

## HCA-Ⅱ 肾保存液对肾脏低温保存效果的实验研究

吴渊文,朱有华\*,杨军昌,鲁可权,张明,高晓刚,张纯

(第二军医大学长征医院器官移植中心,上海 200003)

**[摘要]** 目的:研究 HCA-Ⅱ 肾保存液对草犬肾脏低温保存的效果。方法:采用草犬肾脏非循环离体灌注模型,比较 HCA-Ⅱ 液、UW 液和高渗枸橼酸盐嘌呤溶液(HC-A 液)低温保存肾脏后其形态学及生物化学指标的改变,并进行自体肾脏移植,观察移植后肾功能恢复情况。结果:HCA-Ⅱ 液组保存 48、72 h 后,形态学改变、肾脏线粒体呼吸控制率(RCR)和皮质 ATP 含量、移植肾功能指标明显优于 HC-A 液( $P < 0.05$ ),与 UW 液组无明显差异;低温保存供肾 24 h,3 组上述指标无显著差异。保存 24、48、72 h 后保存液 pH 值,HCA-Ⅱ 液组均明显高于 HC 液组( $P < 0.05$ )。结论:HCA-Ⅱ 液保存犬肾 48 h 及 72 h 效果优于 HC-A 液,与 UW 液相当。

**[关键词]** 高渗枸橼酸盐嘌呤溶液;肾;器官保存

**[中图分类号]** R 692

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2004)08-0852-03

## Cryopreservation of canine kidneys with HCA-Ⅱ kidney preservation solution

WU Yuan-Wen, ZHU You-Hua\*, YANG Jun-Chang, LU Ke-Quan, ZHANG Ming, GAO Xiao-Gang, ZHANG Chun (Department of Urology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the cryopreservation effect of HCA-Ⅱ kidney preservation solution in preserving canine kidneys. **Methods:** The preservation effect of HCA-Ⅱ solution was compared with those of UW solution and HC-A solution in the isolated perfused canine kidney model. After cold preservation, histological changes and biochemical indices of kidneys were analyzed. Then autotransplantation was performed and kidney function changes were studied. **Results:** After 48 h and 72 h cold preservation, histological changes, biochemical functions in HCA-Ⅱ group were better than those of HC-A group ( $P < 0.05$ ), but had no significant difference from those of UW group. The indices of the 3 groups were similar within 24 h cryopreservation. pH values in HCA-Ⅱ group were markedly higher than those in HC-A group with cryopreservation ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The effects of 48 h and 72 h cryopreservation of canine kidneys with HCA-Ⅱ solution are better than those of HC-A solution, similar to those of UW solution.

**[KEY WORDS]** transplantation; kidney; organ preservation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(8): 852-854]

高渗枸橼酸盐嘌呤(HC-A)溶液作为肾保存液经过近 20 年的临床应用,已经得到广泛的肯定,在国内肾脏移植领域发挥了重要作用。近年来随着器官保存及器官移植过程中的缺血再灌注损伤理论的发展,我们在 HC-A 液的基础上作了改进,研制成功 HCA-Ⅱ 肾保存液。在此基础上,我们采用离体肾脏灌注模型,观察了 HCA-Ⅱ 液对肾脏的低温保存效果,并与 HC-A 液、UW 液进行了比较,现报告如下。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物 健康成年雄性草犬 45 条,体质量 11~13 kg,由第二军医大学实验动物中心提供。

1.2 器官保存液 (1)HCA-Ⅱ 液:在 HC-A 液基础上加入组氨酸、盐酸组氨酸,两者比例为 10:1,钾离子浓度调整为 105 mmol/L,钠离子浓度为 45 mmol/L,硫酸镁为 5 mmol/L,并加入还原型谷胱甘肽、腺苷、川芎嗪等成分;pH 值为(7.40±0.05),

渗透压为(340±10) mmol/L。(2)HC-A 液:由长征医院制剂室生产。(3)UW 液:美国威斯康星大学器官移植中心馈赠。

## 1.3 方法

1.3.1 实验分组 草犬随机分成 HCA-Ⅱ 液组、HC-A 液组和 UW 液组,每组 15 条,各组再随机均分成 3 小组,分别为保存 24、48、72 h 组。

