

SMO 液对低温下肾皮质线粒体功能的保护作用

牛 强¹, 朱有华^{1*}, 缪明永², 杨军昌¹, 张 纯³

(1. 第二军医大学长征医院全军器官移植研究所, 上海 200003; 2. 基础医学部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433; 3. 长征医院药学部)

[摘要] **目的:**探讨自制上海多器官保存液(SMO液)对肾皮质线粒体低温缺氧损伤的保护作用。**方法:**以 HC-A 液和 UW 液作对照,在犬肾低温保存各时间点,取皮质标本;通过电镜观察保存期间线粒体形态改变;差速离心法分离皮质线粒体,Clark 氧电极法测定其活性,描记四态呼吸曲线,计算Ⅲ态、Ⅳ态耗氧速率、线粒体呼吸控制率(RCR)及磷氧比(P/O)。**结果:**低温保存期间,HC-A 组肾皮质线粒体水肿、空泡样变明显重于 SMO 组和 UW 组,而后两者改变相似;随着低温保存时间延长,实验组和对照组肾皮质线粒体Ⅲ态呼吸耗氧速率、RCR 和 P/O 均明显降低;保存 1~3 d HC-A 组Ⅲ态呼吸耗氧速率显著低于 SMO 组($P<0.05$);保存各时间点 SMO 组线粒体 RCR 和 P/O 显著高于 HC-A 组($P<0.05$),与 UW 组无明显差异。**结论:**SMO 液对肾皮质线粒体低温缺氧损伤的保护作用比 HC-A 液强,与 UW 液相似。

[关键词] 器官保存液;低温保存;缺氧;肾皮质;线粒体

[中图分类号] R 692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)02-0196-04

Protective effects of self-designed Shanghai multi-organ preservation solution on kidney cortex mitochondria function during cold storage

NIU Qiang¹, ZHU You-hua^{1*}, MIAO Ming-yong², YANG Jun-chang¹, ZHANG Chun³ (1. Organ Transplantation Institute of PLA, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Shanghai 200433; 3. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the protective effect of self-designed Shanghai multi-organ preservation solution(SMO) on mitochondria function in canine kidney cortex during cold storage. **Methods:** Canine kidneys were perfused and stored with cold (0-4°C) SMO, HC-A and UW solution (the later 2 as control) separately. Ultrastructure alteration of mitochondria was observed by electron microscopy. Mitochondria were isolated from cortex homogenization by differential centrifugation and their respiratory function was measured polarographically with Clark oxygen electrode. The four-state curve of mitochondria respiration was drawn and the state Ⅲ and Ⅳ oxygen consumption rate, the respiration control proportion(RCR) and phosphatase/oxygen ratio(P/O) were calculated. **Results:** We found that the mitochondria swelling and membrane disruption in HC-A group were more severe than those in SMO and UW group. The rate of oxygen consumption in state Ⅲ, RCR and P/O were obviously decreased in all groups with the prolongation of cold storage time. The rate of oxygen consumption in state Ⅲ in HC-A group was lower compared to that in SMO group during 1-3 d cold storage($P<0.05$). The rate of oxygen consumption in state Ⅳ was slightly increased during the cold storage, but there was no statistical difference between HC-A and SMO group. RCR and P/O in SMO group were statistically higher than those in HC-A group ($P<0.05$) and were similar to those of UW group. **Conclusion:** SMO solution has similar protective effect on cortex mitochondria function impairment induced by hypothermia and ischemia during cold storage as UW solution, and the effect is more potent than that of HC-A solution.

[KEY WORDS] organ preservation solutions; cryopreservation; anoxia; kidney cortex; mitochondria

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(2): 196-199]

器官保存质量影响移植长期存活^[1]。研制长效国产多器官保存液是目前我国器官保存研究的重点。借鉴国外器官保存液优点,我们配制新型多器官保存液——SMO 保存液(Shanghai multi-organ preservation solution),其以组氨酸/盐酸组氨酸为缓冲系统,含有多种氨基酸和川芎嗪作为细胞保护成分,渗透压 350 mOsm/L, pH 值 7.3。

本实验通过观察犬肾低温保存期间皮质线粒体

超微结构和呼吸耗氧功能改变,以 HC-A 液和 UW 液为对照,研究 SMO 液对肾皮质线粒体低温缺氧损伤的保护作用。

[基金项目] 上海市科委重点项目(024919006)。Supported by the Key Project of Science Committee of Shanghai Municipal Government (024919006)。

