DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.15.014
第26卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 15
1364 2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)15-1364-04

川芎嗪预处理对大鼠移植肾保护作用的实验研究

范连慧,吴雄飞,余荣杰,赵洪雯,李 敛,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)

提 要:目的 研究川芎嗪预处理对大鼠移植肾的保护作用。方法 采用原位大鼠肾移植模型,将SD大鼠肾移植给Wistar大鼠作为同种异体移植,Wistar大鼠肾移植给Wistar大鼠作为同品系移植(空白对照)。共设3个实验组,观察各组大鼠的移植肾功能、粘附分子、细胞因子、MHC-Ⅱ分子的表达及排斥反应发生的程度。结果 川芎嗪预处理能减少移植肾粘附分子ICAM-1及细胞因子IL-2、TNF-α的表达;并抑制MHC-Ⅱ分子在移植肾内表达,改善移植肾功能。结论 川芎嗪预处理对移植肾有保护作用,可明显减轻移植肾排斥反应的程度。

关键词:川芎嗪;预处理;肾移植;排斥反应
中图法分类号:R282.71;R617;R699.2 文献标识码:A

Protective effect of Ligustrazine preconditioning on transplanted rat kidney

FAN Lian-hui, WU Xiong-fei, YU Rong-jie, ZHAO Hong-wen, LI Lian, JIN Xi-yu (Department of Kidney, Center of Urology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the protective effect of Ligustrazine preconditioning on the transplanted rat kidney. **Methods** A model of renal transplantation *in situ* was used. The kidney of an SD rat as allograft was transplanted into a Wistar rat. The kidney of a Wistar rat as isograft was transplanted into another as the control. Experimental rats were divided into 3 groups. The changes of the renal function, expressions of adhesion molecule, cytokine and MHC-Ⅱ, and degree of acute rejection of the transplanted kidney in each group were observed after pretreated renal transplantation. **Results** Ligustrazine preconditioning could reduce the expressions of ICAM-1, IL-2, TNF-α and MHC-Ⅱ, inhibit the expression of MHC-Ⅱ and improve the renal function of the trans planted kidney. **Conclusion** Ligustrazine preconditioning has preventive effect on the transplanted kidney and can greatly alleviate the renal rejection.

Key words: Ligustrazine; preconditioning; kidney transplantation; rejection

缺血再灌注损伤和排斥反应影响移植肾近期功能,也是发生慢性移植肾病的主要因素。预防移植肾的缺血再灌注损伤及降低急性排斥反应有利于改善移植肾功能,提高其长期存活率。研究表明,川芎嗪对家兔心肌的缺血再灌注损伤有保护作用[1]。本实验用川芎嗪对大鼠供肾进行预处理,然后进行异体大鼠肾移植。观察川芎嗪预处理(Ligustrazine preconditioning, LP)对大鼠供肾粘附分子、细胞因子表达的影响,同时观察川芎嗪对供肾主要组织相容性复合物Ⅱ类抗原(major histocompatibility complex-Ⅱ, MHC-Ⅱ)分子的影响,旨在观察LP对移植肾缺血再灌注损伤的保护作用及对移植肾免疫状态的影响。

作者简介:范连慧(1968-),男,河北省唐山市人,博士,主治医师,主要从事肾脏外科及肾移植方面的研究。电话:(023)68754726
通信作者:吴雄飞,电话:(023)68754188
收稿日期:2003-07-10;修回日期:2004-01-05

1 材料与方法

1.1 大鼠肾衰模型及肾移植模型的制备

近交系Wistar大鼠50只(第三军医大学实验动物中心提供),用改良的大部分肾切除法(即6/7肾切除法)[2]制备慢性肾衰模型。6周后模型建立成功作为受体。肾移植供体用近交系SD大鼠40只(购自华西医科大学动物中心),参照康俊生[3]方法进行大鼠原位肾移植。所有大鼠雌雄不限,体质量250~300 g。

