基础研究 文章编号:0253-3626(2010)02-0199-03

丹红注射液对大鼠移植肾缺血再灌注损伤后 ICAM-1 表达的影响

夏 康[1], 李家兵[2],吴建伟[2],吴小候[2]
(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨丹红注射液对大鼠移植肾缺血再灌注损伤和细胞间粘附分子 1(ICAM-1)表达的影响。方法:建立近交系雄性 SD 大鼠同基因原位肾移植模型。共设 4 个实验组,假手术组,移植缺血再灌注组,丹红注射液预防组,丹红注射液治疗组。检测术后 24 h 各组大鼠的移植肾尿素氮(Blood urea nitrogen,Bun)和肌酐(Serum creatinine,Cr)变化,采用免疫组化法检测 ICAM-1 表达,HE 染色光镜下观察肾组织损伤的病理改变,并进行 Paller 氏评分。结果:与假手术组比较,移植缺血再灌注组肾小管细胞 ICAM-1 阳性表达增强($P<0.01$),Paller 氏评分增加($P<0.01$),肾小管上皮细胞肿胀、变性和坏死程度严重,ICAM-1 表达量与肾小管评分呈正相关($P<0.01$);与移植缺血再灌注组及治疗组比较,丹红预处理组肾小管细胞 ICAM-1 阳性表达下降($P<0.01$),Paller 氏评分降低($P<0.01$),肾小管上皮细胞肿胀、变性和坏死程度较轻。结论:丹红注射液可能通过下调 ICAM-1 表达,减轻炎症反应对移植肾的损伤。

【关键词】肾缺血再灌注;丹红注射液;细胞间粘附分子 1
【中国图书分类法分类号】R286;R699.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-15

Effects of Danhong injection on expression of ICAM-1 in rat kidneys with ischemia-reperfusion injury after renal transplantation

XIA Kang, et al
(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical university*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of Danhong Injection on expression of ICAM-1 in rat kidneys with ischemia reperfusion (I/R) injury after kidney transplantation. *Methods*: Ten normal SD rats were allocated into the sham operation. And the rats were only anesthetized, and kidneys were exposed for 45 minutes. The allogeneic male SD rats model of kidney transplantation were established. The recipients were divided into 3 groups ($n=10$, in each) at random: I/Rgroup, Danhong pretreatment group, danhong treatment group. Blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (CR) levels were determined after 24 hours. The expression of ICAM-1 in kidney was quantitatively detected by immunohistochemistry. *Results*: Compared with those in the Sham group, the expression of ICAM-1 ($P<0.01$) and the Paller's grades of kidney tubule ($P<0.01$) in I/R model group and Danhong treatment group were significantly increased. The kidney tubular epithelial cells distributed disorderly. The necrosis and pyknosis of kidney tubular epithelial cells increased very much with inflammatory cell infiltration. The kidney tubular Paller's grades were positively related with the expression of ICAM-1 ($r=0.92$, $P<0.05$). By Danhong pretreatment, the expression of ICAM-1 and the Paller's grades of kindey tubule ($P<0.01$) were decreased significantly ($P<0.01$). The kindey tubules epithelial cells swelled mildly. The inflammatory cell infiltration was obviously relieved. *Conclusion*: Danhong injection can decrease renal ischemia reperfusion injury after renal transplantation, possiblely by down-regulating ICAM-1 expression.

【Key words】Kidney ischemia-reperfusion; Danhong injection; ICAM-1

肾缺血再灌注损伤是造成移植肾失功的主要因素之一。因此减轻缺血再灌注损伤可改善移植肾肾功,提高肾移植患者生存率。研究表明,丹红注射液对心肌以及脑组织的缺血再灌注损伤有保护作用[1,2],但是否对移植肾缺血再灌注损伤有保护作用尚不清楚。本实验通过建立大鼠肾移植模型,探讨丹红注射液对移植肾缺血再灌注损伤是保护作用及可能机制。

作者介绍:夏 康(1979-),男,硕士,
研究方向:肾移植和缺血再灌注损伤。
通讯作者:吴小候,男,教授,E-mail:wuxiaohou86@hotmail.com。

