

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.06.011

依达拉奉对犬自体肾移植缺血再灌注损伤的保护作用研究*

乔振奎¹ 付培德² 张锐³ 李延龙¹ 徐进志⁴ 徐万海^{1,Δ}

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院泌尿外科 黑龙江 哈尔滨 150001; 2 哈尔滨医科大学附属第四医院影像科 黑龙江 哈尔滨 150001;
3 黑龙江省医院泌尿外科 黑龙江 哈尔滨 150001; 4 哈尔滨医科大学附属第四医院胸外科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:探讨依达拉奉对犬自体肾移植缺血再灌注损伤的影响及机制。**方法:**将 18 只体重匹配的健康杂种犬随机分为假手术组(S 组)、依达拉奉组(ED 组)、生理盐水组(PS 组),每组各 6 只。S 组仅进行肾手术切除;ED 组在阻断前在供体静脉内注入依达拉奉 10 mg/kg,然后使用 200 mL 加入依达拉奉 10 mg/kg 的 UW 液灌洗供体肾并在同样的保存液中保存供体肾 8 小时,且再灌注开始时立即在受体静脉内给予依达拉奉 10 mg/kg;PS 组同法使用相同体积的生理盐水。再灌注 4 h 后检测 MDA、MPO、SOD、iNOS、eNOS 等活性;术后 24 h 检测血清肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)浓度;光镜下观察肾组织病理学改变。**结果:**PS 组 MDA 显著高于 S 组及 ED 组 ($P<0.05$),PS 组 MPO 含量亦低于 S 组及 ED 组 ($P<0.05$)。PS 组 SOD、eNOS 含量显著低于 S 组及 ED 组 ($P<0.05$),PS 组 iNOS 含量高于 S 组及 ED 组 ($P<0.05$),ED 组的肾损伤明显减轻。**结论:**依达拉奉能减轻肾移植缺血再灌注损伤,其机制可能与减轻肾脂质过氧化反应有关。

关键词:依达拉奉;肾移植;肾;再灌注损伤;氧自由基

中图分类号:Q95-3,R692 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)06-1040-03

Protective Effect of Edaravone on Ischemia Reperfusion Injury of Kidney Autotransplantation*

QIAO Zhen-kui¹, FU Pei-de², ZHANG Rui³, LI Yan-long¹, XU Jin-zhi⁴, XU Wan-hai^{1,Δ}

(1 Urology, Forth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China; 2 Radiologic department, Forth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China; 3 Urology, the Hospital of Heilongjiang Province, Harbin, Heilongjiang, 150001, China; 4 Thoracic surgery, Forth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of edaravone on malonyldialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), renal tissue superoxide dismutase (SOD), inducible nitric oxide synthase (iNOS), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) after canine autologous renal transplantation. **Methods:** 18 weight matched healthy mongrel dogs were randomly divided into sham operation group (group S), edaravone group (group ED) and normal saline group (group PS), with 6 cases in each group. Group S: only kidney operation resection. Group ED: before clamping in the donor intravenous edaravone 10mg/kg, UW lavage and then use the 200 mL to join the edaravone 10mg/kg donor kidney and the preservation of donor kidney preservation solution for 8 hours in the same, and at the beginning of reperfusion immediately given edaravone 10 mg/kg in receptor intravenous. Group PS: with the same method using the same volume of saline. We detected the activities of MDA, MPO, SOD, iNOS and eNOS after reperfusion for 4H, and postoperative 24h detection of serum creatinine (Cr), blood urea nitrogen (BUN) concentration, while pathological changes of renal tissue in each group were observed under light microscope. **Results:** In PS group, MDA was significantly higher than those in S group and ED group ($P<0.05$), iNOS of PS group were also lower than those in S group and ED group ($P<0.05$). In group PS, SOD, eNOS content was significantly lower than those in S group and ED group ($P<0.05$), iNOS of PS group was higher than those in S group and ED group ($P<0.05$), the pathological injury in ED group was significantly reduced. **Conclusion:** Edaravone can reduce ischemia reperfusion injury in renal transplantation, and its mechanism may be related to reduce renal lipid peroxidation.

