

猪返流性肾脏病发病机理^①

黄锋先^② 李幼姬 叶任高 唐世聪

(中山医科大学附属第一医院肾脏研究所, 广州, 510089)

提 要 通过手术破坏猪的输尿管和膀胱的连接处,建立了国产香江猪膀胱输尿管返流(VUR)和返流性肾脏病(RN)的模型。RN组织学特点为肾极区不规则疤痕、局灶节段性肾小球硬化、肾小管萎缩、间质慢性炎症细胞浸润及小动脉狭窄或闭塞。实验表明:尿渗透压降低是反映RN肾组织学改变较敏感的指标,而蛋白尿是反映肾小球病变及预测RN预后的重要指标。尿路感染在RN发病中起重要作用。无菌非高压返流亦可致RN。

主题词 尿路感染;膀胱-输尿管回流;肾小球硬化症,局灶性

中图分类号 R693.13

返流性肾脏病(RN)是慢性肾功能衰竭的重要原因之一,日益受到国内外学者的重视。国外对其临床及动物实验均开展了较广泛的研究,但迄今国内仍未见动物实验的报道。本文首次报告RN动物模型的建立,并初步探讨RN的发病机理及组织学改变与肾功能损害的关系。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组

国产香江猪17只,均选用2个月龄雌性猪,每只体重9~15 kg,分3组:①对照组:3只,无膀胱输尿管返流(VUR),尿细菌培养阴性,②无菌VUR组:7只,VUR阳性,尿细菌培养阴性。③VUR并尿路感染(UTI)组:7只,VUR及尿细菌培养均阳性。

1.2 返流动物的制作

切开膀胱,显露术侧输尿管口,沿输尿管嵴纵行剪开输尿管的膀胱粘膜下段及部分肌间段,用5-0尼龙线间断缝合两侧肌间段创缘。或同时于膀胱外暴露术侧输尿管膀胱连

接处,纵切开膀胱,输尿管浆膜层,再沿切口分离或切开肌层,并用5-0尼龙线间断缝合,固定两侧肌层,使输尿管膀胱连接部上下共2 cm粘膜下层外露。术后术侧全部出现VUR。手术过程按无菌操作规程进行。术后均未作其它特殊处理。VUR分级按1981年国际返流研究委员会标准^[1]。除1例为I级外,余均II~III级返流。

1.3 观察项目

1.3.1 VUR诊断及生化检测 术前、术后4周及8周均作如下检查,共3次。①VUR影像检查:排尿期膀胱尿路造影(MCU)和直接法同位素膀胱输尿管返流显象(DRC)。凡MCU或/及DRC阳性者,诊断为VUR。②血样检验:抽血测血清肌酸酐(Scr)、尿素氮(BUN)。取膀胱穿刺尿或无菌导尿进行细菌定量培养,所有动物术前细菌培养均为无菌。③尿渗透压测定:禁饮6 h,经导尿或膀胱穿刺取尿液作尿渗透压测定。

1.3.2 部分动物行膀胱压力测定 无菌VUR组4例,VUR+UTI组5例,分别在术前后各进行膀胱压力测定1次。

① 卫生部科研基金资助课题;

② 第一作者,1960年出生,男,副主任医师

1.3.3 肾脏病理学检查 除 2 只动物(无菌 VUR 及 VUR+UTI 各 1 只)在 4 周杀检取肾脏检查外,余 15 只均在术后 8 周处死取肾组织行 HE 及 VG 染色后光镜检查。

1.4 统计学处理方法

两组均数间的显著性检验采用 t 检验。

2 结 果

2.1 各组术前、后生化指标及尿渗透压比较

①对照组 各项指标术前后差异均无显著意义。②无菌 VUR 组,见表 1。③VUR+UTI 组,见表 2。

表 1 无菌 VUR 组术前后生化指标及尿渗透压比较($\bar{x}\pm s$)

检测指标	术 前	术后 4 周	术后 8 周
尿渗透压(mmol/L)	564±203	408±96 ¹⁾	397±190 ¹⁾
尿蛋白 (mg/24 h)	201±115	282±115	414±126 ¹⁾
Scr ($\mu\text{mol/L}$)	67.78±19.50	71.43±15.38	81.33±21.22
BUN (mmol/L)	4.10±1.07	5.20±0.85	6.72±2.83

1)与术前比较 $P<0.05$

表 2 VUR+UTI 组术前后生化指标及尿渗透压比较($\bar{x}\pm s$)

