论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201502016

尿激酶改善长时间热缺血肾脏功能的实验研究

宋 波,李传贵,郑宗钊,黄赤兵 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院泌尿外科)

[摘要] **目的** 探讨尿激酶对长时间热缺血(warm ischemia, WI)肾脏的形态和功能恢复的影响。**方法** 30只家兔按随机数字表法分为3组:假手术、热缺血组(WI组)、热缺血+尿激酶治疗组(WI+UK组)。夹闭左侧肾动、静脉90 min模拟热缺血过程,HCA液冷灌注及肾脏血流复灌,模拟自体原位肾移植。比较各组血肌酐(Cr)、肾脏组织病理改变(HE、Masson染色)和免疫组化检测血栓调节蛋白(thrombomodulin, TM)。**结果** 与假手术组比较,WI组和WI+UK组术后Cr水平明显升高($P<0.05$),术后35 d Cr水平WI+UK组[(118.99±17.18)μmol/L]明显低于WI组[(165.34±8.38)μmol/L,$P<0.01$]。WI组肾小球内大量微血栓形成,肾小管水肿、坏死;WI+UK组肾小球未见血栓,肾小管未见异常。WI组TM表达明显高于假手术组($P<0.01$),WI+UK组明显低于WI组($P<0.05$)。**结论** 热缺血90 min后有明显的微血栓形成,导致肾脏结构破坏及肾功能下降。尿激酶治疗后微血栓溶解,有利于肾脏结构和功能恢复。

[关键词] 热缺血;尿激酶;肾脏
[中图法分类号] R364.12;R692;R977.3 [文献标志码] A

Urokinase improves renal function of rabbits with long-time warm ischemia

Song Bo, Li Chuangui, Zheng Zongzhao, Huang Chibing (Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the impact of urokinase (UK) on improving the renal function of rabbits with long-time warm ischemia (WI). **Methods** Thirty rabbits were randomly divided into 3 groups: sham operation (SO) group, WI group, and WI+UK group. WI rabbit model was established by clipping both left renal artery and left renal vein for 90 min. Renal *in situ* autografting model was simulated by HCA liquid cold perfusion and then blood reperfusion. Serum creatinine (Cr) was examined in each group. Pathological sections were observed by HE staining and Masson staining. Thrombomodulin (TM) expression was analyzed by immunohistochemistry (IHC). **Results** On the 35th day after the operation, the Cr level was greatly increased in the WI group and the WI+UK group than the SO group ($P<0.05$), while the Cr level (118.99±17.18 μmol/L) of the WI+UK group was significantly lower than (165.34±8.38 μmol/L) of the WI group ($P<0.01$). In the WI group, a large amount of micro-thrombi appeared in the glomeruli, and very severe edema and necrosis were found in the kidney tubules, but in the WI+UK group, there was no abnormality in the glomeruli and kidney tubules. The TM expression of the WI group was greatly higher than that of the SO group ($P<0.05$), and the TM expression of the WI+UK group was significantly lower than that of the WI group ($P<0.05$). **Conclusion** Obvious micro-thrombi are observed after 90-min WI, which leads to destroy of kidney structure and decrease of kidney function. After treatment with UK, the micro-thrombi are dissolved, and the kidney structure and function are recovered.

[**Key words**] warm ischemia; urokinase; kidneys

Supported by the Development Fund for Research Disciplines of Xinqiao Hospital (2014). Corresponding author: Huang Chibing, E-mail: huangchibing@medmail.com.cn

[基金项目] 第三军医大学新桥医院研究性学科发展基金(2014)
[通信作者] 黄赤兵,E-mail: huangchibing@medmail.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150505.1359.005.html(2015-05-05)

肾移植是治疗终末期肾病的最有效手段[1],但肾源短缺严重制约了肾移植的发展。心死亡器官捐献(donation after cardiac death,DCD)为解决器官短缺开辟了新的途径[2],但DCD供肾容易遭受长时间热缺血损伤,形成血栓阻碍微循环,导致肾脏灌注不良[3],此类肾脏移植后容易发生原发性无功能(primary nonfunction, PNF)和移植肾功能延迟恢复(delayed graft function, DGF)[4-5],导致手术失败,肾脏切除。Damman等[6]研究发现长时间热缺血肾脏容易发生补体-凝血途径的激活是造成这类肾脏损伤的重要原因。本研究针对长时间热缺血(warm ischemia, WI)肾脏血栓形成现象,采用尿激酶处理[7],观察其对肾脏结构及功能改善的效能。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 健康成年家兔30只,雌雄不限,体质量1.7~2.4 kg,由第三军医大学实验动物中心提供。实验动物生产许可证号:SCXK(渝)200020002;SCXK(军)20002007,笼养1周后进行实验。

