

## 低分子右旋糖酐联用速尿对阿霉素肾病鼠足突形态的影响

刘秉彦, 谢瑶芸\*, 王东林, 陈景波

**摘要:**目的 建立大鼠微小病变型肾病综合征模型, 观察低分子右旋糖酐对肾病综合征水肿状态时肾小球基底膜足突形态的影响。方法 采用连续式静脉输液法给药。标本用透射电镜观察, 通过体视学方法比较正常组、模型组、盐水组(生理盐水+速尿)与右糖组(低分子右旋糖酐+速尿)肾小球基底膜足突形态的变化。结果 正常组足突呈细长的指状突起, 相邻足突之间的间隙及裂孔隔膜清楚可见, 模型组足突广泛融合, 足突间隙及裂孔隔膜消失, 盐水组足突绝大部分处于融合状态, 小部分虽未融合但仍处于明显肿胀的状态, 右糖组足突肿胀明显减轻, 表现为足突局段融合、局段肿胀与局段完全恢复正常混同存在的现象, 多数足突间隙逐渐显现, 有些甚至可清楚的看到裂孔隔膜。体视学形态计量结果表明, 正常组与模型组, 正常组与盐水组, 右糖组与模型组, 右糖组与盐水组这 4 对配组间体积密度、面密度及比表面均有显著差异或高度差异( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), 而右糖组与正常组、模型组与盐水组之间体积密度、面密度无差异( $P>0.05$ ), 比表面有显著差异( $P<0.05$ )。结论 低分子右旋糖酐应用于水肿状态的肾病综合征, 可以显著减轻足突肿胀并逐渐解除其融合状态。

**关键词:** 肾病综合征; 右旋糖酐; 肾小球基底膜; 体视学; 足突

**中图分类号:** R692 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2011)11-1327-03

## The Effects of Low Molecular Dextran and Furosemide to Anionic Sites of Glomerular Basement Membrane.

LIU Bing-yan, XIE Yao-yun, WANG Dong-lin et al. (The Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311, Hainan, P. R. China; corresponding author: Xie Yao-yun, E-mail: hnxieyaoyun@sina.com)

**Abstract Objective** To investigate the effect of low molecular dextran (LMD) and furosemide under edema state on anionic sites (AS) of glomerular basement membrane (GBM) by establishing the rat models of minimal change nephrotic syndrome (MCNS). **Methods** Low molecular dextran (LMD) and furosemide were given by continuously intravenous drip. The specimens were observed under transmission electron microscope. The changes of AS in normal group, model group, normal saline group (normal saline + furosemide) and LMD group (LMD + furosemide) were compared after stained with methods of polyethyleneimine (PEI). **Results** The AS of normal group were equal and regularly distributed with relatively larger particles and without loss of the number. While irregularly and unevenly distributed AS with loss of particles were noticed in other groups. The degree of loss of AS in each group from severe one to light one was in the order of model group, normal saline group, LMD group. The number of AS in inner and outer tectorium of GBM in the three groups was significantly different ( $P<0.01$ ), but without significant difference between LMD group and normal group ( $P>0.05$ ). **Conclusion** LMD and furosemide had an effect of quickly recovering the number of AS while applying to MCNS with edema state.

**Key Words:** Minimal change nephrotic syndrome; Low molecular dextran; Glomerular basement membrane; Anionic sites

低分子右旋糖酐(以下简称右旋糖酐)是临床常用的扩容剂, 具有抗凝、降脂、改善微循环和缓解水肿的作用, 但其用于肾性水肿时对肾小球滤过膜足突形态的影响尚不清楚。阿霉素诱导的大鼠肾病是一种公认的类似于人类微小病变型肾病的动物模型, 其典型的超微结构变化是肾小球基底膜上足突肿胀并广泛融合。本研究通过向肾病鼠体内输注右旋糖酐来初步了解该药对足突形态的影响。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物和材料 健康雄性 SD 大鼠 50 只, 体重 200~250g, 标准饲料喂养, 自由摄食、饮水, 需留取尿标本时将大鼠置入代谢笼内, 禁食不禁水。阿霉素 10mg/支(深圳万乐药业有

限公司出品, 批号 0909C2), 低分子右旋糖酐分子量 40 000(D) (四川科伦药业有限公司生产)。

1.2 制作模型 按  $6\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  尾静脉注射阿霉素, 一次性复制肾病综合征模型( $n=40$ ), 正常对照组( $n=10$ )尾静脉注射等容积生理盐水。造模第 7d 开始, 每 2d 用试纸检测尿蛋白情况, 若尿蛋白呈进行性加重, 定性持续  $\geq 3+$ , 随机抽取 5 只大鼠, 肾脏组织病理见肾小球上皮细胞(足细胞)肿胀, 空泡样变, 并可见足突融合即证明造模成功。