Key words: Edaravone; Kidney transplantation; Kidney; Reperfusion injury; Oxygen free radical

Chinese Library Classification: Q95-3, R692 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)06-1040-03

前言

肾移植对于治疗终末期肾病是一个有效的方法。肾移植术

过程中是不可避免的会引起缺血再灌注损伤,由于免疫抑制剂的
应用,肾移植缺血再灌注损伤成为导致移植后肾功能衰竭的
主要原因。因此,如何减轻肾脏缺血再灌注损伤是肾移植领域

* 基金项目:黑龙江省青年科学基金项目(QC2012C106)

作者简介:乔振奎(1978-),男,主治医师,研究方向:肾移植, E-mail:qiaozhenkui1978@126.com

Δ 通讯作者:徐万海,博士研究生导师, E-mail:xman1900@126.com

(收稿日期:2013-06-30 接受日期:2013-07-26)

研究热点之一。依达拉奉是一种氧自由基清除剂和新型神经保护药物,其在脑血栓的形成和短暂脑缺血时具有保护效应^[2]。许多研究显示,依达拉奉对器官缺血再灌注损伤具有保护效应,包括对非移植情况下肾缺血再灌注损伤^[3,4]的保护。本研究课题旨在将新型脑保护药物依达拉奉引入肾保护领域,进一步研究移植肾损伤机制和依达拉奉对肾移植的保护作用及可能机制,以期给临床肾移植带来新的进展。

1 实验材料与方法

1.1 试剂和仪器

雄性健康成年杂种犬,体重 15-20 kg,18 只(哈尔滨医科大学实验动物中心提供),随机分为 3 组(n=6):假手术组(S 组)、依达拉奉组(ED 组)、生理盐水组(PS 组)。Bear1000 型呼吸机、灌注装置(用三升静脉营养袋加压力表自制)、自动生化仪、i-Star 血气分析仪、PM2000 监护仪、压力换能器、Swan-ganz 导管(ARROW)、电子输液泵、1270 型透射电镜、光学显微镜、恒温烤箱、离心机等仪器。MDA、MPO、iNOS、SOD 检测试剂盒(南京建成生物研究所提供的)、eNOS 检测试剂盒(美国 ADL 生物公司)。

1.2 模型的建立

S 组:犬禁食水一夜,麻醉前皮下注射丁丙诺啡(0.02 mg/kg),上腔静脉置入深静脉导管,预防性使用抗生素头孢唑林(22 mg/kg i.v.)。麻醉诱导使用氯胺酮(2 mg/kg i.v.)和地西泮(2 mg/kg i.v.),麻醉维持使用异氟醚,吸入 100% 氧。硬膜外注射吗啡(0.1 mg/kg i.v.)用于延长术后止痛。腹部清洁消毒,正中切口,切开肾周组织暴露左肾,肝素化。用无损伤血管钳阻断肾动静脉并分别切断之。ED 组:步骤同上。冷 UW 液 200 mL 立

即经肾动脉灌注并经肾静脉流出直到移植变白无血,流出物变清。游离输尿管并在膀胱水平切断,在 4 到 6 °C 储存于 250 mL UW 液 8 h。8 h 后将左肾移植入原供体的髂窝,随后将对侧肾切除,总的再缺血时间定义为肾动静脉开始嵌夹到再灌注开始。PS 组:以生理盐水代替依达拉奉处理。

1.3 静脉血及标本的采集

再灌注 4 h 后左肾上极楔形切除部分组织活检,一部分置于 -80 °C 冰箱保存待测,另一部分 4 %多聚甲醛固定,常规石蜡包埋、切片。静脉采血 2 mL 以检测 MDA、MPO 活性。

