

· 论 著 ·

肾脏损伤早期肿瘤坏死因子- $\alpha$  表达的实验研究韩晓鹏<sup>1</sup>, 李新源<sup>1</sup>, 魏登文<sup>1</sup>, 苗鹏程<sup>1</sup>, 孙少华<sup>2 $\Delta$</sup> 

(1. 兰州军区兰州总医院普外科, 甘肃 730050; 2. 兰州大学医学院第一附属医院病理科, 甘肃 730000)

**摘要:**目的 探讨外源性肾上腺髓质素(ADM)对肾脏机械性损伤早期肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )表达的影响。方法 选健康成年普通级 Wistar 大鼠 104 只,随机分为 4 组:对照组 8 只、创伤组 32 只、伤前给药组 32 只、伤后给药组 32 只,后 3 组的动物分别于创伤后 1、6、12、24 h 各处死 8 只。采用自由落体打击仪直接打击大鼠脊肋区制作肾脏机械性损伤模型。ADM 分别于创伤前或创伤后 10 min 采用腹部注射法给药。实验动物采用快速心脏采血法处死。迅速解剖动物提取下肾脏标本,10% 甲醛固定,免疫组化染色观察 TNF- $\alpha$  在组织中的表达规律。结果 创伤组于创伤早期 TNF- $\alpha$  表达均高于对照组,外源性 ADM 早期(1、6 h)可抑制 TNF- $\alpha$  表达( $P < 0.05$ )。结论 TNF- $\alpha$  在创伤早期即参与了肾组织炎症的急性期反应并加重损伤。ADM 能降低巨噬细胞的白细胞趋化物的分泌水平,降低 TNF- $\alpha$  的分泌。

**关键词:**肾脏损伤;肾上腺髓质素;肿瘤坏死因子  $\alpha$ 

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.16.009

中图分类号:R365.692

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)16-2111-03

Experimental research of the expression of TNF- $\alpha$  in renal early traumaHAN Xiao-peng<sup>1</sup>, LI Xin-yuan<sup>1</sup>, WEI Deng-wen<sup>1</sup>, et al.

(1. Department of General Surgery, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Command, PLA, Lanzhou, Gansu 730050, China; 2. Department of Pathology, First Affiliated Hospital, Lanzhou University Medical School, Lanzhou, Gansu 730000, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects of TNF- $\alpha$  expression about mechanical renal trauma with extragenous ADM. **Methods** There were 104 healthy adult plain grade Wister rtas, randomly divided into four groups: 8 in the group of control, 32 in the group of trauma, 32 in the group injected ADM before trauma, 32 in the group injected ADM post trauma. 8 rats in the last three groups were excuted at 1, 6, 12, 24 h post trauma respectively. The experimental models of rat kidney with mechanical trauma were prepared by striking the area of rat skin reflecting by kidney with free dropping ferreous hammer. ADM administrated by intraperitoneal injection at 10 minutes before trauma or post trauma respectively. All rats were executed by drawing-out all the blood in their hearts. Renal tissue was investigated to study positive expression of TNF- $\alpha$  after SABC stained. **Results** The TNF- $\alpha$  expression of trauma group was more positive than that of control group in the wound early time. The extragenous ADM inhibited the expression of TNF- $\alpha$ (1, 6 h) ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The TNF- $\alpha$  participates in the kidney tissue acute inflammatory stage and aggravates the damage in early time. ADM can reduce the secretion level of leukocyte chemotaxi of macrophage and the expression of TNF- $\alpha$ .

