DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.02.044
第23卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 2
2001年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2001

文章编号:1000-5404(2001)02-0215-02

论著

异搏定在离体肾保存中应用的实验研究

范明齐,张银甫,莫华根,黄赤兵,严治林,王平贤 (第三军医大学附属新桥医院泌尿外科,重庆 400037)

提 要:目的 研究钙拮抗剂异搏定在离体肾保存中对肾细胞的保护作用。方法 日本纯种大耳兔,手术切取双肾,将离体肾置于4℃的HCA灌洗液中保存24 h,检测肾细胞线粒体内总钙和肾组织三磷酸腺苷(ATP)的含量。结果 与肾脏切取后立即检测相比,保存24 h后肾细胞线粒体内钙浓度明显上升、ATP则下降;保存液中加入钙拮抗剂异博定(VP)后,上述现象可得以显著抑制。结论 在离体肾保存过程中,钙拮抗剂异博定能阻止钙进入细胞线粒体内,该现象可能具有保护离体肾的作用。

关键词:肾脏;保存;钙拮抗剂
中图法分类号:R322.61;R972 文献标识码:A

Experimental study of Verapamil in kidney graft preservation

FAN Ming-qi, ZHANG Yin-fu, MO Hua-geng, HUANG Chi-bing, YAN Zhi-lin, WANG Ping-xian (Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect of calcium antagonist Verapamil (VP) on kidney preservation in HCA solution. **Methods** After kidneys were isolated from rabbits, they were perfused and stored in HCA solution or in HCA solution with VP pre-supplement at 4℃ for 24 h respectively. The contents of mitochondrial calcium in renal cells and ATP in renal tissues were measured in every group. **Results** The contents of mitochondrial calcium was remarkably higher and ATP significantly lower in the kidneys in HCA solution at 4℃ for 24 h than those just after resection. But these could be inhibited in those storing in the HCA solution with VP pre-supplement. **Conclusion** Calcium antagonist VP can protect kidney function during HCA solution preservation by inhibiting calcium intaking into mitochondrium.

Key words: kidney; preservation; calcium antagonists

随着外科技术的成熟和新型免疫抑制剂的应用,肾脏移植现已成为治疗慢性肾功能衰竭的有效手段。然而手术前离体肾保存的方式和时间仍然是影响术后肾功能恢复的主要因素,如何较长时间、良好地保存离体肾已越来越受到人们的关注。有迹象表明,保存期间Ca^{2+}大量积蓄于线粒体内,造成线粒体功能障碍、结构破坏、能量物质耗竭,从而导致了离体肾脏细胞损伤[1,2]。本实验旨在探讨于普通保存液中加入钙拮抗剂后,观察其对离体肾的保护作用,为临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物

3月龄日本纯种大耳兔24只,雄雌不限,体重(2.5±0.2)kg。

1.2 试剂与仪器

异博定(Verapamil, VP;针剂,每支2 ml, 5 mg,德国knoll公司);5′-腺苷二磷酸(ADP)、5′-腺苷一磷酸(AMP)等系上海生物化学研究所制品;高渗枸橼酸盐腺嘌呤器官保存液(Hypertonic citrateadenine solution, HCA液)购自上海市中心血站。高效液相色谱分析仪(GILSON,法国);低温高速离心机(长沙离心机厂);日立Z-8000偏振塞曼原子吸收分光光度计(日本);离体肾脏灌注装置、Tdl-R玻璃组织匀浆器(国产)。

1.3 方法

1.3.1 分组 Ⅰ组(正常组):肾脏切取后立即检测;Ⅱ组(对照组):将离体肾置于4℃的HCA灌洗液中保存24 h;Ⅲ组(实验组):将离体肾置于加有钙拮抗剂异博定(VP)的4℃ HCA灌洗液中保存24 h(每100 ml HCA液中加异博定5 ml)。每组8只动物。

1.3.2 以Chin's法建立动物实验模型[3] 3%戊巴比妥钠(1 ml/kg)经耳缘静脉缓慢注射,麻醉后再缓慢静脉推注肝素500 U/kg,取腹正中切口,连同腹主动脉、腔静脉快速切除双肾,经近端腹主动脉立即以4℃ HCA液作单次重力灌洗。

1.3.3 分离肾细胞线粒体 将肾皮质剪碎、净血、磨成匀浆,低温高速离心(600× g, 7 min),取上清液离心(12 000× g, 15 min),将沉淀与4℃、0.25 mol/L蔗糖混匀后离心(12 000× g, 10 min),沉淀物即为线粒体。

1.3.4 线粒体钙含量测定 肾细胞线粒体制成每毫升含2~3 mg线粒体蛋白悬浮液,在日立Z-8000偏振塞曼原子吸收分光光度计以大焰法直接测定钙含量。

1.3.5 肾组织腺苷酸提取与检测 取肾组织50 mg于0℃条件下置于液氮预冷的乳钵中研磨成粉末,加冰冻的0.4 mol/L高氯酸3 ml冰浴中制成匀浆,匀浆液在0℃条件下反应30 min

作者简介:范明齐(1963-),男,天津市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事器官移植方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68755000-74624

收稿日期:2000-07-10;修回日期:2000-12-23

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

后离心(12 000× g, 20 min),取上清液以0.5 mol/L KOH中和,将pH调至7.0~7.2,于冰浴中冷却15 min后第2次离心(0℃,600× g, 10 min),取上清液于-25℃保存备用。利用GILSON系列高效液相分析仪进行样品检测。