1.4 观察指标

取一定量的肾组织制成组织匀浆,按操作指南检测 MDA、MPO;黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性,酶联免疫吸附测定法测定 eNOS、iNOS。全自动生化分析仪测定血清 Cr、BUN 浓度。

1.5 病理学组织观察

将 4%多聚甲醛固定后的肾依次进行脱水、透明、浸蜡,制备石蜡切片。HE 染色后在 200 倍光镜下观察肾组织病理学改变。

1.6 统计学分析

应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料组间比较采用 t 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组样本 MDA、MPO、SOD、iNOS、eNOS 含量结果

各组肾组织 MDA 以及 MPO 的含量及血浆检测 SOD、iNOS、eNOS 的含量见表 1。PS 组 MDA、iNOS 显著高于 S 组及 ED 组(P<0.05),PS 组 MPO、SOD、eNOS 含量亦低于 S 组及 ED 组(P<0.05)。

表 1 三组样本 MDA、MPO、SOD、iNOS、eNOS 含量($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Three groups of samples MDA, MPO, SOD, iNOS, eNOS content

Group	n	MDA(nmol/mg·prot)	MPO(μ /g)	SOD(μ /ml)	iNOS(μ /L)	eNOS(ng/L)
S	6	12.03 $\pm$ 2.71	0.52 $\pm$ 0.10	382.96 $\pm$ 13.12	73.54 $\pm$ 13.98	375.13 $\pm$ 17.04
ED	6	16.79 $\pm$ 3.90	1.42 $\pm$ 0.22	329.18 $\pm$ 22.01	128.35 $\pm$ 22.01	319.78 $\pm$ 23.25
PS	6	21.66 $\pm$ 2.69	1.83 $\pm$ 0.31	288.79 $\pm$ 26.39	175.10 $\pm$ 21.13	280.02 $\pm$ 25.20
t ₁		2.455*	9.122*	5.141*	5.149*	4.703*
t ₂		6.819*	9.851*	7.826*	9.818*	7.658
t ₃		3.034*	2.642*	2.879*	3.753*	2.840*

Note: t₁:S 组 VS ED 组;t₂:S 组 VS PS 组;t₃:ED 组 VS PS 组;*:P<0.05

2.2 术后 24h 血清 BUN、Cr 结果比较

血清检测 BUN、Cr 的含量见表 2。PS 组 BUN、Cr 含量显著高于 S 组及 ED 组(P<0.05)。

2.3 肾组织形态学改变比较

光镜下见 S 组的肾组织病理改变不明显,肾小球、肾小管结构未发生变化;PS 组的间质水肿明显,且有一定程度的炎性细胞浸润。结构上肾小管上皮细胞刷状缘消失,并可见明显管型;ED 组的间质轻度水肿明显减轻,肾小管上皮细胞扁平,仅见部分刷状缘消失,坏死,偶见管型。见图 1。

表 2 术后 24h 三组 BUN、Cr 水平($\bar{x} \pm s$)

Table 2 24h three BUN, Cr levels after operation

Group	n	BUN(mmol/L)	Cr(μ mol/L)
S	6	2.68 $\pm$ 0.32	57.24 $\pm$ 13.99
ED	6	14.78 $\pm$ 2.31	215.10 $\pm$ 22.13
PS	6	19.19 $\pm$ 2.43	386.05 $\pm$ 112.02
t ₁		16.500*	7.134*
t ₂		12.709*	14.769*
t ₃		3.221*	3.667*