1.2 实验分组

将50只肾衰Wistar大鼠按随机数字表法分为3组:Ⅰ组为空白对照组,10只,进行Wistar→Wistar大鼠间肾移植,为同系移植;Ⅱ组为缺血再灌注组,20只,切下SD大鼠左肾,用HC-A液灌注4 ℃冷藏8 h后进行SD→Wistar大鼠间肾移植;Ⅲ组为LP组,20只,切下SD大鼠左肾前30 min经尾静脉注射川芎嗪(40 mg/kg)(购自重庆药友制药有限责任公司),30 min后切下左肾,用HC-A液进行灌注4 ℃冷藏8 h后行SD→Wistar大鼠

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

间肾移植。Ⅱ组及Ⅲ组为同种异体移植，根据观察时间的不同分为 7 d 组及 10 d 组。

各组动物分别于相应的时相点处死，由腔静脉取血 3 ml，1 500 r/min 离心 5 min 留取血清，液氮中保存，以备 IL-2、TNF-α 和肌酐值测定；切取移植肾标本放入升汞 4.5 ml＋甲醛 0.5 ml 的小瓶中固定 15 min，再移入盛有苦味酸 5 ml 的小瓶中于 4 ℃冰箱中保存，以备病理检查。

1.3　免疫组化染色观察移植肾 ICAM-1 及 MHC-Ⅱ抗原的改变

免疫组化染色按常规方法及产品说明书方法进行。每个肾脏随机抽取 2 张切片，计数 5 个高倍视野下的阳性细胞数，取其平均值作为每个移植肾的阳性细胞数。实验所用试剂：山羊抗大鼠 ICAM-1 抗体（中山公司，北京），SABC 免疫组化试剂盒（博士德，武汉），生物素化兔抗山羊 IgG（博士德，武汉），大鼠 MHC-Ⅱ抗体（RT-1B，OX-6）（晶美公司，深圳）。

1.4　ELISA 法测定各组大鼠 IL-2、TNF-α 的变化

将血清标本自液氮中取出，平衡到室温。按 IL-2 及 TNF-α ELISA 试剂盒说明书进行操作，最后于酶标仪测定 A_{450} 值，根据曲线图计算 IL-2、TNF-α 含量。所用试剂：IL-2 ELISA 试剂盒（晶美公司，深圳），TNF-α ELISA 试剂盒（晶美公司，深圳）。

1.5　排斥反应分级

采用国际统一的“Banff Schema（1997 年）”移植肾病理诊断标准，对移植肾的病理改变进行分类、分级评定，结果标准化。

1.6　统计学分析

所有数据均应用 SPSS 进行处理，结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间以 t 检验和方差分析检验。

2　结果

2.1　受体大鼠存活时间

Ⅰ组受体大鼠在术后第 8 天死亡 1 只，其余 9 只存活时间均超过 10 d；Ⅱ组大鼠的 7 d 亚组在 7 d 内死亡 1 只；10 d 亚组在 10 d 内死亡 2 只；Ⅲ组大鼠的 7 d 亚组在 7 d 内无死亡；10 d 亚组在 10 d 内死亡 1 只。

2.2　移植肾中粘附分子的变化

缺血再灌注后，ICAM-1 主要表达在肾小球及肾内小动脉内皮细胞、肾小管周围毛细血管及肾脏近曲小管上皮细胞。LP 可减少移植肾中粘附分子 ICAM-1 表达，第 7 天时Ⅲ组的表达少于Ⅱ组，但无统计学差异（$P>0.05$）；第 10 天时，Ⅲ组的表达少于Ⅱ组，相差显著（$P<0.01$）（表 1）。

表 1　川芎嗪预处理对移植肾粘附分子表达的影响（每高倍视野阳性细胞数）（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1　Effects of Ligustrazine preconditioning on the expression of adhesion molecule in the transplanted kidney (positive cell number/high power) ($\bar{x}\pm s$)

	Ⅰ	Ⅱ		Ⅲ	
	10 d	7 d	10 d	7 d	10 d
ICAM-1	4.13±0.83	7.88±1.25	12.83±1.72▲	6.63±1.69▲	11.00±1.41▲*

