DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.09.014

论著

文章编号:1000-5404(2004)09-0784-03

SIN-1抑制缺血再灌注肾脏ICAM-1表达

刘 宏,吴雄飞,金锡御,李 敛 (第三军医大学西南医院全军泌尿外科中心肾科,重庆 400038)

提 要:目的 进一步探讨一氧化氮(NO)供体SIN-1对急性缺血性肾衰(IARF)的治疗作用机制。方法 分别采用ICAM-1和整合素β2多克隆抗体,免疫组化方法观察NO供体对大鼠肾脏缺血再灌注损伤后ICAM-1表达及炎细胞浸润的影响,同时进行肾功能测定。结果 肾脏缺血再灌注损伤后ICAM-1表达进行性增强,于再灌注24 h达峰值,以外髓直小血管表达显著,整合素β2阳性细胞同样于再灌注24 h达峰值,以外髓明显;再灌注同时灌注NO供体SIN-1可显著抑制缺血再灌注后ICAM-1的表达增强,减少局部炎细胞浸润,改善肾功能。结论 NO供体SIM-1可通过抑制肾组织ICAM-1的表达及炎细胞浸润,发挥对急性缺血性肾衰的治疗作用。

关键词:一氧化氮;缺血再灌注;ICAM-1
中图法分类号:R692.5;R619.9;R972.9 文献标识码:A

Inhibitory effect of SIN-1 on ICAM-1 expression in rat kidney after ischemia/reperfusion injury

LIU Hong, WU Xiong-fei, JIN Xi-yu, LI Lian (Urinary Surgery Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the therapeutic mechanisms of nitric oxide donor (SIN-1) in ischemic acute renal failure (IARF). Methods The effects of SIN-1 on intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and inflammatory cell infiltration in rat kidney after ischemia/reperfusion (I/R) injury were examined using ICAM-1, β2 integrin polyclonal antibody, and immunohistochemistry. The renal functions were measured simultaneously. Results Progressive increased expression of ICAM-1 was found in kidneys, especially in vasa recta, after IR injury. β2 integrin positive cells increased simultaneously in the outer medulla. The two indexes reached the peak values at 24 h after I/R injury. SIN-1 infusion at the beginning of reperfusion could remarkably inhibit the enhanced ICAM-1 expression, reduce the local infiltration of inflammatory cells, and ameliorate the renal functions. Conclusion NO donor can inhibit the renal expression of ICAM-1 and the infiltration of leukocytes after ischemia-reperfusion injury, which may play an important role in the treatment of ischemic acute renal failure.

Key words: nitric oxide; ischemia-reperfusion; ICAM-1

白细胞的粘附、浸润和激活在肾脏缺血再灌注损伤中有重要作用[1],ICAM-1是介导白细胞与活化的内皮细胞粘附的主要粘附分子,采用ICAM-1抗体或ICAM-1基因敲除小鼠可显著减少缺血再灌注后白细胞的浸润并有效减轻肾功能损害[2]。体外研究显示,加用一氧化氮(NO)供体可抑制培养人内皮细胞缺氧、氧化损伤后ICAM-1的表达增加,中性粒细胞与内皮细胞粘附数量显著减少[3]。在体NO灌注可有效抑制肾脏缺血再灌注损伤后的肾功能损害[4]。一般认为,这一作用源于NO对肾脏再灌注后血液动力学的影响[5]。在体NO灌注对缺血再灌注损伤大鼠肾脏ICAM-1表达及炎细胞浸润的影响少见文献报道。本研究采用免疫组化方法观察肾脏缺血再灌注损伤大鼠使用NO供体SIM-1对肾脏ICAM-1表达、局部炎细胞浸润及肾功能的影响,探讨NO对急性缺血性肾衰的治疗作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验分组及肾衰模型建立

Wistar大鼠30只(第三军医大学实验动物中心提供),体质量(150±20) g,雌雄不限,随机分为假手术组(sham-operated)、急性肾衰组(acute renal failure, ARF)、SIN-1(3-morpholino-sydnonimine hyelrochloride,一种NO供体,可在体持续释出NO,由德国Hening教授惠赠)治疗组(SIN-1),每组10只。1%戊巴比妥钠

作者简介:刘 宏(1968-),男,湖北省襄樊市人,博士,主治医师,讲师,主要从事急性肾衰及肾移植方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68754188