1.3 给药途径及方法 制模成功后的大鼠共有 30 只存活并出现全身皮下水肿, 模型组、右糖组与盐水组随机各分配 8 只大鼠。选择尾静脉穿刺并留置静脉针。右糖组给予右旋糖酐, 盐水

基金项目 海南省自然科学基金(No.309088)

作者单位 海南省人民医院 海南 海口 570311

作者简介 刘秉彦(1971~), 女, 副主任医师, 硕士, 主要从事临床超声诊断工作。

\* 通讯作者 E-mail: hnxieyaoyun@sina.com

组给予等容积生理盐水,均配用速尿,用微量注射泵缓慢输注药物,正常组与模型组不予任何处理。右旋糖酐及生理盐水剂量按 20ml/kg 计算,输注速度 8.5ml/kg/h,速尿剂量按 15mg/kg,上述药物每日 1 次,连用 6 日。最后一次用药后 17h 将所有组别的大鼠腹腔注射 3%戊巴比妥钠麻醉(30mg/kg),取出双肾。

1.4 电镜标本制备 快速留取上述各组大鼠的肾皮质 1mm×1mm×3mm,置于 2.5% 戊二醛溶液 4℃固定 4h。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℃染色 10min,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,透射电镜观察。

1.5 体视学形态计量分析 将各组包埋块的超薄切片中,于 10 000 倍下随机拍摄 5 个不同视野,每组动物共摄片 20 张,摄片部位为非系膜区足突,采用复膜光栅矫正放大倍数再统一放大至 10 万倍得到放大照片,然后按体视学网格测量方法提取二维形态参数,网格有 21 条纵线和 31 条横线共 651 个交叉点,提取参数后代入相应体视学公式(1~3)计算出足突的三维形态参数,包括体积密度( $V_v$ )、面密度( $S_v$ )、比表面( $\delta$ )。体积密度说明单位参照空间体积内足突的体积变化,面密度说明单位参照空间体积内足突表面积的变化,比表面代表足突表面积与自身体积之比。足突三维参数的标准差公式(4)与普通统计学有所不同,三项参数的标准差计算亦有所不同,其中面密度及比表面的标准差需乘以系数  $2/\sqrt{z}$ 。标准误公式与统计学相同(5),但用  $W$  表示<sup>[1]</sup>。

$$V_v = \frac{\sum_{i=1}^n P_{vi}}{\sum_{i=1}^n P_{xi}} \quad (1) \quad \delta = \frac{2 \sum_{i=1}^n I_{xi}}{Z \sum_{i=1}^n P_{xi}} \quad (2) \quad S_v = V_v \cdot \delta \quad (3)$$
$$S = \sqrt{\frac{N^2(\sum X^2 + M^2 \sum Y^2 - 2M \sum XY)}{(N-1)(\sum Y)^2}} \quad (4) \quad W = \frac{S}{\sqrt{N}} \quad (5)$$

1.6 统计学方法 采用 SPSS11.5 软件进行统计学处理,所有计量资料用  $\bar{x} \pm W$  表示,组间比较采用配对  $t$  检验,统计学差异以  $P < 0.05$  为差异有显著性,  $P < 0.01$  为高度显著。

2 结果

2.1 透射电镜观察结果 见图 1~4。正常组大鼠足突呈指状突起整齐的附着于肾小球基底膜上,相邻足突之间的间隙及裂孔隔膜清楚可见;模型组足突广泛融合,足突间隙及裂孔隔膜消失;盐水组绝大部分足突处于广泛融合状态,小部分足突虽未完全融合但肿胀依旧十分明显,而右糖组足突肿胀明显减轻,

表现为足突局段融合、局段肿胀与局段完全恢复正常混同存在的现象,多数足突间隙逐渐显现,有些甚至可清楚的看到裂孔隔膜。

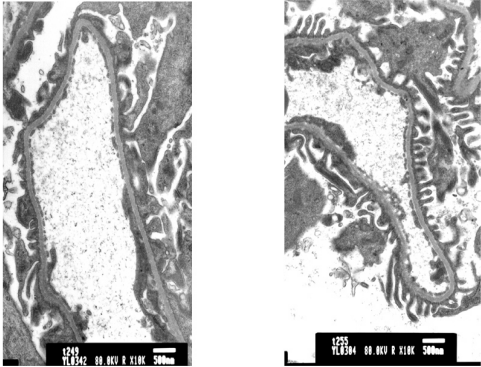


图 3 盐水组足突( $\times 10\ 000$ ) 图 4 右糖组足突( $\times 10\ 000$ )

2.2 体视学形态计量结果 见表 1 及表 2。

表 1 体视学形态测量结果( $\bar{x} \pm W$ )

