

· 论 著 ·

川芎嗪对草犬肾脏低温保存的实验研究

吴渊文, 宋文全, 周晨曦, 丁 俊

[摘要] 目的 研究川芎嗪对犬肾脏低温保存的影响。方法 将草犬分为四组, 分别用高渗枸橼酸盐嘌呤溶液(HC-A 液)及含川芎嗪(4 mg/L)的 HC-A 液对供肾进行灌注和保存 24、48 h, 观察肾脏形态学的改变, 并进行自体肾脏移植, 观察移植后肾功能恢复情况。结果 含川芎嗪的 HC-A 液组低温保存 48 h 后肾脏形态学改变、移植肾功能指标明显优于 HC-A 液组($P < 0.05$), 保存 24 h 两组差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 川芎嗪对低温保存较长时间的肾脏质量有明显改善作用。

[关键词] 移植; 肾; 器官保存; 川芎嗪

[中图分类号] R692 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2012)01-0032-04

Experimental research on the effect of Ligustrazine on canine kidney Cryopreservation

WU Yuan-wen, SONG Wen-quan, ZHOU Chen-xi, DING Jun. Department of Urology, 101 Hospital of PLA, Wuxi, Jiangsu 214044, China

[Abstract] **Objective** To study the application of Ligustrazine in the kidney preservation solution. **Methods** We used an isolated perfused canine kidney model. Twenty canines were randomly divided into 4 groups; in the group I and II, the kidneys were flushed with HC-A solutions, and in the group III and IV, the kidneys were flushed with HC-A solutions which Ligustrazine was added (4 mg/L). After 24 h and 48 h preservation at 4 °C, kidneys underwent histological analysis. In transplantation test, the renal function indices were assessed. **Results** Kidney histological changes and the renal function indices in the group IV were significantly superior to that of the group II ($P < 0.05$). **Conclusion** Ligustrazine could improve the quality of donor kidney that preserved for a longer time.

[Key words] transplantation; kidney; organ preservation; Ligustrazine

肾脏保存质量对肾脏移植效果有决定性作用, 因此器官保存液的改进越来越受重视。随着器官移植过程中的缺血-再灌注损伤理论的发展, 减少肾脏缺血-再灌注损伤成为提高肾脏移植成功率的重要途径。动物实验表明川芎嗪应用于肾脏低温保存后, 对肾脏缺血和再灌注损伤有保护作用^[1]。本实验通过在高渗枸橼酸盐嘌呤溶液(HC-A 液)中加入川芎嗪并进行草犬肾脏低温保存及移植实验, 进一步检验川芎嗪对肾脏保存质量的影响, 为临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物 体重 11 ~ 13 kg 的健康雄性草犬 20 条, 2 岁, 由第二军医大学动物研究所提供, 实验动物许可证号: SYXK(沪)2009-0088。

作者简介: 吴渊文(1968-), 男, 江西南昌人, 硕士, 副主任医师, 从事泌尿外科工作

作者单位: 214044 江苏无锡, 解放军 101 医院泌尿外科

通讯作者: 宋文全, E-mail: songwq2005@hotmail.com

1.2 实验药品 HC-A 液由第二军医大学长征医院制剂室提供, 川芎嗪由北京医药工业研究所提供。

1.3 肾脏保存实验

1.3.1 实验分组 草犬 20 条随机分为 4 组, 每组 5 条, I 组、II 组分别用 4°C HC-A 液对供肾进行灌注保存 24、48 h; III 组、IV 组分别用 4°C 含川芎嗪(4 mg/L)的 HC-A 液对供肾进行灌注保存 24、48 h。

1.3.2 实验方法 草犬术前静脉血测肌酐。以戊巴比妥基础麻醉成功后, 行腹部正中纵行切口; 将其左肾迅速切除, 以 2 ~ 4°C 的保存液灌注直至肾静脉流出液清亮, 肾脏变为均匀苍白, 灌注量约为 100 ~ 150 ml, 压力为 7.84 ~ 9.81 kPa (80 ~ 100 cmH₂O), 并在 0 ~ 4°C 条件下分别保存 24、48 h。再将左肾移植回草犬体内, 同时行对侧肾脏摘除术。精心饲养手术后的草犬, 记录其存活时间, 并检测其肾脏功能(分别于术后第 2、3、5、7、14 天抽静脉血测肌酐)。以 2 ~ 4°C 的保存液灌洗切下的对侧肾脏并在 0 ~ 4°C 条件下保存 24、48 h, 行光镜和电镜下的形态学观测。