▲：$P<0.01$，*vs* group Ⅰ；*：$P<0.05$，*vs* group Ⅱ

2.3　MHC-Ⅱ的变化

各组肾移植后供肾中 MHC-Ⅱ表达均增加，主要表达在肾动静脉内皮细胞、肾小球内皮细胞、肾小管上皮细胞及部分间质细胞。第 10 天时，与缺血再灌注组（图 1）比较，川芎嗪预处理肾脏 MHC-Ⅱ阳性细胞相对明显减少（图 2），相差显著（表 2）。

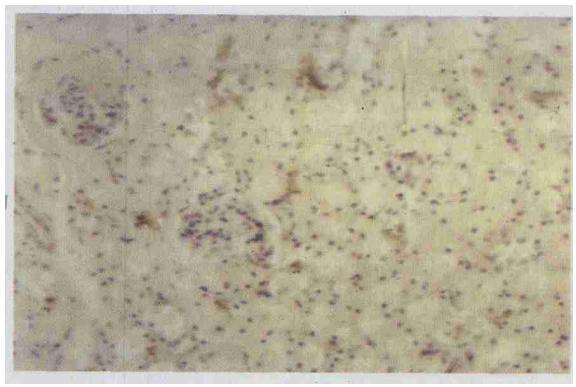


图 1　组织再灌注后肾脏 **MHC**-Ⅱ分子表达上升　（SABC× 200）

Fig 1　Elevation of MHC-Ⅱ expression in kidney after infusion and reperfusion　（SABC× 200）



图 2　川芎嗪预处理后 **MHC**-Ⅱ分子表达下降　（SABC× 200）

Fig 2　Decrease of MHC-Ⅱ expression in kidney after Ligustrazine preconditioning　（SABC× 200）

表 2　缺血预处理对移植肾 **MHC**-Ⅱ表达的影响（每高倍视野阳性细胞数）（$\bar{x}\pm s$）

Tab 2　Effects of Ligustrazine preconditioning on the expression of MHC-Ⅱ in the transplanted kidney (High power) ($\bar{x}\pm s$)

	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ
7 d	—	12.00±1.41	8.88±1.25 *
10 d	7.00±1.85	16.75±1.67▲	11.83±1.6▲ **

▲：$P<0.01$，*vs* group Ⅰ；*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* group Ⅱ

2.4　肾移植后 IL-2 及 TNF-α 的变化

同系对照组大鼠在移植前后 IL-2 及 TNF-α 无明显变化。Ⅱ组及Ⅲ组第 7 天时 IL-2 及 TNF-α 升高不明显，第 10 天其浓度明显升高。但Ⅲ组移植大鼠血清 IL-2 及 TNF-α 浓度与Ⅱ组比较升高缓慢，且相差显著（表 3）。

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

表3 川芎嗪预处理对肾移植大鼠血清 IL-2及 TNF-α 表达的影响(pg/ml)

Tab 3 Effects of Ligustrazine preconditioning on the expressions of serum IL-2 and TNF-α in the transplanted kidney of rat(pg/ml)

	Ⅰ			Ⅱ			Ⅲ		
	0 d	7 d	10 d	0 d	7 d	10 d	0 d	7 d	10 d
IL-2	51.01±11.40	41.00±11.24	46.00±11.00	50.59±8.43	54.80±6.91▲	250.08±10.24▲	52.43±10.48	46.61±10.85▲*	193.28±32.14▲*
TNF-α	46.42±7.41	43.01±12.4	48.75±8.51	49.03±7.45	59.13±13.02▲	183.31±41.63▲	49.29±7.49	42.60±15.77*	143.33±30.55▲*

▲: $P<0.01$, *vs* group Ⅰ; *: $P<0.05$, *vs* group Ⅱ

2.5 缺血预处理对移植肾功能的影响

除对照组外,其它大鼠在移植后的第3天,肌酐值明显下降,但以后又上升。第10天时,肌酐值极度升高,但Ⅲ组肌酐值低于Ⅱ组,相差显著(表4)。

表4 川芎嗪预处理对血清肌酐变化的影响(μmol/L, $\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Effects of Ligustrazine preconditioning on the level of rat serum creatinine in the transplanted kidney (μmol/L, $\bar{x}\pm s$)

