文章编号:1000-5404(2013)24-2709-03

短篇论著

异氟醚后处理对大鼠肾缺血再灌注损伤的影响

黄生辉[1],甘红云[2],王迎斌[1],石翊飒[1] (730030 兰州,兰州大学第二医院麻醉科[1];730000 兰州,西北民族大学医学院形态学教研室[2])

[摘要] **目的** 探讨异氟醚后处理对大鼠肾脏缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury,IRI)的影响。**方法** 健康雄性Wistar大鼠36只,体质量300~350 g,采用随机数字表法分为3组(n=12):假手术(S)组、肾脏缺血再灌注(IR)组和异氟醚后处理(ISO)组。采用夹闭双侧肾蒂60 min、恢复灌注4 h,建立大鼠肾脏缺血再灌注模型。ISO组于再灌注前开始吸入2.5%异氟醚持续5 min。再灌注4 h时处死大鼠,取肾组织,分别采用黄嘌呤氧化酶法、硫代巴比妥法测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量,光镜下观察病理学结果,采用免疫组化法测定肾组织CD44和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)的表达水平。**结果** 免疫组化结果示:与S组比较,IR组肾组织MDA含量升高,SOD活性降低,CD44和TNF-α的表达上调(P<0.05);与S组比较,ISO组MDA含量升高、SOD活性降低、肾组织CD44和TNF-α的表达无显著差异(P>0.05);与I/R组比较,ISO组MDA含量降低、SOD活性升高、肾组织CD44和TNF-α的表达显著下调(P<0.05)。光镜结果示,S组大鼠组织结构基本正常,ISO组大鼠肾组织病理损伤明显轻于IR组。**结论** 异氟醚后处理可以减轻大鼠肾脏IRI。

[关键词] 缺血再灌注损伤;肾;异氟醚;后处理
[中图法分类号] R364.12;R692;R971.2 [文献标志码] A

肾脏缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury,IRI)是临床常见的病理生理过程,可由多种因素引起,临床多见于肾移植术、肾脏部分切除术、休克、肾盂积水、选择性尿道手术和脓毒症等。以异氟醚为代表的挥发性吸入麻醉药的脏器保护作用,已经被很多的研究所证实,其保护作用机制也已经部分地揭示出来,但是,异氟醚对于器官缺血再灌注损伤保护作用的分子信号转导通路还处于研究的起始阶段。异氟醚对器官保护作用机制研究多采用预处理和后处理的方法,其区别主要是分别在器官缺血性损伤发生之前和发生后作为药物干预的时机。研究表明,异氟醚预处理可减轻肾缺血再灌注损伤[1]。但是临床肾IRI常无法预知,后处理较预处理在临床应用方面的潜力更大,更合理。异氟醚后处理对肾缺血再灌注损伤的影响需要更多研究资料证实。本研究拟评价异氟醚后处理对大鼠肾IRI的影响,为临床研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物选择与分组

SPF级健康雄性Wistar大鼠36只,体质量300~350 g(甘肃中医学院药理实验室提供),随机数字表法分为3组(n=12):假手术(S)组、肾脏缺血再灌注(IR)组和异氟醚后处理(ISO)组。

[基金项目] 甘肃省2011年自然科学基金(1107RJZA185)
[通信作者] 甘红云,E-mail: yxghy@xbmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131127.1108.004.html(2013-11-27)

1.2 方法

1.2.1 大鼠肾脏缺血再灌注模型的制备 实验室温度为25 ℃,大鼠实验前禁食12 h,自由进水。腹腔注射3%戊巴比妥50 mg/kg麻醉下,行气管插管后接DHX150B小型动物呼吸机(成都仪器厂)机械通气,动物呼吸机进气口与80麻醉机(Datex-Ohmeda公司,美国)相连,Vt 5~7 mL/100 g,RR 60次/min,吸入纯氧,吸呼比1∶2,气管插管端连接Vamos气体检测仪(Drager公司,德国),维持PETCO 23.5~45 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),维持直肠温度36.5~37.5 ℃,股静脉穿刺置管,注射肝素400 U/kg后,输注林格氏液20 mL/(kg·h)。采用夹闭双侧肾蒂60 min再灌注的方法[1]建立大鼠肾脏缺血再灌注模型。于脊柱两旁0.5 cm肋弓下0.5 cm各纵向切开皮肤1 cm,钝性分离腰大肌,暴露双侧肾脏,分离肾动脉,用无创动脉夹闭双侧肾蒂,肾脏由红褐色短时间内变成苍白色再逐渐变成暗紫色为缺血成功的标志;60 min后松开动脉夹,恢复血流灌注,肾脏由暗紫色变为红褐色为再灌注成功的标志。若松开动脉夹5 min后,肾脏仍未转变为红褐色,则为再灌注未成功,剔出本研究。

