泌尿外科学专题 文章编号:0253-3626(2009)09-1184-03

川芎嗪延缓大鼠慢性移植肾肾病作用及机制的研究

陈 刚,吴小候,唐亚雄,李家兵
(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探索川芎嗪对大鼠慢性移植肾肾病(Chronic allograft nephropathy,CAN)的治疗作用及其机制,为临床上延长移植肾的存活时间提供新的治疗途径。方法:F344 近交系大鼠和 Lewis 近交系大鼠作为供、受体,建立大鼠慢性移植肾肾病模型。将 75 只肾移植大鼠分成 3 组,每组 25 只,分别为对照组(环孢素组),实验组(川芎嗪联合环胞素组)和空白组。观察各组大鼠移植肾组织病理学变化。原位末端标记法检测肾脏细胞凋亡指数,免疫组化检测肾脏 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达。结果:空白组肾移植大鼠存活均未超过 2 周;对照组 4 周最早出现 CAN 病理改变,并随病程进展移植肾病变逐渐加重,12 周可见典型的 CAN 病变;而实验组出现时间晚,且病变相对较轻。实验组与对照组相比移植肾病理变化 Banff 总分差异有统计学意义($P<0.01$)。实验组肾组织细胞凋亡指数为 13.2 ±2.7,对照组肾组织细胞凋亡指数为 28.9 ±4.4,二者比较差异有显著性 $P<0.05$。实验组与对照组相比,Bcl-2 蛋白表达明显增强(15.32 ±0.22 vs 6.89 ±0.14, $P<0.05$),而 Bax 表达明显减弱(7.12 ±0.11 vs 13.45 ±0.61, $P<0.05$)。结论:川芎嗪对大鼠慢性移植肾肾病有延缓作用,其保护作用机制可能与 Bcl-2 蛋白表达增强和 Bax 蛋白表达减弱介导的肾脏细胞凋亡有关。

【关键词】川芎嗪;慢性移植肾肾病;细胞凋亡
【中国图书分类法分类号】R691;R286 【文献标识码】A 【收稿日期】2009—06—11

Ligustrazine delay the proceeding of chronic allograft nephropathy in rat

CHEN Gang, et al
(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the therapeutical effect of Tetramethylpyrazine on chronic allograft nephropathy of rat, reveal the relationship with CAN, then discovering mechanism of action that delaying the proceeding of CAN of rat, which provide a new way of therapy to extend survival time of transplanting kidney. *Methods*: We used Fisher rats as donors and Lewis rats as recipients to establish the model of CAN. 75 rats with transplanting kidney were divided into 3 groups: Ciclosporin group, TMP associating with Ciclosporin group and black group; every group for 25 rats. Renal cell apop totic index was examined by means of terminal deoxynucleotidyl transferase2mediated d-UTP nick end labeling (TUNEL). The expressions of Bcl-2 and Bax in kidney was immunohistochemically evaluated and. The kidney histology were observed by light microscope. *Results*: The rats of black group were died in two weeks. Ciclosporin group, appearance the histopathological changes of CAN since 4th week, it is thus evident that typical histopathological changes of CAN at 12th week. TMP associating with Ciclosporin group was later. There was significant difference ($P<0.05$). By Tetramethylpyrazine treatment, the apoptotic index (13.2 ±2.7 vs 28.9 ±4.4, $P<0.05$) and the expression of Bax (7.12 ±0.11 vs 13.45 ±0.61, $P<0.05$)were decreased significantly, and the expression of Bcl-2 (15.32 ±0.22 vs 6.89 ±0.14, $P<0.05$) was increased significantly as compared with that in Ciclosporin group. *Conclusion*: Tetramethylpyrazine can slowed the proceeding of CAN. and protective mechanism may be partly through inhibition of cell apoptosis byregulating the expressions of apoptosis related genes Bcl-2 and Bax.