[作者简介] 牛 强,博士,主治医师。E-mail:shcznq@sohu.com

* Corresponding author. E-mail:zhuyouhua@126.com

1 材料和方法

1.1 实验动物 实验犬 18 只,雌雄不限,体质量(15±2) kg(第二军医大学实验动物中心),随机分为高渗枸橼酸盐腺嘌呤(HC-A)液组、UW(university of wisconsin)液组和 SMO 液组。

1.2 主要试剂 线粒体分离介质(甘露醇 225 mmol/L,蔗糖 75 mmol/L,EDTA 1 mmol/L,0.25%小牛血清白蛋白,Tris-HCl 10 mmol/L,pH 7.4),反应介质(甘露醇 225 mmol/L,蔗糖 75 mmol/L,EDTA 0.1 mmol/L,KCl 10 mmol/L,Na-PBS 3 mmol/L,pH 7.4),琥珀酸钠 0.5 mol/L,二磷酸腺苷(ADP)50 mmol/L。上述试剂除甘露醇、蔗糖、ADP 为 Amersco 公司产品,其余由上海生工生物技术有限公司提供。HC-A 液、UW 液及 SMO 液由第二军医大学长征医院药学部提供(组分见表 1)。

表 1 UW、HC-A、SMO 保存液组分

Tab 1 Content of UW,HC-A and SMO solution

Content	UW	HC-A	SMO
Mannitol($\rho_B/g \cdot L^{-1}$)	—	30.2	—
Lactionate ($c_B/mmole \cdot L^{-1}$)	100	—	—
Citrate ($c_B/mmole \cdot L^{-1}$)	—	55	48.5
Hydroxyethyl starch ($\rho_B/g \cdot L^{-1}$)	50	—	—
Raffinose ($c_B/mmole \cdot L^{-1}$)	30	—	—
Histidine ($c_B/mmole \cdot L^{-1}$)	—	—	165
H ₂ PO ₄ ⁻ /HPO ₄ ²⁻ ($c_B/mmole \cdot L^{-1}$)	25	—	—
OH ⁻ ($c_B/mmole \cdot L^{-1}$)	—	—	—
Na ⁺ ($c_B/mmole \cdot L^{-1}$)	25-30	80	70.5
K ⁺ ($c_B/mmole \cdot L^{-1}$)	125-130	80	75
Mg ²⁺ ($c_B/mmole \cdot L^{-1}$)	5	41	5
Ca ²⁺ ($c_B/mmole \cdot L^{-1}$)	—	—	—
Cl ⁻ ($c_B/mmole \cdot L^{-1}$)	—	—	15
SO ₄ ²⁻ ($c_B/mmole \cdot L^{-1}$)	5	—	5
Glutathione ($c_B/mmole \cdot L^{-1}$)	3	—	—
Allopurinol($c_B/mmole \cdot L^{-1}$)	1	—	—
Adenosine ($c_B/mmole \cdot L^{-1}$)	5	—	—
Adenin ($c_B/mmole \cdot L^{-1}$)	—	0.38	—
L-arginin ($c_B/mmole \cdot L^{-1}$)	—	—	2
Glutamic acid ($c_B/mmole \cdot L^{-1}$)	—	—	20
Ligustrazine ($\rho_B/mg \cdot L^{-1}$)	—	—	4
pH	7.40	7.0	7.30
Osmolarity ($c_B/mOsm \cdot L^{-1}$)	320	380	350

1.3 主要仪器 动物外科手术器械一套(上海手术器械厂),高速低温离心机(Himac CR21 日立公司),SP-2 溶氧测定仪(中科院上海植物生理研究所),岛津 3000 型分光光度计(岛津公司),台式自动

平衡记录仪(上海大华仪表厂),日立 800 型扫描电镜(日立公司)。

1.4 犬肾单纯低温保存模型的制备 静推戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉犬,腹部正中切口,双肾分别切除,冰生理盐水中降温,分别灌注 0~4℃ 保存液,灌注压 100 cmH₂O(1 cmH₂O=0.098 kPa),灌至肾脏变苍白,置相应保存液中保存。按电镜病理要求取肾实质标本送检。

