

白细胞介素-1 受体拮抗剂对新生鼠窒息后肾损伤保护作用的动态研究

董文斌 陈红英 陈书琴 龙汉安 陈跃 翟雪松 邹艳 唐章华 邓存良 华丽

【摘要】 目的 观察重组人白细胞介素-1 受体拮抗剂(rhIL-1ra)对窒息后肾损伤的保护作用及其机制。方法 检测对照组及 rhIL-1ra(+rhIL-1ra 组)或生理盐水(+NS 组)处理新生鼠窒息后复氧 2、24 和 48 h 肾组织炎症反应及肾损伤指标的变化。结果 与对照组(13 只)比较,窒息后复氧 2 h(10 只)、24 h(11 只)、48 h(10 只)+NS 组的白细胞数(WBC)、白细胞介素-1(IL-1)、IL-8、IL-6、一氧化氮(NO)、内皮素-1(ET-1)、左肾系数(LRC)、肾小管损伤评分均升高,差异均有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与窒息后复氧+NS 组比较,窒息后复氧 2 h(10 只)、24 h(10 只)、48 h(11 只)+rhIL-1ra 组上述指标除 IL-6 外均降低,差异也均有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);而窒息后复氧 24 h、48 h+rhIL-1ra 组 IL-6 均降低,差异均有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 rhIL-1ra 对窒息后肾损伤具有保护作用,其机制可能与抑制窒息后肾组织炎症反应有关。

【关键词】 窒息; 肾损伤; 细胞因子; 白细胞介素-1 受体拮抗剂

Role of interleukin - 1 receptor antagonist in protecting kidney from injury induced by asphyxia in neonatal rats DONG Wen-bin, CHEN Hong-ying, CHEN Shu-qin, LONG Han-an, CHEN Yue, QU Xue-song, ZOU Yan, TANG Zhang-hua, DENG Cun-liang, HUA Li. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan, China

【Abstract】 Objective To observe the role of recombinant human interleukin - 1 receptor antagonist (rhIL - 1ra) in protecting kidney from injury induced by asphyxia in neonatal rats. **Methods** Neonatal rats were used as experimental animals. The changes in intrarenal inflammatory response and renal injury were examined in the control group ($n = 13$), and 2, 24 and 48 hours after asphyxia followed by normal saline treatment in those treated with rhIL - 1ra. **Results** In normal saline group, the white blood cell count, the blood interleukin - 1 (IL - 1), IL - 8, IL - 6, nitric oxide (NO), endothelin (ET - 1) levels, and the renal coefficient (LRC), the scores of injured tubules of the left kidney were significantly increased at 2 hours ($n = 10$), 24 hours ($n = 11$), and 48 hours ($n = 10$, $P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the normal saline group, the levels of the above parameters, except IL - 6, were significantly decreased in rhIL - 1ra treatment group at the same time points ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Serum IL - 6 at 24 hours and 48 hours was also decreased in rhIL - 1ra treatment group significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The results suggest that rhIL - 1ra may protect renal injury after asphyxia via inhibiting intrarenal inflammatory response.

【Key words】 asphyxia; renal damage; cytokine; interleukin - 1 receptor antagonist

新生儿窒息可导致多器官功能损伤,其中以肾损伤的发生率最高。研究显示白细胞和炎症因子与窒息后肾损伤的发生有关^[1,2]。而白细胞介素-1(IL-1)作为炎症反应的启动因子,在缺氧缺血性损伤激发的炎症反应发生中起关键作用^[3]。我们已初

步观察到重组人白细胞介素-1 受体拮抗剂(recombinant human interleukin - 1 receptor antagonist, rhIL - 1ra)对窒息后早期肾损伤具有保护作用^[4]。本研究进一步动态研究 rhIL - 1ra 对窒息后肾损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 动物分组: Wistar 新生大白鼠共 75 只,雌雄不拘,年龄 7~10 d,体重(13.0±5.0)g,由四川泸州医学院标准动物科提供。按同窝随机分为:对照组(13 只)、窒息后复氧 2 h+生理盐水(NS)组(10 只)、窒息后复氧 2 h+rhIL-1ra 组(10 只)、窒息后复氧 24 h+NS 组(11 只)、窒息后复氧 24 h+rhIL-1ra 组(10 只)、窒息后复氧 48 h+NS 组