1 材料与方法

1.1 实验动物

以封闭群成年近交系 SD 雄性大鼠为供、受体（体重 220～250 g），SPF 级，由重庆医科大学实验动物中心提供。许可证：SCXK（渝）2007-0001。

1.2 实验材料

丹红注射液为步长倍通制药有限公司产品（批号 070713）。ICAM-1 多克隆抗体（BA2189，博士德公司），SABC 免疫组化试剂盒（SA1022，博士德公司）及二氨基联苯胺（DAB）显色液（北京中杉生物技术有限公司），石蜡切片机（Leica，Germany），离心机，生物照相显微镜（Olypums-45，日本），全自动生化分析仪，显微外科手术器械若干，北航真彩色医学图像处理系统 CM2000B。

1.3 动物模型的建立

全部操作在肉眼直视下进行。供受体均在术前 12 h 禁食，自由饮水。麻醉方法：10%水合氯醛 3.5 ml/kg 体重腹腔注射麻醉，在术中大鼠如有苏醒可适当腹腔加注 0.1 ml 水合氯醛。获取供肾后用 9/0 医用无损伤缝线作供肾腹主动脉与受体腹主动脉端侧吻合，供肾下腔静脉与受体鼠左肾静脉端端吻合，移植肾尿路重建采用带膀胱瓣的输尿管与受体鼠膀胱吻合。然后切除受体鼠右肾。

1.4 动物模型分组及处理

健康雄性 SD 大鼠随机分成 4 组，1 组 10 只，2、3、4 组为 20 只（分为供、受体 2 组，进行原位肾移植手术），因麻醉意外、失血性休克、尿漏、尿道梗阻、感染、动静脉血栓等并发症导致手术失败或死亡者，均排除在本实验外。（各组根据成人日用量按体重剂量换算系数折算大鼠给药剂量）①假手术组：剖开腹腔后暴露肾脏，45 min 后关腹。于术前 72、48、24 h 经尾静脉注射生理盐水 2 ml/kg。②移植缺血再灌注模型组：行原位肾移植手术，术前处理和假手术组相同。③DH 预处理组：行原位肾移植手术，于术前 72、48、24 h 尾静脉注射丹红注射液 2 ml/kg，术后不再注射。④DH 治疗组，行原位肾移植手术，术后 8、16 h 给予丹红注射液 2 ml/kg。实验各组均于术后 24 h 处死动物。

1.5 检测项目

1.5.1 肾组织形态学观察 实验完后取出大鼠肾脏组织，10%甲醛固定，脱水，石蜡包埋、切片，HE 染色在及光镜下观察组织病理学变化。肾小管间质损害分级按 Pallet[3]氏评分：每高倍视野随机选择 10 个肾小管计分，肾小管明显扩张、细胞扁平或肿胀 1 分、刷状缘损伤或脱落 1 分或 2 分，管型 2 分，小管腔内有脱落的坏死细胞（未形成管形或碎片）1 分，共取 10 个视野。

1.5.2 尿素氮（Blood urea nitrogen，Bun）和肌酐（Serum creatinine，Cr）的测定术后于 24 h 经下腔静脉取血 2 ml，全自动生化分析仪测定血清尿素氮值、肌酐值。

1.5.3 ICAM-1 表达检测 免疫组化按常规方法及试剂盒说明操作，在显微镜下用 DAB 显色，同时采用去掉第一抗体的方法作为阴性对照，苏木素复染，脱水，透明，封片，显微镜观察。胞浆着色呈棕黄色为阳性细胞，每张切片于阳性表达区域选取 5 个高倍（×400）无重叠视野，应用图像分析系统计算平均吸收度值 A 并以此作为半定量参数反映 ICAM-1 表达。

1.6 统计学处理

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS12.0 统计软件进行分析，多组间比较用方差分析，方差不齐的数据采用秩和检验，指标间做相关分析。$P<0.05$ 为差异显著，$P<0.01$ 为差异非常显著。

2 结 果

2.1 肾组织病理学观察

假手术组肾小球结构正常，肾小管管腔清晰，间质无充血水肿。缺血再灌注组肾小管明显扩张，上皮细胞呈空泡样、颗粒样变性并伴有坏死。肾小管内见大量管型和坏死脱落细胞，部分细胞核固缩碎裂，胞质浓缩，小管基底膜断裂管腔阻塞，部分肾小管结构毁损。肾小球内可见红细胞渗出，肾间质水肿并有炎性细胞浸润。见图 1。治疗组与缺血再灌注组损伤程度相近。预处理组肾小管上皮细胞肿胀、变性和坏死程度较轻，肾小球结构基本正常，肾间质水肿较轻炎性细胞浸润少。见图 2。