1.4 检测指标 ①以光镜和电镜观察肾组织在两组保存液中保存 24、48 h 后的细胞形态学变化。②肾移植受犬术后存活时间及肾脏功能状况。

1.5 统计学处理 所有数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,使用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 形态学变化

2.1.1 I 组 光镜所见肾小球结构基本完整,可见少量变性的肾小管上皮(图 1);电镜所见核形大致正常,核质分布均匀,线粒体不同程度肿胀,嵴数量有所减少,但排列尚规律,内质网轻度水肿,近曲小管微绒毛少量水肿、脱落。毛细血管内皮细胞、足突细胞尚可分辨(图 2)。

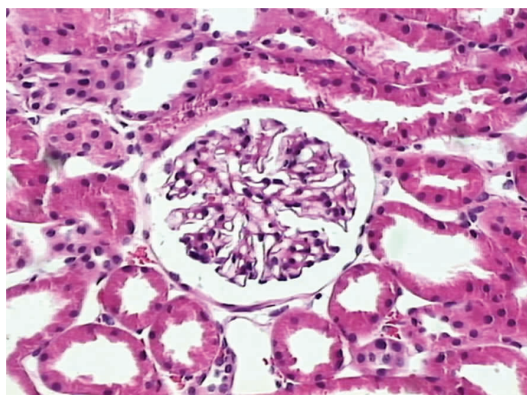


图 1 光镜显示 I 组肾结构图 (HE $\times 100$)

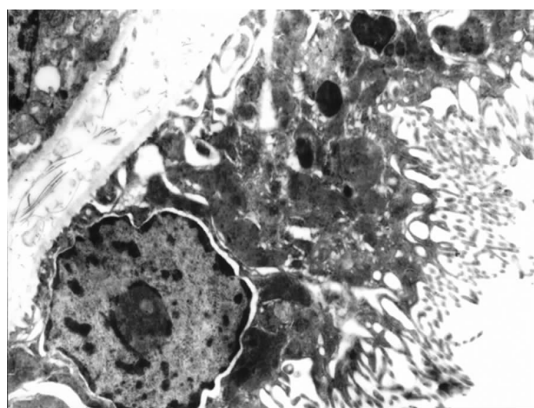


图 2 电镜显示 I 组肾结构图 ($\times 5000$)

2.1.2 II 组 光镜所见肾小球毛细血管轮廓略模糊,小管上皮广泛的中、重度变性,可见数个小灶状小管坏死(图 3);电镜所见核严重变形、核质固缩,核膜不规整,线粒体显著肿胀,嵴断裂、溶解明显,微绒毛分布散乱,大片脱落(图 4)。

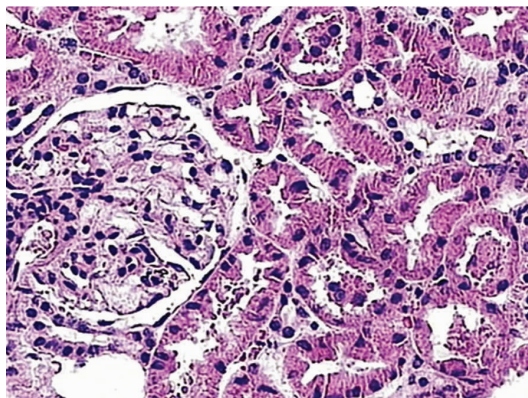


图 3 光镜显示 II 组肾结构图 (HE $\times 100$)

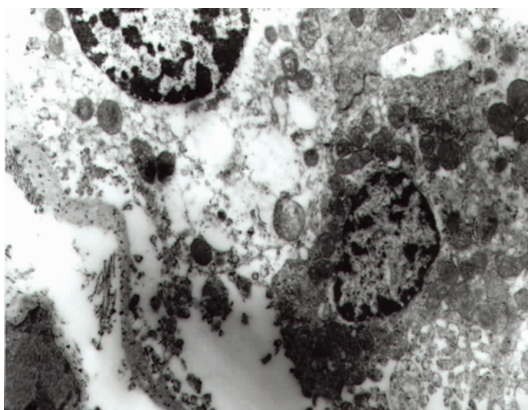


图 4 电镜显示 II 组肾结构图 ($\times 5000$)