1.5 肾皮质线粒体分离及活性测定 低温保存期间取皮质标本,称重,制备匀浆。差速离心法分离线粒体,制成线粒体悬液,双缩脲法测定其蛋白浓度。Clark 氧电极法测定线粒体活性。反应室加线粒体悬液后,依次加入呼吸链反应底物 0.5 mol/L 琥珀酸 20 μ l 及 50 mmol/L ADP 10 μ l,分别出现 II 态及 III 态呼吸,待 ADP 完全磷酸化后,出现 IV 态呼吸,连续描记四态呼吸曲线。根据反应室体积和氧饱和度计算记录纸每小格代表的氧含量,III 态或 IV 态耗氧速率(R_3 或 R_4)=每小格氧含量×III 态或 IV 态每分钟耗氧格数(nmol/min)。计算线粒体呼吸控制率($RCR=R_3/R_4$)和磷氧比(P/O,ADP 量/III 态耗氧量)^[2]。

1.6 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,同一时点两组间差异用单因素方差分析比较。

2 结果

2.1 电镜检查结果 由电镜肾脏病理专家单盲评估 HC-A 组、UW 组和 SMO 组犬肾保存期间皮质细胞线粒体形态结构的改变,结果发现保存 24 h 后,SMO 组皮质线粒体肿胀、空泡化改变轻于 HC-A 组,与 UW 组相似;超过 48 h 后 HC-A 组线粒体水肿破裂、嵴断裂等改变明显重于 SMO 组和 UW 组(图 1)。

2.2 线粒体活性改变 随着低温保存时间延长,实验组和对照组肾皮质线粒体功能均明显降低。保存 1~3 d HC-A 组 III 态呼吸耗氧速率下降明显且显著低于 SMO 组($P<0.05$);低温保存各时间点 HC-A 组、SMO 组和 UW 组 IV 态呼吸耗氧轻度增加,但是多个时点组间差异不显著(表 2)。

低温保存的各时间点,SMO 组皮质 RCR、P/O 显著高于 HC-A 组($P<0.05$);而 UW 组和 SMO 组 RCR、P/O 呈现相似的下降趋势,两组间差异不显著(表 3)。

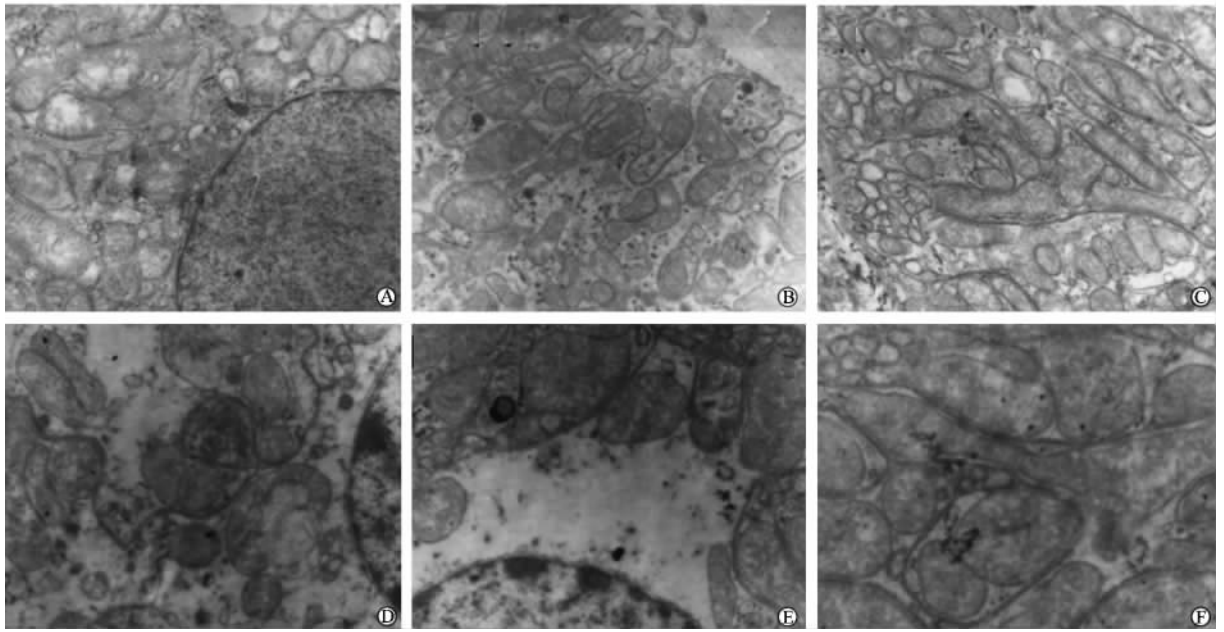


图 1 HC-A 液、UW 液和 SMO 液保存肾皮质 24、48 h 后线粒体超微结构改变

Fig 1 Changes of cortex mitochondrial ultrastructure after 24 h and 48 h cold storage in HC-A, UW and SMO solution

