雾中富含氧化剂,后者可抑制α1-抗胰蛋白酶的活性,从而引起肺内弹性蛋白酶/抗蛋白酶失衡,致使肺弹力纤维破坏[5];同时,吸烟可以抑制弹性蛋白的合成和修复,加重肺气肿的病变。肺气肿的自然发展是一个慢性过程。本组结果表明,吸烟作为一个辅助因素,不但可引起小气道炎症,而且能强化弹性蛋白酶的作用,加快肺气肿的病程。这有利于科研工作者在相对短期内制作出理想的阻塞性肺气肿动物模型,为利用这一模型完成其它重要的科研项目赢得宝贵的时间。

关键词:烟雾;弹性蛋白酶;大鼠;肺气肿,阻塞性;疾病模型
中图法分类号:R563.3 文献标识码:B

参考文献:

[1] Pauwels R A, Buist A S, Calverley P M, *et al*. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(5): 1256-1276.

[2] Chen J C, Serna D L, Brenner M, *et al*. Diffusing capacity limitations of the extent of lung volume reduction surgery in an animal model of emphysema[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1999, 117(4): 728-735.

[3] Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A. Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003, 28(5): 555-562.

[4] Ofulue A F, Ko M. Effects of depletion of neutrophils or macrophages on development of cigarette smoke-induced emphysema[J]. Am J Physiol, 1999, 277(1 Pt 1): 97-105.

[5] 安 立,张洪玉,庞宝森,等.维A酸对大鼠实验性阻塞性肺气肿的预防作用及其机制探讨[J].中华结核和呼吸杂志,2002,25(6):356-359.

[6] Cendon S P, Battlehner C, Lorenzi Filho G, *et al*. Pulmonary emphysema induced by passive smoking: an experimental study in rats[J]. Braz J Med Biol Res, 1997, 30(10): 1241-1247.

(编辑 薛国文)

文章编号:1000-5404(2004)19-1789-02

经验交流

兔肾体外灌注的形态学变化及损伤机制

Morphologic changes of perfused rabbit kidney and its corresponding mechanisms

王贵波,吴 军 (第三军医大学西南医院烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

由于目前待移植肾脏采取单纯冷藏法保存[1],其较短的保存时限以及低温状态使得目前在实验研究中非常有效的以基因治疗为主减轻移植器官排斥反应和诱导受者免疫耐受状态的方法不能在临床实施。本实验即对待移植肾脏进行常温下体外灌注,观察不同灌注液对肾脏的形态学影响并探讨其损伤机制,为进一步的常温下待移植肾脏的免疫修饰条件研究提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

健康成年大耳白兔50只(第三军医大学实验动物中心提供),雌雄不拘,体质量2.5~3.0 kg,随机分为正常对照(5只)、DMEM组(15只)、血浆组(15只)、血液+DMEM组(15只)。观察时相点为灌注后1、3、6 h,每组每时相点5只动物。

1.2 主要试剂

DMEM(Gibco),Bcl-2小鼠IgG1单抗、Bax小鼠IgG2b单抗(Santa Cruz),细胞凋亡POD试剂盒(Roche),DAB显色试剂盒、SP9002免疫组化试剂盒(北京中山生物技术有限公司)。

1.3 实验模型及方法

实验兔3%戊巴比妥钠耳缘静脉麻醉(1 ml/kg)后无菌条件下取左肾,肝素钠抗凝冲洗残存血液,迅速接入灌注系统。灌注系统由可调式蠕动泵(2台)、氧合器、储液器、器官保存器及连接管道组成[2]。将肾脏的动静脉插管接头分别与灌注装置动静脉管接头相连,将输尿管接头与排尿管连接。氧合器供氧浓度为99.9%,氧流量为2 L/h,氧分压大于95 mmHg,灌注液经过两道过滤装置滤除杂质后供给离体肾,流量调节为20 ml/min[3],灌注温度控制在21~25 ℃。DMEM组灌注液为DMEM,血浆组灌注液为新鲜的猪血浆,血液+DMEM组灌注液为两者1∶3混合液。