参数及单位	正常组	模型组	盐水组	右糖组
$V_v (\mu m^3)$	$0.11 \pm 0.04$	$0.18 \pm 0.06$	$0.16 \pm 0.05$	$0.12 \pm 0.04$
$S_v (\mu m^{-1})$	$3.07 \pm 0.08$	$2.29 \pm 0.06$	$2.56 \pm 0.07$	$2.96 \pm 0.08$
$\delta (\mu m^{-1})$	$26.70 \pm 0.39$	$13.32 \pm 0.46$	$16.51 \pm 0.65$	$23.77 \pm 0.75$

表 2 体视学各项参数组间比较统计结果

参数及单位	正常-模型	正常-盐水	正常-右糖	模型-盐水	右糖-模型	右糖-盐水
$V_v$ $t$ 值	-3.881	-4.631	-1.382	1.066	-3.422	-4.165
$V_v$ $P$ 值	0.001	0.000	0.183	0.300	0.003	0.001
$S_v$ $t$ 值	2.504	2.206	0.477	-1.074	3.168	2.781
$S_v$ $P$ 值	0.022	0.040	0.639	0.296	0.005	0.012
$\delta$ $t$ 值	13.101	10.688	5.225	-2.998	11.873	6.606
$\delta$ $P$ 值	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000

从表 2 可以看出,正常组与模型组,正常组与盐水组,右糖组与模型组,右糖组与盐水组这 4 对配对组间体积密度、面密度及比表面均有显著或高度差异( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ),而右糖组与正常组、模型组与盐水组之间体积密度、面密度均无差异( $P > 0.05$ ),比表面有高度差异( $P < 0.01$ )。

3 讨论

以往文献关于肾病鼠治疗方面的实验研究大都采用口服给药的方法,而本实验首次大胆采用了连续式静脉输液的方法,这需要事先在大鼠的尾静脉留置套管针,我们借鉴陈学新<sup>[2]</sup>等人的技术并在实践中进行了改良,很好地避免了大鼠撕咬破坏针管,并取得很好的效果,这为今后采用连续式静脉用药进行相关研究提供了宝贵的经验。

阿霉素肾病鼠模型无论从临床表现还是病理变化均符合人类微小病变型肾病,水肿阶段肾小球滤过膜超微结构最具典型变化,组织电镜下分子屏障出现孔径大小及足细胞形态的改变,表现为足细胞肿胀、空泡样变以及足突广泛融合,裂孔隔膜消失等。足突间裂孔隔膜是构成肾小球滤过屏障的主要结构基础,是肾小球滤过屏障最重要的部分,它在蛋白尿的发生中起着重要的作用,当足突严重肿胀导致裂孔隔膜消失即是蛋白尿发生的形态学基础<sup>[3,4]</sup>,从电镜照片可以看出,盐水组与模型组足突严重肿胀,裂孔隔膜均消失,而右糖组多数足突间隙开

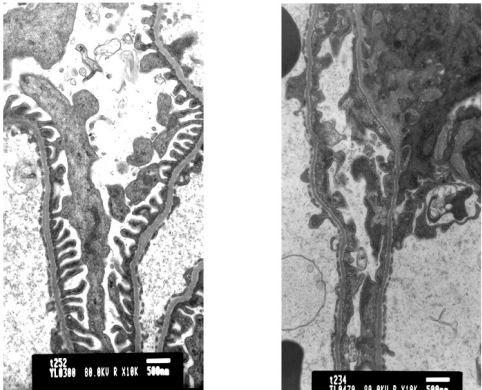


图 1 正常组足突( $\times 10\ 000$ ) 图 2 模型组足突( $\times 10\ 000$ )

始显现,有些甚至可清楚的看到裂孔隔膜,仅次于正常组。

体视学<sup>[1-5]</sup>评价结果显示,连续用药 6d 后,右糖组与正常组之间足突的体积密度和面密度已无统计学差异,说明右旋糖酐配用速尿在缓解机体水肿的同时,能有效地改善足突的异常状态,使原来弥漫性肿胀融合的足突逐渐消除肿胀,解除融合,体积逐渐回缩,表面积逐渐增加,各参数逐渐趋于正常。模型组与盐水组之间体积密度和面密度亦无统计学差异,说明生理盐水配用速尿对足突的肿胀状态尚无明显改善。另外,虽然模型组与盐水组、右糖组与正常组之间体积密度、面密度无差异,但比表面却有差异,这说明三维形态参数中比表面是较为敏感的指标,又由于其中盐水组略好于模型组,考虑盐水组虽输注了盐水,但速尿的使用可能还是在某种程度上减轻了足突的水肿;右糖组除使用右旋糖酐外同样加用了速尿,但足突病理状态恢复比较理想,仅次于正常组,说明尽管速尿可能有一定积极作用,但右旋糖酐的作用更重要,两者配合使用可达到最佳效果。

