

· 短篇论著 ·

阿托伐他汀对大鼠造影剂肾病保护作用的实验研究

王君 戴春

【摘要】 目的 探讨阿托伐他汀对大鼠造影剂肾病是否有保护作用及最佳用药剂量。**方法** 雄性SD大鼠48只随机分为空白对照组、实验对照组、造模组、阿托伐他汀1组、阿托伐他汀2组、阿托伐他汀3组共6组,每组8只,建立造影剂急性肾损伤大鼠模型,并按相应要求分别予不同药物及剂量干预。全自动生化分析仪检测造模前后血肌酐(Scr);光镜下肾组织病理观察并进行肾小管损伤半定量评分。**结果** (1)注射造影剂48 h、72 h后造模组Scr较注射前均升高大于25% ($P < 0.05$),提示造模成功;(2)空白对照组与实验对照组相应时间点Scr差异无统计学意义($P > 0.05$);(3)与造模组比较,阿托伐他汀1~3组注射造影剂48 h、72 h后血Scr有所下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);(4)阿托伐他汀3组与阿托伐他汀1组、阿托伐他汀2组相比较,阿托伐他汀2组与阿托伐他汀1组相比较,注射泛影葡胺后48 h、72 h Scr均有下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$);(5)造模组肾小管损伤评分明显高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);阿托伐他汀组肾小管损伤评分低于造模组,差异有统计学意义($P < 0.05$);阿托伐他汀1~3组组间比较,随给药剂量增加,肾小管损伤评分逐渐下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$);(6)肾小管损伤评分与阿托伐他汀剂量呈负相关性($r = -0.702, P < 0.01$)。**结论** 阿托伐他汀对由造影剂引起的大鼠急性肾损伤有预防作用,且作用效果呈剂量依赖性。

【关键词】 造影剂; 大鼠; 急性肾损伤; 阿托伐他汀

近年来随着放射诊断技术的不断发展与介入治疗的广泛应用,造影剂的使用也日益增加。尽管造影剂本身已经不断地改良,但是由造影剂导致的造影剂肾病(contrast-induced nephropathy)却频频发生。造影剂肾病已成为目前医院获得性急性肾衰竭常见原因的第三位^[1]。而今造影剂肾病的公认的有效预防措施仅限于造影剂的选择与剂量的控制、充分水化等^[2-6]。虽然有相关药物预防的文献报道^[7],但尚未达成共识。其中,有报道^[8]称他汀类药物对造影剂肾病有预防保护作用,但也有学者得出阴性结果^[9],本研究从他汀类药物对大鼠造影剂肾病究竟有无保护作用及其保护作用与剂量有无关系方面进行探讨。

一、材料与方 法

1. 材料:(1)实验对象:健康SD大鼠(徐州医学院动物中心提供)48只,清洁级,雌雄各半,8周龄,体重(200±10)g。(2)主要试剂:阿托伐他汀(atorvastatin)(购自辉瑞制药有限公司),使用0.9%生理盐水配成4 mg/ml;吡嗪美辛(购自美国sigma公司),使用0.9%生理盐水配成2 mg/ml,用量1 mg/100 g;N-硝基-L-精氨酸甲酯(购自美国sigma公司),使用磷酸盐缓冲液(PBS)配成2 mg/ml,用量1 mg/100 g;泛影葡胺(购自上海旭东海普药业有限公司),为含碘造影剂,76%含碘量为370 mg/ml,用量10 ml/kg。

2. 方法:(1)实验分组:96只SD大鼠随机分为6组:空白对照组(生理盐水灌胃、股静脉注射生理盐水)($n = 8$);实验对照组(生理盐水灌胃,股静脉分别注射吡嗪美辛、N-硝基-L-精氨酸甲酯和生理盐水)($n = 8$);造模组(生理盐水灌胃,股静脉分别注射吡嗪美辛、N-硝基-L-精氨酸甲酯和泛影葡胺)($n = 8$);阿托伐他汀1组(10 mg·kg⁻¹·d⁻¹阿托伐他汀灌胃,股静脉注射同

