DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.08.023
第25卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 8
708 2003年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)08-0708-04

不同灌注液对体外灌流兔肾功能和形态的影响

袁发焕[1],程 燕[2] ([1]第三军医大学附属新桥医院肾内科、全军肾脏病中心、重庆市肾脏病研究所,重庆 400037;[2]解放军第252医院内科,保定 071000)

提 要:目的 观察不同灌注液对体外灌流肾脏灌流量的影响,为建立体外灌流保存肾脏的技术平台做准备。方法 45只健康成年新西兰白兔,无菌条件下取其左肾进行灌流,根据灌流液的不同,分为A(肝素抗凝自体全血)、B(肝素抗凝自体血+等量RPMI 1640培养基)、C(异体洗涤红细胞+去纤维蛋白血浆+等量RPMI 1640培养基)3组,每组15只,3只用于观察最长灌流时间,12只用于观察其它指标。以100 mmHg灌注压(酚妥拉明解痉)灌流,测定0、24、48、60 h肾重量、肾静脉流出液乳酸脱氢酶(LDH)活性、尿pH值、尿钠和尿钾的浓度变化,及肾组织的光镜及透射电镜病理变化。结果 C组肾脏灌流时间最长(>72 h),肾脏重量增加值最低($P<0.01$),乳酸脱氢酶活性增加值最低($P<0.01$),尿pH增加值最低($P<0.05$),尿钠浓度增加幅度和尿钾浓度下降幅度最小($P<0.05$),光镜及电镜下C组形态学损害最轻。结论 C组灌流液用于肾脏灌流保存,能改善肾脏功能,延长保存时间。

关键词:肾脏;灌流;保存
中图法分类号:R654.1;R692 文献标识码:A

Effect of different perfusion liquids on the perfused rabbit kidney

YUAN Fa-huan, CHENG Yan (Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of different perfusion liquids on the perfused kidney to establish a method for preserving kidneys *in vitro* by perfusion in the future. **Methods** A total of 45 healthy adult New Zealand White rabbits were randomly divided into 3 groups according to different perfusion media with 15 left kidneys in each group: Group A, heparin anticoagulated blood, Group B, heparin anticoagulated blood diluted with equal volume of RPMI 1640 culture medium substrate, Group C, saline-washed erythrocyte plus fibrin-free plasma diluted with equal volume of RPMI 1640 culture medium substrate. In each group, 3 kidneys were used to observe the longest perfusion time, but other 12 kidneys were used for the observation of the renal weight, activity of lactate dehydreogenase in outflow liquid from renal vein, urine pH value, changes of urine natrium and potassium in 0, 24, 48, 60 h after perfusion at the perfusion pressure of 100 mmHg. At the same time, renal histology was also observed microscopically and trans-electron-microscopically. **Results** Group C had the longest perfusion time (>72 h), the lowest increase of kidney weight ($P<0.01$), LDH activity ($P<0.01$) and urine pH ($P<0.05$), the least decrease of urine sodium and urine potassium ($P<0.05$), and the lightest renal histological lesion. **Conclusion** The mixed perfusion liquid has advantages in improving the function of perfused kidney and prolonging the perfusion preservation time.

Key words: kidney; perfusion; preservation

目前,肾脏体外保存主要是浅低温保存[1],其理论依据是降低保存器官的代谢,就能延长器官的体外保存时间。但低温保存存在保存时间短、不能同时为多个受者选配、不能对肾脏进行抗原修饰等诸多局限性。随着科学的发展,可能需要我们对供肾进行抗原或分子修饰,以降低供肾的抗原性或提高供肾对排异的耐受性。我们不是按传统的思路降低保存肾脏的代谢,而是从尽量满足保存肾脏的代谢需求的角度研究肾脏的体外保存。本研究在我们以往研究不同灌注压、不同解痉剂对体外灌流兔肾灌流量影响的基础上,进一步探讨不同灌流液对常温体外灌流兔肾功能及其灌流保存时间的影响,为建立体外灌流保存肾脏的技术平台,最终建立肾库做准备。