基金项目:四川省卫生厅科研基金资助项目(981017)

作者单位:646000 四川省泸州医学院附属医院新生儿科

作者简介:董文斌(1967-),男(汉族),四川省中江县人,医学硕士,教授,硕士研究生导师,中国中西医结合学会急救专业委员会儿科学组成员,四川省医学会新生儿学组和围产医学学组委员,四川省第三批学术和技术带头人后备人才,四川省卫生厅第四批学术和技术带头人,四川省第十批杰出青年学科带头人培养基金获得者,已主持和参加 11 项科研课题,获市级以上科技成果奖 10 项,参加编写专著 10 部,发表学术论文 60 余篇。

(10 只)和窒息后复氧 48 h+rhIL-1ra 组(11 只), 各组间体重差异无显著性($P>0.05$)。

1.2 窒息模型制备和干预处理方法:窒息后复氧+rhIL-1ra 组在窒息前 5 min,按 5 mg/kg 腹腔注射 rhIL-1ra(北京医科大学免疫中心提供),窒息后复氧+NS 组注射等量 NS,按本实验室已经建立的方法^[2,4]操作。上述动物分别置于容积为 55 ml 的缺氧瓶中(内装 0.005 kg 钠石灰),待动物安静后,窒息后复氧+NS 组和+rhIL-1ra 组塞紧瓶塞(对照组模拟该过程不塞瓶塞)密闭 30 min,立刻复氧,在 2、24 和 48 h 分批断颈放血处死动物后取左肾,游离肾包膜和肾蒂,吸干其表面血迹,精确称取左肾湿重,根据左肾湿重(g)/体重(kg)求出左肾系数(left renal coefficient, LRC),同时纵剖左肾,取一定量肾皮质块,加入冰 NS,在冰浴下制成体积分数为 1%的匀浆液,然后离心收集上清液,于 -20℃ 保存待检。另取 5 mm 厚皮质块进行组织学检测。

1.3 指标检测

1.3.1 肾组织炎症因子的检测:①IL-1 和 IL-8 测定:采用放射免疫分析法,试剂盒由北京北免东雅生物技术研究提供。②IL-6 测定:采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA),试剂盒由上海森雄科技实业有限公司提供。③内皮素-1(ET-1)测定:采用放射免疫分析法,试剂盒由北京原子能研究所提供。④一氧化氮(NO)测定:采用单一试剂法,试剂由第三军医大学微生物教研室提供。

1.3.2 组织病理学观察:在病变严重处采用 Paller

法^[4]对肾小管损伤程度进行评分,即每个高倍视野(HP)随机选择 10 个有病变的肾小管,按 100 个肾小管记分。标准:肾小管明显扩张,细胞扁平(1分);刷状缘损伤或脱落(1分或 2分);管型(2分);肾小管管腔内细胞脱落、坏死,即未成管型或细胞碎片(1分)。同时选择 10 根直径在 50~150 μm 的小静脉,计数其横断面内的白细胞数用以代表肾微血管床的白细胞滞留数^[4]。

1.4 统计学处理:结果用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,统计学处理采用 SPSS 10.0 统计软件包,进行正态性检验和方差齐性检验,两两比较采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

rhIL-1ra 对新生鼠窒息后肾组织白细胞(WBC)、炎症细胞因子水平及肾损伤的影响见表 1~2。与对照组比较,窒息后复氧 2、24 和 48 h+NS 组上述指标均升高,差异均有显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$);窒息后复氧 2、24 和 48 h+rhIL-1ra 组与窒息后复氧 2、24 和 48 h+NS 组比较,除 IL-6 在 2 h 时的改变差异无显著性外,其余指标均降低,差异均有显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3 讨论

窒息时机体出现严重缺氧,为保证心、脑等生命器官的供血、供氧,反射性地引起交感神经兴奋和肾上腺素作用,而窒息解除后恢复供氧时,肾动脉反射性地扩张,使肾脏出现再灌注损伤,这可能是窒息后肾损伤的关键所在^[1,2]。本研究中以 7~10 d 新生鼠