【Key words】Ligustrazine; Chronic allograft nephropathy; Apoptosis

慢性移植肾肾病(Chronic allograft nephropathy,CAN)是影响移植肾远期功能的重要因素[1]。CAN 约占移植肾丢失者的 40%,其具体发病机制尚未阐明。有研究表明,缺血-再灌注损伤(Ischemia-reperfusion, IRI)在 CAN 的发生及发展中起重要作用[2]。川芎嗪具有多种药效,如抗氧化、改善微循环、抑制血小板凝集、防止血栓形成等[3],可抑制肾脏缺血再灌

作者介绍:陈 刚(1975-),男,主治医师,博士,研究方向:肾移植。
通讯作者:吴小候,男,教授,E-mail:wuxiaohou80@hotmail.com。

注的损伤作用[4]。本实验通过建立大鼠慢性肾移植肾病模型，应用川芎嗪处理后，观察川芎嗪对 CAN 的作用并探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 大鼠慢性移植肾肾病模型的建立

以健康 F344 近交系大鼠为供体，Lewis 近交系大鼠为受体，雌雄不论，体重约 180～200 g，行大鼠左肾原位异体移植。将 75 只肾移植大鼠分成 3 组，每组 25 只，分别为对照组（环孢素组），实验组（川芎嗪联合环胞素组）和空白组。对照组：术后即刻环孢素口服液灌胃给药 10 mg/(kg·d)，连续 10 d。实验组：术后即刻用川芎嗪 40 mg/(kg·d)腹腔注射 + 环胞素 10 mg/(kg·d)灌胃给药，连续 10 d。每组各 8 只。受体从肾移植术当天开始，腹腔每天注射青霉素 20 万 U 连续 3 d，术后第 10d 切除右肾。分组喂养，观察肾移植大鼠的食欲、活动情况、毛发光洁度及有无不良反应等一般情况。

1.2 获取标本

各组大鼠分别于移植术后第 2、4、6、8、12 周取标本。腹腔注射水合氯醛麻醉后，由受体左腹部切口入腹，4-0 丝线结扎移植肾动、静脉及输尿管，切除移植肾。取部分肾组织分别用 40 g/L 甲醛和 30 ml /L 戊二醛固定以制备石蜡切片和电镜切片。

1.3 HE、P.A.S 和 Masson 染色观察移植肾病理学改变

大鼠移植肾组织在 4%多聚甲醛中固定，常规酒精脱水，石蜡包埋后，切取约 4 μm 厚的组织切片，分别行 HE、PAS 和 Masson 染色，观察组织病理学改变。HE 染色观察细胞浸润和肾小管萎缩程度；PAS 染色主要观察肾小球基膜增厚，Masson 染色主要观察肾小球、间质纤维化，两者观察共同表现为肾小球及动脉硬化程度。肾小球硬化被定义为血管拌塌陷、包曼氏囊豁连和玻璃样变性形成。根据 Banff97 诊断与分类标准对其病理检测结果予以诊断有无慢性排斥反应。

1.4 移植肾组织 Bcl-2，Bax 免疫组化染色

采用兔抗鼠 Bcl-2 和 Bax mAb，参照抗 Bcl-2 和 Bax 试剂盒进行，显色采用 DAB 试剂盒进行。光镜观察胞质中有棕色颗粒者为阳性细胞，实验所用试剂：兔抗大鼠 Bcl-2 和 Bax mAb、兔抗 β-actin（Santa Cruz 公司）；免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒（武汉博士德生物工程公司）。

1.5 移植肾组织细胞凋亡检测

采用 TUNEL 检测细胞凋亡指数，参照 TUNEL 试剂盒说明书进行，显色采用 DAB 试剂盒进行。光镜观察凋亡细胞，胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞。于阳性表达分布区域、光镜 200 倍下随机选择 5 个无重叠视野，计数阳性细胞，以凋亡阳性细胞数占总细胞数的百分比作为细胞凋亡指数（AI）。实验所用试剂：原位细胞凋亡（TUNEL）试剂盒（美国 Roche 公司）。

1.6 统计学处理

计量资料用表示，多组样本均数之间比较采用单因素方差分析，各组间的两两比较采用多个均数间的多重比较（Dunnett-t 检验），应用 SPSS13.0 统计软件，$P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肾移植后移植肾的病理学改变