基金项目:重庆市科委应用基础基金资助项目(1997)
作者简介:袁发焕(1957—),男,湖北省公安县人,博士,教授,主要从事慢性肾疾病进展机制及其防治方面的研究,发表论文79篇。电话:(023)68755621
收稿日期:2002-04-12;修回日期:2003-01-06

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

1　材料和方法

1.1　实验分组

健康成年新西兰白兔 45 只, 雌雄兼用, 体质量 3～3.5 kg, 20%乌来糖 5 ml/kg 静脉注射麻醉动物后, 无菌条件下取其左肾, 根据灌流液的不同分为 A、B、C 3 组, 每组 15 只兔肾, 于灌流 0、24、48、60 h 观察生化指标和形态学改变, 每组每时相点 4 只兔肾, 另外 A、B、C 组各取 3 只兔肾用来观察最长灌流时间。

表 1　各组灌流液配方

Tab 1　Constituents of 3 perfusion liquids

Group	A	B	C
Perfusion fluid	Heparin + self-whole blood	Heparin+ self-whole blood +equivalent RPMI 1640	Washed xenoma RBC+di-fibrin plasma+equivalent RPMI 1640
Dextran (g/L)	50	50	50
Dexamethasone (mg/L)	8	8	8
Allopurinol (mmol/L)	1	1	1
Ciprofloxacin (mg/L)	2	2	2
Calf serum (ml/dL)	10	10	10

1.2　灌流装置

用 Gambo 血泵作为自制肾脏灌流装置的原动力, 将取下的肾脏的动静脉插管分别与灌流装置动静脉端相连, 将输尿管插管的末端放入尿池内, 开启血泵进行体外灌流。通过三通管补充 RPMI 1640 培养液(含环丙沙星 2 μg/ml), 补充量与尿量相等。灌注压用储血器与肾池的高度调节; 用恒温水浴锅及恒温水循环保证灌流液的温度为 37 ℃。通过鼓泡器和消泡器向储血器供给混合气体(含 95% O_2 和 5% CO_2), 使灌流液氧饱和度大于 97%, 在灌流液进入肾脏前经过 3 个滤器处理以消除气泡。

1.3　检测方法

灌流肾脏尿钠、钾浓度以及肾静脉流出液乳酸脱氢酶(LDH)活性用相应的测试盒测定(南京建成生物工程研究所), 尿 pH 用 pH 计测定, 用灌流后的测定值减去灌流前(取肾时取标本)的测定值, 正值为增加值, 负值为减少值。其他指标按常规方法测定。

1.4　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用第三军医大学数学教研室研制的医用统计程序包进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　肾脏最长灌流存活时间

以尿量小于 0.5 ml/h, 肾脏外观变为褐色为判断灌流肾脏死亡的标准, 则 A 组最长存活时间为 62 h 15 min; B 组最长存活时间为 70 h 12 min; C 组最长存活时间为 72 h 20 min。

2.2　灌流后肾脏重量增加值

灌流 48 h, A 组肾脏重量增加值较灌流 24 h 显著增大(0.47±0.01 *vs* 0.21±0.01, $P<0.05$), 当灌流 60 h, 肾脏重量增加值进一步增大(0.61±0.01, $P<0.01$); 而 B、C 两组灌流 48 h 肾脏重量增加值(0.21±0.01, 0.15±0.01)与 24 h 无显著差异(0.19±0.01, 0.10±0.01, $P>0.05$), 灌流 60 h 肾脏重量增加值(0.44±0.03, 0.42±0.01)虽较 24 h 显著增加($P<0.05$), 但显著低于 A 组同期水平($P<0.05$)。

