

# 血必净注射液对脓毒症肾脏损伤大鼠一氧化氮及其合酶作用的影响

崔莹 张玉想 李春学 李勇 沈洪丽

**【摘要】** 目的 观察血必净注射液对脓毒症大鼠血浆及肾组织一氧化氮(NO)和一氧化氮合酶(iNOS)水平的影响,探讨血必净注射液的肾保护作用。方法 采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症动物模型。健康雄性SD大鼠40只被随机分为正常对照组( $n=8$ )、假手术组( $n=8$ )、模型组( $n=12$ )、血必净组( $n=12$ )。术后6h留取标本,采用生化法测定血浆和肾组织NO含量及iNOS活性,光镜下观察肾脏形态学变化,透射电镜下观察肾脏超微结构变化。结果 模型组血浆和肾组织NO含量[血浆:( $94.00 \pm 15.18$ ) $\mu\text{mol/L}$ ,肾:( $0.50 \pm 0.07$ ) $\mu\text{mol/g}$ ]及iNOS活性[血浆:( $6.19 \pm 0.82$ )U/ml,肾:( $0.20 \pm 0.02$ )U/mg]均明显高于正常对照组[血浆NO:( $52.52 \pm 13.61$ ) $\mu\text{mol/L}$ ,iNOS( $3.69 \pm 0.89$ )U/ml;肾NO:( $0.32 \pm 0.07$ ) $\mu\text{mol/g}$ ,iNOS:( $0.16 \pm 0.01$ )U/mg]和假手术组[血浆NO:( $51.49 \pm 19.00$ ) $\mu\text{mol/L}$ ,iNOS:( $3.26 \pm 1.00$ )U/ml;肾NO:( $0.35 \pm 0.04$ ) $\mu\text{mol/g}$ ,iNOS:( $0.16 \pm 0.02$ )U/mg, $P$ 均 $<0.01$ ];血必净组血浆和肾组织NO含量[血浆:( $77.16 \pm 14.49$ ) $\mu\text{mol/L}$ ,肾:( $0.43 \pm 0.03$ ) $\mu\text{mol/g}$ ]及iNOS活性[血浆:( $4.48 \pm 0.93$ )U/ml,肾:( $0.18 \pm 0.02$ )U/mg]均明显低于模型组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );正常对照组与假手术组各项指标比较差异无统计学意义( $P$ 均 $>0.05$ )。光镜及电镜下观察假手术组肾小球、肾小管结构基本正常;模型组肾脏损伤明显;血必净组肾脏损伤较模型组显著减轻。结论 NO和iNOS在脓毒症大鼠肾损伤发病过程中发挥了重要的作用,血必净注射液干预治疗可使血浆及肾组织中NO含量和iNOS活性下降,并可使肾脏损伤减轻,对肾脏具有保护作用。

**【关键词】** 脓毒症; 肾损伤; 一氧化氮; 诱生型一氧化氮合酶; 血必净注射液

脓毒症可并发急性肾功能衰竭(ARF),脓毒症休克培养阳性者ARF的发生率明显升高<sup>[1]</sup>。脓毒症时,内毒素诱导多种细胞内诱生型一氧化氮合酶(iNOS)表达,大量释放一氧化氮(NO),介导组织损伤。NO和iNOS与肾脏的病理生理过程关系极其密切,iNOS生成过量的NO是介导肾脏损伤的主要因素之一<sup>[2-4]</sup>。血必净注射液能抑制炎症因子的释放,保护和修复应激状态下受损的脏器<sup>[5-6]</sup>。本研究中采用盲肠结扎穿孔术(CLP)复制大鼠脓毒症模型,探讨血必净注射液在脓毒症治疗中的作用。

## 1 材料与方 法

**1.1 动物分组及模型制备:** 雄性SD大鼠40只,体重250~300g(由河北医科大学实验动物中心提供),按随机数字表法分为正常对照组、假手术组、模型组、血必净组,参照文献<sup>[7]</sup>方法采用CLP复制大鼠脓毒症模型。模型组于CLP后