Group	0 d	3 d	7 d	10 d
Ⅰ	152.81±17.38	94.21±7.12	82.41±7.16	70.00±8.45
Ⅱ	144.42±16.28	104.01±17.92	241.56±26.79▲	872.33±25.79▲
Ⅲ	150.40±15.04	104.80±19.56	214.56±22.81▲*	710.50±12.90▲**

▲: $P<0.01$, *vs* group Ⅰ; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* group Ⅱ

2.6 川芎嗪预处理对移植肾急性排斥反应的影响

所有实验组在第7天时(包括7 d内死亡的大鼠),移植肾中仅见散在白细胞浸润,无明显血管炎及小管炎征象。同系移植组中第8天时死亡1只,病理提示为急排Ⅰ级急性排斥。第10天时,同系移植组的其余9只中有7只病理正常,2只为急排Ⅰ级;Ⅱ组所有移植肾(包括2只死亡大鼠)光镜下见大量的白细胞浸润,伴有小管炎和动脉内膜炎,banff 分类为急性排斥反应Ⅱ~Ⅲ级。在进行川芎嗪预处理后的移植肾,排斥反应的程度明显减轻,病理改变为 banff 分类急性排斥反应Ⅰ~Ⅱ级。移植7 d后的病理改变见表5。

表5 大鼠移植肾的组织病理改变(评分)

Tab 5 Histopathological changes in the transplanted kidney(scoring)

Group	*n*	Normal	Acute rejection(Banff score)		
			Mild	Moderate	Severe
Ⅰ	10	7	3	—	—
Ⅱ	10	—	—	7	3
Ⅲ	10	—	8	2	—

3 讨论

预处理是给予某些刺激后机体器官产生的对再次有害刺激的耐受性或适应性。目前对于预处理现象,缺血预处理研究较多,并发现很多器官存在这一现象,如心、脑、肌肉等[4]。但缺血预处理由于要对器官进行预缺血,在临床应用比较困难,很多学者尝试用药理性预处理的方法为缺血的器官提供保护作用。根据缺血预处理机制,有目的的模拟或影响缺血预处理的各环节,以药物代替短暂缺血,有效的保护缺血器官,称为药理性预处理。Bauer 等[5]用细菌内毒素预处理模型,发现预处理后大鼠小肠的 P-selectin、E-selectin 表达均减少;预先注射小剂量的 TNF-α 可模拟 IP,保护肝脏的缺血再灌注损伤[6]。目前药理性预处理保护肾脏的研究报道极少。Lee 等[7]发现 A-1 腺苷促效剂和 A-3 腺苷拮抗剂可重现缺血预处理对肾脏的保护作用。川芎嗪是从中药川芎中分离提取的一种生物碱单体——四甲基吡嗪,目前已广泛应用于心脑血管疾病、肾功能不全及慢性阻塞性肺病的防治。用川芎嗪对心脏进行药理性预处理可减轻心脏的缺血性损伤[1]。我们用川芎嗪对供肾进行预处理,发现川芎嗪预处理后的移植肾功能优于未进行预处理者,同时发现川芎嗪预处理后的移植肾粘附分子 ICAM-1 表达减少,与排斥反应密切相关的 MHC-Ⅱ表达下降,受者大鼠血清中细胞因子 IL-2 及 TNF-α 分泌也减少,表明川芎嗪预处理后改变了移植肾的免疫状态,减轻了移植肾损伤,为移植肾提供保护作用。

