

大黄素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, 张卓然², 田立志³, 王科亮¹, 张锐⁴

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 药剂科, 黑龙江 哈尔滨 150001

3. 大庆市红岗区人民医院, 黑龙江 大庆 163000

4. 黑龙江省医院 泌尿外科, 黑龙江 哈尔滨 150001

摘要: **目的** 探讨大黄素对犬自体肾移植缺血再灌注损伤的影响及机制。**方法** 将 18 只健康杂种犬随机分为假手术组、大黄素组和生理盐水组, 每组各 6 只。假手术组仅进行肾手术切除; 大黄素组在术前 2 h 按 10 mg/kg ip 大黄素, 生理盐水组同法使用相同体积的生理盐水。再灌注 1 h 后检测 MDA、MPO、SOD、iNOS、eNOS 的水平; 术后 24 h 检测血清肌酐 (Cr)、尿素氮 (BUN) 水平以及 TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-10 炎性因子的水平; 光镜下观察肾组织病理学改变。**结果** 生理盐水组的 MDA、iNOS 水平显著高于假手术组, 但 MPO、SOD、eNOS 水平低于假手术组 ($P < 0.05$); 大黄素组的 MDA、iNOS 水平显著低于生理盐水组, 但 MPO、SOD、eNOS 水平高于假手术组 ($P < 0.05$)。生理盐水组的 BUN、Cr、TNF- α 、IL-6、IL-8 水平显著高于假手术组, 但 IL-10 水平低于假手术组 ($P < 0.05$); 大黄素组的 BUN、Cr、TNF- α 、IL-6、IL-8 水平显著低于生理盐水组, 但 IL-10 水平高于生理盐水组 ($P < 0.05$), 肾损伤明显减轻。**结论** 大黄素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以及抑制炎性因子有关。

关键词: 大黄素; 肾移植; 缺血再灌注损伤; 氧自由基; 犬

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2014)02-0131-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.02.005

Protective effect of emodin on ischemia reperfusion injury of kidney autotransplantation

QIAO Zhen-kui¹, ZHANG Zhuo-ran², TIAN Li-zhi³, WANG Ke-liang¹, ZHANG Rui⁴

1. Department of Urology, Forth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

2. Department of Pharmacy, Forth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

3. People's Hospital of Daqing Honggang District, Daqing 163000, China

4. Department of Urology, Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin 150001, China

Abstract: Objective To study the mechanism of emodin on ischemia and reperfusion injury in canine autologous renal transplantation. **Methods** 18 Healthy mongrel dogs were randomly divided into sham group, emodin group, and normal saline group with 6 dogs in each group. Sham group received kidney operation resection. Dogs in emodin group were injected dosage of 10 mg/kg emodin at 2 h before surgery by intraperitoneal injection, and normal saline group with the method using the same volume. MDA, MPO, SOD, iNOS, and eNOS activity were detected after reperfusion after 1 h, and postoperative serum creatinine (Cr) and blood urea nitrogen (BUN) concentration and the level of TNF- α , IL-6, IL-8, and IL-10 inflammatory factor after 24 h were determined. Renal tissues were observed under light microscope pathological changes. **Results** The content of MDA, iNOS, BUN, Cr, TNF- α , IL-6, and IL-8 in normal saline group was significantly higher than that in sham group, while the content of MPO, SOD, eNOS, and IL-10 on the contrary ($P < 0.05$). The content of MDA, iNOS, BUN, Cr, TNF- α , IL-6, and IL-8 in emodin group was significantly lower than that in normal saline group, while the contents of MPO, SOD, eNOS, and IL-10 on the contrary ($P < 0.05$). Renal injury in emodin group were significantly reduced. **Conclusion** Emodin can alleviate the ischemia reperfusion injury in renal transplantation, and the mechanism may be related to reduce renal lipid peroxidation and inhibition of inflammatory factor.

