

缺血后处理对大鼠肾缺血再灌注损伤的作用

梁永会¹ 陈平¹ 韩继媛²

[摘要] 目的:成功建立肾脏缺血后再灌注损伤大鼠模型,研究缺血后处理对肾脏的保护作用。方法:夹闭大鼠左肾动静脉复制大鼠肾缺血再灌注损伤模型。雄性 Wistar 大鼠 30 只随机分成 3 组:缺血再灌注组(I/R, $n=10$),缺血后处理组(IPo, $n=10$),假手术组(S, $n=10$)。检测血肌酐浓度(Cr)、尿素氮(BUN),检测肾组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性;取肾组织做 HE 染色,光镜下观察肾组织病理学变化。结果:S 组血清肌酐水平为 $(63.83 \pm 17.26) \mu\text{mol/L}$,血清尿素氮水平为 $(11.56 \pm 2.75) \text{mmol/L}$ 。I/R 组分别达到 $(175.94 \pm 64.53) \mu\text{mol/L}$ 、 $(42.85 \pm 14.67) \text{mmol/L}$,与 S 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$),IPo 组血清肌酐及尿素氮水平分别为 $(91.51 \pm 35.67) \mu\text{mol/L}$ 、 $(15.91 \pm 4.12) \text{mmol/L}$,与 I/R 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而与 S 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);S 组肾组织中 SOD 含量为 $(91.3 \pm 2.9) \text{U/mgport}$,I/R 组为 $(55.3 \pm 1.6) \text{U/mgport}$,与 S 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),IPo 组 SOD 含量为 $(71.6 \pm 2.7) \text{U/mgport}$,SOD 活性较 I/R 组升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);S 组肾小球、肾小管未发现明显的形态学改变,I/R 组病理形态与 S 组相比有显著差异,IPo 组病理形态较 I/R 组明显减轻,统计学上有显著性差异。结论:缺血后处理对肾起保护作用,机制与增强了肾的抗氧化能力,减轻炎性细胞浸润有关。

[关键词] 肾缺血;缺血后处理;再灌注损伤

[中图分类号] R692 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1009-5918(2012)02-0125-04

Effect of ischemic postconditioning on the renal ischemia-reperfusion injury in rats

LIANG Yonghui¹ CHEN Ping¹ HAN Jiyuan²

(¹Department of Emergency, Yichang Central People's Hospital, Yichang 443003, China; ²Department of Emergency, Xiehe Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology)

Corresponding author: HAN Jiyuan, E-mail: jiyuanhan@126.com

Abstract Objective: To establish a model of renal ischemia-reperfusion in rats. To investigate the effect of ischemic postconditioning on the renal ischemia-reperfusion (I/R) injury and its mechanism. **Method:** The model of rat's RIRI was established, 30 wistar rats were randomly divided into 3 groups: false operating group (S), ischemia reperfusion group (I/R) and ischemic postconditioning (IPo). Blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr), superoxide dismutase (SOD) were detected in each groups, and renal histopathology lesions were examined. **Result:** In I/R group, BUN and SCr serum levels increased significantly after ischemia reperfusion compared with false operating group ($P < 0.05$), while BUN and SCr serum levels of IPo group decreased significantly after ischemic postconditioning compared with I/R group, there was statistic significance ($P < 0.05$). in I/R group, SOD serum levels decreased significantly after ischemia reperfusion compared with false operating group ($P < 0.05$), while SOD serum levels of IPo group increased significantly after ischemic postconditioning compared with I/R group, there was statistic significance ($P < 0.05$). in S group, glomeruli and tubules have no obvious pathological changes, in I/R group, there are significant distinction of the pathological scale which compared with S group, in IPo group, the histologic damage induced by I/R were significantly ameliorated, there were statistic significance ($P < 0.05$). **Conclusion:** Ischemic postconditioning play an important protective role in the renal ischemia-reperfusion injury, the mechanism is that which enhance kidney antioxidant capacity and reduce infiltration of inflammatory cells.