川芎嗪预处理为移植肾提供保护作用的机制,可能包括两方面:一是减轻了移植肾的缺血再灌注损伤;二是降低了移植肾的免疫状态。研究表明,川芎嗪可抑制由先兆子痫引起的 HUVEC 粘附分子表达,而粘附分子在肾脏的缺血再灌注损伤中起重要作用。缺氧复氧后 ICAM-1 的表达增强;用 ICAM-1 基因敲除的大鼠和 ICAM-1 单克隆抗体研究,证实 ICAM-1 是缺血性急性肾功能衰竭的关键介质[8]。缺血时巨噬细胞和单核细胞 TNF-a 和 IL-2 分泌增加,使粘附分子表达升高,说明细胞因子 TNF-α 可增加粘附分子的表达,导致肾脏白细胞浸润增多,可协同加重肾脏的缺血再灌注损伤。我们实验发现川芎嗪减少了移植肾中细胞因子及粘附分子的表达,为移植肾提供保护作用。由于川芎嗪预处理保护了移植肾组织,使移植肾在缺血再灌注时细胞坏死减少,减少了抗原的暴露,如 MHC-Ⅱ暴露减少。而MHC-Ⅱ在急性排斥反应关系密切。HC 是一组编码细胞表面某些抗原的连锁基因群。在正常生理情况下,巨噬细胞、B 淋巴细胞、树突状细胞、胸腺上皮细胞、血管内皮细胞表面均少量表达 MHC-Ⅱ类抗原。研究表明,肺脏缺血再灌注后外周血 T 细胞的 MHC-Ⅱ表达增加,延长缺血时间导致更为强烈的 MHC-Ⅱ抗原表达,和更严重的肺脏排斥反应,提示严重缺血通过 MHC-Ⅱ抗原的表达促进了急性排斥的发展[10]。川芎

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

嗪预处理通过减轻移植肾的缺血再灌注损伤, 而减少了 MHC-Ⅱ分子的表达, 降低了急性排斥反应的发生, 从而保护了移植肾功能。我们的实验结果支持这一假设。当然, 药理性预处理机制复杂, 有待于进一步研究。

本研究说明, 川芎嗪预处理可减轻移植肾的缺血再灌注损伤, 并能降低急性排斥反应的程度, 为移植肾提供良好的保护作用。由于慢性移植肾病的发生与缺血再灌注损伤及排斥反应关系密切[11, 12], 因此, 川芎嗪预处理有望减少远期慢性移植肾病的发生率, 对提高移植肾长期存活率具有重要意义。

参考文献:

[1] 梁日欣, 廖福龙, 韩　东. 川芎嗪预处理对麻醉家兔心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2000, 16(2): 11－13.

[2] 于文慧, 王广有, 马腾骧, 等. 用改良大部分肾切除法制作的慢性肾衰动物模型[J]. 中华实验外科杂志, 1995, 12(4): 235－236.

[3] 康俊生, 王　霞, 徐　涛, 等. 改良袖套法大鼠原位肾移植术[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1997, 6(4): 395－397.

[4] Hopper R A, Forrest C R, Xu H, *et al*. Role and mechanism of PKC in ischemic preconditioning of pig skeletal muscle against infarction[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000, 279(2): R666－676.

[5] Bauer P, Wellbourne T, Shigematsu T, *et al*. Endothelial expression of selectins during endotoxin preconditioning[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000, 279(6): R2015－2021.

[6] Teoh N, Leclercq I, Pena A D, *et al*. Low-dose TNF-alpha protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in mice: implications for preconditioning[J]. Hepatology, 2003, 37(1): 118－128.

[7] Lee H T, Emala C W. Protective effects of renal ischemic preconditioning and adenosine pretreatment: role of A(1) and A(3) receptors[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2000, 278(3): F380－387.

[8] Dragun D, Haller H. Diapedesis of leukocytes: antisense oligonucleotides for rescue[J]. Exp Nephrol, 1999, 7(2): 185－192.

[9] Serrick C, Giaid A, Reis A, *et al*. Prolonged ischemia is associated with more pronounced rejection in the lung allograft[J]. Ann Thorac Surg, 1997, 63(1): 202－208.

[10] 梁后杰, 李建军, 胡绍毅. 川芎嗪对大剂量化疗小鼠骨髓基质细胞损伤的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(11): 1280－1283.

[11] Vazquez M A. Chronic rejection of renal transplants: new clinical insights[J]. Am J Med Sci, 2000, 320(1): 43－58.

