]。I-RI组肾小球足细胞足突有明显的融合现象; GBM外透明层AS排列稀疏[(16.6 \pm 1.0)个/1 000 nm, $P<0.05$], PEI颗粒小。(2)与I-RI组相比, 给予SNP使肾I-RI大鼠肾小球滤过膜上皮细胞足突融合现象加重, 肾小球GBM的AS[(11.7 \pm 3.2)个/1 000 nm]显著少于假手术组($P<0.05$), 且PEI颗粒的电子致密度也明显低于假手术组; 而AG的应用使I-RI大鼠肾小球滤过膜损伤减轻, 可见清晰的足突间隙; L-NNA+I-RI组大鼠肾小球上皮细胞足突融合也明显加重, 但和I-RI组相比, L-NNA+I-RI组大鼠GBM的AS数量[(14.7 \pm 0.9)个/1 000 nm]无显著差异($P>0.05$)。结论: 肾I-RI时出现肾小球上皮细胞足突融合、肾小球滤过膜的负电荷位点减少等病理性损伤, NO可加重这些损伤; 肾I-RI时肾小球滤过膜超微结构的损伤与NO的生成及其作用有关。

[关键词] 一氧化氮; 肾; 再灌注损伤**[中图分类号]** R692 **[文献标识码]** A

Role of nitric oxide in the development of glomerular ischemia reperfusion injury in rats

WANG Xin-liang¹, WANG Xin-ying², WANG Pei-wei¹, LI Hong-juan¹, HUANG Shan-sheng³(¹Department of Pediatrics, The Second Hospital of Hebei Medical College, Shijiazhuang 050000, China. E-mail: wangxl6502@yahoo.com.cn; ²Cangzhou Branch of Hebei Medical College, Cangzhou 061001, China; ³Department of Pathophysiology, Hebei Medical College, Shijiazhuang 050017, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effects of nitric oxide on ultrastructure and anionic sites of glomerular in renal ischemia reperfusion injured (I-RI) rats. **METHODS:** Animals were divided randomly into five groups: (1) sham group ($n=6$); (2) I-RI group ($n=6$), 0.3 mL normal saline was injected via venae lingualis 20 min before ischemia; (3) SNP+I-RI group ($n=6$), 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sodium nitroprusside (SNP) was injected via venae lingualis 20 min before ischemia; (4) AG+I-RI group ($n=6$), 10 mg/kg aminoguanidine (AG) was injected via venae lingualis 20 min before ischemia; (5) L-NNA+I-RI group ($n=6$), 10 mg/kg N^o-nitro-L-arginine (L-NNA) was injected via venae lingualis 20 min before ischemia. Anionic sites of glomerular were studied with a cationic probe-polyethyleneimine (PEI) and ultrastructure was observed under electron microscope in renal I-RI rats. **RESULTS:** (1) Ultrastructure of glomerular was normal and anionic sites (AS) was located clearly in lamina rare externa of GBM in sham rats. The PEI particles arranged regularly in line (19.3 \pm 1.7/1 000 nm) under electronic microscope. Obvious foot processes derangement and effacement were observed and the AS number in GBM of I-RI group was fewer (16.6 \pm 1.0/1 000 nm, $P<0.05$) and the particle was smaller than that in sham group. (2) Compared with I-RI group, the foot process effacement was aggravated in SNP+I-

[收稿日期] 2005-03-14 [修回日期] 2005-08-16

Tel: 0311-87222936; E-mail: wangxl6502@yahoo.com.cn

RI group and L-NNA + I-RI group. SNP caused the numbers of anionic sites reduced after renal I-RI ($11.7 \pm 3.2/1\ 000\ \text{nm}$, $P < 0.05$), and the electronic density of the PEI granule was also reduced. AG lead a increase in anionic site number ($17.8 \pm 1.0/1\ 000\ \text{nm}$, $P < 0.05$), but still fewer than that in sham group ($P < 0.05$). The numbers of anionic sites was not changed in L-NNA + I-RI group ($14.7 \pm 0.9/1\ 000\ \text{nm}$, $P > 0.05$). **CONCLUSION:** Foot process effacement and reduction of anionic sites were present in glomerular filtration membrane in renal I-RI rats. NO aggravated those injuries, indicating that NO plays a role in the ultrastructure damages of glomerular filtration membrane in I-RI rats.