经尾静脉注射生理盐水4ml/kg,血必净注射液等量血必净注射液(天津红日药业股份有限公司);正常对照组不予任何处理,直接处死;假手术组只开腹,不结扎盲肠。

**1.2 检测指标及方法:** 术后6h于右颈总动脉置管采血2.5ml,抗凝备用。实验结束即刻分离右侧肾脏,取上极于液氮中保存,用于检测NO和iNOS。取左肾上极,一部分经多聚甲醛水溶液固定,石蜡包埋、切片,苏木素-伊红(HE)染色后显微镜下观察组织形态学变化;另一部分制成1mm<sup>3</sup>组织块,戊二醛固定,透射电镜下观察肾脏超微结构变化。血浆和肾组织NO含量采用还原比色法测定,NO、iNOS试剂盒均由南京建成生物工程公司提供,操作按说明书进行。

**1.3 统计学方法:** 采用SPSS 11.5统计软件,数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 肾组织形态学变化(彩色插页图1):** 假手术组肾小球、肾小管结构基本正常。模型组肾小球皱缩明显,肾小管上皮细胞变性、坏死脱落,肾小管囊腔扩张,管

型形成,肾间质大量炎性细胞浸润。血必净组肾小球、肾小管变化较模型组减轻。

**2.2 肾组织超微结构变化(彩色插页图2):** 假手术组肾小球滤过膜完整,基底膜厚度均匀,上皮细胞足突排列有序,内皮细胞形态正常,可见窗孔;近曲小管上皮细胞刷状缘绒毛排列整齐,染色质分布均匀,线粒体结构正常。模型组肾小球基底膜部分增厚呈驼峰状,部分足突细胞融合,部分血管内皮细胞增生变厚;近曲小管游离面微绒毛数量明显减少,稀疏,排列不规则,线粒体部分或大部分嵴、少部分膜融合或消失,粗面内质网轻度扩张,脱颗粒现象明显。血必净组肾小球及近曲小管超微结构改变均较模型组轻。

**2.3 血浆NO含量及iNOS活性(表1):** 模型组血浆NO含量和iNOS活性明显高于正常对照组和假手术组,血必净组明显低于模型组( $P$ 均 $<0.01$ );正常对照组与假手术组比较差异无统计学意义( $P$ 均 $>0.05$ )。

**2.4 肾组织NO含量及iNOS活性(表1):** 模型组肾组织NO含量和iNOS活性明显高于正常对照组和假手术组,血必净组明显低于模型组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );正常对照组与假手术组比较

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.

2009.08.018

作者单位:061001 河北,沧州市中心医院中心ICU(崔莹、李春学、李勇、沈洪丽);050011 河北石家庄,河北医科大学第四医院ICU(张玉想)

差异无统计学意义( $P$ 均 $>0.05$ )。

3 讨论

脓毒症合并 ARF 的发生率及病死率均较高, ARF 是脓毒症的独立死亡因素<sup>[8]</sup>。研究认为, 脓毒症时过量的炎症介质以及神经-内分泌异常是脓毒症致 ARF 的主要机制<sup>[9-10]</sup>, 其中 iNOS 诱导产生大量的 NO 起重要作用。NO 是炎症“瀑布样”连锁反应中的介质之一, 在正常情况下, NO 通过调节血管紧张性维持肾血流量和肾小球滤过率, 参与调节和维持肾脏血流动力, 介导内皮细胞和系膜细胞间的信息传递, 在维持肾小球正常功能中起到重要作用。iNOS 的催化不依赖于  $Ca^{2+}$ , 生理状况下表达很少或不表达, 主要在巨噬细胞、中性粒细胞和免疫细胞等受到炎症介质、细胞因子如白细胞介素(IL-1、IL-2)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )和细菌内、外毒素等刺激时, 经基因转录先表达 iNOS mRNA, 再生成 iNOS, 催化生成大量的 NO, 是机体病理过程中 NO 的主要来源。脓毒症时, 内毒素诱导多种细胞内 iNOS 表达, 大量释放 NO, 介导肾脏损伤<sup>[11-12]</sup>, 高特异性 iNOS 抑制剂可防止内毒素所致的脏器损伤<sup>[13-14]</sup>。