[12] Wilkinson A. Progress in the clinical application of immunosuppressive drugs in renal transplantation[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2001, 10(6): 763－770.

（编辑　刘洪娥）

（上接 1363 页）

功能障碍病死率 28.57 %; 3 个脏器 64.7%; 4 个脏器以上 100%。病死率达 55.17%。

3　讨论

3.1　本组病人发病特点

均为高龄, 并存多种内科疾病, 长期卧床者占 44.83%。62%的病人为两叶以上肺炎。痰菌培养显示以革兰阴性杆菌感染为主。2 种以上菌种混合感染占 51.72%。肺部感染至并发 MODS 时间在两周以内的占 31%; 两周以上者占 69%。功能障碍器官数与病死率有明显关系, 3 个及 3 个以上器官功能障碍者病死率达 80%。

3.2　救治体会

3.2.1　积极控制肺炎, 正确选择抗生素, 尽快去除病因　　医院获得性重症肺炎其病原体大多是高度耐药或多重耐药的革兰阴性杆菌及耐甲氧西林金葡菌(MRSA)[3]。本组病人痰菌培养结果以革兰阴性杆菌为主(80.35%), 与此相吻合。在肺炎来势凶猛, 来不及等待痰菌培养结果时, 往往采取经验性用药。临床上应用确有一部分病人很快转危为安, 肺炎得到控制。但仍应根据痰菌培养及药敏结果分析细菌耐药情况, 及时改变抗生素治疗策略, 以尽快控制感染。

3.2.2　尽早气管插管或切开, 加强呼吸支持, 改善通气, 纠正缺氧　　在肺部重度感染时, 患者表现为 PaO_2 降低, $PaCO_2$ 升高。随着病情迁延, 各重要脏器均可发生功能障碍。因此, 首要问题是建立通道, 呼吸机辅助呼吸, 尽快改善缺氧和二氧化碳潴留。临床观察到缺氧纠正得越迅速, 脏器受损程度越轻。

3.2.3　积极保护心脏功能, 改善血液循环　　本组病人多合并有高血压病和冠心病, 肺部感染时, 因缺氧常发生心功能不全, 微循环淤血, 组织氧利用障碍; 因此, 应对心功能和血容量严密监测, 在充分扩容的基础上联合使用血管活性药物, 维持有效胶体渗透压, 防止肺水肿。

3.2.4　防治肾功能损害　　本组病人有 28 例出现肾功能损害, 其中 23 例死亡, 说明合并肾功能损害的 MOSD 死亡率很高。治疗中要保证一定的肾灌注压, 维持有效血容量, 合理应用利尿剂, 避免应用血管收缩药。我们尝试对 1 例病人用床边静脉-静脉超滤和透析治疗, 在排水、降低血肌酐、清除内毒素、细胞因子、炎性介质等方面, 取得良好的效果。

3.2.5　加强支持疗法, 稳定内环境　　肺部感染到 MODS 会产生一系列病理生理反应, 如高血糖、脂肪利用障碍、负氮平衡、水、电解质、酸碱平衡紊乱、免疫抑制、肌肉萎缩等直至器官功能障碍。这种从量变到质变贯穿着疾病的全过程, 有内分泌、神经系统、细胞因子参与代谢调控[4]。因此应采用深静脉营养和胃肠营养结合, 合理掌握各营养物质的比例及量以加强支持治疗, 稳定内环境。

关键词: 老年; 医院获得性重症肺炎; 多器官功能障碍综合征
中图法分类号: R563.1　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 潘　珏, 瞿介明. 重症肺炎[J]. 医师进修杂志, 2000, 23(11): 13－15.

[2] Deitch E A. Multiple organ failure pathophysiology and potential future therapy[J]. Ann Surg, 1992, 216(2): 117－134.

[3] 何礼贤. 医院获得性重症肺炎的经验性抗菌治疗[J]. 医药导报, 2001, 20(2): 80－81.

[4] 高根五. 多器官功能障碍综合征[J]. 医师进修杂志, 2000, 23(8): 56－58.

（编辑　陈聪连）

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