A, B, C; 24 h storage in HC-A, UW, SMO solution, respectively ($\times 10\ 000$); D, E, F: 48 h storage in HC-A, UW, SMO solution, respectively ($\times 13\ 000$)

表 2 低温保存期间肾皮质线粒体呼吸 III 态、IV 态耗氧速率改变

Tab 2 Changes of mitochondrial oxygen consumption rates in state III and IV

($n=6, \bar{x} \pm s, \text{nmol} \cdot \text{min}^{-1}$)

Storage (t/d)	State III			State IV		
	HC-A	UW	SMO	HC-A	UW	SMO
0	192 ± 15	184 ± 9	186 ± 12	72 ± 5	56 ± 5	59 ± 7
1	157 ± 9*	178 ± 8	181 ± 7	77 ± 9	64 ± 10	70 ± 9
2	143 ± 8*	176 ± 10	169 ± 10	79 ± 7	75 ± 7	75 ± 9
3	135 ± 10*	163 ± 9	162 ± 11	84 ± 9	77 ± 7	80 ± 7

* $P < 0.05$ vs SMO group

表 3 低温保存期间肾皮质线粒体功能变化

Tab 3 Cortex mitochondrial function of kidney during cold storage

($n=6, \bar{x} \pm s$)

Storage (t/d)	RCR			P/O (nmol/O)		
	HC-A	UW	SMO	HC-A	UW	SMO
0	2.68 ± 0.52*	3.26 ± 0.41	3.12 ± 0.28	1.34 ± 0.47	1.56 ± 0.36	1.49 ± 0.42
1	2.09 ± 0.33*	2.78 ± 0.13	2.62 ± 0.40	1.21 ± 0.20*	1.49 ± 0.21	1.46 ± 0.24
2	1.82 ± 0.28*	2.30 ± 0.27	2.23 ± 0.26	1.12 ± 0.17*	1.36 ± 0.26	1.38 ± 0.31
3	1.62 ± 0.25*	2.11 ± 0.12	2.05 ± 0.22	0.90 ± 0.17*	1.18 ± 0.25	1.22 ± 0.35

* $P < 0.05$ vs SMO group

3 讨论

20 世纪 80 年代长征医院研制了 HC-A 肾脏保存液, 20 多年来为国内多数肾移植单位使用^[3]。随着目前国内大器官移植、联合器官移植不断增加, HC-A 液的缺点逐渐暴露, 研制更优的国产多器官

保存液是当务之急。我们吸取国内外成熟保存液如 UW 液的优点, 结合长征医院既往器官保存研究的成果^[4], 配制了 SMO 器官保存液, 并通过观察离体犬肾低温保存期间皮质病理形态和细胞线粒体功能改变, 研究 SMO 液对犬肾脏的低温保存效果。

近来研究^[5]表明, 在低温保存中加强对线粒体

功能的保护,能明显减轻低温缺血/再灌注损伤,提高器官保存效果。而线粒体通透性转变(mitochondrial permeability transition, MPT)是低温保存期间和再灌注后细胞凋亡和坏死信号转导途径中的关键事件。因此本实验把低温保存期间线粒体形态、功能改变作为反映保存效果的重要指标。

电镜检查发现线粒体对低温缺氧损伤敏感,线粒体水肿(MPT所致)在保存2 h后就出现了。保存期间HC-A组肾皮质线粒体形态改变(线粒体肿胀、空泡化、嵴溶解、破裂)最明显,显示HC-A组细胞低温缺血损伤最严重,而UW液和SMO液可能通过抑制MPT的发生,减轻线粒体水肿、破裂。