2.1.3 III 组 光镜所见肾组织结构改变轻微,可见轮廓清晰的肾小球、肾小管,除少量肾曲管轻度浊肿外,大部分肾曲管结构正常(图 5);电镜所见核形大致正常,核质分布均匀,线粒体轻微肿胀,但嵴排列尚良好,个别嵴膜间隙略增宽。内质网亦有轻度肿胀。近曲小管上皮细胞微绒毛水肿、增粗,个别脱落。毛细血管内皮与滤过膜内皮细胞轻微水肿,结构尚清(图 6)。

2.1.4 IV 组 光镜所见肾小球毛细血管轮廓略模糊,较多肾曲管上皮呈轻中度肿胀变性,胞浆内红染的颗粒数目明显增多,且颗粒增粗,偶见曲管上皮小灶状坏死(图 7);电镜所见核略变形,核质呈边聚现象,部分核质固缩,线粒体多数肿胀,嵴减少、排列紊乱,甚至破坏、溶解。近曲小管微绒毛有较多断裂、脱落。毛细血管内皮细胞、足突细胞结构不清(图 8)。

从光镜及电镜结果看,以两组保存液分别保存 24 h 的犬肾组织损伤(主要是肾小球、肾小管损伤)无明显差别,肾细胞内结构如线粒体、内质网、细胞核均保持正常,但以含川芎嗪的 HC-A 液组在保存 48 h 后犬肾组织损伤明显轻于 HC-A 组。

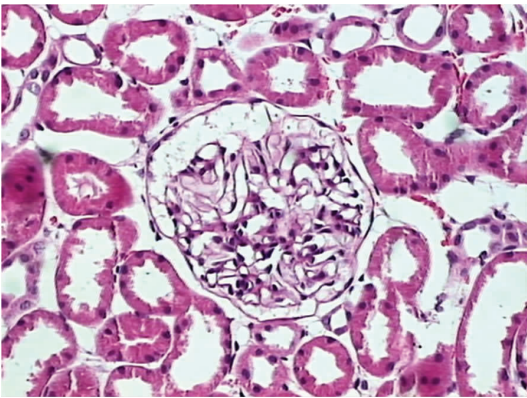


图 5 光镜显示Ⅲ组肾结构图(HE ×100)

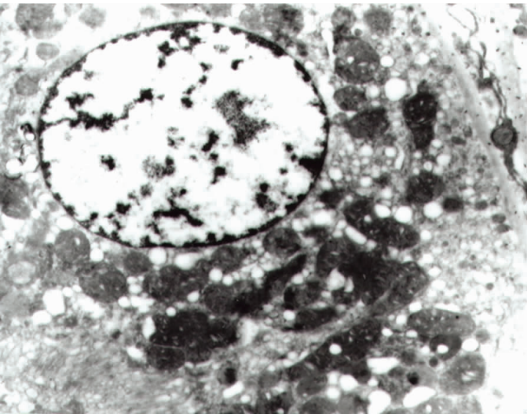


图 6 电镜显示Ⅲ组肾结构图(×5000)

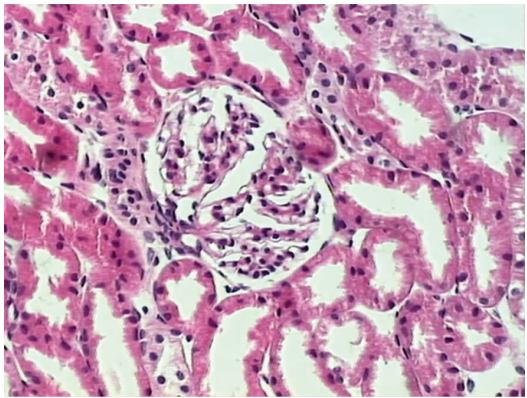


图 7 光镜显示Ⅳ组肾结构图(HE ×100)