造模组)($n = 8$);阿托伐他汀2组(20 mg·kg⁻¹·d⁻¹阿托伐他汀灌胃,股静脉注射同造模组)($n = 8$);阿托伐他汀3组(30 mg·kg⁻¹·d⁻¹阿托伐他汀灌胃,股静脉注射同造模组)($n = 8$)。

(2)建立模型^[10]:大鼠造模前禁水12 h,自由进食。称重后按10%水合氯醛0.32 ml/100 g腹腔注射麻醉,平卧位备皮、酒精消毒后分离左股静脉,插入留置针并固定,每隔15 min分别注射吡嗪美辛、N-硝基-L-精氨酸甲酯和泛影葡胺。

(3)药物干预:阿托伐他汀1~3组于造模前3 d、造模当天及造模后3 d连续分别应用10 mg·kg⁻¹·d⁻¹^[11]、20 mg·kg⁻¹·d⁻¹^[12]、30 mg·kg⁻¹·d⁻¹^[13]阿托伐他汀灌胃;其余3组均使用等量生理盐水灌胃,各组大鼠未予水化治疗。

(4)标本处理:①血清收集:造模前、造模后48 h、造模后72 h经大鼠眼底静脉丛采血离心后取上层血清测血肌酐(Scr)。②肾脏标本收集:造模72 h后立即活体摘取肾脏,洗净滤纸吸干后固定于10%中性甲醛,制作成石蜡切片,经苏木精-伊红(HE)染色后光镜下观察其微结构变化并进行肾脏损伤评分。③肾脏损伤评分:具体评分标准参考文献^[14]:每张标本400倍镜下取外髓质部10个视野,依次观察左上、右上、左下、右下和中间。按0=正常;1=轻微损伤(0<受损肾小管≤5%);2=轻度损伤(5%<受损肾小管≤25%);3=中度损伤(25%<受损肾小管≤75%);4=重度损伤(受损肾小管>75%)。经半定量评分后计算其均值作为肾小管坏死的评分指数。

3. 统计学分析:所有实验数据采用SPSS 16.0 统计软件进行处理。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组内比较采用 t 检验,组间比较采用方差分析(ANOVA),指标与损伤评分用相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 造模前后大鼠肾功能变化(表1,图1):注射造影剂48 h、72 h后造模组Scr较注射前均升高大于25% ($P < 0.05$),提示造模成功;空白对照组与实验对照组相应时间点Scr差异无统计学意义($P > 0.05$);与造模组比较,阿托伐他汀1~3组注射造影剂