收稿日期:2002-11-20;修回日期:2003-03-20

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

腹腔注射麻醉(30 mg/kg)。股动脉插管至腹主动脉肾动脉开口上方, 连接微量电子蠕动泵, 用于再灌注同时腹主动脉灌注生理盐水 0.4 ml·150 g^{-1}·h^{-1}, 持续 3 h, 右肾切除。各组分别处理: 假手术组左侧肾蒂分离后等待 1 h 关闭切口; 肾衰组以无损伤微动脉夹夹闭 1 h 后再灌注; 治疗组微动脉夹夹闭 1 h 后再灌注同时股动脉灌注 NO 供体 SIN-1(100 μmol/kg)。

1.2　肾功能检测

各组动物置单代谢笼收集 24 h 尿, 于再灌注 24 h 取动脉血 2 ml 测定血清肌酐(PCr), 计算内生肌酐清除率(CCr)。

1.3　ICAM-1 免疫组化染色

各实验组于再灌注 24 h 腹主动脉穿刺取血 2 ml 后灌注 4%多聚甲醛 20 ml 至肾静脉流出液清亮。切除肾脏, 沿冠状面正中剖开后置 4 ℃ 4%多聚甲醛后固定 2 h, 梯度蔗糖脱水后冰冻切片, 切片厚度 5 μm。以羊抗大鼠 ICAM-1 多克隆抗体(北京中山公司)作为一抗, 二抗为兔抗羊 IgG, 工作浓度均为 1∶100。SABC 法染色, 采用 PBS 替代一抗作为阴性对照。

1.4　整合素β2 免疫组化染色

一抗: 羊抗大鼠整合素β2 抗体, 二抗: 兔抗羊 IgG, 工作浓度均为 1∶100, 标本处理及染色方法均同 ICAM-1 免疫组化染色。由于整合素只表达于中性粒细胞及淋巴细胞, 在肾实质细胞无阳性表达, 可用于显示局部浸润白细胞。

1.5　统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 Excel 进行单因素方差分析和 t 检验。

2　结果

2.1　SIN-1 灌注对肾功能的影响

再灌注 24 h 肾衰组 PCr 显著高于假手术组, CCr 显著低于假手术组; SIN-1 治疗可显著改善再灌注后的肾功能损害(表 1)。

表 1　SIN-1 灌注对肾功能的影响 ($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effects of SIN-1 perfusion on renal function ($n=10$ $\bar{x}\pm s$)

	Sham-operated	ARF	SIN-1
PCr (μmol/L)	36.2±3.1	157.3±24.7 *	106.40±19.6 #
CCr (ml·h^{-1}·100 g^{-1})	0.32±0.10	0.15±0.04 *	0.23±0.05 #

*: $P<0.01$, *vs* sham-operated; #: $P<0.01$, *vs* ARF

2.2　SIN-1 灌注对再灌注 24 h 肾脏 ICAM-1 表达的影响

正常肾脏 ICAM-1 仅于肾内小动脉、肾小球少量表达。再灌注 24 h, 肾脏 ICAM-1 表达明显增强, 尤以外髓直小血管、肾小球毛细血管表达显著, 肾近曲小管上皮细胞也有少量表达。SIN-1 治疗组 ICAM-1 表达显著弱于肾衰组, 以外髓直小血管明显。

2.3　整合素β2 免疫组化染色

肾衰组外髓整合素β2 染色阳性细胞数量显著高于假手术组(46±14/高倍镜视野比 12±3/高倍镜视野), SIN-1 治疗组外髓整合素β2 染色阳性细胞数(28±9/高倍镜视野)显著低于肾衰组($P<0.01$)。

3　讨论

NO 在维持和调节肾脏正常生理功能中有重要作用[6], 作为内皮细胞依赖的血管舒张因子(EDRF), 肾血管内皮细胞通过 cNOS 固有分泌的 NO 通过控制入球小动脉及系膜细胞的舒张调节肾单位的正常滤过和肾小球的灌流。再灌注后 NO 的分泌紊乱参与肾脏的缺血再灌注损伤, 在体 NO 灌注可对急性缺血性肾衰产生治疗作用, Matsumura 等[4] 的研究显示, 加用 NO 供体可剂量依赖性地缓解缺血再灌注损伤后的肾功能损害; 既往的研究认为其治疗作用源于其对肾脏血液动力学的调节作用, 加用 NO 供体可显著改善再灌注后肾皮质血流量[5], 但是否存在其它效应少见文献报道。