1.1.2 主要实验试剂 注射用尿激酶(批准文号:国药准字H12020491)购于天津生物化学制药有限公司,苯巴比妥钠(进口批号:629F031)购于重庆葆光生物公司,血栓调节蛋白(thrombomodulin, TM)鼠抗兔单克隆抗体(anti-TM抗体)购于美国Abcam公司。

1.1.3 仪器 医用手术器械[上海医疗器械(集团)有限公司手术器械厂],医用高频电刀仪,(GD350-B连续型,上海沪通电子有限公司),Leica徕卡荧光显微镜型号DM6000B(德国徕卡显微系统公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 30只家兔按随机数字表法分为3组:假手术组、热缺血组(WI组)、热缺血+尿激酶组(WI+UK组)。每组10只家兔。

1.2.2 手术步骤 (1)参考周江桥等[8]的方法建立长时间热缺血肾脏自体移植模型:①麻醉:3%戊巴比妥钠溶液30 mg/kg剂量腹腔注射;以静脉穿刺套管针行耳缘静脉穿刺,建立静脉通路并固定。100 U/100 g皮下注射肝素。②游离肾脏:腹部纵行切口,游离左肾,暴露腹主动脉,完全游离左肾动脉、静脉至起始部。③长时间热缺血模型建立:采用无创伤血管夹从肾血管起始部夹闭左侧肾动、静脉,热缺血90 min后选用24#儿科套管针穿刺左肾动脉,以10~15 mL 0~4 ℃的HCA液恒压灌洗(压力为100 mmHg)。根据肾静脉的直径及角度选取适合的套管针穿刺肾静脉引流灌注液,形成肾局部灌注循环通路。灌注过程中自肾周向肾门按摩肾脏,至色泽变白、肾静脉流出液清澈后停止灌注。9-0无创伤显微缝合线于显微镜下缝合肾动脉及肾静脉穿刺口。开放左肾动脉及静脉,使左肾血流复灌。右侧肾脏延迟至术后第30天切除。(2)药物处理:假手术组仅行切开缝合腹部及注射生理盐水,WI组建立模型后注射生理盐水,WI+UK组建立模型后予尿激酶50万U/d,耳缘静脉静滴,连续治疗3 d。

1.2.3 术后处理 术后给予青霉素10万U/kg,肌肉注射,每天2次,连用3 d预防感染。术后第30天切除右侧肾脏,移植术后第35天采用急性失血法处死动物,留取血液标本,摘取左肾,行病理检查。

1.3 主要观测数据

1.3.1 肌酐(Cr) 取术前30 min和术后第30、35天静脉血检测肌酐水平。术前反映了双侧肾脏正常功能,术后第30天反映健康肾脏代偿情况下肾脏功能,术后第35天反映移植肾脏功能。

1.3.2 病理检测 术后第35天取移植肾脏组织行HE、Masson染色。

1.3.3 免疫组化 以鼠抗兔anti-TM单克隆抗体(工作浓度1∶250)为一抗行免疫组化检测。免疫组化操作按试剂盒说明书进行。在显微镜下观察,免疫组化阳性染色为细胞质内棕黄色颗粒,以正常家兔肾脏组织为阴性对照。免疫组化结果以平均光密度表示[9],具体方法如下:采用Image-Pro Plus软件,分别测定累积光密度(IOD)和面积,计算平均光密度(mean density=累积光密度/面积)。每例标本显微镜下在肾小管区域随机选择6个高倍镜视野(×200),计算平均光密度后,进行统计学分析。

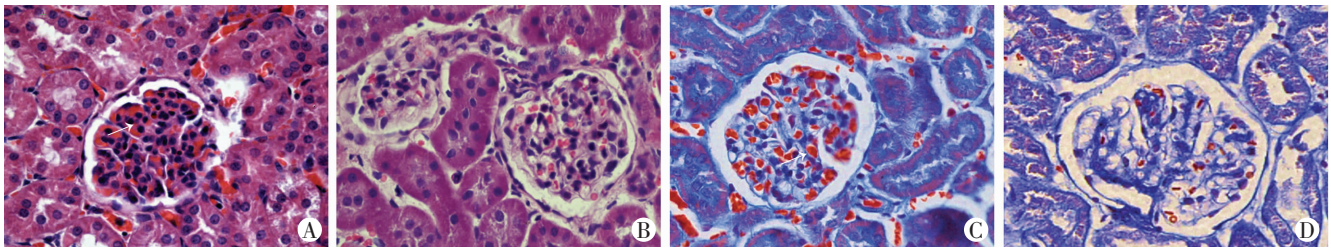
1.4 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件,正态分布数据采用$\bar{x} \pm s$表示,非正态分布数据用中位数表示,2组间比较采用两个独立样本的t检验,手术前后肌酐水平比较采用配对样本t检验。