Key words renal ischemia; ischemic postconditioning; reperfusion injury

缺血后处理(ischemic postconditioning, IPO)是指一种在组织或者器官缺血后持续血流再灌注前即刻执行短暂多次重复的再灌注-缺血处理,可以有效减轻缺血再灌注损伤的内源性保护现象^[1]。

近年来国内外针对肝、脑、心脏^[2-3]以及肢体^[4]缺血后处理方面做了一些研究,各种研究结果表明缺血后处理对缺血再灌注损伤具有保护作用^[2]。但以往国内外涉及到肾脏缺血后处理的研究尚不多见(本研究时间:2009-07-2010-07),本课题组针对肾脏缺血后处理及其机制研究发现缺血后处理对肾脏的缺血再灌注损伤有保护作用,现介绍如下。

¹ 三峡大学第一临床医学院 宜昌市中心人民医院急诊科(湖北宜昌,443003)

² 华中科技大学同济医学院附属协和医院急诊科
通信作者:韩继媛, E-mail: jiyuanhan@126.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康的雄性 Wistar 大鼠, 体重 200~220 g, 由湖北省实验动物研究中心提供。

1.1.2 主要仪器设备与试剂 Citadel 2000 脱水机(英国姗顿公司); Histocentrez 包埋机(英国姗顿公司); AS-325 切片机(英国姗顿公司); YT-6B 烤片机(湖北孝亚光电子技术研究所); BHS 显微镜(日本奥林巴斯公司); 超低温冰箱(德国贺利氏公司); 26×76 mm 载玻片(中国青岛); 全自动生化分析仪(荷兰 Vital 公司); 酶标仪(德国 BMG 公司); 小动物的显微外科手术 1 套, 主要包括电镊、剪刀、无损伤眼科镊、持针器、蚊式血管钳、无损伤动脉夹等(购自上海医疗器械厂), 自制的泡沫塑料手术台板、自制腹腔拉钩、1 ml 和 5 ml 医用注射器、小棉球、棉签、纱布、红外线取暖器等。兔抗鼠 TNF- α 抗体(Santa 公司); SOD 试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备与分组 30 只健康雄性 Wistar 大鼠随机分为假手术组(S 组)、缺血再灌注组(I/R 组)及缺血后处理组(IPO 组), 每组 10 只。大鼠手术前禁食 12 h, 自由饮水。0.3%戊巴比妥钠溶液, 按 1 ml/100 g 剂量进行腹腔麻醉, 将大鼠仰卧固定于鼠台上, 剔除腹部皮毛, 75%酒精消毒腹部的皮肤, 暴露手术区域。沿腹中线剪开腹部的皮肤, 钝性分离肌肉, 打开腹腔。I/R 组用生理盐水浸湿的纱布牵开腹腔脏器, 钝性分离肾包膜, 游离和暴露肾脏, 细心分离肾蒂, 保护输尿管, 以无损伤动脉夹夹闭在左侧肾蒂, 开始记时。肉眼观察肾脏颜色变为暗红色即可确认肾脏血流阻断, 造成左侧肾缺血, 缺血模型成功。腹腔内保留生理盐水 20 ml/kg, 间断夹闭腹部切口, 用生理盐水纱布覆盖; 缺血 45 min 后, 再打开腹腔, 切除右肾, 放开左肾动脉夹, 肾脏由暗红色恢复为鲜红色可确认血流恢复, 再灌注成功, 同时开始记录再灌注的时间, 恢复肾血流 6 h 即为肾缺血再灌注模型。腹腔内保留生理盐水 20 ml/kg, 逐层缝合腹部切口。用 75%酒精消毒将大鼠放回鼠笼, 给予自由饮食和饮水。IPO 组夹闭左侧肾蒂 45 min 后再灌注 10 s, 缺血 10 s, 反复 3 次后, 完全恢复肾血流 6 h, 余操作同 I/R 组。假手术组仅开腹, 游离出左侧肾脏, 分离左侧肾蒂不夹闭, 切口用生理盐水纱布覆盖, 显露 45 min 不作肾缺血处理。