**Key words:** renal trauma; ADM; TNF- $\alpha$ 

随着创伤的日益增加,肾脏损伤的发生率亦有明显增加趋势。肾脏损伤在泌尿系统损伤中仅次于尿道损伤而居第 2 位。有关创伤免疫的研究日益受到国内外学者的极大关注。本文对外源性肾上腺髓质素(ADM)对肾脏机械性损伤肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )表达的影响进行研究,进一步探讨外源性 ADM 是否具有调节肾脏损伤后免疫失衡的作用。

**1 材料与方**

**1.1 实验动物** 健康清洁级 Wistar 大鼠由兰州大学动物实验中心提供(动物合格号:医动字 14-006),雌雄各半,体质量(210 $\pm$ 30)g,鼠龄 3 个月,分笼饲养。

**1.2 实验药品及试剂** (1)固体石蜡、10%福尔马林、苏木素复染液、梯度乙醇、二甲苯、40 mg/L 水合氯醛、蒸馏水、去离子水等由兰州大学法医学教研室提供;(2)肾上腺髓质素(ad-

renomedullin Rat1-50, ADM)购自美国 CALBIOCHEM 公司,货号 121703。TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、TNFR 一抗及 SABC 免疫组化试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。

**1.3 主要仪器** (1)生物撞击仪:自行研制<sup>[1]</sup>;(2)光学显微镜及显微照相系统:日本 Olympus 公司;(3)计算机 Mias 图像分析系统:四川大学图像图形研究所;(4)切片机:德国 AQ820;(5)电子分析天平:上海天平仪器厂;(6)微量加样器(20~200  $\mu$ L、0~10  $\mu$ L):Labsystem 公司;(7)冰箱、恒温电烤箱、微波炉、湿盒等。

**1.4 实验动物分组** 将 104 只 Wistar 大鼠随机分为 4 组,即对照组(8 只)、创伤组(32 只)、伤前给药组(32 只)、伤后给药组(32 只)。后 3 组分别在打击后 1、6、12、24 h 各处死 8 只。

**1.5 ADM 的配制与使用** ADM 使用前先用 0.9%生理盐水

 $\Delta$  通讯作者, E-mail: sunshaohua2006@sohu.com.

稀释成 50 nmol/L 母液,置于 -20 °C 保存。实验时按照 0.1 nmol/kg 计算每只动物所需的量,再以 0.9% 生理盐水稀释为 0.5 mL 终体积腹部注射即可。

**1.6 实验动物肾脏损伤模型的制作** 建立肾脏 I 级损伤动物模型及采集标本,动物不经任何麻醉处理,采用卧位将其四肢固定于打击台上,自 45 cm 高度处释放 160 g 铁质打击锤以自由落体下降直接打击脊肋区,分别间接打击双侧肾脏造成肾脏 I 级损伤(根据美国创伤外科学会器官损伤标准委员会制定的肾脏损伤标准<sup>[2]</sup>)。伤前给药组于打击前 10 min 及伤后给药组于打击后 10 min 均腹部注射 ADM 0.1 nmol/kg,各组动物均于 8:00 采用快速心脏采血法处死。处死前仰卧固定,用水合氯醛(3 mg/kg)深度麻醉,剪去胸腹部毛发,消毒,开胸、腹直视抽取心脏血致死。将采集到的血液迅速移入抗凝管中并轻轻摇匀备用,解剖及采血过程控制在 2 h 以内。各组肾脏经 HE 染色病理组织切片观察后符合肾脏 I 级损伤标准。根据美国创伤外科学会器官损伤标准委员会指定的肾脏标准选择打击强度。本实验选择 I 级损伤标准的致伤强度建立动物模型,镜下观察选择标准是组织中不出现出血灶,但有红细胞管型。