注:t₁:S 组 VS ED 组;t₂:S 组 VS PS 组;t₃:ED 组 VS PS 组;*:P<0.05

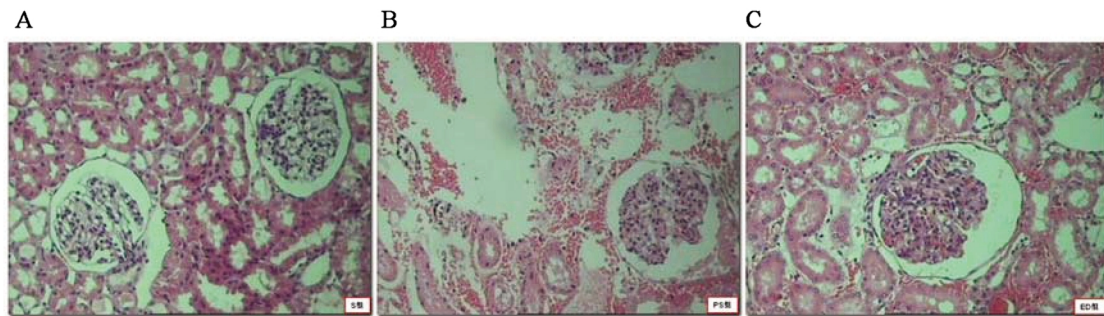


图1 各组肾组织的光镜检查结果

Fig.1 Results of the renal morphology in different groups

3 讨论

肾移植是治疗终末期肾病的有效方法。移植后肾功能衰竭是肾移植术后的主要并发症之一,缺血再灌注损伤是导致其产生的主要原因。缺血再灌注损伤 (ischemia-reperfusion injury, IRI)是指组织缺血后一旦恢复灌注,原来缺血的组织细胞不但不能迅速恢复正常的代谢机能,反而加重其损伤,表现为充血、水肿等^[5-8]。IRI的存在增加了急性排斥反应和移植后慢性肾功能不全的风险并可能导致远期移植物的功能异常^[9-12]。参与肾缺血再灌注损伤的介质包括细胞因子、氧自由基、蛋白水解酶、磷脂酶、花生四烯酸代谢产物、血小板活化因子、补体、金属蛋白酶和内皮素等。氧自由基是一种高反应性的分子,能引起一系列细胞内毒性级联反应,机制主要包括脂质过氧化、蛋白质损伤、DNA损伤、刺激转录因子活化改变信号传导通路。氧自由基是机体内氧分子的不全代谢产物,在正常情况下,氧自由基可以被内源性自由基清除系统所清除,细胞免遭其毒性损伤。当组织细胞缺血、缺氧时,氧自由基清除系统功能降低或丧失,生成系统潜在活性增大,一旦恢复血供与氧供,氧自由基便爆发性产生与急剧“堆积”,通过攻击夺获生物膜脂质多聚不饱和脂肪酸侧链上的氢原子等过程,造成膜流动与钙离子通透性增加,破坏膜结构完整性,钙跨膜内流与超负荷,最终导致细胞损伤或死亡。因此,清除氧自由基是预防肾移植再灌注损伤的首要措施。

依达拉奉(3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one)是一种氧自由基清除剂和新型神经保护药物,常用于脑血栓的急性治疗^[13-15]。其在脑血栓的形成和短暂脑缺血时具有保护效应。许多研究显示,依达拉奉对器官缺血再灌注损伤具有保护效应,包括对非移植情况下肾缺血再灌注损伤的保护。研究发现,依达拉奉可与 $\cdot\text{OH}$ 或过氧基反应,抑制脂质过氧化和细胞损伤依达拉奉可以抑制由 H_2O_2 和 Fe^{3+} 反应产生的细胞损伤因子 $\cdot\text{OH}$,对水杨酸和 $\cdot\text{OH}$ 的反应产物对羟基苯甲酸二聚体的生成具有抑制作用,对 $\cdot\text{OH}$ 所致的亚油酸的过氧化有抑制作用。Matsuyama等^[16]通过鼠在体缺血再灌注模型证实,依达拉奉可通过清除氧自由基预防中性粒细胞激活,保护肾缺血再灌注损伤。崔华庆等^[17]对依达拉奉在活体肾移植缺血再灌注损伤中的保护作用进行研究,显示依达拉奉可以提高SOD活性,减少MDA的产生,减轻肾脏缺血再灌注损伤,有效地保护了肾脏功能。本组研究显示,光镜下ED组肾组织损伤明显减轻;在肾脏组织中,PS组MDA显著高于S组及ED组($P<0.05$),PS组MPO含量亦低