[**KEY WORDS**] Nitric Oxide; Kidney; Reperfusion injury

肾缺血再灌注损伤 (ischemia-reperfusion injury, I-RI) 是临床上常见的病理过程, 可导致急性肾功能衰竭。以往研究证实, 肾 I-RI 可以造成肾小管上皮细胞损伤, 严重影响肾小管的功能, 而肾 I-RI 后有关肾小球的损伤及其机能障碍尚未引起人们足够的重视。我们以往的研究证实^[1,2], 肾 I-RI 后 NO 生成增多, 并且与肾组织损伤、肾小球滤过功能改变、尿蛋白增多有密切关系。本研究应用电镜和组化电镜技术观察肾 I-RI 对大鼠肾小球超微结构及负电荷位点的影响, 并观察改变肾组织 NO 的生成后肾 I-RI 大鼠肾小球超微结构和负电荷位点的变化, 为揭示肾 I-RI 时蛋白尿生成的机制, 提供肾小球滤过机能障碍的形态学依据。

材 料 和 方 法

1 实验动物及处理

健康雄性 Sprague Dawley 大鼠 30 只, 体重 250-300 g (河北省实验动物中心)。实验前 12 h 禁食, 自由饮水。25% 乌拉坦 6 mL/kg 腹腔注射麻醉动物, 维持直肠温度在 (37.0 ± 0.5) °C。输入 0.9% NaCl 溶液, 先以 $0.1\ \text{L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速率输入半个全血量的生理盐水, 再以 $0.2\ \text{L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速率维持液路, 以补充体液丢失并维持一定的尿量。夹闭左侧肾动、静脉, 缺血 45 min 后再灌注, 持续观察 5 h 以上。实验动物随机分为 5 组, 每组 6 只: (1) 假手术 (sham) 组, 不夹闭左侧肾动静脉, 其余处理同前; (2) I-RI 组, 缺血前 20 min 舌静脉注入生理盐水 0.3 mL; (3) SNP + I-RI 组, 缺血前 20 min 舌静脉注入 $2.5\ \mu\text{g}/\text{kg}$ SNP; (4) AG + I-RI 组, 缺血前 20 min 舌静脉注入 $10\ \text{mg}/\text{kg}$ AG; (5) L-NNA + I-RI 组, 缺血前 20 min 舌静脉注入 $10\ \text{mg}/\text{kg}$ 的 L-NNA。

2 肾小球超微结构观察

快速留取各鼠 $1\ \text{mm} \times 1\ \text{mm} \times 3\ \text{mm}$ 左肾皮质, 置于 2.5% 戊二醛溶液 4 °C 固定 4 h。常规乙醇梯度脱水、Epon812 包埋剂浸透、包埋, 将半薄切片用 1% 甲苯胺蓝水溶液在 40-50 °C 染色 10 min, 冲掉染色液, 光镜观察定位肾小球, 制作超薄切片, 醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, H-7500 透射电镜观察。

3 组化电镜观察肾小球基底膜负电荷位点^[3]

用浸泡法实施聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI) 对肾小球基底膜负电荷位点的染色。2-3 mm × 1 mm × 1 mm 组织块 0.5% PEI 浸泡 30 min, $0.2\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二甲基胍酸盐缓冲液洗涤 30 min, 0.1% 戊二醛和 2% 磷钨酸混合液浸泡 30 min, $0.2\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二甲基胍酸盐缓冲液洗涤 30 min, 1% 四氧化锇后固定 2 h, 乙醇梯度脱水, 浸透, 包埋, 超薄切片, TEM 观察。每只动物的超薄切片随机观察 3 个肾小球, 每个肾小球随机观察 3 处, 计数每 1 000 nm 肾小球基底膜 (glomerular basement membrane, GBM) 上负电荷位点个数。

4 统计学处理

数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 以非配对 *t* 检验进行统计学处理。

结 果

1 肾 I-RI 后大鼠肾小球滤过膜超微结构的改变及肾小球基底膜负电荷位点的变化

Sham 组大鼠电镜下可见肾小球结构清晰, 滤过膜完整, 上皮细胞足突排列有序, 无融合, GBM 可见分界明显的外透明层、致密层和内透明层, 可见内皮细胞窗孔 (图 1)。肾 I-RI 组大鼠 GBM 无断裂及增厚, 但上皮细胞足突排列紊乱, 分界不清, 有明显的融合现象。大鼠 GBM 负电荷位点主要位于 GBM 的外透明层, 呈点线样排列 (图 2)。Sham 组大鼠 GBM 外透明层负电荷位点 (anionicsite, AS) 比较清晰, 呈连续的规则点线状排列, 内透明层偶尔也可见到 AS (图 3)。肾 I-RI 组大鼠 GBM 的 AS 也位于外透明层, 与 sham 组相比, 结构模糊, 排列稀疏, PEI 颗粒小 (图 4)。



Fig 1 Ultrastructure of glomerular basement membrane in sham group (TEM, ×30 000).