肾移植术后空白组大鼠存活均未超过 2 周；对照组 4 周时最早出现 CAN 病理改变，可见血管内膜开始增厚，肾小球开始出现硬化以及轻度的间质纤维增殖，淋巴细胞和浆细胞的浸润；6～8 周见明显的单核细胞浸润，血管内膜增厚，肾小球硬化；12 周见广泛的间质纤维增殖，肾小球基底膜增厚、硬化、闭塞，肾小管萎缩退化（图 1）。实验组移植肾出现明显的血管内膜增生及 CAN 病理改变的时间较对照组出现较晚，且病变相对较轻（图 2）。Banff 评分实验组和对照组之间的差异有显著性（$P<0.05$）（见表 1）。

2.2 肾组织细胞凋亡的变化

实验组肾组织细胞凋亡指数（%）为 13.2 ± 2.7，对照组肾组织细胞凋亡指数为 28.9 ± 4.4，二者比较差异有统计学意义（$P=0.024<0.05$）。

2.3 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

实验组与对照组相比，Bcl-2 蛋白表达明显增强（15.32 ± 0.22）与（6.89 ± 0.14），$P<0.05$（如图 3、4），而 Bax 表达明显减弱[（7.12 ± 0.11）与（13.45 ± 0.61），$P<0.05$（如图 5、6）。

3 讨 论

慢性移植肾肾病（Chronic allograft nephropathy，

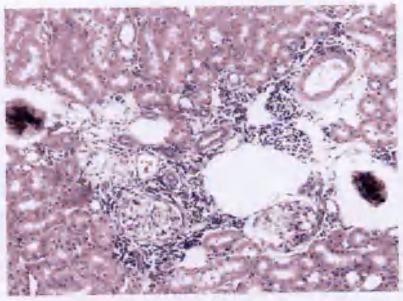


图 1 对照组 12 周病理学改变（HE×200）

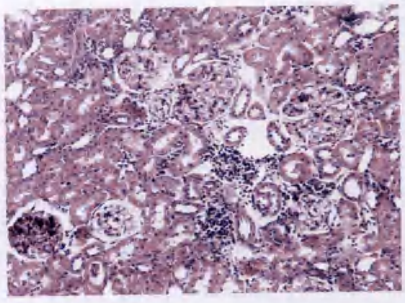


图 2 实验组 12 周病理学改变（HE×400）

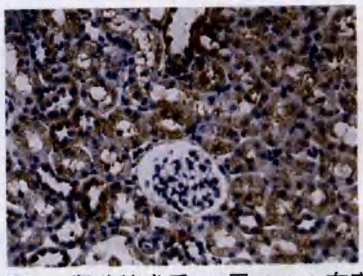


图 3 肾移植术后 12 周，Bcl-2 在实验组移植肾的表达（SABC×200）

表 1 大鼠移植肾组织病理形态学观察 Banff 评分结果

组别	n	4 周	6 周	8 周	12 周
对照组	20	2.30 ± 0.58	4.06 ± 1.00	6.67 ± 1.54	8.68 ± 1.53
实验组	20	1.00 ± 0.98	2.00 ± 1.00	5.32 ± 0.58	7.63 ± 0.58