2.2 各组大鼠肾小管间质损害 Paller 氏评分比较

见表 1，与假手术组比较，各实验组评分增加（$P<0.01$）。与移植缺血再灌注组比较，丹红注射液治疗组评分无统计学差异（$P>0.05$），丹红注射液预处理组评分较缺血再灌注组及丹红注射液治疗组评分显著下降（$P<0.01$）。

2.3 各组肾功能的变化

见表 2，与假手术组比较，各组血 Bun，Cr 检测值显著增高（$P<0.01$）。与移植缺血再灌注组比较，丹红注射液治疗组血 Bun，Cr 检测值无统计学差异（$P>0.05$），丹红注射液预处理组血 Bun，Cr 检测值显著下降（$P<0.01$）。

2.4 基因 ICAM-1 的表达情况

免疫组化染色后阳性产物呈弥漫性的黄色、棕黄色颗粒，阳性表达位于肾小管上皮细胞，以近曲小管上皮为主，肾小球未见表达，见图 3，图 4，图像分析后结果见表 3。ICAM-1 在假手术组表达极少。与假手术组比较，移植缺血再灌注组 ICAM-1 表达显著增强（$P<0.01$）；丹红注射液治疗组同移植缺血再灌注组比较 ICAM-1 表达无显著差异（$P>0.05$）；同移植缺血再灌注组比较丹红注射液预处理组 ICAM-1 表达明显下降（$P<0.01$）。

2.5 相关性分析

移植缺血再灌注 24 h 后肾小管评分与肾组织中细胞间黏附分子 1 表达均呈正相关（$r=0.92$，$P<0.05$）。

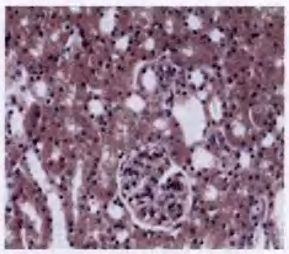


图 1 移植缺血再灌注组(HE 染色 × 400)

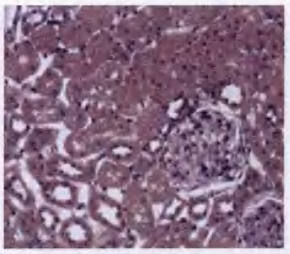


图 2 丹红注射液预处理组(HE 染色 × 400)

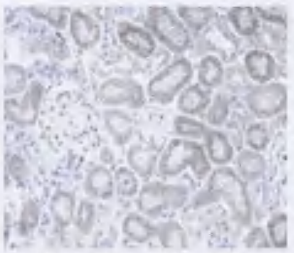


图 3 移植缺血再灌注组 ICAM-1 表达(× 400)

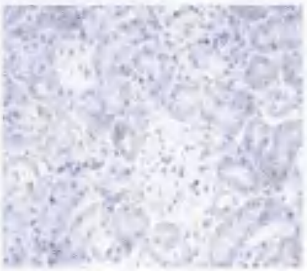


图 4 丹红注射液预处理组 ICAM-1 表达(× 400)

表 2 各组 Bun、Cr 值 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	Bun(mmol/L)	Cr(μmmol/L)
假手术组	8.43 ± 1.12	54.13 ± 5.67
移植缺血再灌注组	69.96 ± 6.22#	404.08 ± 45.39#
丹红注射液预处理组	45.16 ± 6.50#▲	269.87 ± 41.49 #▲
丹红注射液治疗组	67.12 ± 5.86#	393.71 ± 44.19#

与假手术组比较，#P <0.01；与移植缺血再灌注组比较，P <0.01；与丹红注射液治疗组比较，▲P <0.01

表 1 各组肾小管间质损害 Pallet 氏评分 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	评分
假手术组	4.10 ± 1.52
移植缺血再灌注组	51.00 ± 2.83#
丹红注射液预处理组	32.20 ± 3.29#▲
丹红注射液治疗组	48.50 ± 3.89#