2.3　灌流后肾静脉流出液 LDH 活性增加值

A 组灌流 24 h 以后, 肾静脉流出液 LDH 活性进行性升高; 而 B 组灌流 48 h 以后才开始升高, 且升高的幅度轻于 A 组; C 组各时相点无显著升高, 见表 2。

表 2　灌流后肾静脉流出液 LDH 活性增加值(IU/L, $n=4$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　The increased value of LDH activity of renal vein out flow (IU/L, $n=4$, $\bar{x}\pm s$)

Time (h)	Group A	Group B	Group C
24	50.33±0.27	3.40±0.08▲	3.15±0.13▲
48	77.15±0.21 *	48.35±0.39 **	4.05±0.13▲
60	100.95±0.94 *	82.18±0.22 **	8.53±0.33▲

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$; ▲: $P<0.001$ *vs* group A

2.4　灌流后尿 pH 增加值

A 组灌流后尿 pH 增加值进行性增高; B、C 两组灌流 60 h 尿 pH 也有增加, 但增加幅度显著低于 A 组, 见表 3。

2.5　灌流后尿钠浓度增加值

A 组灌流后尿钠浓度增加值进行性增加; B 组灌流 60h 尿钠浓度也显著增加, 但增加幅度显著低于 A 组同期水平; C 组各时相点尿钠浓度无显著变化, 见表 3。

2.6　灌流后尿钾浓度下降值

A、B、C 3 组灌流后尿钾浓度下降值均进行性增加, 但 B、C 两组尿钾下降值增加的幅度显著小于 A 组, 以 C 组最小, 见表 3。

表 3　灌流后尿钠、钾、pH 变化($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　The change of urine pH, Na^+, K^+ after perfusion ($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

Time (h)	Group A	Group B	Group C
Urine pH increased value			
24	0.05±0.01	0.05±0.01	0.02±0.01
48	0.21±0.01 *	0.08±0.05▲	0.05±0.01▲
60	0.51±0.01 **	0.21±0.01 *▲	0.11±0.01 *▲
Urine Na^+ increased value (mmol/L)			
24	1.15±0.06	1.13±0.05	0.93±0.05
48	4.23±0.05 *	1.95±0.06▲	1.08±0.05▲
60	10.16±0.06 **	5.15±0.10 *▲	1.38±0.05▲▲
Urine K^+ decreased value (mmol/L)			
24	7.35±0.06	1.35±0.13▲▲	0.75±0.13▲▲
48	12.43±0.1 *	5.23±0.17 *▲	2.25±0.13▲▲
60	20.15±0.13 **	10.15±0.13 **	4.15±0.13 *▲▲

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* 24 h; ▲: $P<0.05$, ▲▲: $P<0.01$ *vs* group A

2.7　灌流肾脏形态学

光镜: 灌流 24 h, 各组肾组织结构基本正常; 灌流 48 h, A 组肾小管上皮细胞胞浆显水肿变性, 刷状缘部分脱落, 见图 1, 肾小囊腔狭小, B、C 两组病变较轻, C 组病变最轻, 见图 2; 灌流 60 h, A 组肾小管上皮细胞出现小空泡, 肾间质高度水肿, 肾小囊腔内可见大量均质物质, B、C 两组肾间质水肿较轻, 肾小囊腔内未见不定形物质。

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

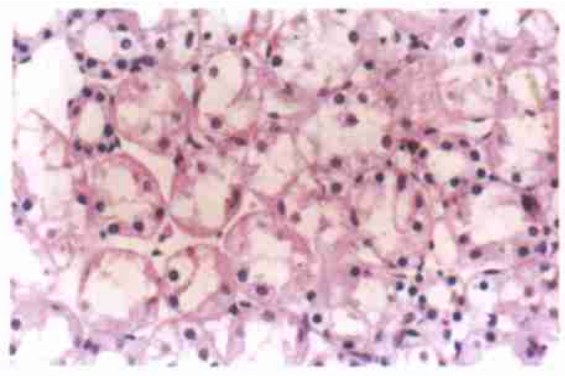


图 1 A 组兔肾体外常温灌流 48 h, 示肾小管上皮细胞胞浆水肿变性, 刷状缘部分脱落 (HE× 400)