1.2.2 分组处理 肾脏缺血再灌注组(IR组),夹闭双侧肾动脉60 min,恢复灌注4 h建立大鼠肾脏缺血再灌注损伤模型;ISO组再灌注前1 min开始使用专用挥发罐吸入异氟醚5 min,维持异氟醚呼气末浓度2.5%。假手术组相同部位切皮后缝合伤口。

1.2.3 标本采集及处理 取双侧肾组织甲醛中固定,石蜡包埋,6 μm连续切片,取3张相邻的切片,HE染色进行病理学观察;将剩余肾组织蜡封,制成厚4 μm切片,脱蜡至水;3% H_2O_2室温孵育5~10 min用以封阻内源性过氧化物酶;蒸馏水冲洗3次,置于0.01 mmol/L柠檬酸盐缓冲液(pH=6.0)中,100 ℃微波热修复10 min;冷却2 h后PBS冲洗2~3次,每次

5 min,滴加5% BSA封闭液封闭30 min;滴加1∶80的CD44单克隆抗体或TNF-α单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司),4 ℃孵育过夜,PBS冲洗3次,每次2 min;滴加生物素标记的羊抗小鼠IgG,室温下孵育20 min,PBS冲洗3次,每次2 min;SP染色、DAB显色、脱水、透明、封片,光镜下进行观察,黄染为阳性表达。采用BL-2000医学图像分析处理系统(成都泰盟有限公司)分别测定CD44和TNF-α的光密度值,每张切片随机取6个视野,取其平均值,以反映CD44和TNF-α的表达水平。

1.2.4 SOD活力和MDA含量的测定 肾组织匀浆,取上清液,分别采用黄嘌呤氧化酶法、硫代巴比妥法测定(南京建成生物工程研究所)超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量。

1.2.5 病理学观察 取保存的切片行HE染色,200倍光镜(BX51型Olympus显微镜)下观察肾组织病理学结果。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0统计学软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 肾组织形态学改变

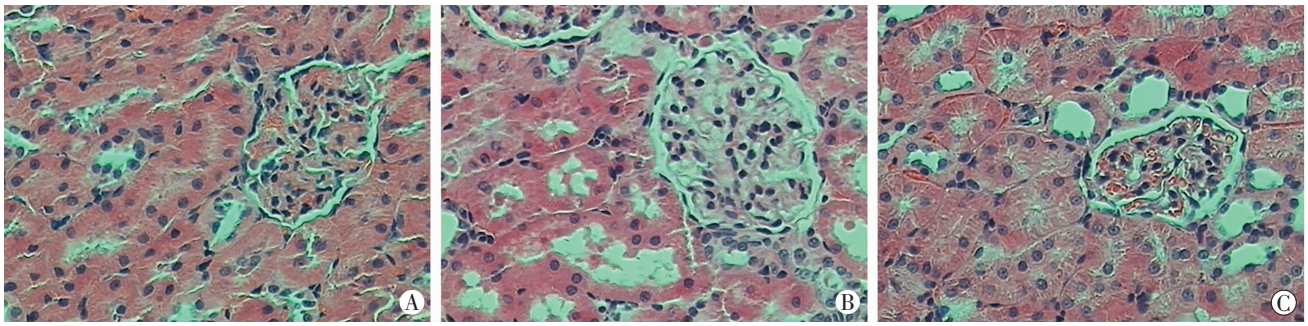
S组肾小球和肾小管结构基本完整(图1A);IR组肾小管上皮细胞水样和气球样变性,管腔内中性粒细胞浸润,上皮细胞扁平,肾间质充血、水肿(图1B);ISO组肾小管肿胀为主,肾小管上皮细胞水样变和气球样变轻微,无明显坏死细胞,病理学损伤轻于IR组(图1C)。

2.2 肾组织SOD、MDA含量变化

与S组比较,IR组和ISO组肾组织SOD活性降低,肾组织MDA含量升高($P<0.05$);与IR组比较,ISO组肾组织SOD活性升高,肾组织MDA含量降低($P<0.05$),见表1。

2.3 肾组织CD44和TNF-α的表达

与S组比较,IR组肾组织CD44和TNF-α的表达上调($P<0.05$),ISO组肾组织CD44和TNF-α的表达差异无统计学意义($P>0.05$);与IR组比较,ISO组肾组织CD44和TNF-α的表达下调($P<0.05$),见图2、表1。



A:S组;B:IR组;C:ISO组

图1 光镜下3组大鼠肾组织形态学的变化 (HE ×200)