1.4 检测指标及方法

在确定的时相点终止灌注,观察肾脏大小、色泽和形态变化。将离体肾脏用4%多聚甲醛固定,常规脱水、透明、包埋、5 μm切片,HE染色后光镜下观察分析。

凋亡原位末端标记法(terminal deoxynucleotidyl transferase TdT-mediated biotin dUTP nick end-labeling, TUNEL)染色并苏木素复染行凋亡率分析,每时相点各5张切片,在10×40倍视野下计阳性细胞率。

Bcl-2、Bax LAB-SA法(labeled strept avidin-biotin)免疫组化染色及半定量分析,按试剂盒说明书行Bcl-2、Bax免疫组化染色。每时相点各5张切片,MIG2000图像分析软件(重庆大学)行其

基金项目:第三军医大学西南医院院管课题(2002)
Supported by the Research Project Sponsored by Southwest Hospital of Third Military Medical University (2002)
作者简介:王贵波(1969-),男,安徽省涡阳县人,博士,医师,主要从事移植免疫方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)68752688, E-mail: wangguibo2002@yahoo.com.cn
通信作者:吴 军,电话:(023)68754006, E-mail: Juneupro@public.cta.cq.cn
收稿日期:2003-11-18;修回日期:2004-04-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

阳性表达的半定量分析。

1.5 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计程序进行 t 检验。

2 结果

2.1 肾脏病理变化

正常肾脏色泽红润、质软，灌注后肾脏体积增大，颜色发白，DMEM 组尤为明显。正常肾脏肾小球、髓放线、集合管结构清晰，细胞密度中等，着色良好。灌注各组肾小球细胞数量早期无明显变化，6 h 时肾小球细胞数量显著减少，尤以 DMEM 组明显。灌注组均出现显著的细胞间质水肿，细胞结构不清，肾小管上皮细胞脱落，以 DMEM 组最明显。肾髓质集合管也有细胞脱落现象，但脱落程度不如肾皮质部。

2.2 细胞凋亡染色结果

正常对照TUNEL阳性细胞主要见于肾皮质的肾小管和髓质集合管，平均凋亡率为(2.3±0.4)%。灌注后细胞凋亡率明显增高，细胞凋亡主要发生在肾小管和集合管，肾小球阳性细胞较少。结果见表1。

表1 肾脏凋亡细胞比率[$n=5$ ($\bar{x}\pm s$)%]

组别	1 h	3 h	6 h
正常对照组	2.3±0.4		
DMEM 组	15.9±1.7**	23.8±3.4**	20.2±2.2**
血浆组	10.8±2.2**	19.8±3.0**	23.4±2.9**
血液+DMEM 组	11.6±2.0**	20.6±2.3**	24.2±2.6**

与正常对照组比较 *：$P<0.05$，**：$P<0.01$

2.3 Bcl-2 和 Bax 表达变化结果

正常对照 Bcl-2 在部分肾小管表达，肾小球和肾髓质均不表达。Bcl-2 表达部位在胞浆，胞核不表达。灌注后 Bcl-2 在肾脏的表达部位和程度均降低，其降低程度以 DMEM 组最为显著，6 h 时基本无 Bcl-2 表达。正常对照 Bax 在肾皮质和髓质均有表达，胞浆和部分胞核表达，灌注后 Bax 表达程度加深，DMEM 组 6 h 时 Bax 表达减少。结果见表2、3。

表2 肾脏 **Bcl-2** 表达相对灰度值($\bar{x}\pm s$，$n=5$)

组别	1 h	3 h	6 h
正常对照组	67.4±6.1		
DMEM 组	46.9±5.7**	19.3±1.7**	—
血浆组	56.3±5.8	41.4±4.4**	31.4±3.0**
血液+DMEM 组	58.7±4.2	42.6±3.3**	34.35±2.5**