Fig 1 The group A rabbit kidney perfused for 48 h. It shows tubular cells cloudy swelling, and some brush border shedding (HE× 400)

电镜: 灌流 24 h, 各组肾小球和肾小管固有细胞无异常发现, 近曲肾小管上皮细胞微绒毛正常, 线粒体基质电子密度均一, 线粒体嵴的数量及分布未见异常, 外膜清晰, 个别线粒体变大、嵴分布较散乱、基质电子密度轻度减低; 灌流 48 h, A 组肾小管基底膜厚度不均一, 细胞内褶明显减少, 个别上皮细胞核染色质边集, 线粒体肿胀变形, 线粒体基质电子密度明显减低, 嵴数量减少或消失, B、C 两组病变较轻, C 组病变最轻; 灌流 60 h, A 组肾小管上皮细胞多数线粒体严重肿胀, 常见外膜断裂, 基质电子密度明显下降, 嵴消失, 出现髓鞘样结构, 见图 3, 细胞核异染色质边集, 肾小球内皮细胞、上皮细胞及系膜细胞肿胀明显, 线粒体有同肾小管上皮细胞类似的改变, 肾小球毛细血管腔内可见大量血小板填塞, 见图 4, B 组也可见到类似的病变, 但程度轻于 A 组, C 组病变最轻, 肾小球毛细血管腔内未见血小板填塞。

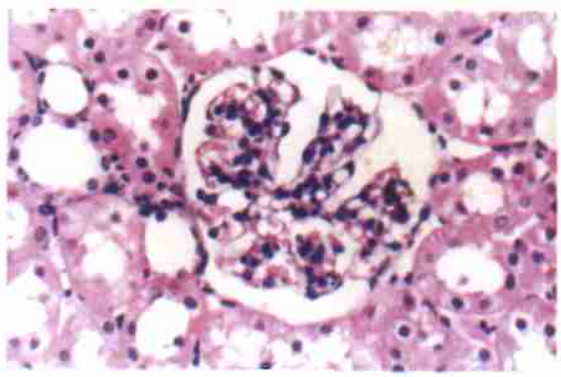
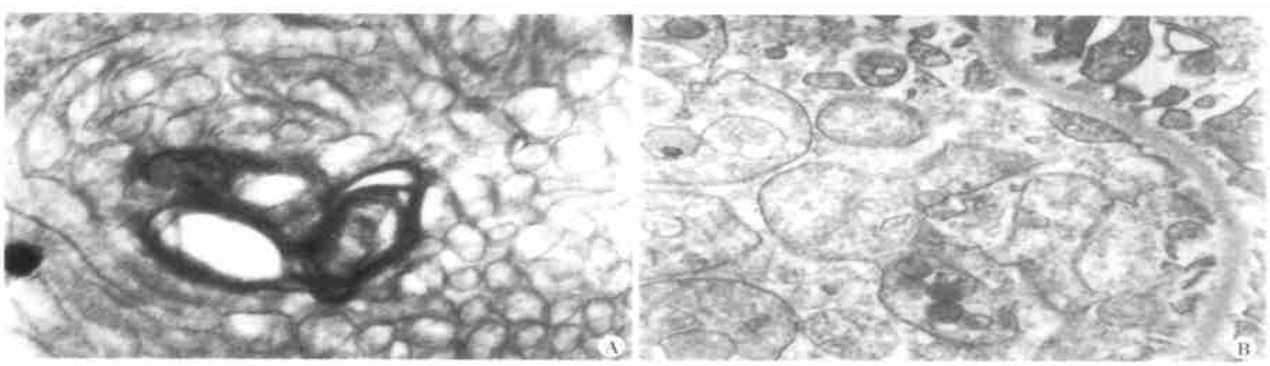