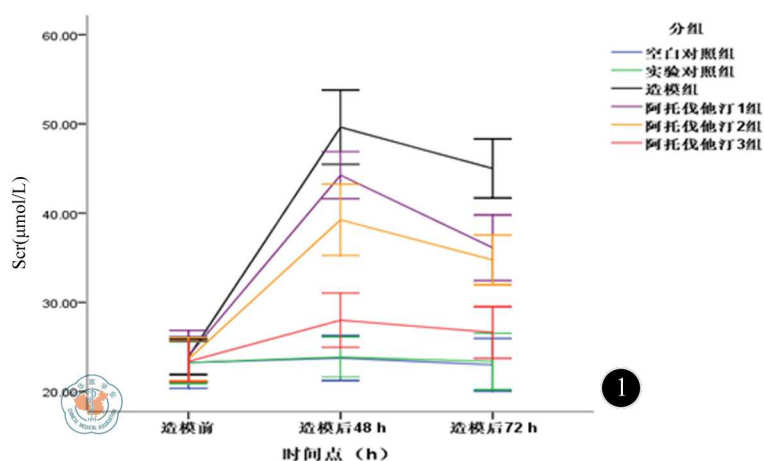


图1 各组大鼠造模前后血Scr变化趋势

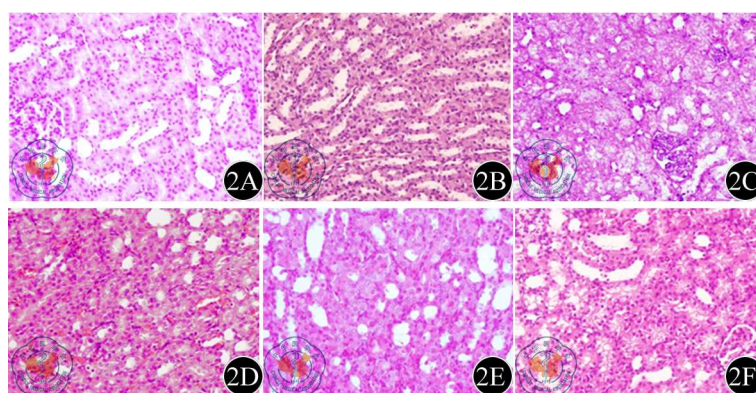


图2 各组大鼠肾脏病理变化(HE ×400)。2A: 空白对照组; 2B: 实验对照组; 2C: 造模组; 2D: 阿托伐他汀1组; 2E: 阿托伐他汀2组; 2F: 阿托伐他汀3组

48 h、72 h 后血 Scr 有所下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 阿托伐他汀 3 组与阿托伐他汀 1 组、阿托伐他汀 2 组相比较, 及阿托伐他汀 2 组与阿托伐他汀 1 组相比较, 注射泛影葡胺后 48 h、72 h 血 Scr 均有下降, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表1 对照组与造模组大鼠 Scr 的比较 ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

| 组别 | 造模前 | 造模后 48 h | 造模后 72 h |
|-----------|--------------|------------------------------|------------------------------|
| 空白对照组 | 23.25 ± 3.45 | 23.75 ± 3.01 | 23.00 ± 3.55 |
| 实验对照组 | 23.25 ± 2.82 | 23.88 ± 2.70 ^{bed} | 23.38 ± 3.78 ^{bed} |
| 造模组 | 23.88 ± 2.36 | 49.63 ± 4.98 ^a | 45.00 ± 3.96 ^a |
| 阿托伐他汀 1 组 | 24.00 ± 3.42 | 44.25 ± 3.15 ^{ab} | 36.13 ± 4.39 ^{ab} |
| 阿托伐他汀 2 组 | 23.63 ± 2.88 | 39.25 ± 4.77 ^{abc} | 34.75 ± 3.33 ^{abc} |
| 阿托伐他汀 3 组 | 23.38 ± 2.72 | 28.00 ± 3.63 ^{abcd} | 26.63 ± 3.46 ^{abcd} |

注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与造模组比较, ^b $P < 0.05$; 与阿托伐他汀 1 组比较, ^c $P < 0.05$; 与阿托伐他汀 2 组比较, ^d $P < 0.05$

2. 病理改变及肾小管损伤评分: (1) 肾脏病理学改变: 正常对照组、实验对照组大鼠肾小球、肾小管、肾间质无明显病变。造影剂组大鼠肾组织出现肾小管上皮细胞广泛空泡样变性, 部分肾小管坏死, 上皮细胞脱落, 系膜基质轻度增多, 肾间质灶性水肿、炎性细胞浸润。阿托伐他汀 1~3 组肾损害较造影剂组有不同程度的减轻, 仅见肾小管上皮细胞轻度肿胀, 部分空泡变

性, 肾间质少量炎性细胞浸润, 阿托伐他汀 3 组改善最为明显 (图 2)。见表 2。

(2) 肾小管损伤评分: 造模组、阿托伐他汀组肾小管损伤评分明显高于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 阿托伐他汀组肾小管损伤评分低于造模组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 阿托伐他汀 1~3 组组间比较, 随给药剂量增加, 肾小管损伤评分逐渐下降, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 2, 图 3)。

表2 各组大鼠肾小管损伤评分的比较

| 组别 | 只数 | 肾小管损伤评分 |
|-----------|----|-----------------------------|
| 空白对照组 | 8 | 0.13 ± 0.13 |
| 实验对照组 | 8 | 0.13 ± 0.13 ^{bed} |
| 造模组 | 8 | 3.88 ± 0.13 ^a |
| 阿托伐他汀 1 组 | 8 | 3.38 ± 0.26 ^{ab} |
| 阿托伐他汀 2 组 | 8 | 3.13 ± 0.13 ^{abc} |
| 阿托伐他汀 3 组 | 8 | 2.00 ± 0.19 ^{abcd} |