Key words: emodin; kidney transplantation; reperfusion injury; oxygen free radical; dogs

收稿日期: 2013-11-03

基金项目: 黑龙江省青年科学基金资助项目 (QC2012C106)

作者简介: 乔振奎 (1978—), 男, 主治医师, 硕士, 从事泌尿外科肾移植、肾肿瘤研究。Tel: (0451)82576558 E-mail: qiaozenkui1978@126.com

肾移植对于治疗终末期肾病是一个有效的方法，但是肾移植术中不可避免地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。如何减轻肾脏缺血再灌注损伤是肾移植领域研究热点之一。大黄素是一种蒽醌类化合物，具有抗氧化、清除自由基、抗炎、抗肿瘤等作用^[1-4]。研究表明，大黄素对脑、肝、肠等器官缺血再灌注损伤具有保护作用^[5-7]。本实验研究了大黄素对肾缺血再灌注损伤的保护作用，以期给临床肾移植治疗带来新思路。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

Bear 1000 型呼吸机(上海寰熙医疗器械有限公司)，灌注装置(3 L 静脉营养袋加压力表自制)，AMS200 自动生化仪(北京奥普森科技发展有限公司)，PM2000 监护仪(上海维世康医用电子有限公司)，Swan Ganz 导管(美国 Arrow 公司)，Horiba 透射电镜、L1500B 光学显微镜(深圳市瑞鑫达仪器有限公司)。

MDA、MPO、SOD、iNOS 检测试剂盒(南京建成生物研究所)，eNOS、TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-10 检测试剂盒(美国 ADL 生物公司)，大黄素(质量分数为 98%，西安融升生物科技有限公司)，丁丙诺啡(青海制药厂有限公司)，氯胺酮(北京双鹤药业股份有限公司)，地西洋(吉林钰洋药业有限公司)，头孢唑林(深圳华润九新药业有限公司)，吗啡(东北制药集团沈阳第一制药有限公司)。

雄性健康成年杂种犬，体质量 15~20 kg，哈尔滨医科大学实验动物中心提供，合格证号 SCXK(黑)2010—2013。

1.2 动物分组和模型的建立^[8]

选择 18 只犬，随机分为 3 组，分别为假手术组、大黄素组和生理盐水组，每组 6 只。假手术组犬禁食水一夜，麻醉前 ih 丁丙诺啡(0.02 mg/kg)，上腔静脉置入深静脉导管，预防性使用头孢唑林(22

mg/kg, iv)。麻醉诱导使用氯胺酮(2 mg/kg, iv)和地西洋(2 mg/kg, iv)，麻醉维持使用异氟醚，吸入 100% O₂。硬膜外注射吗啡(0.1 mg/kg)用于延长术后止痛。腹部清洁消毒，正中切口，推开肠管，分离左肾周围结缔组织，按外侧、上极、前侧、下极、后侧的顺序逐渐游离，至输尿管近膀胱处剪断、结扎。于近腹主动脉和下腔静脉处将肾动、静脉结扎、切断，残端双重结扎。大黄素组犬术前 2 h 按 10 mg/kg ip 大黄素^[9]，手术步骤同上。将左肾移植入原供体的髂窝，随后将对侧肾切除，总再缺血时间定义为肾动静脉开始嵌夹到再灌注开始。生理盐水组犬以生理盐水代替大黄素，按以上步骤处理。

1.3 观察指标

再灌注 1 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。取一定量肾组织制成组织匀浆，按试剂盒操作指南检测 MDA、MPO 水平；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、TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-10。全自动生化分析仪测定血清 Cr、BUN。

1.4 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 倍镜下观察肾组织病理学改变。

1.5 统计学分析

采用 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。

2 结果

2.1 MDA、MPO、SOD、iNOS、eNOS 水平测定

各组肾组织中 MDA、MPO 的水平及血浆中检测的 SOD、iNOS、eNOS 的水平见表 1。可见生理盐水组的 MDA、iNOS 水平显著高于假手术组，但 MPO、SOD、eNOS 水平低于假手术组($P < 0.05$)；大黄素组的 MDA、iNOS 水平显著低于生理盐水组，但 MPO、SOD、eNOS 水平高于假手术组($P < 0.05$)。