1.3.2 保存实验 采用离体肾脏灌注模型,取肾后以 0~4℃的 HCA-Ⅱ 液、HC-A 液和 UW 液灌注并低温保存 24、48、72 h,然后行草犬自体肾脏移植。

1.3.3 检测指标 (1)以光镜和电镜观察肾组织在 3 种保存液中保存 24、48、72 h 后的细胞形态学变

**[基金项目]** 上海市科委基金资助项目(024919006)。

**[作者简介]** 吴渊文(1968-),男(汉族),硕士,主治医师。现在解放军第 101 医院泌尿外科,无锡 214044。

E-mail: yuanwenw@yahoo.com.cn

\*Corresponding author. Tel: 021-63610109-73949

化。(2)低温延时保存后肾组织生物化学的改变:按中国科学院生物物理研究所分离线粒体的方法测得线粒体蛋白含量,计算出肾脏线粒体呼吸控制率(RCR);根据 Strehler 法采用荧光发光微量检测技术测定皮质 ATP 含量变化。(3)保存液 pH 值测定:检测肾脏低温保存后各保存液 pH 值。(4)肾移植受犬术后存活时间及肾脏功能状况。

1.4 统计学处理 所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验。

## 2 结果

2.1 形态学变化 从光镜及电镜结果看,3 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,但在保存 48 h 及 72 h 时

HCA-Ⅱ 组的犬肾组织损伤与 UW 液组相当,均明显轻于 HC-A 组,而且随着时间延长差异越显著。

2.2 生物化学指标 3 组液体低温保存犬肾脏 24 h,RCR、皮质 ATP 含量差异无显著性,保存 48、72 h,HCA-Ⅱ 液组与 UW 液组 RCR、皮质 ATP 含量差异无显著性,但均优于 HC-A 液组,差异有显著意义( $P < 0.05$ ),见表 1。

2.3 保存液 pH 值 肾脏保存 24、48 h 后,保存液 pH 值 HC-A 液组( $7.03 \pm 0.04, 6.91 \pm 0.04$ )明显低于 UW 液组( $7.38 \pm 0.05, 7.32 \pm 0.05$ )和 HCA-Ⅱ 液组( $7.38 \pm 0.05, 7.36 \pm 0.05$ )( $P$  均  $< 0.05$ );保存 72 h 后,HC-A 液组( $6.85 \pm 0.04$ )明显低于 UW 液组( $7.18 \pm 0.05, P < 0.05$ ),而 UW 液组明显低于 HCA-Ⅱ 液组( $7.32 \pm 0.05, P < 0.05$ )。

表 1 3 组液体低温保存犬肾脏组织生物化学改变

Tab 1 Changes of canine kidney biochemical indices during cryopreservation with 3 kinds of solutions

Group	RCR(%)			ATP( $mg/\mu mol \cdot g^{-1}$ )		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
HCA-Ⅱ	$3.06 \pm 0.41$	$2.82 \pm 0.33^*$	$2.78 \pm 0.31^*$	$2.46 \pm 0.46$	$2.15 \pm 0.43^*$	$1.89 \pm 0.39^*$
HC-A	$2.93 \pm 0.36$	$2.37 \pm 0.30$	$2.15 \pm 0.28$	$2.23 \pm 0.42$	$1.64 \pm 0.38$	$1.37 \pm 0.31$
UW	$2.99 \pm 0.38$	$2.85 \pm 0.34^*$	$2.80 \pm 0.31^*$	$2.39 \pm 0.42$	$2.11 \pm 0.39^*$	$1.86 \pm 0.35^*$

\* $P < 0.05$  vs HC-A group

2.4 移植肾功能指标 3 组液体低温保存供肾 24 h,移植后血肌酐差异无显著性,低温保存供肾 48、

72 h,HCA-Ⅱ 液组与 UW 液组血肌酐差异无显著性,但均明显低于 HC-A 液组( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 3 组液体低温保存供肾不同时间草犬手术前后血肌酐变化

Tab 2 Changes of serum creatinine before and after renal transplantation during cryopreservation with 3 kinds of solutions