于S组及ED组($P<0.05$);血浆检测SOD、iNOS、eNOS的结果显示,PS组SOD、eNOS含量显著低于S组及ED组($P<0.05$),PS组iNOS含量高于S组及ED组($P<0.05$),血清检测PS组BUN、Cr含量显著高于S组及ED组($P<0.05$),表明依达拉奉通过抑制MDA、MPO、iNOS的含量以及提高eNOS、SOD的含量来减轻肾移植术后再灌注损伤,起到保护作用。

缺血再灌注损伤涉及医学各领域,探寻其切实有效的治疗药物成为临床研究的热点。依达拉奉对移植肾缺血再灌注损伤有着良好的保护作用,减轻或消除移植肾缺血再灌注损伤将明显的延长受体移植后的存活时间,对解决移植肾缺血再灌注损伤具有重要的意义,为临床肾移植后IRI的预防和治疗提供理论依据。

参考文献(References)

- [1] Thuillier R, Renard C, Rogel-Gaillard C, et al. Effect of polyethylene glycol-based preservation solutions on graft injury in experimental kidney transplantation[J]. Br J Surg, 2011, 98(3): 368-378
- [2] Zhang P, Li W, Li L, et al. Treatment with edaravone attenuates ischemic brain injury and inhibits neurogenesis in the subventricular zone of adult rats after focal cerebral ischemia and reperfusion injury[J]. Neuroscience, 2012, 201: 297-306
- [3] Zhang G, Xu QP, Huang HY. Protective effects of edaravone on renal ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Journal of Zhejiang Medical University, 2008, 37(3): 308-311
- [4] Sonoda A, Nitta N, Seko A, et al. Edaravone prevents bowel infarction after acute superior mesenteric artery thromboembolism using autologous fibrin clots in a rabbit model [J]. Br J Radiol, 2009, 82(981): 711-715
- [5] O'Neill S, Ross JA, Wigmore SJ, et al. The role of heat shock protein 90 in modulating ischemia-reperfusion injury in the kidney[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2012, 21(10): 1535-1548
- [6] D'Annunzio V, Donato M, Buchholz B, et al. High cholesterol diet effects on ischemia-reperfusion injury of the heart [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2012, 90(9): 1185-1196
- [7] Minguet G, Brichant JF, Joris J. Opioids and protection against ischemia-reperfusion injury: from experimental data to potential clinical applications[J]. Acta Anaesthesiol Belg, 2012, 63(1): 23-34
- [8] Minamino T. Cardioprotection from ischemia/reperfusion injury: basic and translational research[J]. Circ J, 2012, 76(5): 1074-1082
- [9] Vatazin AV, Astakhov PV, Zul'karnaev AB, et al. Cellular factors of ischemia/reperfusion injury pathogenesis in the renal transplantation [J]. Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova, 2012, 98(7): 906-914

的同时,也应该重视对铁和维生素 B₁₂ 的补充。

参考文献(References)