表 1 rhIL-1ra 对新生鼠窒息后肾组织 WBC、IL-1、IL-8、IL-6、NO 和 ET-1 水平的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effects of rhIL-1ra on the count of WBC, IL-1, IL-8, IL-6, NO and ET-1 in renal tissue of neonatal rats with asphyxia($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	WBC(个/HP)	<i>t</i> 值	IL-1(pg/g)	<i>t</i> 值	IL-8(ng/g)	<i>t</i> 值
对照组	13	20.23±13.13		12.30±2.07		0.34±0.04	
窒息后复氧 2 h+NS 组	10	51.40±19.71	4.552**	18.82±1.55	8.328**	0.46±0.05	6.402**
+rhIL-1ra 组	10	37.00±9.49	2.082 Δ	13.52±4.58	3.467 $\Delta\Delta$	0.35±0.03	5.966 $\Delta\Delta$
窒息后复氧 24 h+NS 组	11	60.36±28.50	4.551**	20.13±1.21	10.173**	0.59±0.07	10.960**
+rhIL-1ra 组	10	42.22±8.33	1.935 Δ	15.86±4.37	3.004 $\Delta\Delta$	0.35±0.04	9.509 $\Delta\Delta$
窒息后复氧 48 h+NS 组	10	56.15±15.06	7.683**	21.19±3.53	7.573**	0.47±0.14	3.202**
+rhIL-1ra 组	11	35.45±11.28	3.587 $\Delta\Delta$	12.47±2.86	6.247 $\Delta\Delta$	0.31±0.07	3.362 $\Delta\Delta$
组别	动物数(只)	IL-6(ng/g)	<i>t</i> 值	NO(μmol/g)	<i>t</i> 值	ET-1(pg/g)	<i>t</i> 值
对照组	13	0.19±0.05		36.54±16.54		38.22±15.98	
窒息后复氧 2 h+NS 组	10	0.24±0.03	2.792*	87.06±42.26	3.956*	59.57±20.30	2.272*
+rhIL-1ra 组	10	0.20±0.14	0.883	57.17±44.73	1.736 Δ	33.97±20.44	2.810 $\Delta\Delta$
窒息后复氧 24 h+NS 组	11	0.33±0.09	4.811*	100.26±33.61	6.042*	85.73±28.42	5.153*
+rhIL-1ra 组	10	0.22±0.06	3.259 $\Delta\Delta$	62.53±40.11	2.344 Δ	55.96±26.89	2.459 Δ
窒息后复氧 48 h+NS 组	10	0.29±0.08	3.681*	98.43±46.19	4.497*	75.15±34.66	3.416*
+rhIL-1ra 组	11	0.21±0.03	3.092 $\Delta\Delta$	57.86±29.29	2.428 Δ	58.19±14.26	1.893 Δ

注:与对照组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$;与窒息后复氧同时间+NS 组比较: $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

表 2 rhIL-1ra 对新生鼠窒息后肾损伤指标的影响比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of rhIL-1ra on the parameters of renal injury in neonatal rats with asphyxia($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	LRC(g/kg)	t 值	肾小管损伤评分(分/HP)	t 值
对照组	13	4.88±0.90		5.46±1.76	
窒息后复氧 2 h+NS 组	10	7.64±1.33	5.950**	28.80±7.16	11.388**
+rhIL-1ra 组	10	5.81±0.51	4.062 $\Delta\Delta$	20.67±7.12	2.546 Δ
窒息后复氧 24 h+NS 组	11	7.70±1.00	7.271**	34.91±1.58	42.775**
+rhIL-1ra 组	10	5.77±0.73	5.005 $\Delta\Delta$	21.50±5.52	7.734 $\Delta\Delta$
窒息后复氧 48 h+NS 组	10	6.17±0.76	1.750*	31.70±1.89	33.851**
+rhIL-1ra 组	11	4.74±1.29	3.053 $\Delta\Delta$	21.73±3.07	8.778 $\Delta\Delta$

注:与对照组比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与窒息后复氧同时间+NS 组比较: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

为研究对象,其生理功能与人类新生儿时期相似,窒息 30 min 复氧后,肾组织病理观察显示肾小管损伤早于肾小球,且在 24~48 h 达到高峰,这些改变与其他学者报道有关新生鼠窒息后肾损伤的病理改变相一致^[5],也与临床上新生儿窒息后肾损伤发生的高峰时间一致,证明模型成功。