1.2.2 标本处理 再灌注 6 h 时, 过量的麻醉剂下开胸, 经心脏抽血后快速处死动物。按标准取材, 待测。①肾组织标本处理: 无菌条件下, 迅速摘取左肾, 一部分分装入 1.5 ml 离心管, 液氮冻存, 待测; 一部分 10%甲醛固定, 依次进行脱水、透明、浸

蜡, 石蜡包埋。②血液标本的处理: 将血液标本导入离心管, 静置 30 min, 4 500 r/min 离心 10 min, 提取血清标本, 装入 1.5 ml 离心管, -70℃冰箱保存, 待测。

1.2.3 肾功能的检测 采用全自动生化分析仪检测血清肌酐(SCr)含量, 尿素氮(BUN)含量。

1.2.4 肾组织 SOD 活力的测定 通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应产生超氧阴离子自由基(O₂⁻·), 后者通过氧化羟胺形成亚硝酸盐, 在显色剂的作用下呈现成紫红色, 采用分光光度法在波长 550 nm 处比色, 然后测定其吸光度。当被测样品中含有 SOD 时, 则专一性的抑制超氧阴离子自由基, 使其形成的亚硝酸盐减少, 比色时测定管的吸光度值则低于对照管的吸光度值, 根据计算公式: 组织匀浆中 SOD 活力(U·mg/prot)=(对照管吸光度-测定管吸光度)/对照管吸光度/50%×反应体系的稀释倍数/组织中蛋白含量。

1.2.5 肾脏病理学检测 每只大鼠肾组织切片随机选择 10 个无重叠视野(×400), 每个视野下随机选择 10 处肾小管, 共按 100 个肾小管计分, 根据肾组织肾小管扩张、肾小管内细胞脱落、肾小管细胞坏死、间质浸润和水肿的程度, 分数越高表示肾小管损伤程度越严重, 评价者以盲法评价编号切片, 光镜下阅片。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料先行正态性检验, 再行方差齐性检验, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾脏功能的改变

I/R 组经缺血 45 min 及 6 h 再灌注后, SCr、BUN 急剧上升, 与假手术组(S)相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。IPO 组与 I/R 组对照相比较差异有统计学意义($P < 0.01$); 而与 S 组相比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。其各组大鼠血清肌酐、尿素氮水平见表 1。

表 1 各组大鼠血肌酐、血尿素氮的比较

组别	n=10, $\bar{x} \pm s$	
	SCr/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	BUN/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
S 组	63.83±17.26	11.56±2.75
I/R 组	175.94±64.53 ¹⁾²⁾	42.85±14.67 ¹⁾²⁾
IPO 组	91.51±35.67	15.91±4.12

与 S 组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与 IPO 组比较, ²⁾ $P < 0.01$

2.2 SOD 活性的变化

S 组 SOD 为(91.3±2.9) U/mgport, I/R 组为(55.3±1.6) U/mgport, IPO 组为(71.6±2.7) U/

mgport。与 S 组相比, I/R 组和 IPo 组 SOD 活性降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); IPo 组 SOD 活性较 I/R 组升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 肾组织病理学结果

S 组肾小球、肾小管未发现明显的形态学改变; I/R 组部分肾小管上皮细胞肿胀, 出现水样变性和空泡变性, 肾小管扩张, 内可见管型和坏死脱落细胞, 少量肾小管腔内有蛋白性液体积聚, 间质充血水肿大量炎细胞浸润, 管周血管明显扩张淤血; IPo 组肾小球轻度淤血, 少量肾小管上皮细胞轻度水肿、空泡变性, 罕见管型, 间质充血水肿有少量炎细胞浸润管周稍有淤血, 见图 1~3。