- [1] Lu Zai-ying, Zhong Nan-shan. Internal Medicine[M]. SMM7.Beijing: People's Medical Publishing House, 2010, 567
- [2] Gao Shu-sheng, Hong Yu, Liu Yue-wang, et al. Serum folate and vitamin B12 levels dynamically of normal pregnancy[J]. Chinese Journal of Perinatal Medicine, 2002, 5(1): 56-57
- [3] Wei Li-juan. The effects on pregnancy outcome and complications with supplementation folic acid to women of childbearing age [J]. China Health Care & Nutrition, 2012, 10: 3760-3761
- [4] Qi Wei-min, Chen Sha, Cheng Wen-jing. Determination of folic acid with luminescence immune method [J]. Chinese Journal of Aesthetic Medicine.Sep, 2012, 21(9): 203-204
- [5] Liu Li-hui, Cao Lu-xian. Clinical application of ferritin [J]. Clinical Focus, 2011, 26(5): 437-441
- [6] Zhou Ying-jie, Zhang Ceng-qiao, Wang Xiang-jie, et al. Scientific prevention and control anemia the new idea [M]. Beijing: King Tun Publishing House, 2012: 32
- [7] Yao Yi-xiong, Chen Ping, Su Xiao-mei, et al. Clinical Significance of Pregnant Women at Different Gestational Serum Ferritin, Folic Acid and Vitamin B₁₂[J]. Guide of China Medicine, 2009, 7(15): 35-36
- [8] Zhang Jin-hua, Yin Xi-yan. Analysis on the delivery outcome of 321 pregnancy women with anemia [J]. Modern Preventive Medicine, 2009(19): 3657-3658
- [9] Guo Ze-Xing, Lin Jin-xi, Fan Ying-xiang, et al. The relation of serum levels of transferring, ferritin, folic acid and vitamin B₁₂ in pregnant women to the eugenic [J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2011, 10(23): 1841-1842
- [10] Huang Jun, Wang Gui, Wang Jing. Investigation and analysis on the supplementary situation of folic acid in women of child-bearing age before pregnancy and at early stage of pregnancy in urban areas of Wuhan city [J]. Maternal and Child Health Care of China, 2010, 16 (04): 487-488
- [11] Ye Fang-qing, Sun Yuan, Jiang Xiao-ya, et al. Serum folate, vitamin B₁₂, homocysteine levels and clinical significance of Pregnant women [J]. Maternal and Child Health Care of China, 2006, 21 (16): 2230-2232
- [12] Javed Y, Wasim J, Shahab A. Helicobacter pylori infection and micronutrient deficiencies [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9 (10): 2137-2139
- [13] Zhu Qiu-rong, Ning Mei-hua. 1238 cases of Clinical observation of Folic acid supplementation in the before and after pregnancy [J]. Maternal and Child Health Care of China, 2009, 24(22): 3074-3075
- [14] Liang Lian-hong. The cause analysis of pregnancy complicating iron deficiency anaemia [J]. China Health Care& Nutrition, 2012, 12: 4990-4991
- [15] Li Xiao-ling. Clinical observation of incremin to prevent anemia in the middle of pregnancy [J]. Guide of China Medicine, 2011, (36): 95-96

(上接第 1042 页)

- [10] Mühlberger I, Perco P, Fechet R, et al. Biomarkers in renal transplantation ischemia reperfusion injury[J]. Transplantation, 2009, 88(3 Suppl):S14-19
- [11] Boratyńska M, Kamińska D, Mazanowska O. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury in renal transplantation [J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2004, 58: 1-8
- [12] Boratyńska M, Kamińska D, Mazanowska O. Prevention and therapy of ischemia-reperfusion injury in renal transplantation[J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2004, 58: 9-17
- [13] Feng S, Yang Q, Liu M, et al. Edaravone for acute ischaemic stroke [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2011, (12): CD007230
- [14] Kikuchi K, Uchikado H, Miyagi N, et al. Beyond neurological disease: new targets for edaravone (Review) [J]. Int J Mol Med, 2011, 28 (6): 899-906
- [15] Yang J, Liu M, Zhou J, et al. Edaravone for acute intracerebral haemorrhage[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2011, (2): CD007755
- [16] Matsuyama M, Hayama T, Funao K, et al. Treatment with edaravone improves the survival rate in renal warm ischemia-reperfusion injury using rat model[J]. Transplant Proc, 2006, 38(7): 2199-2200
- [17] 崔华庆, 贾树山. 依达拉奉对活体肾移植肾缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 实用心脑血管病杂志, 2013, 21(1): 33-34
- Cui Hua-qing, Jia Shu-shan. Protective effect of edaravone on renal transplant renal ischemia reperfusion injury [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2013, 21(1): 33-34