Group		Serum creatinine( $\mu mol \cdot L^{-1}$ )			
		Before transplantation	2 d after transplantation	7 d after transplantation	14 d after transplantation
HCA-Ⅱ	24 h	$73.6 \pm 6.5$	$246.4 \pm 58.7$	$85.6 \pm 7.4$	
	48 h	$74.8 \pm 5.7$	$266.7 \pm 66.3^*$	$168.5 \pm 43.6^*$	$96.3 \pm 11.7^*$
	72 h	$74.2 \pm 5.4$	$312.5 \pm 74.2^*$	$204.4 \pm 49.3^*$	$141.5 \pm 23.4^*$
HC-A	24 h	$74.0 \pm 5.6$	$285.3 \pm 68.9$	$83.7 \pm 8.2$	
	48 h	$73.8 \pm 6.0$	$319.6 \pm 72.4$	$229.3 \pm 53.8$	$138.7 \pm 15.6$
	72 h	$75.1 \pm 6.4$	$383.1 \pm 71.2$	$323.8 \pm 69.1$	$235.2 \pm 47.1$
UW	24 h	$74.5 \pm 5.8$	$235.7 \pm 63.3$	$83.7 \pm 8.4$	
	48 h	$73.6 \pm 5.9$	$264.5 \pm 69.1^*$	$162.5 \pm 52.9^*$	$102.5 \pm 15.9^*$
	72 h	$75.3 \pm 6.1$	$298.8 \pm 71.6^*$	$221.6 \pm 59.8^*$	$157.4 \pm 39.6^*$

\* $P < 0.05$  vs HC-A group

2.5 草犬肾脏移植后存活情况 3 组低温保存供肾 24、48、72 h,移植后草犬存活数( $> 14$  d):HCA-Ⅱ 液组分别为 5、4、3 条;HC-A 液组为 4、4、2 条;UW 组为 5、4、3 条。

## 3 讨论

在临床应用中,我们发现 HC-A 肾保存液存在以下缺点:(1)硫酸镁浓度较大,低温时可析出,沉淀于保存液和肾血管中。(2)甘露醇可能对离体肾脏有

损害。(3)pH值偏低且不稳定,不足以防止细胞的酸化作用。HCA-Ⅱ离体肾保存液主要改进为:(1)离子浓度调整为细胞内液型(高钾低钠),细胞内外离子浓度相似,保存期间细胞内外离子交换减少,能量消耗减少,有利于再灌注时迅速恢复跨膜阳离子梯度和细胞功能,最主要的是细胞内液型保存液的低 $\text{Na}^+$ 将明显减少 $\text{Na}^+$ 离子的内流,减少细胞内 $\text{Na}^+$ 离子的聚集,能阻止细胞水肿的发生<sup>[1]</sup>。明显降低了硫酸镁浓度,减少了其低温时的析出。(2)以组氨酸/组氨酸盐酸替代甘露醇,其浓度比为150/15(mmol/L),如此高浓度的缓冲对作为一种非渗透性成分,能明显抑制组织的酸化<sup>[2]</sup>。(3)加入右旋糖酐40,它对微循环有较好的作用,有利于再灌注,可增加保存效果<sup>[3]</sup>。(4)加入具有可清除氧自由基作用的川芎提取物——川芎嗪,它是川芎的有效成分之一,化学结构为四甲基吡嗪(TMP),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,并对已聚集的血小板有解聚作用,尚能扩张小动脉改善微循环和脑血流,产生抗血栓形式和溶血栓的作用<sup>[4]</sup>。川芎嗪还具有钙拮抗效应,能抑制离体细胞对钙离子的摄入,避免了细胞内钙超载引起的细胞损伤<sup>[5]</sup>。

线粒体在维持肾脏能量供给方面起重要作用,肾脏缺血再灌注后,线粒体功能降低,RCR随之降低<sup>[6]</sup>。组织中能量物质与保存器官生存能力密切相关<sup>[7]</sup>。实验表明HCA-Ⅱ液低温保存肾脏较长时间(48、72 h)后,无论是从肾脏形态学改变、能量物质含量与生物化学改变,还是从动物移植肾功能指标来看,其效果基本类同于UW液,明显优于HC-A液,而在低温保存供肾24 h情况下,从上述指标看3组液体无显著差异。我们认为改善肾脏低温保存及再灌注时能量代谢是HCA-Ⅱ液有效保存肾脏的重要因素之一。HCA-Ⅱ液低温保存肾脏组织ATP含量减少缓于HC-A液的可能机制为:(1)扩张肾血管,改善了微循环,与HCA-Ⅱ液中含有低分子右旋糖酐40及川芎嗪有关;(2)HCA-Ⅱ液中离子浓度调整为细胞内液型,有助于保持细胞膜的稳定,川芎嗪的钙拮抗效应可进一步减轻了细胞膜的损伤。