3 讨论

肾脏对缺血以及缺血再灌注都很敏感, 恢复灌注容易发生缺血再灌注损伤。研究表明肾脏缺血 45 min 再灌注 3 h 即可造成明显组织损伤^[5]。为了排除肾蒂夹闭可能并发的静脉淤血性损伤及无肾期代谢废物积聚对已经很虚弱的缺血-再灌注损伤肾脏予以重击的因素, 本研究采用夹闭左侧肾蒂 45 min 再灌注之始切除右侧肾脏, 在左肾缺血期先保留右肾在左肾复灌始再切除右肾的方法, 制备肾脏缺血再灌注损伤模型^[4], 实验的结果显示: I/R 组肾小管, 肾组织形态学严重受损; 且血清 BUN、SCr 水平显著增高, 肾功能损害严重; SOD 活性显著降低; 上述结果从客观上验证了缺血再灌注损伤模型建立成功。在本实验过程中, 非常注重并设法维持动物的体温、呼吸功能及血流动力学稳定, 因而可排除上述因素对实验结果产生的影响。

本实验中 IPo 组与 I/R 组相比血清 BUN、SCr 水平显著下降, 而 IPo 组与 S 组比较差异无统计学意义, 说明缺血再灌注对肾功能有明显的损伤作用, 而 IPO 则能改善肾功能并对肾脏缺血再灌注损伤(IR)起保护作用, 但 IPO 主要是通过减轻大鼠肾脏的哪部分组织结构损伤来发挥对肾脏的保护作用呢? 本研究通过三组肾组织病理学结果发现 S 组肾脏组织颜色、肾小球、肾小管结构正常; I/R 组

肾小管上皮细胞崩解脱落、肾小管管腔塌陷变窄并广泛坏死、肾间质充血水肿伴大量炎性细胞浸润, 而 IPo 组较 I/R 组明显减轻, 其肾小管上皮细胞坏死崩解、间质水肿以及淋巴细胞、单核细胞等炎性细胞浸润明显减少, 提示了 IPO 是通过减轻缺血再灌注后肾小管上皮细胞损伤、减少细胞凋亡坏死的病理变化, 抑制淋巴细胞、单核细胞等炎性细胞浸润, 从而保护肾功能。对于上述结果, 我们认为缺血再灌注肾小管上皮细胞迅速发生变性坏死的机制可能是: ①由于缺血再灌注损伤作用使细胞膜的屏障受损, 大量的 Ca 离子通道开放造成细胞内钙超载, 引起线粒体基质内钙离子浓度升高, 使线粒体内膜产生一种渗透性运转孔道开放, 干扰了线粒体的产能, 从而导致细胞结构、功能遭受损伤, 使本已遭受缺血、缺氧损害的肾小管细胞迅速发生死亡。②由于再灌注期间大量的钙离子内流使线粒体氧化磷酸化障碍, 从而影响 ATP 合成, 引起蛋白质的分解和膜破坏促进了大量氧自由基的生成, 氧自由基的氧化能力极强, 而脂质对氧自由基的氧化活性最为敏感, 氧自由基与不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应氧化生物膜(包括细胞膜、核膜、线粒体膜和溶酶体膜等), 生成脂质过氧化物, 最终裂解成包括 MDA 在内的许多终末产物, 而且这些产物也具有极强的细胞毒性, 从而引起细胞膜、线粒体、内质网、溶酶体等细胞器管架系统及其功能的破坏; 氧自由基还能干扰细胞蛋白激酶系统以及增强 NF- κ B 的表达, 造成细胞坏死或凋亡^[1,6]; 氧自由基还能趋化中性粒细胞, 在缺血条件下, 使血中炎性细胞的数量增加并堵塞微血管, 降低肾小球滤过率, 损伤肾功能。而 SOD 是内源性的氧自由基清除剂, 其活性的高低反映了机体抗氧自由基水平的强弱^[1], 因此通过 SOD 活性检测能间接反映氧自由基水平。本研究中与 S 组相比, I/R 组和 IPo 组 SOD 活性显著降低, 提示缺血再灌注可引起 SOD 活性降低, 产生大量氧自由基, 引起细胞的氧化损伤; 而 IPo 组 SOD 的活性明显比 I/R 组高, 验证了

