

·专题报道·

西罗莫司延缓肾功能不全常染色体显性遗传性多囊肾病大鼠的疾病进程

崔心刚^{1,2}, 俞能旺¹, 安瑞华^{2*}, 王立明³, 梅长林⁴, 朱有华³

(1. 第二军医大学长征医院泌尿外科, 解放军泌尿外科中心, 上海 200003; 2. 哈尔滨医科大学附属第一医院泌尿外科, 哈尔滨 150001; 3. 第二军医大学长征医院器官移植科, 解放军器官移植研究所, 上海 200003; 4. 长征医院肾内科, 解放军肾脏病研究所)

[摘要] 目的: 观察西罗莫司对已经出现肾功能不全的常染色体显性遗传性多囊肾病(ADPKD)大鼠疾病进程的影响。方法: 20只6月龄ADPKD模型 Han:SPRD杂合子(Cy/+)雄性大鼠,均已出现肾功能不全,随机分成实验组和对照组,每组10只。实验组按0.2 mg·kg⁻¹·d⁻¹的剂量每天灌胃西罗莫司口服液1次,对照组常规饲养,观察生存情况,定期测量大鼠体质量和血尿素氮(BUN)等指标,实验45 d后处死大鼠取双肾,测定双肾质量、双肾质量/体质量比(2K/TBW),免疫组化染色,统计增殖细胞核抗原(PCNA)阳性细胞数。结果: 两组大鼠实验过程中均无死亡,体质量均增加,但两组间无显著差异;实验组与对照组BUN均进行性升高,但45 d实验组升高较对照组低12.5%(P<0.05);与对照组相比,实验组大鼠双肾质量、2K/TBW分别减少11.8%(P<0.05)和7.1%(P<0.01);实验组大鼠囊化程度较对照组轻,每个囊肿中PCNA阳性细胞数较对照组少(0.23±0.11 vs 0.47±0.24, P<0.05)。结论: 西罗莫司口服液可以延缓已经发生肾功能不全的 Han:SPRD大鼠肾功能减退的进程。

[关键词] 多囊肾,常染色体显性;肾功能衰竭;西罗莫司

[中图分类号] R 692.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)11-1170-04

Sirolimus slows down disease progression in rats with autosomal dominant polycystic kidney disease and renal dysfunction

CUI Xin-gang^{1,2}, YU Neng-wang¹, AN Rui-hua^{2*}, WANG Li-ming³, MEI Chang-lin⁴, ZHU You-hua³ (1. Department of Urology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Urology Center of PLA, Shanghai 200003, China; 2. Department of Urology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001; 3. Department of Organ Transplantation, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Organ Transplantation Institute of PLA, Shanghai 200003; 4. Department of Nephrology, Changzheng Hospital, Kidney Disease Research Institute of PLA)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the influence of sirolimus on the disease progression of a rat model of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) - Han:SPRD with chronic renal insufficiency. **Methods:** Twenty 6-month-old male ADPKD heterozygous (Cy/+) rats with chronic renal insufficiency were divided into 2 groups at random (n=10). Rats in experimental group received intragastric administration of sirolimus (0.2 mg·kg⁻¹·d⁻¹) for 45 days and those in control group were bred routinely. The general state and renal function of rats were monitored throughout the treatment. The rats were sacrificed 45 days later and both kidneys were harvested, weighed; and the 2-kidney/total body weight (2K/TBW) ratio was determined. Then the kidneys were subjected to immunohistochemistry examination and the numbers of cells positive of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) were counted. **Results:** There was no death in the 2 groups and all rats gained weights, with no significant difference between the 2 groups. Blood urea nitrogen (BUN) increased progressively in both groups, with the increase in experimental group lower than that in the control group by 12.5% on 45 days after administration (P<0.05). The 2-kidney-weight and 2K/TBW ratio in experimental group was lower by 11.8% (P<0.05) and 7.1% (P<0.01) than those in the control group, respectively. Renal enlargement and cystogenesis were inhibited by sirolimus, with the number of PCNA-positive cells per cyst being 0.23±0.11 in experimental group and 0.47±0.24 in the control group (P<0.05). **Conclusion:** Sirolimus can slow down the disease progression in Han:SPRD rats with ADPKD, even though they had been in a condition of renal insufficiency.