2 结果

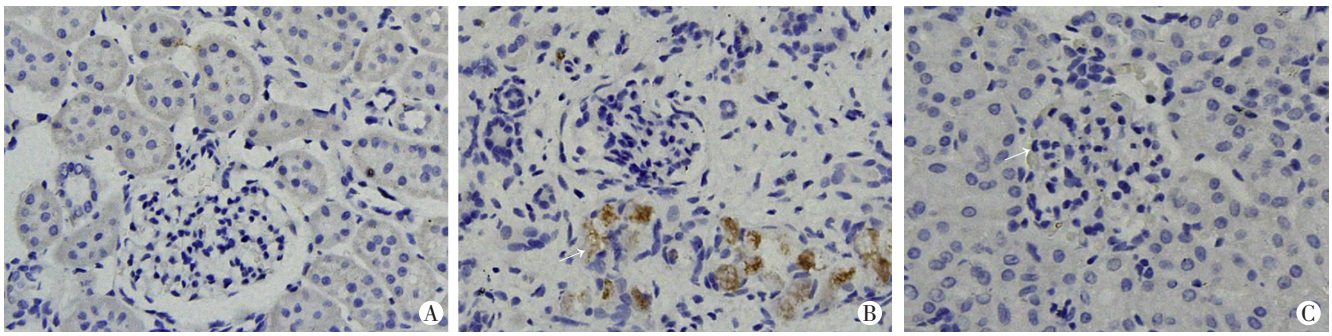
2.1 各组Cr水平比较

各组肾移植前后Cr水平见表1。术后第30、35天,WI组和WI+UK组Cr水平明显高于该时间点假手术组($P<0.01$),且较各组术前明显升高($P<0.01$);移植后第30天WI+UK组Cr水平与WI组比较差异无统计学意义($P>0.05$),术后第35天移植肾



A:WI组HE染色;B:WI+UK组HE染色;C:WI组Masson染色;D:WI+UK组Masson染色;箭头所指为微血栓

图1 WI组和WI+UK组术后第35天移植肾脏组织病理变化 (×400)



A:假手术组;B:热缺血组;C:热缺血+尿激酶组;箭头示TM蛋白阳性表达

图2 免疫组化染色观察各组术后第35天移植肾脏组织 (×400)

脏Cr水平WI+UK组明显低于WI组($P<0.01$)。

2.2 病理学观察

术后第35天肾脏HE染色和Masson染色见图1。光镜下:假手术组肾组织形态结构清晰,肾小管、肾小球结构正常;WI组肾小球及毛细血管内有明显微血栓,肾小球毛细血管腔皱缩呈缺血样改变,肾小管上皮出现明显的水肿、坏死(图1A、C);WI+UK组术后第35天肾小球内未见明显血栓,肾小管未见明显异常(图1B、D)。

表1 各组家兔肾移植前后Cr水平比较 ($\mu mol/L, n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	术前	术后第30天	术后第35天
假手术组	68.91±15.19	79.82±7.90	78.78±9.91
WI组	65.46±12.14	112.30±13.22^{ab}	165.34±8.38^{ab}
WI+UK组	70.01±6.85	98.68±12.58^{ab}	118.99±17.18^{abc}

a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与本组术前比较;c:$P<0.01$,与WI组比较

2.3 免疫组化观察

术后第35天WI组TM表达(43.87×10^{-5})明显高于假手术组(3.53×10^{-5},$P<0.01$)及WI+UK组(3.88×10^{-5},$P<0.01$),WI+UK组与假手术组无明显差别($P=0.63$)。见图2。

3 讨论

肾脏热缺血损伤后容易形成微血栓,阻碍血流灌注,加重肾脏损伤。国内外临床实践显示DCD供肾质量差,主要原因是热缺血时间长、血栓形成,甚至因此而丢弃肾脏[3]。移植后再灌注损伤会进一步加重肾脏热缺血损伤,血栓形成会致移植肾脏原发性无功能。针对血栓形成这一问题,本研究采取尿激酶进行溶栓治疗,观察其效果。

尿激酶可直接作用于内源性纤维蛋白溶解系统,能催化裂解纤溶酶原成纤溶酶,后者不仅能降解纤维蛋白凝块,亦能降解血循环中的纤维蛋白原、凝血因子Ⅴ和凝血因子Ⅷ等,从而发挥溶栓作用,故我们选择尿激酶进行溶栓治疗。文献[10-11]报道,热缺血时间最长达60 min时兔肾脏结构和功能损伤仍可逆,而热缺血90 min时肾脏发生了不可逆损伤,因此本实验选取了热缺血90 min这一时间点,建立长时间热缺血模型。术后延迟切除右侧肾脏以模拟透析治疗,避免发生急性肾功能衰竭,减少动物死亡,提高实验动物存活率[12]。为了观测缺血肾脏真实肾功能,术后第30天切除右侧肾脏。