1.4 统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验。

2 结果

各组肾皮质细胞线粒体内钙含量和肾组织ATP含量见表1。与肾脏切取后立即检测相比,保存24 h后肾细胞线粒体内Ca^{2+}浓度明显上升、ATP则下降;但若在保存液中加入钙拮抗剂异博定(VP),上述现象可得以显著抑制。

表1 各组肾皮质细胞线粒体内 Ca^{2+} 和ATP含量(m_B/ nmol·mg^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The concentrations of Ca^{2+} and ATP in mitochordrial of renal cortex(m_B/ nmol·mg^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Parameter	Ⅰ(n=8)	Ⅱ(n=8)	Ⅲ(n=8)
Ca^{2+}	1.32±0.29	1.98±0.38*	1.43±0.30#
ATP	9.47±1.06	1.62±0.81*	3.83±0.78#

Ⅰ: Normal; Ⅱ: Control; Ⅲ: Verapamil treated; *: $P<0.01$ vs Ⅰ; #: $P<0.01$ vs Ⅱ

3 讨论

在同种异体肾移植前,离体肾都要经历一个时间长短不一的冷藏期(2~4℃),在这期间肾脏细胞及其细胞器会发生不同程度的水肿、变性、细胞内能量耗竭等一系列改变,且随着时间的延长,上述损伤性的改变亦逐渐加重,而这种损伤又直接影响到术后肾脏功能恢复的速度和程度。目前研究表明,上述冷藏期的病理改变在很大程度上与钙离子的活动有关[4,5],且大量证据显示移植前肾细胞内能量残存的多寡直接影响术后肾脏细胞的功能状况[2,4,6]。在临床肾移植中,我们对部分离体肾使用了加有异搏定的HCA灌洗液,结果发现这些患者移植肾功能恢复明显较对照组快,由此我们进行了该项研究。

一般认为钙离子与细胞损伤的关系主要表现在当离体肾冷藏时因线粒体膜上的 Ca^{2+}-ATP酶失活,致使从胞浆自由弥散至线粒体内的钙离子不能被泵出线粒体,从而导致线粒体内钙离子高于正常含量即所谓钙超载,钙超载一方面可导致线粒体水肿、变性,另一方面钙积聚不仅导致线粒体内膜极化状态发生改变,干扰氧化磷酸化过程,而且可直接损伤线粒体膜的结构,从而阻止ATP的形成,并加速其分解。

钙拮抗剂可作用于线粒体膜上的电位调控L型钙通道,通过与其 α_1 亚单位结合,从而阻断 Ca^{2+} 内流进入线粒体[3]。本实验表明离体肾冷藏期间若于普通保存液中加入钙拮抗剂异搏定,线粒体内钙含量明显低于未加异搏定的对照组,线粒体内ATP含量也较之显著增高,由此可见,钙拮抗剂对离体肾具有保护作用。

参考文献:

[1] Orii T, Ohkohchi N, Satomi S, *et al*. Assessment of liver graft function after cold preservation using ^{31}P and ^{22}Na magnetic resonance spectroscopy[J]. Transptantation, 1992, 53(4): 730-734.

[2] Viertel A, Ditting T, Pistorius K, *et al*. An unusual case of aspergillus endocarditis in a kidney transplant recipient[J]. Transplantation, 1999, 68(11): 1 812-1 813.

[3] Chin J, Zhong R, Duff J, *et al*. Microsurgical renal transplant models in rats: a comparison of four anastomotic techniques[J]. Transplant Proc, 1989, 21(2): 3 351-3 352.

[4] Maessen J, Vander G, Vork M, *et al*. Potentiation of ischemic injury during hypothermic storage in donor kidneys: role of energy metabolism[J]. Trasplant Proc, 1995, 37(5): 2 752-2 754.

[5] Mattys E P, Mallo I J, Iusi C, *et al*. Lipid alteration induced by renal ischemia pathogenic factor in membrane damage[J]. Transplantation, 1998, 65(2): 155-160.

[6] Polyak M R, Arrington B O, Boykin J, *et al*. The influence of pulsatile preservation on renal transplantation in 1990s[J]. Transplantation, 2000, 69(2): 249-258.

(编辑 汪勤俭)

(上接214页)

中仅存活27例,1964年至1980年的275例中,存活127例,占46%,近年报道采用输血浆及(或)血浆置换疗法,存活率可高达80%,但仍有重症TTP,病情不可逆转而死亡[11]。TTP无特效治疗,但以输血浆疗法和血液透析,是较好的治疗手段,但血浆置换,价格昂贵,如有条件,可以首选,对预后更为有利。配合强的松治疗可有一定疗效,而细胞毒药物,输血小板,血小板聚集抑制剂等疗效均不能肯定[11]。从本例治疗来看,积极给予糖皮质激素,输注新鲜血浆,配合透析,是一种有效的治疗方法。此病例出院随访至今,患者情况良好。

关键词: Moschcowitz综合征;溶血性尿毒症综合征
中图法分类号: R554.6 文献标识码: B

参考文献:

[1] Beutler B. Williams hematology[M]. 5th ed. New York: McGraw-Hill Inc, 1995. 1 290-1 303.

[2] Wasserstein A. Recurrent thrombotic thrombocytopenic purpura after viral infection[J]. Arch Intern Med, 1981, 141(5): 685.

[3] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 288-289.

[4] 王海燕. 肾脏病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 1 029-1 033.

[5] 叶任高, 沈清瑞. 肾脏病诊断与治疗学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 406-407.

[6] 张家华, 黄 平. 现代血液病治疗学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1997. 266-267.

(编辑 陈聪连)

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