[KEY WORDS] polycystic kidney, autosomal dominant; kidney failure; sirolimus

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(11):1170-1173]

常染色体显性遗传性多囊肾病 (autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD) 是一种以双肾出现无数液性囊泡为主要特征的疾病, 发病率在 1/500 ~ 1/1 000, 是人类最常见的遗传性肾病。我国约有 150 万 ~ 300 万患者。患者通常在 30 ~ 40 岁时发病, 主要临床表现为高血压、腰痛、血尿、泌尿系统结石或感染、进行性肾功能减退, 约在

[基金项目] 黑龙江省博士后基金(LRB04-228); 第二军医大学长征医院“三重三优”优秀青年后备人才基金。Supported by Fund for Postdoctor Candidate of Heilongjiang Province(LRB04-228) and the Key Superior Program of Changzheng Hospital.

[作者简介] 崔心刚, 博士, 讲师、主治医师。现在哈尔滨医科大学附属第一医院泌尿外科博士后流动站, 哈尔滨 150001。

* Corresponding author. E-mail: anruihua@yahoo.com.cn



5~10 年间进展到终末期肾病。ADPKD 的治疗目前尚无有效方法, 很多学者致力于寻找能有效延缓多囊肾疾病进程的药物。最近两项关于抗排斥药物西罗莫司的动物实验^[1,2], 观察到其对 Han:SPRD 大鼠的肾功能减退有延缓作用。但这两个实验都是从大鼠肾功能尚正常时开始给药的。本实验探讨对于已经开始发生肾功能不全的 Han:SPRD 大鼠, 西罗莫司是否具有延缓其疾病进程的作用。

1 材料和方法

1.1 试剂和动物来源 Han:SPRD 大鼠由第二军医大学长征医院肾内科惠赠, 第二军医大学实验动物中心 SPF 级动物房饲养、繁殖。兔抗增殖细胞核抗原 (Rabbit anti-PCNA) 购于美国 Santa Cruz 公司; EnVision 试剂 (HRP/Rabbit) 即用型购于丹麦 DAKO 公司。西罗莫司口服液 (赛莫司) 由杭州中美华东制药有限公司提供, 规格为 50 ml:50 mg, 批号: 280514511125。贮存条件: 闭光, 密封, 2~8℃ 冷藏。

1.2 动物分组与处理 取 20 只 6 月龄雄性 Han:SPRD 杂合子 (Cy/+) 大鼠, 均已经开始出现肾功能不全 [血尿素氮 (BUN) 为 (9.89 ± 1.59) mmol/L], 随机分成实验组和对照组, 每组 10 只, 两组大鼠均能自由无限制摄食标准鼠粮和水。称体质量、眼眶静脉取血测 BUN, 然后实验组按 0.2 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 的剂量每天灌胃西罗莫司口服液 1 次, 对照组常规饲养。观察大鼠生存状况, 计量每日摄食量、摄水量, 每 15 d 重复测体质量、BUN, 第 45 天注射戊巴比妥 (40 mg/kg) 麻醉大鼠, 取出双肾, 去除肾脏包膜, 称量双肾质量, 计算双肾质量/体质量比 (2K/TBW)。大鼠肾组织切片经 4% 磷酸缓冲多聚甲醛溶液固定, 乙醇系列脱水并包埋在石蜡中, 进行 4 μm 厚的连续切片, 将肾脏组织常规制成 4 μm 厚组织切片, 备用。

1.3 大鼠血清 BUN 测定 眼眶静脉取血后即刻 4℃ 离心 (3 000 r/min × 10 min), 血清冰块冷藏立即送第二军医大学新药评价中心, 应用日立 7080 全自动生化分析仪测量 BUN, 试剂购于上海复星长征医学科学有限公司 (批号: D060723)。

1.4 组织学观察 采用免疫组化法, 取上述 4 μm 厚组织切片, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化, 3% 过氧化氢室温孵育 10 min 消除内源性过氧化物酶, 切片置 250 ml 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5, 含 1 mmol/L EDTA) 中, 600 W 微波炉 50% 强度加热 10 min, 切片在缓冲液中室温放置 20 min。TBS 洗切片 3 次 (将标本周围的缓冲液擦干), 将切片置于湿盒中, 切

片用 1:200 抗 PCNA 抗体室温孵育过夜; EnVision 试剂 37℃ 30 min, TBS 洗切片 3 次; DAB 显色 10 min, 苏木精复染, 封片。

1.5 PCNA 染色及阳性细胞计数 免疫反应产物呈棕褐色, 位于细胞核内。每只大鼠肾切片中随机抽取 100 个直径约 300 μm 大小的囊肿, 人工计数其中 PCNA 阳性细胞数。计数由不知实验内容的第二军医大学长海医院病理科医师完成。

1.6 统计学处理 全部计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用独立 *t* 检验, 重复测定数据的整体趋势比较采用重复测量设计的方差分析, *P* < 0.05 差异有统计学意义。