分子量 40 000(D)的右旋糖酐,半径约为 4.5nm<sup>[6,7]</sup>,加之其线性、易弯曲<sup>[8]</sup>的结构特点完全可以通过大鼠肾小球滤过膜的分子屏障<sup>[9]</sup>而不影响药物排泄,该药在肾小管内形成高渗,有利于排尿量的增加,配合速尿的使用有利于快速缓解机体水肿状态。我们认为右旋糖酐可能通过逆转足细胞的水肿变性状态从而促进足突形态的恢复。临床上 MCNS 的特点是起病急骤,尿蛋白很快达到 +++,机体也在短时间内即进入高度水肿状态,而此时激素或中药还尚未控制病情,右旋糖酐的应用,可以快速缓解机体水肿,包括缓解胃肠道水肿,这有利于激素以及中药的吸收和药效的发挥。临床研究中已有文献报道右旋糖酐用于 MCNS 水肿的疗效较白蛋白更优越<sup>[10,11]</sup>,本文认为尽管右旋糖酐的半衰期较短,但右旋糖酐能够促进足突形态和功能的恢复则会使其更加受到重视,我们期待这些新的发现能够促进 MCNS 的治疗向以中药为主的中西医结合方向发展。

#### 参考文献:

- [1] 郑富盛. 细胞形态立体计量学[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1990,12-153.
- [2] 陈学新,郑月梅,熊利泽,等. SD 大鼠尾静脉穿刺置管实用技术[J]. 宁夏医学院学报,2008,30(1):114.
- [3] Takeda T, McQuistan T, Orlando RA, et al. Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton[J]. J Clin Invest, 2001, 108(2):289-301.
- [4] Pierchala BA, Munoz MR, Tsui CC. Proteomic analysis of the slit diaphragm complex: CLIC5 is a protein critical for podocyte morphology and function[J]. Kidney Int, 2010 Jul 21. [Epub ahead of print]
- [5] Nyengaard JR. Stereologic Methods and Their Application in Kidney Research[J]. J Am Soc Nephrol, 1999, 10:1100-1123.
- [6] Mishler JM, Ricketts CR, Parkhouse EJ. Urinary excretion kinetics of hydroxyethyl starch 350/0.60 in normovolaemic man [J]. J Clin Pathol. 1981, 34(4):361-365.
- [7] Friedman S, Jones HW 3rd, Golbetz HV, et al. Mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. II. A study of the size-selective glomerular filtration barrier[J]. Diabetes, 1983, 32 Suppl 2:40-46.
- [8] Venturoli D, Rippe B. Ficoll and dextran vs. globular proteins as probes for testing glomerular permselectivity: effects of molecular size, shape, charge, and deformability[J]. Am J Physiol Renal Physiol. 2005, 288(4):F605-613.
- [9] Rodewald R, Karnovsky MJ. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse [J]. J Cell Biol, 1974, 60(2):423-433.
- [10] 邹和群,李昌荣,陈铭珍,等. 反复输入白蛋白对儿童单纯性肾病缓解与复发的影响[J]. 中华儿科杂志,1996,34(2):98.
- [11] 周太光,卢昌碧. 低分子右旋糖酐与白蛋白治疗小儿肾病综合征重度水肿的疗效比较[J]. 西部医学,2010,2:237-239.

收稿日期:2011-06-27 编辑:吴中菲

## 《中国热带医学》征订启事

《中国热带医学》杂志(China Tropical Medicine)是经国家科学技术部批准,由中华人民共和国卫生部主管,中华预防医学会和海南省疾病预防控制中心主办的国家级中华预防医学会系列杂志。月刊,大16开,128页。本刊现为中国学术期刊综合评价数据库统计期刊、中国生物医学文献数据库、万方数据库数字化期刊群、中国核心期刊(遴选)数据库、中国期刊全文数据库等国内数据库来源期刊,被MEDLINE、CAB International、《美国化学文摘》等国际文献检索系统文摘期刊收录。2006、2008和2010年均为中国科技核心期刊,中国科技论文统计源期刊。

本刊主要报道寄生虫病、病毒、细菌性疾病、地方病、皮肤与性传播疾病、环境与职业卫生、食品与营养、中毒、健康教育等热带病防治、研究成果,国内外在热带病防治与研究中的新技术及发展趋势。本刊主要设论著、实验研究、临床研究、疾病监控、专家论坛(述评)、研究进展(综述)、短文等栏目。

订阅方式:1. 全国各地邮局 邮发代号 34-20

2. 《中国热带医学》编辑部 地址:海南省海口市海府路44号 邮政编码 570203

电话:0898-65377298,传真:0898-653221969(自动)

电子信箱:ctmfff@163.com,ctmfff@vip.163.com

网址: http://www.cntropmed.com