图 2 C 组兔肾体外常温灌流 48 h, 示肾小管上皮细胞胞浆轻度肿胀 (HE× 400)

Fig 2 The group C rabbit kidney perfused for 48 h. It shows tubular cells slight swelling (HE× 400)



A: It shows myelin finger in the tubular cell (TEM× 50 000); B: It shows many platelet plugging in the glomerular capillary (TEM× 50 000)

图 3 A 组兔肾体外常温灌流 60 h

Fig 3 The group A rabbit kidney perfused for 60 h

3 讨论

关于对体外灌流肾脏功能状况的评价指标体系文献中尚无规范借鉴。我们采用了灌流肾脏重量增加值、静脉流出液 LDH 活性增加值、尿 pH 增加值、尿钠浓度增加值、尿钾浓度下降值等指标。灌流肾脏重量增加, 提示组织中水分增加, 灌流液内液体成分向组织间隙渗出过多, 是由于灌流液中胶体渗透压低或/和血管通透性增加所致。灌流肾静脉流出液 LDH 活性增加, 提示组织细胞受损[2~4], 细胞内 LDH 释出并进入静脉回流液。在灌流液 pH 值、肾组织细胞代谢和肾小管排泌功能稳定的条件, 尿 pH 应保持稳定; 若组织细胞供氧不足, 无氧糖酵解增多, 只要肾小管排泌功能正常, 尿 pH 应是降低的; 本实验中, 灌流液 pH 是恒定的, 灌流肾尿 pH 值增加只能说明肾小管的酸化功能障碍。在灌流液钠钾浓度恒定的条件下, 尿钠浓度增高, 尿钾浓度降低, 说明肾小管的钠钾交换功能障碍[5,6]。

本实验结果表明, 对比不同灌流液对体外灌流肾脏功能的影响, C 组(异体洗涤红细胞+去纤维蛋白血浆+等量 RPMI1640 培养基)体外灌流, 达 72 h 以上

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

(有尿),同时 C 组灌流肾脏重量增加值、静脉流出液 LDH 活性增加值、尿 pH 增加值、尿钠浓度增加值、尿钾浓度降低值显著低于 A 组(肝素抗凝自体全血)和 B 组(肝素抗凝自体全血+等量 RPMI1640 培养基),C 组灌流肾脏光镜和电镜下的形态学损害也显著轻于 A、B 两组,说明在本实验中,C 组灌流液对离体灌流肾脏的保存效果最佳。

C 组灌流液中,加入了等量 RPMI 1640 培养基,具有较强的酸碱缓冲能力,同时还含有较多的氨基酸[7]、谷胱甘肽、镁等。其中精氨酸是合成一氧化氮(NO)的前体物质,而 NO 有抑制血小板聚集、抑制中性粒细胞粘附和扩张血管等功能[8];谷胱甘肽能抑制氧自由基反应[9];镁离子可使肾血管舒张[10]。这些可能是 C 组灌流液优于 A 组(肝素抗凝自体全血)的重要机制。

A 组灌流后,在肾小球毛细血管腔中出现大量血小板血栓,导致灌流阻力增高,尿量减少,是否与肝素用量不足(或是肝素代谢消耗)有关,有待于进一步研究。

B 组灌流后,肾功能、肾组织形态学等指标均优于 A 组,可能与 B 组灌流液含有等量 RPMI1640 液有关。而 B 组灌流液的效果不如 C 组,是否与 B 组含纤维蛋白和补体有关,有待进一步的深入研究。

本实验 C 组体外灌流保存时间长达 72 h,为临床上肾库的建立摸索出了新的思路。

参考文献:

[1] Polyak M M, Arrington B, Hardy M T, *et al*. The state of renal preservation for transplantation in New York[J]. Transplant Proc, 1999, 31(5): 2091—2093.