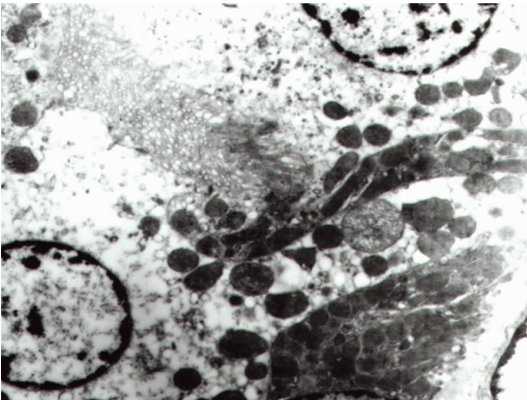


图 8 电镜显示Ⅳ组肾结构图(×5000)

2.2 移植肾功能指标 I 组、Ⅲ组液体低温保存供肾 24 h,移植后血肌酐差异无统计学意义;低温保存供肾 48 h,Ⅳ组血肌酐值明显低于Ⅱ组,差异有统计学意义 ($P<0.05$,表 1)。

表 1 四组低温保存草犬供肾 24、48 h 后
行肾移植手术前后血肌酐变化 ($\mu\text{mol/L}, \bar{x} \pm s$)

组别	术前	第 2 天	第 7 天	第 14 天
I 组(24 h)	74.0 ± 6.5	244.6 ± 58.3	85.3 ± 7.1	83.7 ± 7.1
Ⅱ组(48 h)	74.8 ± 6.0	319.6 ± 72.4	232.3 ± 54.3	139.6 ± 15.9
Ⅲ组(24 h)	74.2 ± 5.5	287.4 ± 69.8	84.5 ± 8.3	82.6 ± 7.3
Ⅳ组(48 h)	74.7 ± 5.7	265.8 ± 66.1 *	166.9 ± 43.3 *	96.7 ± 11.8 *

注:与Ⅱ组同期比较, * $P<0.05$

2.3 草犬肾脏移植后存活情况 移植后草犬存活数(>14 d)分别为: I 组为 5 条,Ⅱ组为 3 条,Ⅲ组为 5 条,Ⅳ组 4 条。

3 讨论

器官保存的缺血和再灌注损伤理论中普遍认可的是氧自由基毒性学说和钙离子超负荷学说,两者相互关联,导致细胞膜性结构破坏以及线粒体功能障碍、ATP 生成和储备减少,从而不能修复受损的组织细胞^[2-3]。我国学者尝试从中药中筛选高效低毒的药物减轻缺血和再灌注损伤,已取得一定成绩。川芎嗪是中药川芎的有效成分之一,药理研究证明,其盐酸盐和碳酸盐均具有抗血小板聚集作用,能扩张小动脉改善微循环和脑血流,提高组织耐受缺血缺氧的能力^[4]。川芎嗪还具有钙离子拮抗效应,能抑制离体细胞对钙离子的摄入,避免了细胞内钙离子超载引起的细胞损伤^[5]。

器官组织形态学的改变可以较直接地反映器官组织结构损伤。光镜可以粗略地反映损伤情况,集中表现在肾小球的结构轮廓及曲管细胞的变性、坏死的程度和范围。而电镜则细致地反映出细微组织损伤情况,其中有代表性的改变是线粒体^[6-7]。线粒体发生轻度溶解变性或肿胀变性均属于可逆性代谢性改变,仍能进行三羧酸循环和氧化磷酸化反应。只有当内外膜胀裂、基质逸出时才失去功能^[8-9]。

从光镜及电镜结果看,两组保存液在保存 24 h 的犬肾组织损伤(主要是肾小球、肾小管损伤)无明显差别;在保存 48 h 时含川芎嗪的 HC-A 液组的犬肾组织损伤明显轻于 HC-A 液组,表现为肾细胞内线粒体溶解变性或肿胀变性程度明显减轻。移植实验证明在保存 48 h 时含川芎嗪的 HC-A 液组的肾功能指标明显好于 HC-A 液组。究其原因,本研究认为与川芎嗪能保护缺血再灌注肾脏线粒体结构的

完整性、改善肾脏低温保存及再灌注时能量代谢有关。

川芎嗪能改善肾脏低温保存及再灌注时能量代谢,机制可能为①扩张肾血管,改善了微循环。②川芎嗪的钙离子拮抗作用抑制了细胞的钙离子超载,减轻低温保存期间细胞膜、线粒体膜和内质网膜上钙泵的负荷,减少了对能量的需求,细胞内的能量平衡因而得以长期维持^[10-12]。动物器官移植实验表明川芎嗪对肾脏缺血和再灌注损伤有保护作用,下一步可通过临床应用进一步加以验证。

【参考文献】

[1] 吴渊文,周晨曦,周 赞,等. 川芎嗪改善肾脏低温保存效果的实验研究[J]. 中国微循环,2005,9(1):26-27.