国内外学者及本实验室前期工作^[2-4,6-8]显示:窒息缺氧、缺血时,肾组织既是病变损伤的靶细胞之一,也是造成缺氧损伤进展的主要参与者,首先被活化产生大量活性介质,如 IL-1、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-8、ET-1、NO 等,这些因子可增强中性粒细胞上的 CD11b/CD18 表达,诱导血管内皮细胞 P-选择素、E-选择素的表达,进而增强缺血、缺氧时白细胞趋化、黏附、聚集,在肾组织出现炎症反应,甚至出现全身炎症反应综合征(SIRS),导致组织细胞损伤,这些改变在窒息后 24~48 h 达到高峰^[2],说明在窒息后的肾损伤过程中存在缺氧-炎症反应-损伤的复杂病理生理过程。而 IL-1 作为炎症反应的启动因子,作用于单核/巨噬细胞的 IL-1 受体,促进和诱发 TNF- α 、IL-8 等多种细胞因子和炎症介质大量释放,诱导白细胞聚集,放大炎症过程,从而引起“瀑布样”全身炎性损伤,出现多器官功能不全^[2-4]。采用 IL-1ra 阻断 IL-1 受体的作用后,可使脑、心、肝、肾等器官缺血-再灌注损伤减轻^[3]。我们已经观察到 IL-1ra 对窒息后早期肾损伤具有保护作用^[4]。本研究进一步动态观察到 IL-1ra 能使窒息大鼠复氧后不同时间点肾组织炎症反应和损伤因子均显著下降,同时肾损伤明显降低,证明了 IL-1 在窒息后肾组织炎症反应中的重要作用^[3]。

IL-1ra 属 IL-1 家族的一个新成员,是单纯的受体拮抗剂,能特异地与 IL-1 受体结合而无任何激动作用,可以消除或减轻 IL-1 的多种生物学效应^[9],抑制中性粒细胞和单核细胞的 IL-8、IL-6、

TNF- α 等细胞因子的产生,进而抑制炎症反应的发生^[3,4,10],提示可将 IL-1ra 用于新生儿窒息后肾损伤的防治。但从本研究结果来看,使用 IL-1ra 预处理动物后,肾组织局部的炎症反应并没有抑制到正常水平,说明窒息后炎症反应的激发存在更为复杂的机制,同时也可能与 IL-1ra 的剂量、使用次数和时机等有关,这些均值得进一步探讨。

参考文献:

- 董文斌,唐章华,陈红英,等.窒息新生儿尿中炎症细胞因子改变与肾小管损伤的关系[J].中国危重病急救医学,2003,15:94-96.
- 董文斌,唐章华,翟雪松,等.炎症细胞因子参与新生鼠窒息后肾损伤的作用时间[J].中华急诊医学杂志,2002,11:25-26.
- Haq M, Norman J, Saba S R, et al. Role of IL-1 in renal ischemic reperfusion injury[J]. J Am Soc Nephrol, 1998, 9: 614-619.
- 董文斌,冯志强,邓存良,等. rhIL-1ra 减轻新生大鼠窒息后肾损伤的作用机制[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2000, 16: 382-386.
- 官月,刘春峰,魏克伦.缺氧新生鼠肾组织腺嘌呤核苷酸水平变化及线粒体形态改变[J].中华儿科杂志,1999,37:82-84.
- Kitada H, Sugitani A, Yamamoto H, et al. Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury by FR167653 in dogs[J]. Surgery, 2002, 131: 654-662.
- 张斌,刘德焕,蒋丽,等. SIRS 期血中相关细胞因子及肾血流动力学变化的临床意义探讨[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12: 220-222.
- Scannell G. Leukocyte responses to hypoxic/ischemic conditions [J]. New Horiz, 1996, 4: 179-183.
- Arend W P. IL-1 receptor antagonist: a new member of the IL-1 family [J]. J Clin Invest, 1991, 88: 1445-1450.
- 范祖森,曹荣华,孙汶生,等. IL-10 与 IL-1ra 对大鼠腹腔 M Φ 诱生细胞因子的影响 [J]. 免疫学杂志, 1996, 12: 165-168.

(收稿日期:2004-11-12 修回日期:2005-07-11)

(本文编辑:李银平)

• 广告目次 •

- ①珠海丽珠:丽珠血液灌流器 (封二)
- ②廊坊爱尔:炭肾 (插页)
- ③恩华药业:力月西 (插页)
- ④北京四环医药:苏诺 (插页)
- ⑤珠海弘升:血液净化 (封三)
- ⑥索诺声有限公司:便携式彩超 (封底)