线粒体Ⅲ态呼吸反映ADP对呼吸链活性的控制,Ⅳ态呼吸反映无ADP存在的情况下呼吸链耗氧速率,RCR反映线粒体结构完整性及整体功能,P/O反映其氧化释放能量转化为ATP的效率。上述指标常用于器官低温保存中监测细胞损伤^[7, 8]。随低温缺血损伤加重,HC-A组皮质线粒体Ⅲ态呼吸耗氧速率下降,导致RCR、P/O明显低于SMO组;而UW组和SMO组Ⅲ态呼吸耗氧速率、RCR、P/O呈现相似的下降趋势,两组间差异不显著。这说明SMO液对线粒体低温缺血损伤的保护作用比HC-A液强,而与UW液相似。低温保存多个时间点HC-A组、SMO组和UW组Ⅳ态呼吸耗氧增加可能与呼吸链解偶联后,线粒体为维持自身膜电位病理性耗氧增加有关。

SMO液具有多种细胞保护成分。其含有的组氨酸缓冲对能够进入细胞内,较好的抑制细胞内酸中毒,减少由 Na^+/H^+ 交换导致的细胞内钠离子增多和细胞水肿^[9];组氨酸具有结合钙离子的作用,可以减轻细胞内和线粒体钙超载。SMO液含有的川芎嗪目前是临床上常用的抗缺血性疾病的药物。其药理特性主要是增进微循环,提高组织对缺氧缺血的耐受性,而且川芎嗪也有钙离子拮抗作用^[10]。低温保存期间细胞钙离子超载会导致线粒体内膜通透性增加,线粒体内膜电位消失,氧化磷酸化解偶联^[11]。SMO液具有的多重钙离子拮抗特性,对线粒体功能有保护作用。SMO液含有L-精氨酸(一氧化氮前体),能够通过NO/cGMP途径增加鸟苷

酸环化酶活性,增加环鸟苷(cGMP)的合成,促进线粒体活性升高^[12]。

总之,本实验通过检测皮质线粒体形态和功能改变,证实SMO液能够抑制低温缺氧损伤导致的线粒体水肿,提高线粒体活性,与其抑制细胞内酸中毒、线粒体钙超载等作用有关。低温保存期间SMO液对线粒体的保护作用比HC-A液强,而与UW液的保护能力无明显差异,可以认为SMO保存液能够有效抑制肾皮质低温缺血损伤。

[参考文献]

- [1] Salahudeen AK, Haider N, May W, et al. Cold ischemia and the reduced long-term survival of cadaveric renal allografts[J]. *Kidney Int*, 2004, 65: 713-718.
- [2] Sammut IA, Burton K, Balogun E. Time-dependent impairment of mitochondrial function after storage and transplantation of rabbit kidneys[J]. *Transplantation*, 2000, 69: 1265-1275.
- [3] 何长民, 张昊, 齐隽, 等. 临床肾脏保存2068例经验[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2003, 24: 151-153.
- [4] 郑军华, 闵志廉, 李玉莉, 等. 长征1号多器官保存液效果的动物实验研究[J]. *中华泌尿外科杂志*, 1999, 20: 712-714.
- [5] Baumert H, Faure JP, Zhang K, et al. Evidence for a mitochondrial impact of trimetazidine during cold ischemia and reperfusion[J]. *J Pharmacol*, 2004, 71: 25-37.
- [6] Rauen U, de Groot H. New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury[J]. *J Investig Med*, 2004, 52: 299-309.
- [7] Jassem W, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury in organ transplantation[J]. *Kidney Int*, 2004, 66: 514-517.
- [8] Salahudeen AK. Cold ischemic injury of transplanted kidneys: new insights from experimental studies[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004, 287: F181-F187.
- [9] Delmas-Beavieux MC, Gallis JL, Clerc M, et al. ³¹P NMR studies of rat liver cold preservation with histidine-buffered lactobionate solution[J]. *J Cryobiol*, 1993, 30: 551-561.
- [10] 孙经建, 吴孟超, 陈汉. 川芎嗪对缺血再灌注肝细胞钙含量和线粒体功能的影响[J]. *解放军医学杂志*, 1998, 23: 133-135.
- [11] McNulty JF, Waller K. The effect of quinine on oxidative stress in kidney tissue stored at low temperature after warm ischemic injury[J]. *J Cryobiol*, 1999, 39: 197-204.
- [12] Thomas S, Anup R, Susama P, et al. Nitric oxide prevents intestinal mitochondrial dysfunction induced by surgical stress[J]. *Br J Surg*, 2001, 88: 393-399.

[收稿日期] 2005-08-11

[修回日期] 2005-11-11

[本文编辑] 贾泽军, 邓晓群