表 1 各样本中 MDA、MPO、SOD、iNOS、eNOS 水平的测定 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Levels of MDA, MPO, SOD, iNOS, and eNOS in samples ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	MPO/(U·g ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	iNOS/(U·L ⁻¹)	eNOS/(ng·mL ⁻¹)
假手术	12.03±2.71	0.52±0.10	382.96±13.12	73.54±13.98	375.13±17.04
大黄素	16.79±3.90*	1.42±0.22*	329.18±22.01*	128.35±22.01*	319.78±23.25*
生理盐水	21.66±2.69*#	1.83±0.31*#	288.79±26.39*#	175.10±21.13*#	280.02±25.20*#

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与大黄素组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs Sham group; # $P < 0.05$ vs emodin group

2.2 术后 24 h 肾功及相关炎症因子的比较

血清检测 BUN、Cr 结果见表 2。生理盐水组的 BUN、Cr、TNF- α 、IL-6、IL-8 水平显著高于假手术

组，但 IL-10 水平低于假手术组 ($P < 0.05$)；大黄素组的 BUN、Cr、TNF- α 、IL-6、IL-8 水平显著低于生理盐水组，但 IL-10 水平高于生理盐水组 ($P < 0.05$)。

表 2 术后 24 h 各组 BUN、Cr、TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-10 水平的测定 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Levels of BUN, Cr, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 in the groups at postoperative 24 h ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	BUN/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Cr/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	TNF- α (ng·L ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	IL-8/(pg·mL ⁻¹)	IL-10/(pg·mL ⁻¹)
假手术	12.68 \pm 0.32	57.24 \pm 13.99	61.18 \pm 5.01	161.18 \pm 25.21	40.18 \pm 3.95	66.34 \pm 6.91
大黄素	14.78 \pm 2.31*	215.10 \pm 22.13*	62.24 \pm 4.86	163.14 \pm 22.46	41.58 \pm 2.95*	67.13 \pm 5.88*
生理盐水	19.19 \pm 2.43*#	386.05 \pm 112.02*#	82.96 \pm 8.12*#	382.96 \pm 17.13*#	63.96 \pm 6.43*#	57.42 \pm 5.93*#

与假手术组比较：* $P < 0.05$ ；与大黄素组比较：# $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs Sham group; # $P < 0.05$ vs emodin group

2.3 肾组织形态学改变比较

假手术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；生理盐水组的间质水肿明显，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；大黄素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。

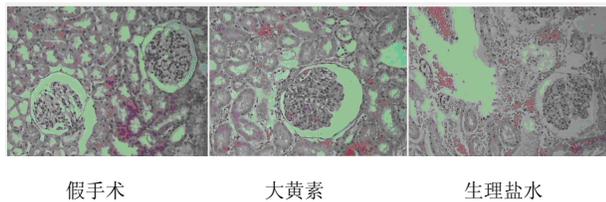


图 1 各组肾组织的光镜检查结果

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^[10-13]。缺血再灌注损伤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^[14-17]。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和急剧“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。缺血再灌注损伤不是单纯的肾小管疾病或血管疾病，也是一种严重的炎症过程^[18]。Kielar 等^[19]认为，炎症过程始于血管内皮损伤和肾小管细胞功能障碍，一系列的免疫调节细胞因子，包括 IL-1、IL-6、IL-8、TGF- β 、TNF- α 和单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1)，分别释放入肾组织和血液。针对间质炎症治疗肾脏缺血再灌注损伤的研究已取得很大的进展。IL-10 可通过抑制 Th1 细胞的功能缓解缺血再灌注损伤^[20]；抗 IL-6 单克隆抗体则通过抑制促炎性介质的产生和中性粒细胞的浸润保护肾脏^[21]。因此，清除氧自由基和抑制炎症因子是预防肾移植再灌注损伤的首要措施。

近年来，大黄素在多种器官缺血再灌注损伤中显示了较好的保护作用。刘瑞林等^[3]研究显示，大黄素可减少 TNF- α 、NO 释放，抑制过度炎症反应，减轻中性粒细胞聚集及活化，减少大鼠氧自由基的生成，对大鼠肠 I/R 损伤具有保护作用。林胜璋等^[6]探讨了大黄素对肝脏缺血 - 再灌注损伤的保护作用，显示大黄素能减轻肝脏缺血再灌注后脂质过氧化程度和肝窦内皮细胞损伤。大黄素对脑组织缺血再灌注损伤也有较好的保护作用^[7]。本实验研究了大黄素对肾缺血再灌注损伤的保护作用，结果显示，光镜下大黄素组的肾组织损伤明显减轻。在肾脏组织中，生理盐水组的 MDA、iNOS 水平显著高于假手术组，但 MPO、SOD、eNOS 水平低于假手术组