与正常对照组比较，*：$P<0.05$，**：$P<0.01$

表3 肾脏 **Bax** 表达相对灰度值($\bar{x}\pm s$，$n=5$)

组别	1 h	3 h	6 h
正常对照组	69.8±6.5		
DMEM 组	82.5±5.5*	71.0±7.5	60.7±6.7
血浆组	85.3±8.5*	89.9±5.5**	74.4±5.0
血液+DMEM 组	83.2±6.8*	85.0±6.9*	78.1±5.6

与正常对照组比较，*：$P<0.05$，**：$P<0.01$

3 讨论

无论是常规冷藏保存还是机器灌注保存，器官活力往往受水肿程度的影响，器官保存研究中较重要的一点就是避免器官水肿的发生[4]。在本研究中，DMEM 组发生较严重的水肿，说明适于细胞培养的 DMEM 并不适于器官的保存，而新鲜的猪血浆和血液+DMEM 灌注液保存的肾脏水肿程度小于 DMEM 组，故采用血液制品可能更有利于肾脏的体外灌注保存，病理观察也证实了这一结果。在对细胞损伤的研究中我们采用了细胞凋亡作为研究指标，结果发现灌注后肾脏皮质区和髓质区均有阳性细胞，可以认为，凋亡机制参与了灌注后的肾脏损伤过程。凋亡相关蛋白的表达变化在肾脏灌注损伤中也应有其一定的作用，本研究结果表明，在正常条件下，肾脏组织即有抗凋亡作用的 Bcl-2 蛋白和促凋亡的 Bax 蛋白表达，这正是正常条件下肾脏细胞维持其一定的凋亡率的可能机制[5]，而在灌注后，选择性表达在肾小管的 Bcl-2 无论是表达部位还是表达程度均减少，因此，灌注条件下肾脏细胞保护性蛋白的合成减少参与了细胞凋亡的发生。Bax 的表达基本呈现升高后降低的趋势，结合病理观察可以发现，Bax 的晚期降低与肾脏细胞的脱落时相一致，此时单位面积上的细胞数量下降，因此 Bax 的表达降低与肾脏细胞数量的减少有直接的关系。目前条件下的灌注尚不能完全模拟体内的血液供应情况，因此，能量和氧份的供应不足和失衡是损伤发生的重要原因。此外在无神经调节的情况下，无法调节灌流的分布，肾皮质部位的灌流远不如髓质充分，这是肾脏皮质部细胞脱落现象较髓质部位明显的重要解剖依据。本研究结果表明，水肿和上皮细胞脱落是常温时(21～25 ℃)肾脏体外灌注时重要的病理学改变，凋亡参与了其损伤过程，减轻肾脏水肿程度和抑制细胞凋亡的发生应是提高肾脏常温灌注保存效果的途径。

关键词：肾脏；灌注；凋亡

中图法分类号：R692 文献标识码：B

参考文献：

[1] Starzl T E. History of clinical transplantation[J]. World J Surg, 2000, 24: 759－782.

[2] Balupuri S, Mantle D, Mohamed M, *et al*. Machine perfusion and viability assessment of non-heart-beating donor kidneys a single centre result[J]. Transplant Proc, 2001, 33(1-2): 1119－1120.

[3] Stubenitsky B M, Booster M H, Brasile L, *et al*. Negative effect of cold ischemia on initial renal function[J]. ASAIO J, 2000, 46(1): 60－61.

[4] Dalessandro A M, Southard J H, Love R B, *et al*. Organ preservation[J]. Surg Clin North Am, 1994, 74(5): 1083－1095.

[5] 张丰深，马宽生，何振平，等. 胆管癌组织中自发性细胞凋亡和bcl-2bax表达的状况及意义[J]. 第三军医大学学报，2002，24(1)：96－99.

(编辑 刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net