注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与造模组比较, ^b $P < 0.05$; 与阿托伐他汀 1 组比较, ^c $P < 0.05$; 与阿托伐他汀 2 组比较, ^d $P < 0.05$

3. 相关性分析: 肾小管损伤评分与阿托伐他汀剂量呈负相关性 ($r = -0.702$, $P < 0.01$) (图 4)。

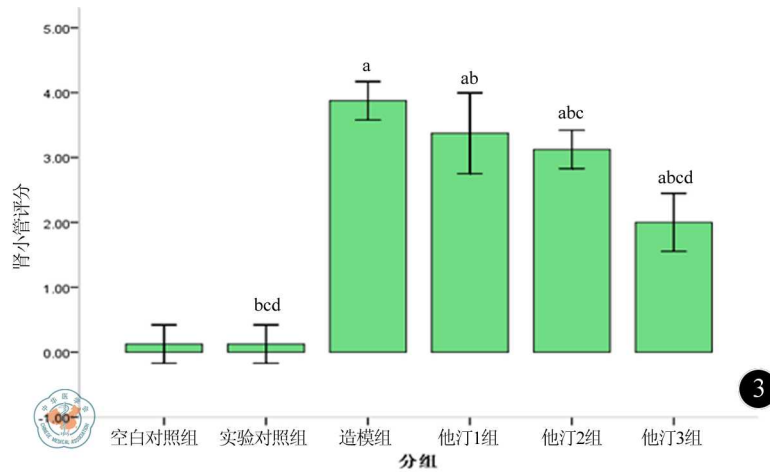


图3 各组大鼠肾小管损伤评分比较。注：与空白对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与造模组比较，^b $P < 0.05$ ；与阿托伐他汀1组比较，^c $P < 0.05$ ；与阿托伐他汀2组比较，^d $P < 0.05$

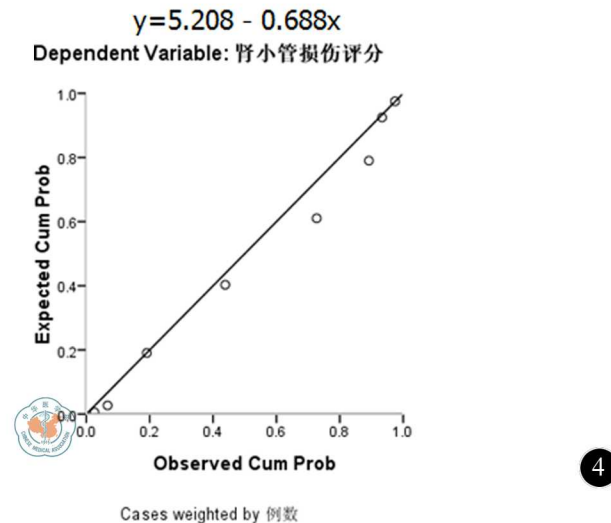


图4 大鼠肾小管损伤评分与ATO剂量回归分析散点图

三、讨论

目前对于造影剂肾病的诊断标准有两种说法：多数研究者采纳造影剂应用后48 h内无其他原因可解释的急性肾功能损害性疾病，通常以Scr值较使用前升高25%或升高44 μmol/L为标准^[15]；但也有学者提出造影剂应用后72 h内出现的Scr升高25%或升高44 μmol/L为诊断标准^[16]。本研究中，造模组大鼠应用造影剂后48 h、72 h两个时间点的血Scr均升高，较造模前水平差异有统计学意义($P < 0.05$)，且上升幅度均大于造模前25%，提示造模成功。此结果与以上两种诊断标准均不冲突。

目前，造影剂肾病的发病机制还尚未明确，多数学者认为是下列可能损伤机制的协同作用^[17-18]：造影剂引起肾血流减少，尤其是髓质血流量明显减少；对肾小管上皮细胞的直接毒性引起肾小管上皮细胞坏死，溶酶体增多，细胞凋亡；氧化应激反应；造影剂可与尿中的蛋白质或尿酸盐结合，加上造影剂渗透性利尿引起脱水，阻塞肾小管。