本研究结果显示, 与正常对照组及假手术组比较, CLP 后 6 h 模型组血浆及肾组织 iNOS 活性和 NO 含量显著升高, 且光镜及电镜下观察到肾组织结构发生了明显的病理变化; 而假手术组肾组织形态及超微结构均正常, 排除了手术创伤造成 iNOS 活性和 NO 含量升高及肾脏损伤的可能性。因此推测, 升高的 iNOS 和 NO 在脓毒症早期大鼠肾损伤中发挥重要作用。

业已明确, 血必净注射液能有效拮抗内毒素, 抑制内毒素诱导单核/巨噬细胞产生炎症介质, 下调促炎介质水平, 保护内皮细胞, 减轻内毒素引起的大鼠器官超微结构损伤<sup>[15-16]</sup>。临床观察证实, 血必净注射液治疗创伤、脓毒症和多器官功能障碍综合征(MODS)具有较好的临床疗效和安全性<sup>[17-18]</sup>。本实验结果显示: 与模型组相比, 血必净组大鼠血浆及肾组织 iNOS 活性和 NO 含量显著降低, 光镜及电镜下观察其肾脏损伤明显减轻。说明, 血必净注射液具有抑制 iNOS

表 1 各组大鼠血浆和肾组织 NO 含量及 iNOS 活性比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数	血浆		肾组织	
		NO( $\mu$ mol/L)	iNOS(U/ml)	NO( $\mu$ mol/g)	iNOS(U/mg)
正常对照组	8	52.52 $\pm$ 13.61	3.69 $\pm$ 0.89	0.32 $\pm$ 0.07	0.16 $\pm$ 0.01
假手术组	8	51.49 $\pm$ 19.00	3.26 $\pm$ 1.00	0.35 $\pm$ 0.04	0.16 $\pm$ 0.02
模型组	12	94.00 $\pm$ 15.18 <sup>a</sup>	6.19 $\pm$ 0.82 <sup>a</sup>	0.50 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.20 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
血必净组	12	77.16 $\pm$ 14.49 <sup>c</sup>	4.48 $\pm$ 0.93 <sup>c</sup>	0.43 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.18 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>

注: 与正常对照组和假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$

和 NO 的作用, 从而对脓毒症大鼠肾脏具有保护作用。其机制可能有: ①抑制 iNOS 活性从而减少 NO 大量生成, 避免了全身血管扩张及神经-体液轴的兴奋, 减少应激激素的产生, 使肾脏缺血减轻。②抑制 iNOS 诱导 NO 大量生成, 减轻了炎症反应和液体渗出, 避免了低血容量对肾脏灌注的影响。③减轻 iNOS 诱导 NO 大量生成对内皮型一氧化氮合酶的抑制, 保护了肾脏血管内皮。④减轻 NO 大量生成导致的肾脏细胞凋亡。

参考文献

[1] Schrier RW, Wang W. Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med*, 2004, 351(2):159-169.  
 [2] 刘革非, 屈燧林, 姚平, 等. 诱导型一氧化氮合酶在缺血性急性肾衰竭肾小管损伤中的作用及 L-精氨酸的疗效观察. *四川医学*, 2006, 27(1):13-15.  
 [3] Baylis C. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 294(1):F1-9.  
 [4] Wilcox CS. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney, a critical link to hypertension? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, 289(4):R913-935.  
 [5] 李志军, 孙元莹, 吴云良, 等. 血必净注射液防治家兔应激性脏器损伤的研究. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(2):105-108.  
 [6] 武子霞, 李银平, 乔佑杰, 等. 血必净注射液对脓毒症大鼠器官功能及死亡率的影响. *天津中医药大学学报*, 2007, 26(2):68-70.  
 [7] Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, et al. Cecal ligation and puncture. *Shock*, 2005, 24(Suppl 1):52-57.  
 [8] Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, 2001, 29(7):1303-1310.  
 [9] Rabb H. Immune modulation of acute