与假手术组比较 #P <0.01；与移植缺血再灌注组比较 *P <0.01；与丹红注射液治疗组比较 ▲P <0.01。

表 3 ICAM-1 平均吸收度 A ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	ICAM-1 (A)
假手术组	0.034 ± 0.012
移植缺血再灌注组	0.216 ± 0.028#
丹红注射液预处理组	0.123 ± 0.019#▲
丹红注射液治疗组	0.205 ± 0.022#

与假手术组比较 #P <0.01;与移植缺血再灌注组比较 *P <0.01;与丹红注射液治疗组比较▲P <0.01

3 讨 论

肾缺血再灌注损伤是导致急性肾功能衰竭及影响移植肾存活的重要因素，但发生机制尚未完全阐明，目前认为同活性氧、钙超负荷、炎症反应、内皮素以及细胞凋亡等因素有关。因此寻找有效的抗肾缺血再灌注损伤药物是研究热点之一。丹红注射液为丹参、红花等提取物的中药制剂，其主要成分为多种丹参酮、红花黄素、红花酮苷、原儿茶醛、丹参酚酸 B 等[4,5]。研究表明，丹红注射液具有抗氧化、防止血栓形成及扩张血管等功效并对心、脑组织缺血再灌注损伤有保护作用[1,2]。但是否对移植肾缺血再灌注损伤有保护作用尚不清楚。

本实验予以丹红注射液对肾移植大鼠进行干预，结果表明：缺血再灌注组 Bun、Cr 值较假手术组有明显升高(P<0.01)。说明缺血再灌注对移植肾造成了严重损害。丹红注射液治疗组与缺血再灌注组相比，Bun、Cr 值无统计学差异(P>0.05)，提示移植术后再用药难以在短时间内减轻肾脏损伤。丹红注射液预处理组与缺血再灌注组及治疗组相比，Bun、Cr 值明显降低(P<0.01)，说明预防性使用丹红注射液可改善肾功，减轻组织损伤。但 Bun、Cr 值仍高于假手术组(P<0.01)，表明预处理后仍不能够完全避免缺血再灌注损伤对肾脏造成的损害。

众多研究发现由粘附分子介导的白细胞与内皮细胞相互粘附是白细胞聚集、活化和释放炎性介质的关键，在缺血再灌注损伤中起着重要作用[6,7]。ICAM-1 是免疫球蛋白超家族粘附分子之一。ICAM-1 同受体结合后可介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质间粘附作用和炎症反应[8,9]。本实验发现 ICAM-1 在假手术组少量表达，而缺血再灌注组较假手术组 ICAM-1 表达有明显升高(P<0.01)，同时发现移植肾组织发生明显病理变化，肾小管明显扩张，上皮细胞变性并伴有坏死。部分细胞核固缩碎裂，间质水肿伴炎性细胞浸润。ICAM-1 表达量与肾小管评分呈正相关(P<0.01)。研究表明，ICAM-1 增加可介导更多的白细胞活化并与内皮细胞稳定黏附，加重炎症级联反应，使肾脏损伤加重[10,11]。因此能有效抑制 ICAM-1 表达可减轻炎症反应对肾脏损伤。丹红注射液治疗组与缺血再灌注组相比，ICAM-1 表达无统计学差异(P>0.05)，移植肾病理损伤程度相似。说明术后用药不能抑制 ICAM-1 表达，减轻炎症反应。丹红注射液预处理组与缺血再灌注组及治疗组相比，ICAM-1 明显降低(P<0.01)，移植肾肾小管上皮细胞肿胀、变性和坏死程度较轻，肾间质水肿较轻炎性细胞浸润少。提示术前使用丹红注射液可减少肾脏移植术后 ICAM-1 表达水平，从而减轻炎症反应对移植肾脏的损伤。