3-羟-3-甲基戊二酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶抑制剂(即他汀类药物)，为胆固醇合成酶系中的限速酶。他汀类药物除具有降脂作用外，有大量报道称他汀类药物对糖尿病肾病有保护作用^[19-20]，其机制可能为直接的抗炎、抗氧化作用；通过改善内皮

依赖性血管舒张作用增加肾血流；抗纤维化、抗增殖和促凋亡效应；减轻系膜细胞扩张，减少细胞外基质积累；调节免疫应答等。但他汀类药物对造影剂肾病的保护作用的研究较少。有研究发现洛伐他汀的抑制系膜细胞增殖作用存在剂量依赖性^[21]，但阿托伐他汀对大鼠造影剂肾损伤保护作用是否有剂量依赖性尚缺乏充分的研究和报道。

本研究参考Goodman等^[10]的造模方法，预先应用吲哚美辛和L-NAME阻断前列腺素和一氧化氮合酶，然后注射造影剂，成功建立了造影剂肾病大鼠模型。Billings等^[22]于2008年依以上方法成功制作造影剂肾病大鼠模型；马雪等^[23]于2011年也成功利用该步骤制作出了造影剂肾病大鼠模型。在本实验条件下，空白对照组与实验对照组注射泛影葡胺后48 h、72 h血Scr差异无统计学意义($P > 0.05$)，排除了吲哚美辛和L-NAME对肾损伤的干扰因素，大鼠急性肾损伤为泛影葡胺损伤所致。

阿托伐他汀干预组大鼠造模后Scr较造模前水平均升高且与造模组相应时间点Scr差异有统计学意义，而统计分析得出肾损伤评分与造模后48 h Scr值有显著相关性，阿托伐他汀1~3组大鼠造模后48 h Scr分别为(44.25 ± 3.15) μmol/L、(39.25 ± 4.77) μmol/L、(28.00 ± 3.63) μmol/L，均较造模组大鼠

(49.63 ± 4.98) $\mu\text{mol/L}$ 有所下降,从下降趋势证实阿托伐他汀应用剂量越大,Scr 的下降幅度越大。另在各组大鼠肾脏病理变化中发现:空白对照组大鼠肾小球、肾小管、肾间质无明显病变;实验对照组大鼠肾小球、间质无明显病变,肾小管上皮细胞零星水肿;造模组大鼠肾组织出现肾小管上皮细胞广泛空泡样变性,部分肾小管上皮细胞凋亡、脱落,肾间质灶性水肿、炎性细胞浸润;阿托伐他汀组肾损害较造模组减轻,以阿托伐他汀3组尤为明显,仅见肾小管上皮细胞轻度肿胀,部分空泡变性,肾间质少量炎性细胞浸润。肾小管损伤评分及与阿托伐他汀剂量呈负相关的相关分析也进一步证实阿托伐他汀剂量越大,肾脏损伤越轻。

综上所述,本研究发现阿托伐他汀能有效预防造影剂造成的大鼠急性肾损伤,降低 Scr 水平,改善肾功能,减轻肾组织病理改变,且其预防作用呈剂量依赖性。本研究为临床应用阿托伐他汀预防造影剂肾病提供了有效依据,为大量临床实验研究提供了动物实验的可能性。