**1.7 组织的处理** 迅速解剖动物取下肾脏标本,10% 甲醛固定,经脱水、透明、石蜡包埋后,常规切片(4 μm),HE 染色和免疫组化染色观察。

**1.8 免疫组化过程** (1)采用 SABC 法,将防脱片处理过的组织捞片;(2)切片于 62 °C 烤片 12 h,二甲苯及梯度乙醇脱蜡至水;(3)热修复抗原,将切片放入有枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)的容器中,置微波炉中加热,中低火持续 2 min,取出容器冷却至室温;(4)用蒸馏水对切片清洗 1~2 次;(5)PBS 洗 3 次,每次 2 min;(6)H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消化 5~20 min;(7)在室温下用山羊血清封闭 20 min;(8)一抗(兔抗大鼠 TNF)4 °C 过夜;(9)0.01 mmol/L PBC 漂洗 3 次,每次 2 min;(10)室温下(20~30 °C)生物素化羊抗兔 IgG(二抗)20 min;(11)0.01 mmol/L PBC 漂洗 3 次,每次 2 min;(12)室温下(20~30 °C)SABC 20 min;(13)0.01 mmol/L PBC 漂洗 3 次,每次 2 min;(14)DAB 显色 12 min;(15)苏木素复染;(16)脱水(同 HE 染色中的相应处理);(17)透明(同 HE 染色中的相应处理);(18)封片(阴性对照用 PBS 代替一抗,阳性对照采用预实验中表达较好的组织)。

**1.9 阳性标准** 在高倍视野下出现棕黄色颗粒,特异性分布于细胞胞浆、胞核或胞膜。

**1.10 图像采集分析方法** 根据 Kraan 等标准略做修改,采用计算机图像分析系统分别对免疫组化染色切片 SAB 中免疫组化染色进行计量分析。在开机 20 min 后,用计算机图像分析系统在 10 倍物镜下采集图像,从每张切片中随机选取带有 1~2 个近皮质肾小球的区域,作为采集图像标准。在该视野中选取 5 个显色较好且非特异性背景染色控制良好的面积近似的肾小管区域进行平均黑度值测量。数据导出为 Excel 格式。

**1.11 统计学方法** 采用 SPSS11.0 统计软件分析及处理数据,以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

伤前给药组于伤后 1、12 h 处于高表达水平,伤后 6 h 低表

达,且较该时间点创伤组明显降低( $P < 0.05$ ),伤后 24 h 接近对照组水平,其余各时间点比较均无统计学意义。伤后给药组于伤后 1 h 明显低于该时间点创伤组和伤前给药组( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ),伤后 24 h 其表达明显高于伤后 1 h( $P < 0.01$ ),其余时间点之间比较均无统计学意义。创伤组各时间点与对照组比较及各时间点之间比较均无统计学意义(表 1、插图 II 图 1)。

表 1 各组大鼠肾组织 TNF-α 阳性表达( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | n | TNF-α(黑度值)                        |
|---------|---|-----------------------------------|
| 正常对照组   | 8 | 111.268 5 ± 5.934 0               |
| 创伤组     |   |                                   |
| 伤后 1 h  | 8 | 120.040 4 ± 8.082 3               |
| 伤后 6 h  | 7 | 121.880 5 ± 9.181 6               |
| 伤后 12 h | 8 | 111.336 9 ± 6.657 6               |
| 伤后 24 h | 8 | 113.460 7 ± 7.377 8               |
| 伤前给药组   |   |                                   |
| 伤后 1 h  | 8 | 114.558 7 ± 6.212 0               |
| 伤后 6 h  | 7 | 107.335 9 ± 6.305 6 <sup>■</sup>  |
| 伤后 12 h | 8 | 116.827 9 ± 3.923 0               |
| 伤后 24 h | 7 | 111.894 9 ± 8.820 8               |
| 伤后给药组   |   |                                   |
| 伤后 1 h  | 7 | 103.388 8 ± 4.585 0 <sup>▲#</sup> |
| 伤后 6 h  | 8 | 112.905 0 ± 10.864 2              |
| 伤后 12 h | 6 | 111.775 6 ± 6.794 7               |
| 伤后 24 h | 8 | 117.575 1 ± 5.219 7               |

▲:与创伤组伤后 1 h 比较, $F = 9.690$ , $P < 0.05$ ;■:与创伤组伤后 6 h 比较, $F = 4.365$ , $P < 0.05$ ;#:与伤前给药组同时点比较, $F = 12.236$ , $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