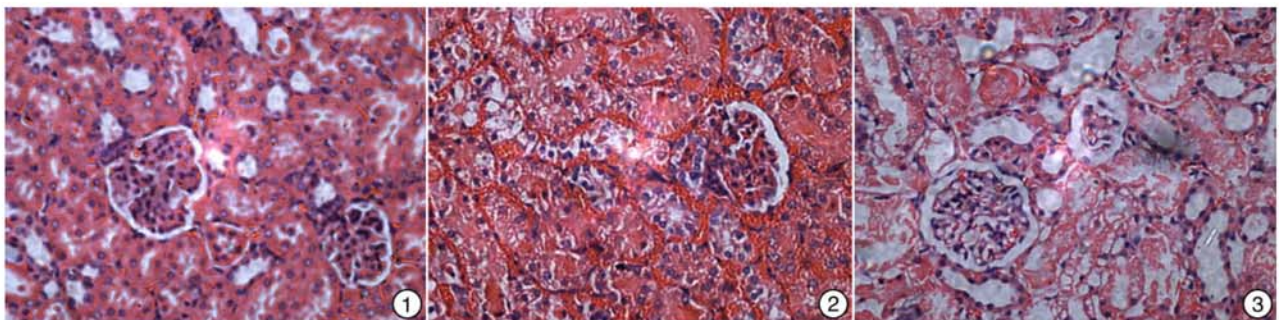


图 1 S 组: 正常的肾小管结构, 无炎性细胞浸润(苏木精-伊红 $\times 400$); 图 2 I/R 组: 肾小管淋巴细胞和单核细胞浸润, 重度肾小管炎症(苏木精-伊红 $\times 400$); 图 3 IPO 组: 肾皮髓质淋巴细胞和单核细胞较 I/R 组明显好转, 轻度肾小管炎症(苏木精-伊红 $\times 400$)

IPO 能通过清除自由基,抑制脂质过氧化,进而抑制细胞的氧化损伤,使再灌注中肾小管的病理损害减轻,从而保护肾功能。而对于炎性细胞浸润肾小管的机制,我们认为:缺血和坏死细胞可引起炎性细胞趋化激活,促使组织和自身释放出更多的炎性介质,如肿瘤坏死因子(TNF- α)、白血病介素-8(IL-8)、白血病介素-6(IL-6)、氧自由基等;而 TNF- α 可增强中性粒细胞(PMN)上 CD11/CD18 的表达^[1],诱导血管内皮细胞选择素的表达,增强缺血时 PMN 与血管内皮细胞(VEC)的粘附,促进 PMN 的激活、外渗与浸润,导致组织的损伤;TNF- α 还可刺激单核巨噬细胞合成和分泌 IL-1 β 、IL-8 等炎症介质,并能协同扩大其生物学效应。IPO 可能是通过抑制上述机制从而抑制炎性细胞的浸润和激活,保护肾功能。总之,缺血后处理能对肾脏缺血再灌注损伤起保护作用,机制与增强肾脏组织的抗氧化能力,减轻肾脏组织炎性细胞浸润有关。

缺血后处理是一个多因素、多信号通路介导的复杂的内源性保护机制^[2],因此,深入了解 IPO 保护 IR 的发病机制,早期干预 IR 的过程,对于预防急性肾功能衰竭及肾移植术后肾功能的早期恢复和移植肾的长期存活都具有重要的临床意义,本研

究仅从肾功能,肾脏病理学以及 SOD 活性的角度分析证实了缺血后处理对肾脏起保护作用,仍有待后来学者进一步研究其他保护作用机制以便更好地为临床服务。

参考文献

- [1] 范治璐,杜鑫,李卫平.缺血后处理对大鼠肾脏缺血再灌注损伤及 NF- κ B 表达的影响[J].大连医科大学学报,2009,31(5):525-528.
- [2] 陈光磊,王汉民,刘广厚,等.大鼠急性肾脏缺血再灌注后处理动物模型的建立[J].第四军医大学学报,2007,28(9):812-814.
- [3] THIBAUT H,PIOT C,STAAT P,et al. Long Term Benefit of Postconditioning[J]. Circulation,2008,117:1037-1044.
- [4] 冷玉芳,姚爱军.肢体缺血后处理和肾脏缺血后处理对大鼠肾脏缺血-再灌注损伤的影响[J].临床麻醉学杂志,2009,25(11):974-976.
- [5] 李爱芝,马加海,丁永波,等.七氟醚对大鼠急性肾缺血-再灌注损伤的保护作用[J].临床麻醉学杂志,2008,24(8):690-692.
- [6] LI C H Y,ROBERT M. Reactive sepecies mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury [J]. Am J Physiol Cell Physiol,2002,282:227-241.