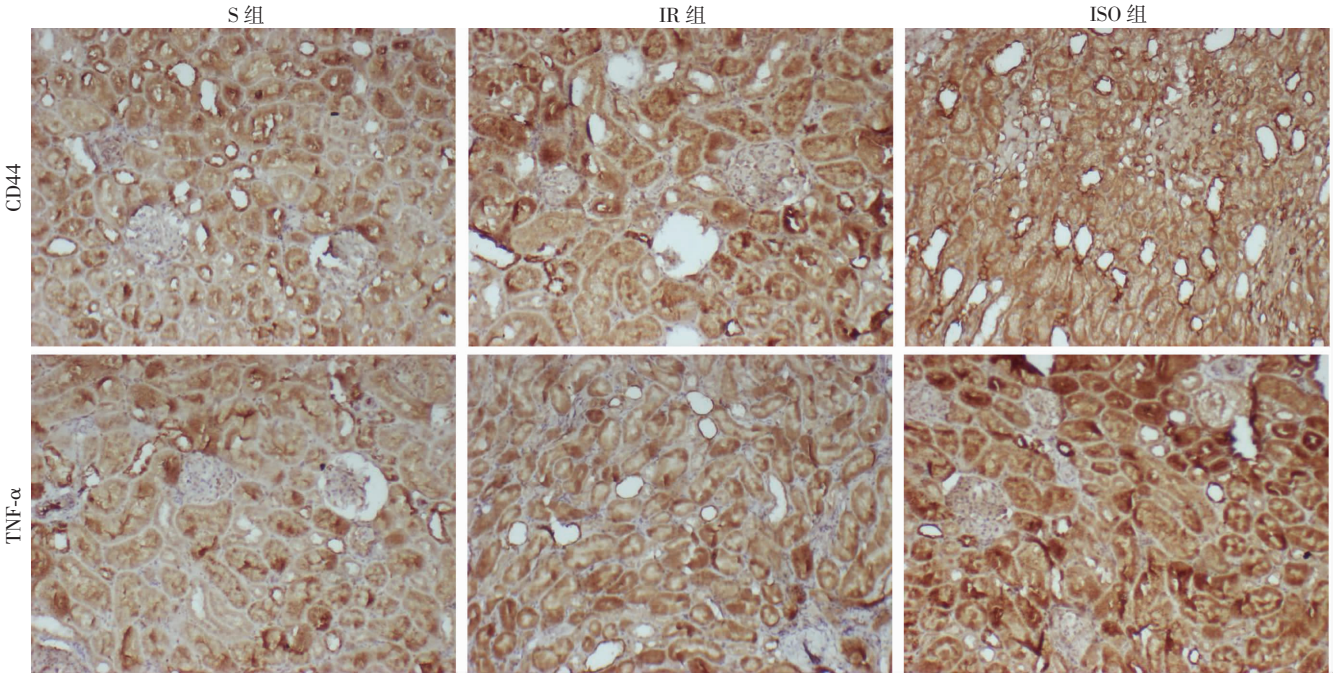


图2 3组大鼠肾组织CD44和TNF-α的表达 (S-P ×200)

表1 3组大鼠肾组织SOD、MDA、CD44和TNF-α表达水平的比较（$n=12$，$\bar{x}\pm s$）

组别	SOD(U/mg)	MDA(nmol/mg)	CD44	TNF-α
S组	88±10	8.7±2.3	0.10±0.02	0.18±0.03
IR组	59±8[a]	12.0±3.4[a]	0.92±0.11[a]	0.87±0.10[a]
ISO组	72±6[b]	9.6±2.9[b]	0.35±0.06[ab]	0.40±0.07[ab]

a：$P<0.01$，与S组比较；b：$P<0.05$，与IR组比较

3 讨论

本研究采用夹闭双肾动脉60 min再灌注的方法建立大鼠肾脏IRI模型[2]。MDA是氧自由基与生物膜外不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的产物，可反映脂质过氧化反应程度，SOD可清除氧自由基。本研究表明，与S组比较，I/R组肾组织病理学损伤明显，肾组织SOD活性降低，肾组MDA含量升高，提示肾脏IRI模型制备成功。

本研究参照前人的研究方法[3-4]选择异氟醚的给药方法并选择术后4 h作为取材时点[5]。本研究结果表明，与IR组比较，ISO组肾组织病理学损伤减轻，肾组织SOD活性升高，肾组织MDA含量降低，提示异氟醚后处理可减轻大鼠肾脏缺血再灌注后的组织损伤。

Kocak等[6]的研究表明，大鼠肾脏缺血再灌注后肾组织CD44表达上调，4 h时达峰值，24 h后逐渐下调。因此，本研究选择于再灌注4 h时测定大鼠肾组织CD44和TNF-α的表达水平。

CD44是一种粘附分子，属于糖蛋白家族并且表达于细胞表面。在胚胎和成人组织中CD44都有表达，是器官形成和伤口修复过程中作为细胞-细胞和细胞-基质之间形成聚合的重要粘附分子。其在多核中性粒细胞的迁移，淋巴细胞的导引以及肿瘤组织的代谢中均发挥作用。血管型肾小球肾炎、同种异体移植物排斥反应中，CD44在管状上皮组织中的表达上调[7-11]。肾脏IRI中CD44的作用并未完全被诠释，现有研究表明，缺血后肾细胞和管周内皮细胞CD44的表达始于中性粒细胞肾脏内浸润，为肾脏损伤水平的佐证之一[12]。