kidney injury. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(3):604-606.  
 [10] Flierl MA, Schreiber H, Huber-Lang MS. The role of complement, C5a and its receptors in sepsis and multiorgan dysfunction syndrome. *J Invest Surg*, 2006, 19(4):255-265.  
 [11] Heemskerk S, Masereeuw R, Moesker O, et al. Alkaline phosphatase treatment improves renal function in patients with severe sepsis or sepsis shock. *Crit Care Med*, 2009, 37(2):417-423.  
 [12] Heemskerk S, Pickkers P, Bouw MP, et al. Upregulation of renal inducible nitric oxide synthase during human endotoxemia and sepsis is associated with proximal tubule injury. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2006, 1(4):853-862.  
 [13] Hallemeesch MM, Cobben DC, Soeters PB, et al. Differential effects of selective and non-selective NOS inhibition on renal arginine and protein metabolism during endotoxemia in rats. *Clin Nutr*, 2002, 21(2):111-117.  
 [14] Schwartz D, Brasowski E, Raskin Y, et al. The outcome of non-selective vs selective nitric oxide synthase inhibition in lipopolysaccharide treated rats. *J Nephrol*, 2001, 14(2):110-114.  
 [15] 曹书华, 王今达. 血必净对感染性多器官功能障碍综合征大鼠组织及内皮损伤保护作用的研究. *中国危重病急救医学*, 2002, 14(8):489-491.  
 [16] 李银平, 乔佑杰, 武子霞, 等. 血必净注射液对脓毒症大鼠蛋白 C 及肿瘤坏死因子基因表达的影响. *中国危重病急救医学*, 2007, 19(8):488-491.  
 [17] 张晔, 曹书华, 崔克亮, 等. 血必净对多器官功能障碍综合征单核细胞 HLA-DR 表达影响的研究. *中国中西医结合急救杂志*, 2002, 9(1):21-23.  
 [18] 王庆, 赖国祥. 血必净注射液与甲泼尼龙治疗脓毒症临床疗效观察. *中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14(5):292-295.  
 (收稿日期: 2009-02-25)  
 (本文编辑: 李银平)

## 脓毒症大鼠心肌细胞 Toll 样受体 4 和炎症因子基因表达的变化及作用机制

(正文见488页)

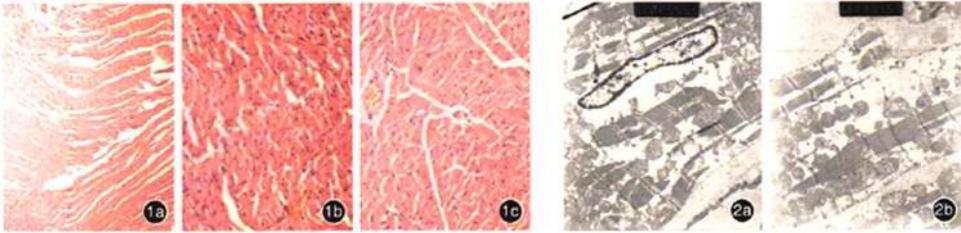


图1 光镜下观察各组大鼠12h心肌组织病理学变化 对照组(a)心肌组织无明显病理学改变; LPS组(b)可见灶性心肌纤维断裂、心肌坏死,肌膜细胞增生并肌质溶解;间质水肿及血管内淤血,心肌细胞可见空泡变性和嗜酸性变;Gln组(c)虽可见上述病理改变,但程度有所减轻 HE × 200 图2 电镜下观察各组大鼠12h心肌组织病理学变化 LPS组(a)心肌细胞水肿,肌原纤维断裂,部分细胞崩解或凋亡;线粒体水肿、膜消失、嵴断裂;Gln组(b)心肌细胞水肿程度较LPS组有所减轻,仅有少量心肌细胞崩解,线粒体膜破坏程度也有所减轻 铀-铅双染 × 5 200

## 血必净注射液对脓毒症肾脏损伤大鼠一氧化氮及其合酶作用的影响

(正文见497页)