($P < 0.05$); 大黄素组的 MDA、iNOS 水平显著低于生理盐水组, 但 MPO、SOD、eNOS 水平高于假手术组 ($P < 0.05$)。生理盐水组的 BUN、Cr、TNF- α 、IL-6、IL-8 水平显著高于假手术组, 但 IL-10 水平低于假手术组 ($P < 0.05$); 大黄素组的 BUN、Cr、TNF- α 、IL-6、IL-8 水平显著低于生理盐水组, 但 IL-10 水平高于生理盐水组 ($P < 0.05$)。表明大黄素通过抑制 MDA、MPO、iNOS 与炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-8 水平以及提高 eNOS、SOD、IL-10 水平来减轻肾移植术后再灌注损伤, 以起到保护作用。

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。大黄素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地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, 为临床肾移植后缺血再灌注损伤的预防和治疗提供理论依据。

参考文献

- [1] 梁生旺. 中药制剂分析 [M]. 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 120-124.
- [2] 丁艳, 黄志华. 大黄素药理作用研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2007, 23(5): 236-238.
- [3] 保永亮, 龚晓燕, 黄金玲, 等. 大黄素对人胃癌 MNK-45 和 MGC8-03 细胞增殖的影响 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(6): 408-411.
- [4] 关翠雯, 金晶, 朱少华, 等. 大黄素诱导人肾上皮 HK-2 细胞凋亡及内质网应激的介导作用 [J]. 中草药, 2013, 44(12): 1621-1627.
- [5] 刘瑞林, 张嘉, 吴薇, 等. 大黄素对肠缺血/再灌注损伤保护作用的实验研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(1): 45-47.
- [6] 林胜璋, 余耀军, 游涛, 等. 大黄素对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的预防作用 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2006, 12(2): 136-138.
- [7] 谭力, 王联英, 向海鹰, 等. 大黄素对脑缺血再灌注大鼠的保护作用及机制研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(9): 1100-1101.
- [8] 朱耿隆, 王长希, 卢剑. 自体 Beagle 犬肾移植模型的建立 [J]. 海南医学, 2009, 20(5): 3-5.
- [9] Liang J W, Hsiu S L, Wu P P, et al. Emodin pharmacokinetics in rabbits [J]. *Planta Med*, 1995, 61(5): 406-408.
- [10] O'Neill S, Ross J A, Wigmore S J, 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.
- [11] 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.
- [12] Minguet G, Brichant J F, 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.
- [13] Minamino T. Cardioprotection from ischemia/reperfusion injury: basic and translational research [J]. *Circ J*, 2012, 76(5): 1074-1082.
- [14] Vatazin A V, Astakhov P V, Zul'kamaev A B, et al. Cellular factors of ischemia/reperfusion injury pathogenesis in the renal transplantation [J]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*, 2012, 98(7): 906-914.
- [15] Mühlberger I, Perco P, Fechete R, et al. Biomarkers in renal transplantation ischemia reperfusion injury [J]. *Transplantation*, 2009, 88(3 Suppl): S14-S19.
- [16] Boratyńska M, Kamińska D, Mazanowska O. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury in renal transplantation [J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2004, 58: 1-8.
- [17] 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.
- [18] 李雪, 孙启. 移植肾缺血-再灌注损伤与炎症和微血管病变 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2012, 21(3): 287-290.
- [19] Kielar M L, John R, Bennett M, et al. Maladaptive role of IL-6 in ischemic acute renal failure [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(11): 3315-3325.
- [20] Deng J, Kohda Y, Chiao H, et al. Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury [J]. *Kidney Int*, 2001, 60(6): 2118-2128.
- [21] Patel N S, Chatterjee P K, Di Paola R, et al. Endogenous interleukin-6 enhances the renal injury, dysfunction, and inflammation caused by ischemia/reperfusion [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 312(3): 1170-1178.