检测指标	术 前	术后 4 周	术后 8 周
尿渗透压(mmol/L)	503±163	302±45 ¹⁾	213±38 ¹⁾
尿蛋白 (mg/24 h)	347±266	678±434	3 005±2 113 ¹⁾
Scr ($\mu\text{mol/L}$)	69.46±14.51	74.51±11.49	119.34±58.58
BUN (mmol/L)	3.64±1.26	3.98±1.20	8.36±9.32

1)与术前比较 $P<0.05$

术后 4 周尿渗透压下降在 VUR+UTI 组较无菌 VUR 组显著(302.0 mmol/L ± 41.5 mmol/L vs 408.0 mmol/L ± 96.9 mmol/L, $P<0.05$),同时, VUR+UTI 组术后 8 周尿蛋白量增加较无菌组明显(3 005 mg/24h ± 2 113 mg/24h vs 414 mg ± 126 mg/24 h, $P<0.05$),见表 1,表 2。两组动物术前后 BUN 和 Scr 的差异均无显著意义($P>0.05$)。

2.2 术前后膀胱充盈压

术前后膀胱充盈压(包括无菌 VUR 4 例和 VUR+UTI 5 例共进行膀胱测压 18

次)分别为 1.28 kPa ± 0.15 kPa vs 1.94 kPa ± 1.15 kPa, ($P>0.05$)。最大膀胱收缩压分别为 3.58 kPa ± 1.25 kPa vs 2.95 kPa ± 1.55 kPa, ($P>0.05$)。

2.3 肾脏病理学检查

2.3.1 肉眼观察 对照组肾脏大小、外形、肾盂肾盏均正常。无菌 VUR 组:4 只猪返流侧肾脏正常,2 只切面可见小疤痕;非返流侧正常。VUR+UTI 组:返流侧均见明显的上下极区疤痕,切面可见部分肾实质萎缩变薄,疤痕灶贯穿肾实质与肾盂相连,肾盂肾盏变形;非返流侧肾正常。

2.3.2 光镜检查 ①对照组肾内结构正常。②VUR 动物(包括无菌 VUR 及 VUR + UTI)病变区呈不规则片状夹杂于相对正常肾组织之间,分界清楚。病变区肾小球呈现典型的局灶节段性硬化(FSGS)及全球硬化。部分毛细血管祥与包曼性囊壁粘连,球周纤维化。肾小管萎缩,小管上皮细胞变平,管腔呈囊性扩大。间质可见大量慢性炎症细胞浸润,严重者呈淋巴滤泡形成,同时伴不同程度纤维组织增生。返流侧 42.8% 出现小动脉管腔变窄,管壁增厚,血管周围纤维化。有小动脉病变的均有肾小管萎缩。③在 VUR + UTI 组,3 只对侧非返流肾实质也出现局灶慢性炎症细胞浸润,其中 1 只可见部分肾小球呈 FSGS,1 只肾小管明显萎缩。

4 周处死的 2 只猪中,无菌 VUR 者仅光镜下见轻微肾小管萎缩;而 VUR + UTI 者,切面见点状疤痕,光镜下见肾小管明显萎缩,肾小球见 FSGS 及全球硬化。

2.3.3 无菌 VUR 与 VUR + UTI 光镜下改变比较 ①VUR + UTI 组 100% 出现 FSGS,而无菌 VUR 组仅 28% 有 FSGS,两者差异有显著意义($P < 0.05$)。②VUR + UTI 组发生肾小管明显萎缩较无菌 VUR 组多见(100% vs 14.3%, $P < 0.05$)。

2.4 组织学改变与 Scr、尿蛋白及尿渗透压的关系

有 FSGS 与无者比较,Scr 分别为 $104.3 \mu\text{mol/L} \pm 52.3 \mu\text{mol/L}$ vs $79.6 \mu\text{mol/L} \pm 19.4 \mu\text{mol/L}$, $P > 0.05$ 。但有 FSGS 者中 2 例 $\text{Scr} > 176.8 \mu\text{mol/L}$ 。有 FSGS 者,其尿蛋白量($2144 \text{mg} \pm 2113 \text{mg}/24 \text{h}$)较无 FSGS 者($411 \text{mg} \pm 129 \text{mg}/24 \text{h}$)明显升高($P < 0.05$)。肾小管明显萎缩者其尿渗透压下降较轻度萎缩者明显($245 \text{mmol/L} \pm 42 \text{mmol/L}$ vs $420 \text{mmol/L} \pm 156 \text{mmol/L}$), $P < 0.05$ 。