图 1 假手术组大鼠肾小球滤过膜超微结构



Fig 2 Ultrastructure of glomerular basement membrane in renal ischemia reperfusion group (TEM, ×30 000).

图2 肾缺血再灌注组大鼠肾小球滤过膜超微结构

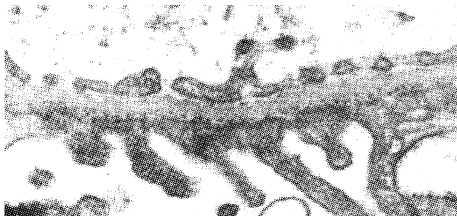


Fig 3 Anionic sites of glomerular basement membrane in sham group (TEM, ×30 000).

图3 假手术组大鼠肾小球滤过膜负电荷位点



Fig 4 Anionic sites of glomerular basement membrane in renal ischemia reperfusion group (TEM, ×30 000).

图4 缺血再灌注组大鼠肾小球滤过膜负电荷位点

2 SNP、AG、L-NNA 对肾 I-RI 所致肾小球滤过膜超微结构改变的影响

与 I-RI 组相比,SNP + I-RI 组大鼠肾小球滤过膜上皮细胞足突融合现象加重,有局部的 GBM “双轨征”;而 AG + I-RI 组足突融合现象减轻,可见局部的 GBM 增厚;L-NNA + I-RI 组大鼠肾小球上皮细胞足突融合也明显加重,且可见上皮细胞微绒毛。

3 SNP、AG、L-NNA 对肾 I-RI 所致肾小球基底膜负电荷位点改变的影响

给予 SNP 使肾 I-RI 大鼠肾小球 GBM 的 AS 显著减少 ($P < 0.05$),且 PEI 颗粒的电子致密度也明显降低;而 AG 的应用使肾 I-RI 大鼠 GBM 的 AS 有所增多,但仍低于 sham 组 ($P < 0.05$);和 I-RI 组相比,L-NNA + I-RI 组大鼠 GBM 的 AS 数量变化无显著性 ($P > 0.05$) (表 1)。

讨 论

肾小球滤过膜由带孔的内皮细胞、GBM 和脏层上皮细胞即足细胞 (podocyte) 构成,足细胞发出足

表 1 SNP、AG、L-NNA 对肾 I-RI 所致肾小球基底膜负电荷位点改变的影响

Tab 1 Effects of SNP, AG, L-NNA on changes of anionic sites in GBM after ischemia reperfusion injuries ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Group	AS(dots/1 000 nm GBM)
Sham	19.3 ± 1.7
I-RI	16.6 ± 1.0*
SNP + I-RI	11.7 ± 3.2* [△]
AG + I-RI	17.8 ± 1.0*
L-NNA + I-RI	14.7 ± 0.9

* $P < 0.05$ vs sham group; [△] $P < 0.05$ vs I-RI group.

突,足突之间的裂隙隔膜的结构和功能完整性破坏是产生蛋白尿的重要原因之一^[4]。研究证实^[2],肾 I-RI 大鼠出现蛋白尿,且 SDS-PAGE 电泳证实有分子量大于白蛋白的大分子蛋白滤出,表明肾 I-RI 可能造成肾小球滤过膜结构和功能的改变。本实验发现肾 I-RI 后大鼠肾小球出现明显的足突融合或消失 (foot process effacement) 现象,从超微结构上证实了肾 I-RI 后大鼠肾小球足细胞存在病理性改变。

生理情况下肾脏可以不断产生 NO,在肾 I-RI 时肾组织生成 NO 进一步增多、脂质过氧化明显增强^[1]。我们的实验观察到在肾 I-RI 时应用 SNP 能够加重足突融合,而 iNOS 抑制剂 AG 则能够减轻足突融合现象,给予 L-NNA 将 NOS 完全阻断后反而加重肾 I-RI 引起的足突融合,说明 NO 和足突融合具有一定的关系,大量生成的 NO 可能是促使足突融合发生的因素之一,完全阻断 NO 的生成也不利于足突融合的恢复,提示肾 I-RI 时 NO 的生成增多是造成足突融合的重要原因之一。

PEI 具有很强的阳离子特性,是公认的较好的负电荷位点标记物^[5,6]。我们应用 PEI 阳离子探针在肾 I-RI 导致大量蛋白尿的动物模型上观察到肾小球滤过膜负电荷位点明显减少,负电荷位点的减少削弱了肾小球滤过膜的电荷屏障作用,显然,这也是肾 I-RI 后大量蛋白尿生成的重要因素。