中性粒细胞等炎细胞的浸润在介导缺血再灌注损伤中有重要作用, 采用去白细胞血灌注肾脏可显著减轻再灌注后的肾损伤[7]。我们的研究也显示, 再灌注后局部炎细胞的浸润程度与肾功能损害密切相关, 是介导再灌注损伤的重要因素。白细胞主要通过 ICAM-1 等粘附分子介导与内皮的粘附, 导致炎细胞在组织的浸润及组织损伤。我们的研究表明, 缺血再灌注损伤后肾脏微血管内皮细胞 ICAM-1 的表达显著增强, 并与肾组织特别是外髓的炎细胞浸润密切相关。通过对 NO 作用的进一步研究表明, NO 参与炎细胞的浸润过程。加用 NO 供体可抑制中性粒细胞与培养的内皮细胞间的粘附, 这一作用依赖于 ICAM-1 的表达抑制[8], NO 可通过 NF-κB 依赖的途径抑制内皮细胞的激活和粘附分子的表达进而抑制白细胞、血小板的粘附和激活, 发挥抗凝、抗粘附作用; 缺血再灌注后内皮 NO 分泌改变在介导炎细胞浸润及组织损伤中的作用已引起人们的重视。心肌缺血再灌注损伤后加用 NO 供体可显著减少坏死区面积, 这一效应与局部炎细胞的浸润减少密切相关[9]; 但对再灌注后 NO 分泌减少对肾脏微血管内皮细胞 ICAM-1 表达及炎细胞浸润的作用、NO 供体在内皮粘附性改变中的作用少见文献报道。本研究显示, 再灌注 24 h 肾脏 ICAM-1 表达增强, 尤以外髓直小血管明显。NO 治疗组再灌注 24 h ICAM-1 表达明显弱于肾衰组, 外髓局部浸润白细胞数量显著减少, 并伴有肾功能的改善。表明: ①肾脏缺血、再灌注后血管内皮 NO 合成相对或绝对不足是造成肾血管内皮 ICAM-1 等粘附分子表达增加的原因之一。②再灌注后肾脏 ICAM-1 的表达增强参与局部炎细胞的浸润及由此引发的组织损害。③加用 NO 供体可减少肾脏 ICAM-1 表达及炎细胞浸润, 改善再灌注后的肾功能。Linas 等[10] 发现 NO 供体对用含白细胞灌注液灌注的离体缺血再灌注肾脏有治疗作用, 而对无白细胞灌注液灌注的肾脏无肾衰治疗作用, 支持我们的上述观点。分析 NO 供体抑制白细胞在局部粘附对肾衰发生的影响可能有: ①减少局部炎细胞的浸润及直接的组织损害。②减少粘附白细胞及血小板对肾脏微血管的机械

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

阻塞作用。③减少因粘附白细胞的激活对内皮损伤引起的内皮细胞进一步损伤。

参考文献：

[1] Ysebaert D K, De Greef K E, Vercauteren S R, *et al*. Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury[J]. Nephrol Dial Transplant, 2000, 15(10): 1562－1574.

[2] Kelly K J, Williams W W J, Colvin R B, *et al*. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury[J]. J Clin Invest, 1996, 97(4): 1056－1063.

[3] Lindemann S, Sharafi M, Spiecker M, *et al*. NO reduces PMN adhesion to human vascular endothelial cells due to downregulation of ICAM-1 mRNA and surface expression[J]. Thromb Res, 2000, 97(3): 113－123.

[4] Matsumura Y, Nishiura M, Deguchi S, *et al*. Protective effect of FK409, a spontaneous nitric oxide releaser, on ischemic acute renal failure in rats [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1998, 287(3): 1084－1091.

[5] 吴雄飞，金锡御，刘　宏. 一氧化氮供体防治急性缺血性肾衰的实验研究[J]. 中华泌尿外科杂志，1997，18(8)：461－464.

[6] Just A. Nitric oxide and renal autoregulation[J]. Kidney Blood Press Res, 1997, 20(3): 201－204.

[7] Niu X F, Smith C W, Kubes P. Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils[J]. Circ Res, 1994, 74(6): 1133－1140.

[8] Lefer A M. Attenuation of myocardial ischemia-reperfusion injury with nitric oxide replacement therapy[J]. Ann Thorac Surg, 1995, 60(3): 847－851.