实验中热缺血后Cr水平升高,特别是WI组术后第35天较术前及假手术组明显升高,说明肾功能降低。尿激酶溶栓后UK组术后第35天Cr水平较假手

术组高,即肾脏有一定程度损伤,但明显低于WI组,提示热缺血90 min肾脏经溶栓处理后功能得以改善。WI术后第35天肾小球及毛细血管内大量微血栓存在,肾小管上皮出现明显的水肿、坏死;WI+UK组微血栓减少,肾小管及肾小球形态未见明显异常,说明热缺血90 min后会形成明显微血栓,尿激酶可将其溶解并且促进肾脏结构的修复。TM能够反映血管内皮损伤[13-14],是血栓前状态标志之一,TM表达水平与血栓形成密切相关。本实验中WI组TM表达明显高于假手术组,提示热缺血90 min后血管内皮细胞损伤严重,容易导致血栓形成;WI+UK组TM蛋白表达水平明显低于WI组,说明溶栓治疗后血管内皮损伤减轻,血栓形成风险减小。以上结果说明:肾脏热缺血90 min后血管内皮损伤严重,血栓大量形成,造成严重微循环障碍,导致肾脏结构和功能损害;而尿激酶溶栓后血栓减少,微循环得以改善,肾脏结构和功能恢复。

综上所述,热缺血90 min可形成明显的微血栓,再灌注后会导致肾脏结构破坏及肾功能损害。尿激酶治疗后微血栓溶解,可促进肾脏结构和功能恢复。尿激酶改善了长时间热缺血肾脏功能,为临床应用此类肾脏提供了实验研究。

参考文献:

[1] 周山, 刘宏, 余荣杰, 等. 肾移植受体93例生存质量调查研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 32(15): 1652-1655.

[2] Ledinh H, Weekers L, Bonvoisin C, *et al*. Results of kidney transplantation from controlled donors after cardio-circulatory death: a single center experience[J]. Transpl Int, 2012, 25(2): 201-209.

[3] Wang C, Fu Q, Liu L, *et al*. Kidney transplantation from donation after cardiac death donors in China——a single-center experience [J]. Transplant Proc, 2012, 44(4): 862-864.

[4] Chen G, Shiu-Chung Ko D, Wang C, *et al*. Kidney transplantation from donors after cardiac death: an initial report of 71 cases from China[J]. Am J Transplant, 2013, 13(5): 1323-1326.

[5] Pieter-Hoogland E R, van-Smaalen T C, Christiaans M H, *et al*. Kidneys from uncontrolled donors after cardiac death: which kidneys do worse? [J]. Transpl Int, 2013, 26(5): 477-484.

[6] Damman J, Bloks V W, Daha M R, *et al*. Hypoxia and Complement-and-Coagulation Pathways in the Deceased Organ Donor as the Major Target for Intervention to Improve Renal Allograft Outcome[J]. Transplantation, 2015, 99(6): 1293-1300.

[7] Johari Y, Hosgood S A, Mohamed I H, *et al*. Back-table thrombolysis in live donor kidney transplantation[J]. Transplantation, 2010, 89(6): 765-766.

[8] 周江桥, 雷伟, 王玲珑, 等. 自体原位移植肾缺血再灌注损伤模型的建立与环孢素A对移植肾的保护作用[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(5): 562-564.

[9] 崔巍, 王硕仁, 朱陵群, 等. 平均光密度值分析法和阳性染色面积分析法在免疫组化图像分析中的对比研究[C]//2008中华中医药学会内科分会中医内科学科建设研讨会论文汇编. 北京: 中华中医药学会, 2008.

[10] Tyritzis S I, Kyroudi A, Liatsikos E, *et al*. Comparison of prolonged warm and cold ischemia on the solitary kidney during partial nephrectomy in a rabbit model[J]. World J Urol, 2007, 25(6): 635-640.

[11] Tyritzis S I, Zachariades M, Evangelou K, *et al*. Effects of prolonged warm and cold ischemia in a solitary kidney animal model after partial nephrectomy: an ultrastructural investigation[J]. Ultrastruct Pathol, 2011, 35(2): 60-65.

[12] 黄赤兵, 方玉华, 吴军, 等. 应用新技术建立大鼠肾移植模型[J]. 中华器官移植杂志, 2001, 22(2): 114.

[13] Boehme M W, Nawroth P P, Kling E, *et al*. Serum thrombomodulin. A novel marker of disease activity in systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum, 1994, 37(4): 572-577.

[14] 李世军, 刘志红, 陈书芬, 等. 血栓调节蛋白检测在狼疮性肾炎血管病变中的意义[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2003, 12(4): 313-335.

(**收稿**:2015-02-03;**修回**:2015-03-05)

(编辑 龙 亮)