TNF-α是一种由活化的单核细胞产生、活性作用广泛的细胞因子，通过与两种特定的膜结合受体（TN-FR1和TN-FR2）结合发挥生物学作用[13]。肾缺血再灌注可激活p38MAPK通路，导致TNF-α大量表达，TNF-α可通过细胞毒性作用收缩血管以降低肾脏血流，聚集中性粒细胞和单核细胞，导致细胞凋亡、肾小球纤维蛋白沉积、肾小球滤过率下降，加重肾脏损伤；同时，TNF-α与其受体结合，又反作用于p38MAPK和核因子-κappaB（NF-κB）形成正反馈，增强TNF-α的表达，并易化其他细胞因子的表达[14]。

本实验结果表明，与S组比较，IR组肾组织CD44和TNF-α的表达上调，提示大鼠肾脏IRI的发生与肾组织CD44和TNF-α的表达上调有关；与IR组比较，ISO组肾组织CD44和TNF-α的表达下调，提示异氟醚PC减轻大鼠肾脏缺血再灌注损伤与其抑制肾组织CD44和TNF-α的表达有关。

综上所述，异氟醚后处理可减轻大鼠肾脏缺血再灌注损伤。既往吸入麻醉药后处理对脑损伤和心肌损伤中研究较多，涉及许多分子信号转导通路的改变。肾脏IRI在异氟醚后处理后相关的信号转导通路需要在临床和基础实验中进一步阐明。

参考文献：

[1] 肖丹，孔高茵，凌英姿，等. 异氟醚预处理对大鼠肾缺血再灌注损伤的影响[J]. 中国医师杂志，2012，14(5)：589-592.

[2] 朱小兵，刘志龙，刘志群，等. 利多卡因预先给药对大鼠肾脏缺血再灌注时肾组织HMGB1表达的影响[J]. 中华麻醉学杂志，2012，32(4)：497-500.

[3] 刘国利，张锦英，沈途. 异氟醚后处理对兔心肌缺血-再灌注损伤的影响[J]. 临床麻醉学杂志，2011，27(11)：1116-1118.

[4] 刘悦，张瑾，刘雅，等. 七氟醚后处理对大鼠心肌缺血再灌注时Na^+-K^+-ATP酶和Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP酶活性的影响[J]. 中华麻醉学杂志，2010，30(10)：1179-1181.

[5] 石翊飒，朱小兵. 利多卡因预先给药对肾脏缺血再灌注损伤大鼠肾组织CD44和TNF-α表达的影响[J]. 中华麻醉学杂志，2010，30(2)：231-233.

[6] Kocak B, Orug T, Turhan N, *et al*. CD44 expression in renal ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Int Urol Nephrol, 2009, 41(4): 791-794.

[7] Heel K, Blennerhassett L, Kong S E, *et al*. Influence of ischaemia-reperfusion injury on CD44 expression in rat small intestine[J]. Br J Surg, 1998, 85(8): 1086-1089.

[8] Decleves A M, Caron N, Nonclercq D, *et al*. Dynamics of hyaluronan, CD44, and inflammatory cells in the rat kidney after ischemia/reperfusion injury[J]. Int J Mol Med, 2006, 18(1): 83-94.

[9] Rouschop K M, Roelofs J J, Claessen N, *et al*. Protection against renal ischemia reperfusion injury by CD44 disruption[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(7): 2034-2043.

[10] Poulsom R. CD44 and hyaluronan help mesenchymal stem cells move to a neighborhood in need of regeneration[J]. Kidney Int, 2007, 72(4): 389-390.

[11] Moon C, Jeong C W, Kim H, *et al*. Expression of CD44 adhesion molecule in rat testis with ischemia/reperfusion injury[J]. J Vet Med Sci, 2006, 68(7): 761-764.

[12] Weber G F, Ashkar S, Glimcher M J, *et al*. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1)[J]. Science, 1996, 271(5248): 509-512.

[13] Cau J, Favreau F, Zhang K, *et al*. FR167653 improves renal recovery and decreases inflammation and fibrosis after renal ischemia reperfusion injury[J]. J Vasc Surg, 2009, 49(3): 728-740.

[14] Meldrum K K, Hile K, Meldrum D R, *et al*. Simulated ischemia induces renal tubular cell apoptosis through a nuclear factor-kappaB dependent mechanism[J]. J Urol, 2002, 168(1): 248-252.

（收稿：2013-10-13；修回：2013-11-13）

（编辑 栾 嘉）