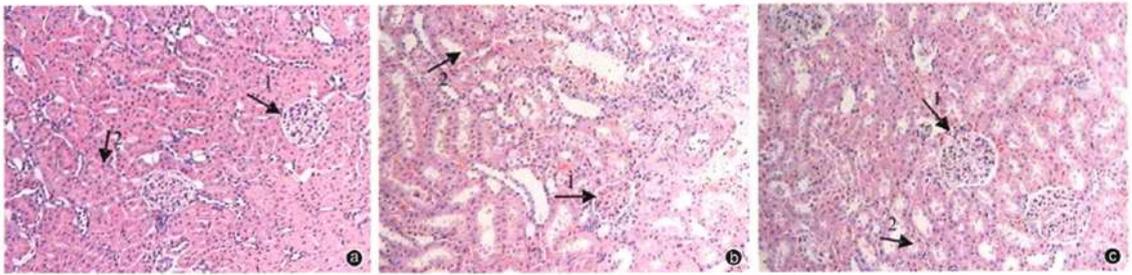


图1 光镜下观察各组大鼠肾脏组织形态学变化 假手术组(a)肾小球、肾小管结构基本正常;模型组(b)肾小球皱缩明显,肾小管上皮细胞变性,坏死脱落,肾小管囊腔扩张,管型形成,肾间质大量炎性细胞浸润;血必净组(c)肾小球、肾小管变化较模型组减轻;箭头1为肾小球,箭头2为肾小管 HE × 200

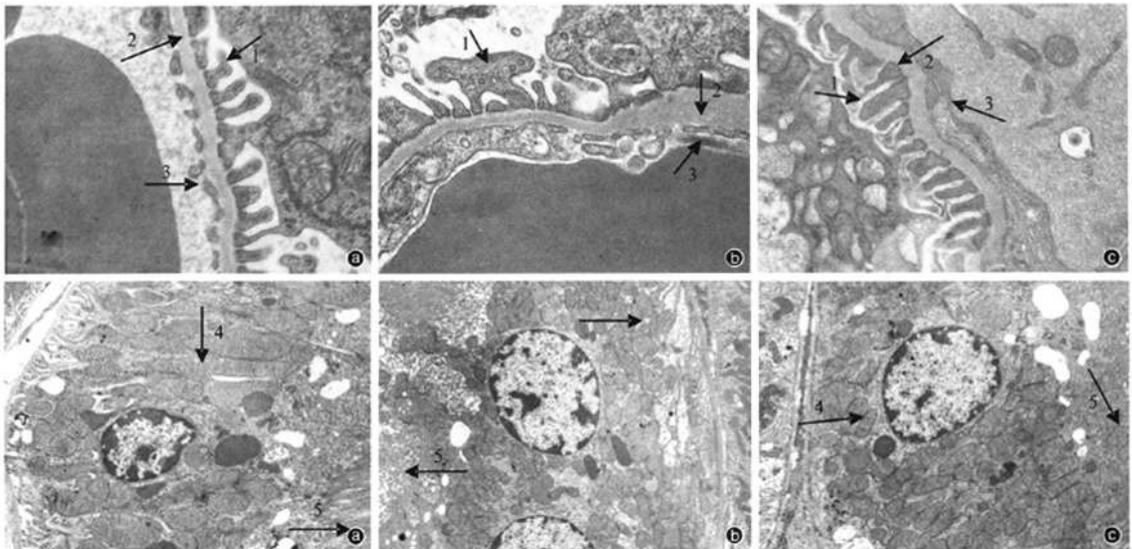


图2 电镜下观察各组大鼠肾小球及近曲肾小管超微结构变化 假手术组(a)肾小球滤过膜完整,基底膜厚度均匀,上皮细胞足突排列有序,内皮细胞形态正常,可见窗孔;近曲小管上皮细胞刷状缘绒毛排列整齐,染色质分布均匀,线粒体结构正常;模型组(b)肾小球基底膜部分增厚呈驼峰状,部分足突细胞融合,部分血管内皮细胞增生变厚;近曲小管游离面微绒毛数量明显减少,稀疏,排列不规则,线粒体部分或大部分嵴和少部分膜融合或消失,粗面内质网轻度扩张,脱颗粒现象明显;血必净组(c)肾小球及近曲小管超微结构改变均较模型组轻;箭头1~3依次为肾小球足突细胞、基底膜、内皮细胞 箭头4~5依次为肾近曲小管线粒体、微绒毛 铀-铅双染 × 5 000