[2] Goddard P J, Keay G, Grigor P N. Lactate dehydrogenase quantification and isoenzyme distribution in physiological response to stress and in red deer [J]. Res Vet Sci, 1997, 63(2): 119—122.

[3] Ahmed S A, Gad M Z. Diagnostic value of serum lactate dehydrogenase isoenzyme and amino acid patterns in several schistosomal and non-schistosomal disorders as compared to other biochemical parameters[J]. Dis Markers, 1996, 13(1): 19—29.

[4] Tanishima K, Gao S X, Yamamoto R. Biochemical and enzymological study of lactate dehydrogenase isoenzymes from commercial quality control sera and several animal tissue sources[J]. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1995, 33(11): 865—868.

[5] Qureshi F, Jacques S M, Seifman B, *et al*. In utero fetal urine analysis and renal histology correlate with the outcome in fetal obstructive uropathies [J]. Fetal Diagn Ther, 1996, 11(5): 306—312.

[6] Abendroth D, Schilling M, Fenzlein P G, *et al*. Pretransplant assessment of renal viability by using ion-selective electrodes——A pilot study[J]. Transplant Proc, 1993, 25(4): 2563—2564.

[7] Baldan N, Toffano M, Cadrobbi R, *et al*. Kidney preservation in pigs using celsior: a new organ preservation solution[J]. Transplant Proc, 1997, 29(8): 3539—3540.

[8] Caramelo C, Espinosa G, Manzarbeitia F, *et al*. Role of endothelium-related mechanisms in the pathophysiology of renal ischemia/reperfusion in normal rabbits[J]. Circ Res, 1996, 79(5): 1031—1038.

[9] Kievit J K, Nederstigt A P, Oomen A P, *et al*. Release of alpha-glutathione S-transferase and pi-glutathione S-transferase from ischemic damaged kidneys into the machine perfusate-relevance to viability assessment[J]. Transplanta Proc, 1997, 29(8): 3591—3593.

[10] Brenna S, Thonney Viani M, Drukker A, *et al*. Effect of magnesium sulfaten on kidney function in the newborn rabbit[J]. Biol Neonate, 1998, 74(6): 451—456.

(编辑 冯崇英)

文章编号:1000-5404(2003)08-0711-02

个案与短篇

纤维支气管镜置放镍钛记忆合金支架治疗重度气管狭窄 2 例

Nickel-titan alloy stenting under the guide of fibrobronchoscope in treatment of severe tracheal stenosis: report of 2 cases

刘 平,杨和平,胡建林,王 波,沈渝菊,周沪明 (第三军医大学附属西南医院呼吸科内科,重庆 400038)

我科在纤维支气管镜直视下用高频电刀切除疤痕组织,随后放置镍钛记忆合金支架,取得满意疗效,现报告如下。

1 临床资料

患者女,22 岁,因气管外伤后 30 余 d,进行性呼吸困难 10 d 于 2002 年 2 月 20 日入我院呼吸科。患者 2002 年 1 月 16 日,因轻生自行划破气管,当时立即到当地县医院就诊,予以清创缝合、气管插管,同时积极予以抗炎及对症治疗,拔除气管插管后,伤口愈合较好。于 2002 年 2 月 5 日出院。出院时患者走平路感轻微呼吸困难,伴咳嗽,随后患者呼吸困难进行性加重,在静息状态下亦感吸气性呼吸困难,伴吸气性喘鸣音,剧烈咳嗽时出现短暂晕厥,无发热、胸痛,门诊以"气管狭窄"收入院。体格检查:呼吸急促,24 次/min,床旁即可闻吸气性喘鸣音,三

作者简介:刘 平(1956—),男,硕士,副主任医师,副教授,主要从事慢性阻塞性肺气肿方面的研究,发表论文 20 篇。电话:(023)68754121

收稿日期:2002-10-30;修回日期:2003-01-23

(下转 717 页)

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