参 考 文 献

- [1] Gleeson TG, Bulughapitiya S. Contrast-induced nephropathy. *AJR*, 2004, 183:1673-1689.
- [2] 高瑞雪,李明子. 术后不同饮水方法对减轻冠状动脉介入术后造影剂相关肾损害的效果及护理. *中华护理杂志*, 2009, 44:293-296.
- [3] Merten GJ, Bruggess WP, Gray LV, et al. Prevention of contrast-induced nephropathy with sodium bicarbonate: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2004, 291:2328-2334.
- [4] Cigarroa RG, Longe RA, Williams RH, et al. Dosing of contrast material to prevent contrast. Nephropathy in patient with renal disease. *Am J Med*, 1989, 86:649-652.
- [5] Manske CL, Sprafka JM, Strong JT, et al. Contrast nephropathy in azotemic diabetic patients undergoing coronary angiography. *Am J Med*, 1990, 89:615-620.
- [6] Sharma SK, Kini A. Effect of nonionic radiocontrast agents on the occurrence of contrast-induced nephropathy in patients with mild-moderate chronic renal insufficiency: pooled analysis of the randomized trials. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2005, 65:386-393.
- [7] Yokomaku Y, Sugimoto T, Kume S, et al. Asialoerythropoietin prevents contrast-induced nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19:321-328.
- [8] Toso A, Maioli M, Leoncini M, et al. Usefulness of atorvastatin (80 mg) in prevention of contrast-induced nephropathy in patients with chronic renal disease. *Am J Cardiol*, 2010, 105:288-292.
- [9] Jo SH, Koo BK, Park JS, et al. Prevention of radio contrast medium-induced nephropathy using short-term high-dose simvastatin in patients with renal insufficiency undergoing coronary angiography (PROMISS) trial--a randomized controlled study. *Am Heart J*, 2008, 155:499.
- [10] Goodman AI, Olszanecki R, Yang LM, et al. Heme oxygenase-1 protects against radio contrast-induced acute kidney injury by regulating anti-apoptotic proteins. *Kidney Int*, 2007, 72:945-953.
- [11] 张国欣,薛兰芬. 阿托伐他汀对单侧输尿管梗阻大鼠肾小管间质纤维化的保护作用. *河北医药*, 2010, 16:2165-2167.
- [12] Jandeleit-Dahm K, Cao Z, Cox AJ, et al. Role of hyperlipidemia in progressive renal disease: focus on diabetic nephropathy. *Kidney Int*, 1999, 71:S31-36.
- [13] 张炜,顾民. 阿托伐他汀对大鼠移植肾骨桥蛋白表达的影响. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11:605-609.
- [14] Furuichi K, Wada T, Iwata Y, et al. Administration of FR167653, a new anti-inflammatory compound, prevents renal ischaemia/reperfusion injury in mice. *Nephrol Dial Transplant*, 2002, 17:399-407.
- [15] Peter A. Nephrotoxicity and the role of contrast media. *RadialMed*, 2004, 22:377-378.
- [16] Thomsen HS. Guidelines for contrast media from the European Society of Urogenital Radiology. *AJR Am J Roentgenol*, 2003, 181:1463-1471.
- [17] Drager LF, Andrade L, Barros de Toledo JF, et al. Renal effects of N-acetylcysteine in patients at risk for contrast nephropathy: decrease in oxidant stress-mediated renal tubular injury. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19:1803-1807.
- [18] Fishbane S, Durham JH, Marzo K, et al. N-acetylcysteine the prevention of radio contrast-induced nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15:251-260.
- [19] Athyros VG, Mikhailidis DP, Papageorgiou A, et al. The effect of statins versus untreated dyslipidemia on renal function in patients with coronary heart disease. A subgroup analysis of the Greek atorvastatin and coronary heart disease evaluation (GREACE) study. *J Clin Pathol*, 2004, 57:673-674.
- [20] Patti G, Nusea A, Chello M, et al. Usefulness of statin pretreatment to prevent contrast-induced nephropathy and to improve long-term outcome in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol*, 2008, 101:279-285.
- [21] Nogaki F, Essig M, Yashiro M, et al. Direct inhibitory effects of simvastatin on matrix accumulation in cultured murine mesangial cells. *Kidney Int*, 1999, 56:S198-201.
- [22] Billings FT 4th, Chen SW, Kim M, et al. alpha2-Adrenergic agonists protect against radio contrast-induced nephropathy in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 295:741-748.
- [23] 马雪,张蓓茹,李德天. 尿 KIM-1 蛋白诊断早期造影剂肾病的实验研究. *南方医科大学学报*, 2011, 31:357-360.

(收稿日期:2012-03-05)

(本文编辑: 张志巍)