(收稿日期:2011-09-06)

第二届盛京急重症诊治论坛通知

为巩固和提高我国城市大医院及基层医院急重症的诊治水平,中国医科大学附属盛京医院将于 2012 年 8 月 3~4 日在沈阳市举办第二届盛京急重症诊治论坛。本次论坛将邀请桂永浩教授、胡大一教授、霍勇教授、李春盛教授、刘大为教授、刘又宁教授、邱海波教授、申昆玲教授、王辰教授、于凯江教授、于学忠教授,以及我国台湾荣民总医院邓昭芳教授、美国纽约中毒中心主任 Alan Woolf 教授、北美临床毒理协会 Leslie Dye 教授、伊力诺依大学叶纯浦教授、Rainbow Babies & Children's Hospital 的 Avroy A. Fanaroff 教授、阿拉巴马大学医学院 Wally A. Carlo 教授等国内外急重症诊治方面著名专家参加会议,就各学科急重症诊治问题,尤其是多学科联合救治急重症方面的最新进展及热点问题进行交流讨论。会议将设主论坛及 EICU、MICU、ICU、NICU、PICU、CCU 分论坛。我们热诚邀请国内外从事该领域的临床医师和研究人员踊跃参加会议。参会者将获得国家级 I 类继续教育学分 10 学分。现将会议有关事项通知如下:

1. 会议主题 急诊(EICU)、内科危重症(MICU)、重症医学(ICU)、新生儿急重症(NICU)、小儿急重症(PICU)、循环急重症(CCU)等学科领域的诊治研究及新进展。
2. 会议内容 邀请国内外知名专家,讨论 EICU、MICU、ICU、NICU、PICU、CCU 等学科领域的急重症诊断和治疗,尤其是跨学科领域对急重症患者的抢救和治疗;推广上述学科领域的急重症诊治进展及多种实用技术;组织与会代表对盛京医院上述学科病房的现场参观考察。
3. 征文要求 EICU、MICU、ICU、NICU、PICU、CCU 等学科领域的危重症诊治临床应用与基础研究;征文采取网上投稿方式,邮箱地址:sjltzw@sj-hospital.org 截稿时间:2012 年 7 月 6 日。
4. 会议地点与日程安排 会议地点:沈阳市皇朝万鑫酒店;会议时间:2012 年 8 月 2 日(星期四)报到,3 日(星期五)、4 日(星期六)学术论坛,8 月 5 日(星期日)撤离。
5. 参会人员 EICU、MICU、ICU、NICU、PICU、CCU 等学科领域的相关人员。
6. 会议费用 会务费 800 元(含资料费及分论坛费用),网络注册减免 100 元。住宿由大会统一安排,宿费自理。
7. 学分 参加会议的代表可获国家级继续医学教育 I 类学分 10 分。
8. 报名方式 请报名人员于 2012 年 7 月 6 日前将报名回执发送到会议组委会秘书处。网站报名:www.sj-hospital.org 联系方式 中国医科大学附属盛京医院 沈阳市和平区三好街 36 号,邮编:110004 电子邮箱:sjlt@sj-hospital.org 联系电话:024-23892620 联系人:高璇 李丽妍
9. 会议报到 报到时间:2012 年 8 月 2 日。报到地点:沈阳皇朝万鑫酒店。地址:沈阳市和平区青年大街 390 号。联系电话:024-28359000

论坛支持媒体:中华急诊医学杂志、中国危重病急救医学、中国小儿急救医学、中华危重症医学杂志(电子版)、中国急救医学、中国急救复苏与灾害医学杂志、中国中西医结合急救杂志、临床急诊杂志、岭南急诊医学杂志

中国医科大学附属盛京医院
盛京急重症诊治论坛会议组委会