综上所述，术前预防性使用丹红注射液对移植肾脏有保护作用，其机制可能同减少 ICAM-1 表达进而减少炎症反应对肾脏损害有关。为临床选用抗肾缺血再灌注损伤药物提供

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)02-0202-04

金属硫蛋白对全脑缺血再灌注后损伤神经的修复作用

李 峥,董 志

(重庆医科大学药学院药理教研室,重庆市生物化学与分子药理学重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察金属硫蛋白(Metallothionein,MT)外源性补充对大鼠全脑缺血再灌注(Cerebral ischemia and reperfusion,I/R)损伤的保护作用,并初步探讨其可能机制。方法:建立 I/R 模型,采用低血压并双侧颈总动脉夹闭的全脑缺血再灌注模型。缺血 20 min 再灌注 1 d 后,测行为学指标,石蜡切片 HE 染色观察海马神经元形态变化,并用免疫组化方法检测海马神经生长因子-β(Nerve growth factor-β,NGF-β)的表达。结果:MT 脑室注射给药(1.4、4.2 mg/kg)能剂量依赖性的减轻大鼠行为学症状,增加大鼠海马神经元 NGF-β 的表达(0.46、1.4、4.2 mg/kg)。同时病理组织学观察还发现,MT(0.46、1.4、4.2 mg/kg)能显著减少 I/R 大鼠海马区神经元的固缩,增加存活细胞的数量,减轻脑损伤。结论:MT 对脑缺血再灌注损伤有神经保护作用,可能机制为促损伤神经元修复。

【关键词】金属硫蛋白;神经生长因子;脑缺血再灌注

【中国图书分类法分类号】R743.3; R962 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-25

The reparation of metallothionein to the injuried neuron after cerebral ischemia and reperfusion in rats

LI Zheng, et al

(*Department of Pharmacology, Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the protect action of exogenous metallothionein on rats' cerebral ischemia and reperfusion and explore its possible mechanism. *Methods*: I/R modle was established. After 20 min ischemia and 1 d reperfusion, determined the ethology index and the HE staining was determined to see the morphologic changes of neurons in hippocampus. The expression of NGF-β in hippocampus was determined by immunohistochemistry.

作者介绍:李 峥(1983-),男,硕士,
研究方向:新药开发与研究。

通讯作者:董 志,男,教授,E-mail:zhidong073@hotmail.com。

了实验依据。

参 考 文 献

[1] 齐惠丽,赵广荣,王典瑞,等.丹红注射液对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用的实验研究[J].现代中医药,2007,27(4):65-67.

[2] 辛 勤,李秀芳,司端运,等.丹参红花注射液对实验性大鼠脑缺血的保护作用[J].中成药,2004,26(3):222-224.

[3] Paller M S, Hoidl J R, Ferris T F, et al. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat[J]. J Clin Invest, 1984, 74(1): 1156-1164.

[4] 王书梅. 高效液相色谱法测定丹红注射液中丹参水溶性成分的含量[J].时珍国医国药,2006,17(6):989-990.

[5] 张梅兰,金静维,杜秀芳,等.丹红注射液对实验性脑缺血大鼠脑毛细血管通透性及脑含水量的影响 [J]. 河北医药,2007,29(3):204-205.

[6] Stefanutti G, Pierro A, Smoth vv, et al. Peroxynitrite decomposition catalyst FeTMPyP provides partial protection against intestinal ischemia and reperfusion injury in infant rats[J]. Basic Science Investigation, 2007, 62(1):43-48.

[7] Patel NS, Chatterie PK, Mazzon E, et al. Endogenous interleukin-6 enhances the renal injury, dysfunction, and inflammation caused by ischemia/reperfusion[J]. J Pharmaeol ExpTher, 2005, 312(3): 1170-1178.

[8] Fukatsu K, Kudsk K A, Zarzaur B L, et al. Increased ICAM-1 and [beta]2 integrin expression in parenterally fed mice after a gut ischemic insult [J]. Shock, 2002, 18(2), 119-124.

[9] Olanders K, Borjesson A, Dib M, et al. The effect of intestinal ischemia and reperfusion injury on ICAM-1 expression, endothelial barrier function, neutrophil tissue influx, and protease inhibitor levels in rats[J]. Shock, 2002, 18(1): 86-92.

[10] Langer R M, Janczewska S, Furian L, et al. Methoxyethyl-modified intercellular adhesion molecule-1 antisense phosphorothiateol-igonucleotides inhibit allograft rejection, ischemic-reperfusion injury, and cyclosporine-induced nephrotoxicity[J]. Transplantation, 2005, 79(4): 401-408.

[11] Burne-Taney, MJ, Rabb H. The role of adhesion molecules and T cells in ischemic renal injury[J]. Current Opinion in Nephrology & Hypertension, 2003, 12(1): 85-90.

(责任编辑:关蕴良)