[2] Menger MD, Vollmar B. Pathomechanisms of ischemia-reperfusion injury as the basis for novel preventive strategies; is it time for the introduction of pleiotropic compounds[J]. Transplant Proc,2007,39(2):485-488.

[3] 张育才,匡重申,曾因明. 钙蛋白抑制剂 calpeptin 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 东南国防医药,2007,9(4):241-242.

[4] 王振猛,张 鹏,唐 乙,等. 川芎嗪对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 药物服务与研究,2010,16(1):3343-3346.

[5] 陈辉乐,毛朝鸣,方周溪,等. 川芎嗪对兔肾缺血再灌注损伤超微结构改变的干预作用[J]. 温州医学院学报,2007,10(1):30-32.

[6] Rusai K, Huang H, Sayed N, et al. Administration of interleukin-1 receptor antagonist ameliorates renal ischemia-reperfusion injury[J]. Transpl Int,2008,21(6):572-580.

[7] 陈增刚,蒋电明,欧云生,等. 大鼠坐骨神经-20℃川芎嗪玻璃化液保存对异体移植后神经再生的影响[J]. 第四军医大学学报,2009,30(11):978-981.

[8] 叶 青,徐 达,王祥慧,等. 丹参注射液和川芎嗪防治肾缺血再灌注损伤的对比研究[J]. 上海中医药大学学报,2007,21(5):49-52.

[9] 范国华,黄 杰. 川芎对幼兔肺缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 武汉大学学报:医学版,2010,31(5):616-618.

[10] 曹正品,陈春生,赵志伟,等. 川芎嗪对皮瓣缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中华组织工程研究与临床康复,2010,14(19):172-173.

[11] Chen SY, George H, Hwongru H, et al. Tetra-methylpyrazine induces heme oxygenase-1 expression and attenuates myocardial ischemia reperfusion injury in rats [J]. J Biomed Sci, 2006, 13(5):731-740.

[12] 陈德森,郭俐宏,李 莉,等. 川芎嗪对大鼠局限性脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 山西医科大学学报,2010,41(9):780-783.

(收稿日期:2011-05-20;修回日期:2011-11-15)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)

(上接第 26 页)

内膜及肌壁均未见癌组织侵犯;子宫旁组织未见癌组织侵犯;双侧附件、子宫阔韧带未见癌组织侵犯。出院后 1 个月至外院化疗 4 个疗程,后因不能耐受停止化疗,改口服中药。术后半年复查阴道残端愈合好,CT 及 B 超检查未发现盆腔病变。

2 讨 论

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤,原发癌多见,转移癌较少见,国内外报道较少,原发灶包括胃、卵巢、结肠、乳腺、肾、胰脏^[1]。结肠癌早期易出现淋巴转移,晚期癌细胞及癌栓通过门脉系统血行转移至肝脏多见,宫颈转移较罕见,浙江省肿瘤医院曾对该院 1994 年至 2007 年该症患者进行报道,8 例术后病理发现当病灶侵犯宫体时表现为外膜到肌层的受累模式,故认为肿瘤经腹膜播散,直接浸润是其主要转移途径^[2],亦有文献通过分析患者 MRI 图像后得出该结论^[3]。但该例患者病灶未侵犯宫体,且病理示宫颈外环完

整,故其转移途径不明。结肠癌转移宫颈治疗目前尚无统一意见,多数认为对于能手术患者选择以手术为主的综合治疗可使其生存期延长,通过手术达到根治及最大程度的减瘤,术后再通过放化疗控制可能存在的转移灶及术后残留病灶,从而提高疗效。

【参考文献】

[1] 吴小华. 实用妇科肿瘤学[M]. 南京:江苏科学技术出版社,2005:302-303.

[2] 殷卓敏. 胃癌与结直肠癌宫颈转移 22 例临床分析[J]. 中国癌症杂志,2009,19(3):210-213.

[3] Metser U, Haider MA, Khalili K, et al. MR imaging findings and patterns of spread in secondary tumor involvement of the uterine body and cervix[J]. AJR,2003,180(3):765-769.

(收稿日期:2011-07-25)

(本文编辑:黄攸生)