ADM 是于 1993 年从人嗜铬细胞瘤中发现一种由 52 个氨基酸残基组成的活性肽<sup>[3-5]</sup>,其具有广泛的生物学作用:(1)可抑制致炎因子释放;(2)有细菌脂多糖存在时能降低肺泡巨噬细胞白细胞趋化物分泌水平;(3)可提高 IL-6 而降低 TNF-α 的分泌;(4)降低炎性渗出;(5)扩张血管,增加管壁通透性,增强 IL-6 诱导的中性粒细胞聚集;(6)对炎症血管反应具有抑制作用。有研究显示,创伤性炎症诱导 T 细胞产生免疫源性降钙素基因相关肽(CGRP),可负性调节免疫细胞的功能;ADM 属于 CGRP 家族,具有炎症调节作用,而致炎因子又可促使 ADM 自分泌而发挥作用。

近年来国内外许多学者研究发现,TNF-α 与缺血再灌注损伤密切相关。TNF-α 主要是由激活的单核细胞、巨噬细胞、内皮细胞产生的细胞因子。TNF-α 是细胞因子家族中最强效的炎症介质,通过与 2 种特定的膜结合受体——TNF 受体 1 和 TNF 受体 2 结合而发挥生物学作用。TNF-α 大量表达后可通过直接的细胞毒作用,收缩血管以降低肾脏血流及聚集中性粒细胞和单核细胞等,导致肾脏细胞凋亡、肾小球纤维蛋白沉积、清蛋白滤过增加、滤过率下降、中性粒细胞浸润等,而这些因素可进一步加重肾脏损伤。TNF-α 还可能进一步导致缺

血再灌注损伤后出现肾脏失去功能和细胞死亡。本实验结果表明,创伤后 1、6 h TNF- $\alpha$  表达均高于对照组,并于 6 h 达到峰值,12、24 h TNF- $\alpha$  表达降低并接近对照组。说明 TNF- $\alpha$  在创伤早期即参与了肾组织炎症的急性期反应并加重损伤。TNF- $\alpha$  可促进内皮细胞表达黏附因子,增强白细胞与之黏着,促进中性粒细胞聚集和激活间质释放蛋白水解酶诱发炎症反应<sup>[5]</sup>。TNF- $\alpha$  可以刺激单核巨噬细胞和其他类型的细胞分泌 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-2 等炎性细胞因子以放大或间接增强其本身的效应,这些效应加重了创伤局部的炎症反应。另一方面渗出的炎性细胞及其释放的蛋白水解酶促进了创伤坏死组织的吞噬和分解,有利于坏死组织的清除和创伤的修复,减少 TNF- $\alpha$  的释放,故表现在本实验创伤组中 12、24 h TNF- $\alpha$  表达降低并接近对照组。创伤组各时间点与对照组比较及各时间点之间比较差异均无统计学意义,提示 TNF- $\alpha$  参与炎症的过程既有放大本身的效应,又可间接地减少自身的释放。

伤前给药组 TNF- $\alpha$  表达于伤后 1、12 h 处于高表达水平。伤后 6 h 低表达,且较该时间点创伤组明显降低( $P < 0.05$ ),伤后 24 h 接近对照组水平,其余各时间点比较差异均无统计学意义。血循环中 ADM 以 20 min 的半衰期迅速代谢<sup>[6]</sup>。伤前 10 min 注射,外源性 ADM 刚好处于半衰期内,与机体遭受创伤时产生的内源性 ADM 一起对创伤器官发挥了良好的保护作用。伤前给药组 TNF- $\alpha$  在 1、6 h 的表达低于创伤组同时时间点的表达,并与 6 h 比较差异有统计学意义。证实了 ADM 能降低巨噬细胞白细胞趋化物分泌水平,降低 TNF- $\alpha$  分泌。此效应及时地下调了急性创伤后 TNF- $\alpha$  的级联放大作用,避免创伤对肾脏组织的过度损害。