2 结果

两组大鼠实验过程中均无死亡, 也无明显衰弱迹象。两组鼠摄食量、摄水量均无明显差异; 体质量均增加, 但两组间无显著差异。实验组与对照组血清 BUN (mmol/L) 均进行性升高, 但 45 d 时实验组比对照组少升高了 12.5% (0.88 ± 0.46 vs 2.08 ± 1.4, *P* < 0.01, 图 1)。实验组大鼠双肾质量、2K/TBW 较对照组分别减少 11.8% (*P* < 0.05, 图 2A) 和 7.1% (*P* < 0.01, 图 2B)。

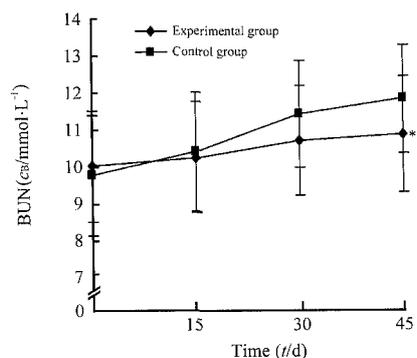


图 1 两组大鼠 BUN 的变化趋势

Fig 1 Changes of BUN in both groups

** *P* < 0.01 vs control group

免疫组化结果显示实验组和对照组均布满大小不等的囊泡和扩张的肾小管, 但对照组较实验组更为明显 (图 3); 每个囊肿中 PCNA 阳性细胞数相对对照组明显减少 (0.23 ± 0.11 vs 0.47 ± 0.24, *P* < 0.05)。

3 讨论

西罗莫司对 ADPKD 的作用可能是由于多囊素-1 (PC-1) 缺失导致了西罗莫司靶分子 (mTOR) 的

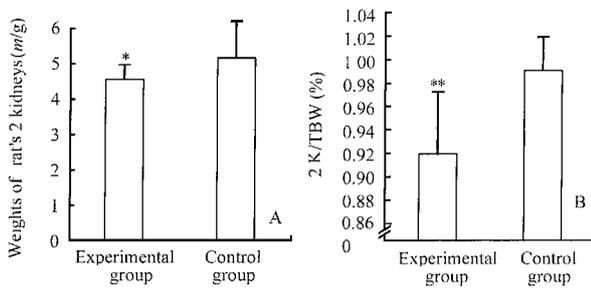


图 2 两组大鼠双肾质量(A)及 2K/TBW(B)的比较

Fig 2 Comparison of 2 kidneys weights(A) and 2-kidney/ total body weight ratio (2 K/ TBW, B) between 2 groups

* P<0.05, ** P<0.01 vs control group

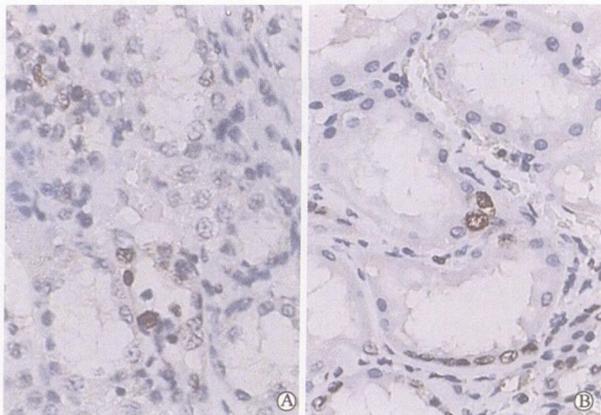


图 3 实验组(A)与对照组(B)肾组织 PCNA 免疫组化染色

Fig 3 Immunohistochemical examination of kidney tissue in experimental group(A) and control group(B) (En Vision, x200)

过度活化^[3],约有 85% 的 ADPKD 存在 PC-1 的缺失^[4]。在细胞中,西罗莫司与亲免疫蛋白结合,生成免疫抑制复合物。此复合物与 mTOR 结合,并抑制其活性。mTOR 是一种丝氨酸、苏氨酸蛋白激酶,它依次通过磷酸化 S6 激酶和 4E-BP1 促进蛋白的翻译表达,其活化与细胞生长、增殖、凋亡、分化均相关^[5]。

在国外进行的类似实验研究中,Tao 等^[6]给予 3 周龄 Han:SPRD 大鼠腹腔注射西罗莫司 0.2 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 共 5 周,结果对照组比给药组的 BUN 增加 59%,PCNA 阳性细胞对照组是给药组的 6 倍。随后 Wahl 等^[2]通过饮用水按 2 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 剂量给 5 周龄 Han:SPRD 大鼠西罗莫司 3 个月,结果发现服用西罗莫司后,多囊肾大鼠 BUN 和肌酐增长比对照组分别减少 39% 和 34%,双肾质量和 2K/TBW 分别