保持溶液的缓冲能力、预防细胞内酸中毒也十分重要。低温冷冻保存状态下,由于缺血缺氧,将促进组织糖酵解和糖原分解,同时又促进乳酸的生成和其浓度的增加,导致组织酸化。组织酸化可损伤细

胞并且导致溶酶体的不稳定,激活溶酶体和损害线粒体性能,因此防治细胞酸化是器官保存的一个重要环节<sup>[8]</sup>。本研究表明HCA-Ⅱ液的缓冲能力优于HC-A液及UW液,与其含有极强的缓冲体系组氨酸/组氨酸盐酸有关。

HCA-Ⅱ肾保存液易于配制,成本较低,长期保存效果好,下一步将在临床应用实验中验证其效果。

#### [参考文献]

- [1] Yoshida H, Okuno H, Kamoto T, et al. Comparison of the effectiveness of ET-Kyoto with Euro-Collins and University of Wisconsin solutions in cold renal storage[J]. *Transplantation*, 2002, 74(9):1231-1236.
- [2] Richter S, Yamauchi J, Minor T, et al. Heparin/phento-lamine does not improve kidney perfusion with HTK solution after prolonged warm ischemia in a rat non-heart-beating donor model[J]. *Transplant Proc*, 2000, 32(1):23-24.
- [3] 郑军华, 闵志廉, 李玉莉, 等. 自制长征-1号多器官保存液的动物实验和部分临床应用研究[J]. 第二军医大学学报, 1999, 20(6):341-345.  
Zheng JH, Min ZL, Li YL, et al. The efficacy of CZ-1 solution in flushing the donor renal transplant for prolonged cold storage [J]. *Di-er Junyi Daxue Xuebao (Acad J Sec Mil Med Univ)*, 1999, 20(6):341-345.
- [4] 陈刚, 张肖红, 陈实. 血栓素 $\text{A}_2$ 合成抑制剂——川芎嗪改善大鼠胰腺保存效果的实验研究[J]. 中华器官移植杂志, 1996, 17(4):172-173.  
Chen G, Zhang XH, Chen SH. Experimental research on the effect of thromboxane synthase inhibitor ligustrazine on rat pancreas preservation[J]. *Zhonghua Qiguan Yizhi Zazhi (Chin J Organ Transplant)*, 1996, 17(4):172-173.
- [5] 孙经建, 吴孟超, 陈汉. 川芎嗪对缺血再灌注肝钙含量和线粒体功能的影响[J]. 解放军医学杂志, 1998, 23(1):133-134.  
Sun JJ, Wu MC, Chen H. The effect of ligustrazine on rat livers preservation[J]. *Jiefangjun Yizue Zazhi (Med J Chin PLA)*, 1998, 23(1):133-134.
- [6] Cavallari G, Catena F, Santoni B, et al. Kidney preservation in pigs with University of Wisconsin and Celsior solution[J]. *Minerva Chir*, 2002, 57(3):295-300.
- [7] 李幼生. 低温保存器官的能量代谢与生存能力的关系[J]. 中华器官移植杂志, 1994, 16(3):185-187.  
Li YS. Correlation between energy metabolism and living ability of the cold-storaged organs[J]. *Zhonghua Qiguan Yizhi Zazhi (Chin J Organ Transplant)*, 1994, 16(3):185-187.
- [8] de-Boer J, Smits JM, De-Meester J, et al. A randomized multicenter study on kidney preservation comparing HTK with UW [J]. *Transplant Proc*, 1999, 31(5):2065-2066.

[收稿日期] 2003-11-28

[修回日期] 2004-05-10

[本文编辑] 邓晓群