关于 NO 对负电荷位点的影响,尚未见文献报道。本实验证明肾 I-RI 时肾脏产生 NO 增多,而 GBM 的负电荷位点减少,尿蛋白生成增多。给予 NO 后加重了肾 I-RI 导致的负电荷位点减少及尿蛋白的增多,应用 iNOS 抑制剂减少 NO 的大量生成后肾 I-RI 所致负电荷位点减少的程度有所减轻,尿蛋白的排出量也明显减少。已经证实,肾缺血再灌注可以引起 NO 和超氧阴离子同时大量产生,从而生成具有很强生物活性的过氧亚硝基阴离子 (peroxynitrite, ONOO⁻)^[7],导致脂质过氧化,破坏肾小球滤过膜的

生物大分子^[6,8],这可能是 NO 造成负电荷位点减少的重要机制。总之,肾 I-RI 后 NO 大量生成时导致肾小球的损伤,肾小球的损伤引起 GBM 负电荷位点减少,负电荷位点减少削弱肾小球滤过膜的电荷屏障作用,这可能是肾 I-RI 时出现大量蛋白尿的重要机制之一。

[参 考 文 献]

- [1] 王新良,黄善生,陈晓玲,等. 肾缺血再灌注损伤时肾脏 NO 的生成及其作用[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(10): 1105.
- [2] 王新良,黄善生,陈晓玲,等. 肾再灌注损伤大鼠蛋白尿的生成及其机制的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(10): 1106.
- [3] 刘芳,段惠军,甄彦君,等. 苯那普利对糖尿病大鼠肾小球基底膜负电荷位点的影响[J]. 电子显微学报, 2002, 21(2): 176.
- [4] Mundel P, Shankland SJ. Podocyte Biology and Response to Injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(12): 3005 - 3015.
- [5] Ueda H, Baba T, Toriumi H, et al. Anionic sites in articular cartilage revealed by polyethyleneimine staining[J]. Micron, 2001, 32(4): 439 - 446.
- [6] Morita H, Yoshimura A, Inui K, et al. Heparan sulfate of perlecan is involved in glomerular filtration[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(6): 1703 - 1710.
- [7] Chatterjee PK, Patel NS, Sivarajah A, et al. GW274150, a potent and highly selective inhibitor of iNOS, reduces experimental renal ischemia/reperfusion injury[J]. Kidney Int, 2003, 63(3): 853 - 865.
- [8] Wartiovaara J, Öfverstedt LG, Khoshnoodi J. Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography[J]. J Clin Invest, 2004, 114(10): 1475 - 1483.

2006 年中国病理生理学会学术活动安排

会议名称	日期	地点	预期人数	联系人地址、电话及网址
1. 中国病理生理学会第八届全国代表大会	6月27 - 7月1日	北京	500	吴立玲 北京大学医学部病理生理 邮编: 100083 电话:010 - 82802403
2. 第5届国际病理生理大会	6月28 - 7月2日	北京	650	吴立玲 北京大学医学部病理生理 邮编: 100083 电话:010 - 82802403 E-mail: pathophy@bjmu.edu.cn
3. 国际危重病医学大会第14届会议	9 - 10月	北京	1 500	陈德昌教授 协和医院加强医疗科 邮编: 100005 电话:010 - 65296561 E-mail: chendc@pumch.ac.cn
4. 动脉粥样硬化性疾病进展巡回讲习班	3 - 12月 共8次	8个城市		杨永宗教授 南华大学医学院 邮编:421001 电话: 0734 - 8281288 E-mail: yzyanghy@163.com
5. 动脉粥样血栓论坛	9月	苏州	200	杨永宗教授 南华大学医学院 邮编:421001 电话:0734 - 8281288 E-mail: yzyanghy@163.com
6. 受体信号转导专业委员会的第八次学术会议同时进行专业委员会的换届选举	6月	北京	100	卢建教授 第二军医大学 电话:021 - 25070321 E-mail: Lujian326@yahoo.com.cn
7. 心血管专业委员会第十二次学术会议	6月	北京	150	张幼怡教授 北京大学医学部第三医院 电话: 010 - 82802306 E-mail: zhangyy@bjmu.edu.cn
8. 肿瘤专业委员会第十次学术会议	6月	北京	150	李敏教授 中南大学湘雅医学院肿瘤研究所 电话:0731 - 4805443 E-mail: Tingyi_lee6@hotmail.com
9. 第十一届全国微循环学术大会	7月	北京	100	刘秀华教授 北京解放军301医院微循环室 电话:010 - 66937820 E-mail: Xiuhualiu98@yahoo.com.cn
10. 消化专业委员会第五次学术会议	7月	北京	50	李永渝教授 上海同济大学医学院病理生理室 电话:021 - 65985447 E-mail: liyongyu@mail.tongji.edu.cn