[9] Linas S L, Whittenburg D, Parsons P E, *et al*. Mild renal ischemia activates primed neutrophils to cause acute renal failure[J]. Kidney Int, 1992, 42(3): 610－616.

[10] Linas S L, Whittenburg D, Repine J E. Nitric oxide prevents neutrophil-mediated acute renal failure[J]. Am J Physiol, 1997, 272(1 Pt 2): F48－54.

（编辑　汪勤俭）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)09-0786-02

非边缘肾双肾移植1例

Double non-marginal kidney transplant: a case report

范连慧，吴雄飞，余荣杰，刘　宏，孙　岩，赵洪雯，金锡御

（第三军医大学西南医院全军泌尿外科中心肾科，重庆 400038）

患者，男性，26岁，身高1.82 m，体质量85 kg，因乏力、头昏、尿量减少半年入院。检查：B超示双肾萎缩，血清肌酐1 457 μmol/L。乙肝及丙肝抗体阴性，心肺功能正常。诊断：慢性肾小球肾炎尿毒症。入院后进行血液透析治疗。于2001年9月25日在全麻下进行双肾移植。供者男性，30岁，身高约1.68 m，体质量约55 kg。取肾前化验检查肝功、肾功正常，艾滋病抗体阴性，乙肝及丙肝抗体阴性。供肾取出后测量：左肾：9.3 cm×4.8 cm×3.7 cm，质量135 g，右肾9.1 cm×4.6 cm×3.5 cm，质量130 g。热缺血时间5 min，冷缺血时间8 h。供受者淋巴细胞毒性实验5%，PRA阴性，因条件不允许，未行HLA配型。

手术及围手术期处理　按常规方法进行肾移植。先行右腹直肌旁切口，将左供肾移植于右髂窝，通血后0.5 min开始泌尿，尿量约5 ml/min。供肾的输尿管和受者膀胱隧道式吻合后缝合切口。同法将右供肾移植于左髂窝，通血后2 min泌尿，但较左侧供肾稍差，尿量约3 ml/min。术中移植左供肾时静滴甲基强的松龙1 000 mg，移植右供肾时未再使用激素。术后前3 d甲强龙500 mg，维生素D，1/d。3 d后免疫抑制方案为：CsA＋MMF＋Pred。所用免疫抑制剂剂量的调整等同于单肾移植受者。术后第3天肌酐降到235 μmol/L，第10天肌酐降到128 μmol/L，至出院前一直维持在此水平。围手术期无并发症发生，术后1个月出院。目前已术后8个月余，患者一般情况较好，免疫抑制方案为CsA＋MMF＋Pred，所用免疫移植剂量的调整与一般单肾移植受者相同，多次彩超检查提示双侧移植肾血流丰富，血管阻力指数正常；移植肾功能正常，血清肌酐在80～100 μmol/L波动。2004年4月5日复查血清肌酐115 μmol/L。

讨论

大部分肾脏移植患者会逐渐出现慢性移植肾肾功能不全。除慢性排斥反应外，非免疫因素也起着重要的作用。多项研究证实，肾脏的大小与晚期移植肾功能关系密切，即有功能肾单位的数量决定晚期移植肾功能的状况。国外[1～3]研究报道，接受双肾移植的大鼠，其蛋白尿和肾小球硬化的程度较单肾移植组明显降低，且保持接近正常的肾结构和功能，而单肾移植的大鼠表现为代偿性高滤过和过度增生。Brenner等[4]认为部分肾单位缺失后使残余肾单位出现进行性的肾小球损伤。这一过程与肾小球过度增生、高滤过及系统性高血压有关。肾单位不足是慢性移植肾病发生发展的重要因素。

常规肾移植，用1个供肾代替受者2个自体的肾脏，造成肾单位的供应和受者代谢及排泄要求方面不平衡，刺激了有功能供肾单位的功能亢进和过度增生，这种失衡可能由于缺血再灌注损伤或急性排斥的发生使肾单位损失加剧，影响移植肾的远期功能。如果主动增加移植的肾单位数量，如双肾移植，则可能很好的纠正这种不平衡。双肾移植在国外早有报道，但大

（下转789页）

作者简介：范连慧(1968－)，男，河北省唐山市人，博士研究生，主治医师，主要从事肾脏外科及临床肾移植方面的研究。电话：(023)68754188

通信作者：吴雄飞，电话：(023)68754188

收稿日期：2002-09-10；修回日期：2003-10-08

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