伤后给药组 TNF- $\alpha$  的表达于伤后 1 h 明显低于该时间点创伤组和伤前给药组( $P < 0.01$ )。说明创伤后注射 ADM 可明显抑制 TNF- $\alpha$  在伤后 1 h 的表达,且其效果优于创伤前给药。伤后 24 h TNF- $\alpha$  表达明显高于伤后 1 h( $P < 0.01$ )。分析其原因可能是伤后 24 h 外源性 ADM 基本已完全代谢,仅有内源性 ADM 发挥效应。

血浆中 ADM 主要来源于血管内皮细胞(VEC)和血管平滑肌细胞(VSMC),正常人血浆 ADM 浓度较低,大多为具有免疫反应性的 ADM-gly,它是 ADM 的一种中间形式,这也反映了 ADM 在组织中的产生过程<sup>[7]</sup>。IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、脂多糖

(LPS)、内皮素-1(ET-1)、血管紧张素-II 均可刺激 VSMC 分泌 ADM,而 ADM 能降低 TNF- $\alpha$  的分泌,抑制 TNF- $\alpha$  的级联放大作用,本实验结果与多数学者观点相吻合。

TNF- $\alpha$  是一种具有多种生物学功能的炎性细胞因子,参与了肾脏损伤的炎症发展过程,随着对 TNF- $\alpha$  研究的深入,可能为揭示肾脏损伤的发病机制提供新的理论依据,并为治疗肾脏损伤性疾病提供新的手段,如采用控制 TNF- $\alpha$  产生量、中和 TNF- $\alpha$  触发的细胞反应来防止 TNF- $\alpha$  所引起的组织损伤,利用转基因技术直接在炎症部位使 TNF- $\alpha$  等炎症介质失去生物学活性等。

#### 参考文献:

- [1] 蒙伶俐,孙少华,张军荣,等. 经体表创伤后肾脏组织中缺氧诱导因子-1 $\alpha$  表达的调控[J]. 第四军医大学学报, 2005,26(14):1311.
- [2] Moore EE, Shackford SR, Pachter HL, et al. Organ injury scaling: spleen, liver, and kidney[J]. J Trauma, 1989, 29: 1664.
- [3] Liu J, Chen M, Wang X. Calcitonin gene-related peptide inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin 12 release from mouse peritoneal macrophages, mediated by the cAMP pathway[J]. Immunology, 2000, 101(1): 61.
- [4] 蔡大勇,唐朝枢. 肾上腺髓质素的抗感染和炎症调节作用[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(3): 614.
- [5] Noiri E, Nakao A. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2001, 281: 948.
- [6] Betowski J, Jamroz A. Adrenomedullin-what do we know 10 years since its discovery[J]. Pol J Pharmacol, 2004, 56(1): 27.
- [7] Kitamura K, Kato J, Kawamoto M, et al. The intermediate form of glycine-extended adrenomedullin is the major circulating molecular form in human plasma[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 244(2): 551.

(收稿日期:2009-08-24 修回日期:2010-01-08)

(上接第 2110 页)

- [2] 毛新丽,静进,廖军娟. 8~12 个月龄 152 名儿童气质分析[J]. 中国儿童保健杂志, 2006, 8(14): 396.
- [3] 冯惠敏,岳亿玲. 婴幼儿气质的影响因素[J]. 安徽医科大学学报, 2009, 44(4): 512.
- [4] 刘国艳,王惠珊,张建端,等. 中国幼儿气质特征相关影响

因素的现状研究[J]. 中国社会医学杂志, 2007, 24(3): 167.

- [5] 夏梓红,文秋生,李光辉,等. 1~6 岁儿童气质相关因素的研究[J]. 中国儿童保健杂志, 2005, 13(1): 22.

(收稿日期:2009-07-18 修回日期:2010-01-19)

**《重庆医学》——中国科技论文核心期刊, 欢迎投稿, 欢迎订阅!**