3 讨 论

由于人类 RN 的病理研究仅能来自肾切

除及肾活检标本,因而发病机理的研究受到很大限制。故多年来,学者们通过建立实验性 VUR 及 RN 的动物模型,以更清楚地观察各种因素在肾疤痕的发生和发展中所起的作用及 RN 的肾病理学改变与肾功能的关系。学者们曾利用鼠、兔、狗等动物制作 RN 的动物模型,但上述动物的肾结构均为单乳头型,不易产生肾内返流和进一步导致 RN。近年发现猪的肾乳头解剖类型及分布与人类完全一致,同时其尿路上皮细胞的大肠杆菌受体与人类相同。故近年国外大多数 RN 的动物实验研究均采用猪作为实验动物。但迄今为止,国内尚未见有关 RN 动物实验的报道。本研究采用国产猪作为实验动物,通过手术破坏输尿管膀胱连接处的方法成功地建立了实验性 VUR 及 RN 的动物模型。本实验模型 RN 的病理改变特点与文献报道相符^[2,4]。

RN 的确切发病机理目前仍未完全阐明。一般认为肾内返流是 VUR 造成 RN 的必要基础,但肾内返流导致肾疤痕的机制仍不清楚。多数学者认为 RN 肾损害的产生可能与菌尿、尿流动力学改变、免疫损害、血管病变及肾小球硬化等因素有关。

尿路感染(UTI)可促进肾疤痕的形成,已得到大多数学者认同。但 UTI 是否为 RN 肾疤痕形成的必要条件,仍有争论。本研究显示合并 UTI 的 VUR 动物,肾疤痕的程度较无菌 VUR 者明显,且前者肾小管明显萎缩和尿渗透压的下降,肾小球出现 FSGS 和尿蛋白量增加均较显著,提示 UTI 在 RN 肾疤痕的发生和发展中起重要作用。UTI 可由于直接导致组织破坏,或由于炎症导致间质水肿及炎症细胞渗出,进而阻断了肾小管间毛细血管对肾小管的血液供应,造成局部缺血,及细菌抗原引起局部免疫反应而导致肾损害。然而,本实验亦显示无菌性 VUR 组也出现肾小球及肾小管病变及肾功能损害,说明无菌返流也可引起肾疤痕,与某些文献报道相符^[1,5]。

尿流动力学改变在肾疤痕形成中所起的

作用日益受到重视。无菌高压返流可致肾疤痕形成已得到大多数学者认同^[6]。但低压无菌返流能否引起肾损害则尚未定论。本实验制作 VUR 模型与国外有些学者不同之处, 在于破坏膀胱输尿管时并未造成器质性尿路梗阻。术前和术后膀胱充盈压及最大收缩压均无明显差异说明本实验 VUR 模型应属非高压返流所致, 而无菌返流猪也出现肾损害, 提示非高压无菌返流亦可引起 RN。Ransley^[7]报道, VUR 动物当肾盂压力达 1.33 kPa 时即可引起肾内返流。

国外临床及动物研究提示免疫损害在 RN 肾损害的发病机理中起重要作用^[2,8]。本研究亦显示返流肾肾间质均见不同程度的慢性炎症细胞浸润, 部分可见类淋巴滤泡样改变。

本实验部分(42.8%)返流侧肾出现小动脉病变, 并出现明显的肾小管萎缩。提示局部血管病变所致的缺血在 RN 的发病中亦可能起一定作用。VUR 时, 感染所累及的部位由于广泛间质水肿的机械压迫, 致肾间质血管闭塞, 尤其肾小管旁的小血管。另外, 由于肾小管破裂, 尿渗漏至肾小管外间质及毛细血管及直血管旁, 引起炎症和纤维化, 也导致肾内血管闭塞、狭窄, 产生局部缺血^[9]。

返流动物有 64.3% 出现 FSGS 及全球硬化, 有 FSGS 者其尿蛋白的程度较无 FSGS 者显著。在有 FSGS 动物中, 虽有 2 例 Scr 超过 176.8 $\mu\text{mol/L}$, 而 Scr 的差异在统计学上无显著意义, 这可能与我们的观察例数较少及观察时间较短有关。RN 发生肾小球硬化的机理仍未明了, 可能原因: ①血流动力学异常, 肾疤痕的发展使残存的正常肾组织日益减少, 而残留的功能肾单位出现超滤过; 后者可直接损伤内皮细胞, 促使巨分子物质通过毛细血管壁进入肾小球系膜区而导致 FSGS。②免疫复合物在肾小球的沉积。③VUR 残余的正常肾组织中的肾小球并发增生性肾小球肾炎等^[10]。