注：同一组各阶段比较差异有统计学意义，$P<0.05$；对照组和实验组比较差异有统计学意义，$P<0.05$

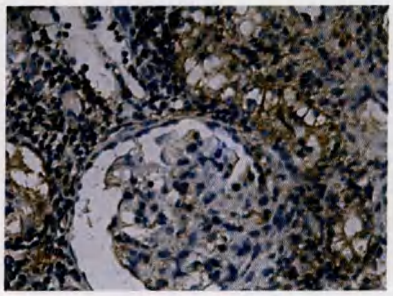


图 4 肾移植术后 12 周，Bcl-2 在对照组移植肾的表达（SABC×200）

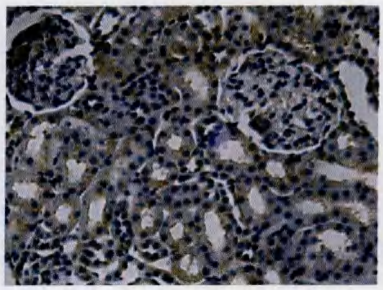


图 5 肾移植术后 12 周，Bax 在实验组移植肾的表达（SABC×200）

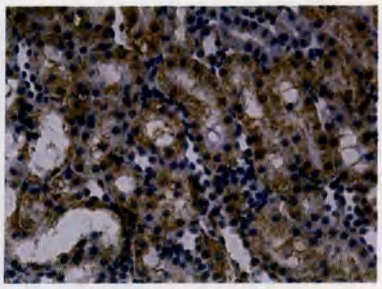


图 6 肾移植术后 12 周，Bax 在对照组移植肾的表达（SABC×200）

CAN）是影响移植肾远期功能的重要因素[1]。CAN 约占移植肾丢失者的 40%，其具体发病机制尚未阐明。大鼠慢性移植肾肾病模型的建立为研究 CAN 提供了平台。有研究表明，缺血-再灌注损伤（Ische 此同时 mia-reperfusion，IRI）在 CAN 的发生及发展中起重要作用[2]。川芎嗪具有多种药效，如抗氧化、改善微循环、抑制血小板凝集、防止血栓形成等[3]，可抑制肾脏缺血再灌注的损伤作用[4]。大量的研究[5,6]证实川芎嗪对肾脏有明显的保护作用。肾脏 IRI 损伤后除发生细胞坏死外，细胞凋亡也是其重要的死亡形式，本研究也表明了 CAN 发生时凋亡的发生。细胞凋亡受多种凋亡相关基因及其蛋白的调控，与凋亡相关的基因通常分为抗凋亡基因和促凋亡基因。Bcl-2 家族凋亡抑制基因之一，对细胞凋亡起着重要的调控作用[7]而 Bax 为 Bcl-2 家族成员，其作用则与 Bcl-2 相反，具有促凋亡作用。Reed[8]认为，Bcl-2 高表达或 Bcl-2/Bax 比值升高可抑制 Bax 的活化，从而抑制细胞凋亡。本研究结果提示，应用川芎嗪处理后，CAN 模型 Bcl-2 蛋白表达增强，Bax 蛋白表达减弱，Bcl-2/Bax 比值增高，细胞凋亡指数下降，表明川芎嗪能抑制 CAN 发生过程中肾脏细胞凋亡的发生，且可能与抑制 Bcl-2/Bax 介导的细胞凋亡密切相关。因而我们推测在CAN 发生过程中的细胞凋亡是可以预防的。

本研究可得出以下结论：川芎嗪有延缓 CAN 发生的作用。其作用机制之一可能是川芎嗪通过调节 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达，抑制细胞凋亡起到肾脏保护作用，进而延缓 CAN 的发生。然而，川芎嗪具有多种药效，川芎嗪延缓 CAN 发生的机制肯定很复杂，而调控细胞凋亡可能只是其中之一，更多机制的阐明还有待进一步研究证实。

参 考 文 献

[1] Womer K L, Vella J P, Sayegh M H. Chronic allograft dysfunction: mechanisms and new approachs to therapy[J]. Semin Nephrol, 2000, 20(2): 126-147.

[2] Bohmova R, Viklicky O. Renal ischemia-reperfusion injury: an inescapable event affecting kidney transplantation outcome[J]. Folia Microbiol, 2001, 46(4): 267-276.

[3] 祝海洲，廉 萍，雷学锋，等. 川芎嗪对肾缺血再灌注时 c-1os、bc1-2、ICAM-1 蛋白表达的影响[J]. 济宁医学院学报，2003，26(2)：14-16.

[4] 孔维信，叶志斌，刘银坤，等. 川芎嗪和 SOD 对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 镇江医学院学报，1998，8(2)：147-50.

[5] Sun L, Li Y, Shi L, et al. Protective effects of ligustrazine on ischemia-reperfusion injury in rat kidneys[J]. Microsurgery, 2002, 22(8): 343-346.

[6] 王汉民，吴雄飞，谭 华，等. 川芎嗪对缺血/再灌注损伤大鼠肾脏细胞凋亡及 Bcl-2 和 Bax 表达的影响 [J]. 第四军医大学学报，2006，27(20)：1884-1887.

[7] Devarajan P, Mishra J, Supavekin S, et al. Gene exp ression in early ischemic renal injury: clues towards pathogenesis, biomarker discovery, and novel therapeutics[J]. Mol Gene Metab, 2003, 80(4): 365-376.

[8] Reed J C. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax2-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities[J]. Cell Death Differ, 2006, 13(8): 1378-1386.

（责任编辑：冉明会）