减少 34% 和 26%。囊肿容积密度也减少了 18%,多囊肾大鼠过表达的 S6 K 及其过度磷酸化,在服用西罗莫司后也显著地降低了。

以上两个实验都是在大鼠肾功能尚正常时给药的,而国内多囊肾患者很多都是在肾功能已经发生不全时才开始就诊或者开始愿意接受治疗的。Tao 等^[6]实验给药的途径是腹腔注射,临床如果长期应用该给药方法很不方便。Wahl 等^[2]给药剂量为 2 mg · kg⁻¹ · d⁻¹,按体表面积计算,约是目前肾移植术后患者应用西罗莫司剂量的 10 倍,其副作用及费用都显著增大。通过饮水给药会不会导致饮水量的变化,药物溶解在饮用水中 2 d(该实验 2 d 更换 1 次饮水)是否有分解变质?对这些问题该实验均未能顾及。鉴于此,我们设计了更符合临床 ADPKD 患者诊治特点的此项实验,即按 0.2 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 剂量灌胃(类似临床顿服药物)已经发生肾功能不全的 Han:SPRD 大鼠西罗莫司口服液,观察灌胃后疗效。

目前对 SD 大鼠血清 BUN 正常值上限,各实验室尚不统一。第二军医大学新药评价中心应用日立 7080 全自动生化分析仪测定 BUN,SD 大鼠的 BUN 上限定为 8.2 mmol/L。入选我们实验的 Han:SPRD 大鼠的 BUN 均大于此上限。目前也没有大鼠 CKD 分期分级的统一标准,根据第二军医大学长征医院肾内科多年喂养 Han:SPRD 大鼠经验,一般 BUN < 45 mmol/L 的多囊肾大鼠尚能正常生存,大鼠死亡时 BUN 平均值为 58 mmol/L,最大记录为 84 mmol/L。我们的 Han:SPRD 大鼠实验开始时 BUN 为 (9.89 ± 1.59) mmol/L,所以可以认为是处在肾功能不全早期。

目前在肾移植患者,西罗莫司一般按 2 mg · d⁻¹ 的剂量给药,按 500 g 左右体质量的大鼠体表面积校正,本实验大鼠用药剂量设定为 0.2 mg · kg⁻¹ · d⁻¹,大致与肾移植术后用量相同,并未观察到明显的副作用。下一步,我们考虑增加不同剂量的实验组,以便更有效的评估药物的正、副作用。

本实验结果显示,在灌胃西罗莫司 45 d 后,反映 Han:SPRD 大鼠生存状态的指标与对照组相比未有明显变化,而肾功能的减退速度有所下降,肾脏无论从大体上还是从病理切片上囊化进程都有所缓解,反映囊肿衬里上皮细胞增生速度的 PCNA 阳性细胞数量也相对减少。这些都表明,在已经发生肾功能不全的 Han:SPRD 大鼠,西罗莫司虽然不能逆转肾功能不全,但在一定程度上延缓了疾病的进展。但由于本实验只是针对肾功能刚开始发生不全

的 Han : SPRD 大鼠给予西罗莫司口服液得出的结论,对更晚期肾功能不全 Han : SPRD 大鼠西罗莫司的作用,尚需进一步实验观察。

西罗莫司作为抗排斥药物,临床上被用于器官移植术后抗排斥,其有效性和安全性已得到比较充分的证实。鉴于上述一系列实验和临床观察结果,未来可以考虑进一步开展西罗莫司治疗多囊肾病的临床试验,西罗莫司可能会成为多囊肾治疗的一个切实可行的药物。

[参考文献]

- [1] Mostov KE. mTOR is out of control in polycystic kidney disease[J]. Proc Natl Acad Sci,2006,103:5247-5248.
[2] Wahl PR, Serra AL, Le Hir M, et al. Inhibition of mTOR with sirolimus slows disease progression in Han : SPRD rats

- with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) [J]. Nephrol Dial Transplant,2006,21: 598-604.
[3] Shillingford JM, Murcia NS, Larson CH, et al. The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease [J]. Proc Natl Acad Sci,2006,103:5466-5471.
[4] Torra R, Badenas C, Darnell A, et al. Linkage, clinical features, and prognosis of autosomal dominant polycystic kidney disease types 1 and 2 [J]. J Am Soc Nephrol,1996,7: 2142-2151.
[5] Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth[J]. Cell,2000,103: 253-262.
[6] Tao Y, Kim J, Schrier RW, et al. Rapamycin markedly slows disease progression in a rat model of polycystic kidney disease [J]. J Am Soc Nephrol,2005,16: 46-51.