RN 病人可出现肾小管及肾小球功能障

碍, 有学者发现, VUR 首先影响远曲小管, 故最先表现为尿浓缩功能降低^[11]。本实验显示 VUR 术后 4 周即出现明显尿渗透压下降, 而术后 8 周才出现尿蛋白明显增加。另外, 在两例 4 周处死的动物中, 均见不同程度的肾小管损害, 而肾小球病变仅见于其中 1 例; 同时, 肾小管明显萎缩者, 其尿渗透压下降较轻度萎缩者显著, 提示尿渗透压下降是反映 RN 病理和功能改变较敏感指标。

目前认为, 蛋白尿的程度与 RN 预后有关, 蛋白尿的出现提示 VUR 已导致了进行性肾小球硬化, 为预后不良指征。本研究中有 FSGS 者, 其尿蛋白增加较无 FSGS 者显著, 提示有肾小球病变时, 尿蛋白增加出现较早且较明显, 蛋白尿为估计 RN 预后的重要指标, 与文献所述相同。

参 考 文 献

- 1 Bellinger MF. The management of vesicoureteric reflux. *Urol Clin N Am*, 1985, 12(1): 23
- 2 Torres VE, Velosa JA, Holley KE, et al. The progression of vesicoureteral reflux nephropathy. *Ann Intern Med*, 1980, 92: 776
- 3 Kumar S, Muchmore A. Tamm-Horsfall protein-uromodullin (1950 ~ 1990). *Kidney Int*, 1990, 37: 1395
- 4 Jorgensen TM, Noragaard JP, Mortensen J, et al. Dynamics of the urinary tract in longterm vesicoureteral reflux with intravesical obstruction and infection in pigs. *Scand J Urol Nephrol*, 1985, 19: 113
- 5 Hodson CJ, Maling TMJ, McManamon PJ, et al. The pathogenesis of reflux nephropathy (chronic atrophic pyelonephritis). *Br J Radiol*, 1975, (suppl 13): 1
- 6 Hodson CJ. Reflux nephropathy: A personal historical review. *Am J Roentgenol*, 1981, 137: 451
- 7 Johnston JH. The significance of intrarenal reflux. In: Johnston JH. ed. *Management of vesicoureteric reflux*. Baltimore: Williams and

- Wilkins, 1984. 36~39
- 8 Torres VE, Kramer SA, Holley HE, et al. Effect of bacterial immunization on experimental reflux nephropathy. *J Urol*, 1984, 131 : 773
- 9 Androulakakis PA, Ransly PG, Risdon PA, et al. Microvascular changes in the early stage of reflux pyelonephritis. *Eur Urol*, 1987, 13 : 219
- 10 Steinhardt GF. Reflux nephropathy. *J Urol*, 1985, 134 : 885
- 11 Walker BD. Renal functional changes associated with vesicoureteral reflux. *Urol Clin N Am*, 1990, 17(2) : 307

(1994-09-21 收稿 1995-05-30 修回)

REFLUX NEPHROPATHY IN THE EXPERIMENTAL PIG MODELS

Huang Fengxian Li Youji Ye Rengao Tang Sicong

(Renal Research Institute, First Affiliated Hospital,
Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

Destroyed the unilateral vesicoureteral junction by operation, the Chinese pig model with vesicoureteral reflux(VUR) and reflux nephropathy (RN) was established first in China. These kidneys with RN had the typical histological changes: (1) Gross pathology: there are some irregular parenchymal scars, especially in both poles. (2) Microscopic findings: focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), global sclerosis and tubular atrophy were shown. There were various interstitial fibrosis, chronic inflammatory cells infiltration and arterioles with narrowing of their lumen. The reduction urinary concentration is a sensitive index for histological lesions in RN. Meanwhile, proteinuria might represent a sensitive index for glomerular lesions and prognosis of RN. Urinary tract infection (UTI) might play an important role in renal damage in RN. Non-high pressure sterile reflux could cause renal damage (RN).

Subject headings urinary tract infections; vesico-ureteral reflux; glomerulosclerosis, focal