[收稿日期] 2006-09-27

[修回日期] 2006-10-29

[本文编辑] 贾泽军

· 个案报告 ·

同一患者痰培养标本中检出 2 株不同铜绿假单胞菌

Presence of 2 types of *Pseudomonas aeruginosa* in a sputum sample

吉 强,方 芳,王爱华 (第二军医大学东方肝胆外科医院实验诊断科,上海 200438)

[关键词] 假单胞菌,铜绿:感染

[中图分类号] R 517.9

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2006)11-1173-01

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)菌体一端有单鞭毛,属革兰阴性杆菌,是医院感染常见的条件致病菌,可引起机体多系统、多脏器或多部位等严重感染。由于该菌繁殖能力强,生长要求低,极易形成生物膜,对许多常用抗菌药物有天然耐药性。铜绿假单胞菌感染是目前各种感染中最广泛、最严重的问题之一^[1]。我院从 1 例肝癌术后感染的患者痰标本中分离出不同生物性状和不同药敏结果的铜绿假单胞菌,现报告如下。

1 临床资料 患者,女,38 岁,于 2005 年 9 月因肝癌入住我院。术后体温 38.9,实验室检查:WBC 25.90 × 10⁹/L, N 0.76, L 0.013, M 0.18,多次痰培养检出铜绿假单胞菌。

细菌培养鉴定:痰培养 24 h 后分离出 2 种菌株,一种为血平板上 - 溶血菌落,比例约为 35%,麦康凯平板呈淡黄色;另一种为血平板上 - 溶血菌落,比例约为 65%,继续培养 48 h 后出现 - 溶血,麦康凯平板呈淡粉红色。涂片染色 2 株细菌均为革兰阴性杆菌,菌体细长。2 株细菌的生化反应一致:氧化酶试验阳性,分解葡萄糖,不分解麦芽糖、甘露醇和蔗糖;动力、枸橼酸盐、精氨酸双水解酶和硝酸盐还原试验均阳性;吲哚、赖氨酸和鸟氨酸脱氢酶试验阴性。经生物梅里埃公司 ATB 细菌鉴定仪鉴定,鉴定条为 ID32 E,鉴定均为铜绿假单胞菌,鉴定值:淡黄色菌 id = 99.8%,粉红色菌 id = 99.9%。

药敏试验:用生物梅里埃公司 ATB PSE 5(00)药敏条在 ATB 检测仪上检测,淡黄色菌株药敏结果显示:复方氨苄西林、替卡西林、复方替卡西林、头孢他定、复方磺胺甲噁唑耐

药,亚胺培南、美洛匹宁中敏,替卡西林 PYO、替卡西林-克拉维酸 PYO、哌拉西林、哌拉西林 PYO、复方哌拉西林、哌拉西林-他唑巴坦 PYO、头孢吡肟、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、环丙沙星、多黏霉素 E 敏感;粉红色菌株药敏结果显示:复方氨苄西林、替卡西林、替卡西林 PYO、复方替卡西林、替卡西林-克拉维酸 PYO、哌拉西林、哌拉西林 PYO、复方哌拉西林、哌拉西林-他唑巴坦 PYO、亚胺培南、美洛匹宁、头孢他定、庆大霉素、复方磺胺甲噁唑耐药,头孢吡肟、环丙沙星中敏,阿米卡星、妥布霉素、多黏霉素 E 敏感。

2 讨论 从鉴定和药敏结果可看出,两株细菌虽然同为铜绿假单胞菌,但是它们的生物性状特别是药敏结果有很大的差异。在同一患者痰标本中分离出差异如此大的铜绿假单胞菌在文献中少见报道,为何会出现如此现象,是患者同时交叉感染了不同株的铜绿假单胞菌,还是由于抗生素选择等原因导致的不同药敏表现的菌株同时存在?对此类问题的探讨有利于指导临床药物治疗和耐药机制的研究。

[参考文献]

- [1] 何 林,张立军,李 勇,等. 铜绿假单胞菌对 22 种抗菌药物耐药性的差异[J]. 中华医院感染学杂志,2002,12:853-855.

[收稿日期] 2006-09-10

[修回日期] 2006-09-30

[本文编辑] 贾向春

[作者简介] 吉 强,检验技师. E-mail: ehbhjcjq@yaho. com. cn