

· 专题报道 ·

SMO 保存液对犬肾低温保存期间皮质细胞凋亡的影响

牛 强¹, 朱有华^{1*}, 于常虎¹, 罗 明¹, 缪明永²

(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)

[摘要] 目的:探讨自制上海多器官保存液(Shanghai multi-organ preservation solution, SMO 液)对低温保存期间犬肾皮质细胞凋亡的影响,以探讨 SMO 液的作用机制。方法:犬肾分别以 0~4 的 SMO 液、高渗枸橼酸盐腺嘌呤液(HC-A)或 UW 液(University of Wisconsin solution)灌注保存,在低温保存各时间点取肾皮质标本作形态学观察;采用 TUNEL 法检测皮质细胞凋亡发生情况;以硫代巴比妥酸法测定各保存液组肾皮质丙二醛(MDA)含量的改变,黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性变化。结果:低温保存第 1 天光镜观察细胞水肿、胞质空泡化、肾小管坏死等改变,三组相似,但保存 2 d 后 SMO 组和 UW 组形态学改变明显轻于 HC-A 组。随低温保存时间延长,各保存液组肾皮质细胞凋亡的发生增加,而 SMO 组凋亡指数显著低于同时点 HC-A 液组($P < 0.05$)。随着低温保存时间延长,各保存液组肾皮质 MDA 含量增加,保存 1~3 d SMO 液组 MDA 含量显著低于 HC-A 液组($P < 0.05$);低温保存中 SMO 液组、HC-A 液组、UW 液组肾皮质 SOD 酶活性无明显差异。结论:SMO 液可以提高肾皮质保存效果,可能与其减少低温保存期间肾皮质细胞凋亡和抑制脂质过氧化损伤有关。

[关键词] 器官保存;反应性氧族;低温;细胞凋亡

[中图分类号] R 692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)10-1059-04

Influence of a self-designed multiple organ preservation solution on apoptosis of renal cortical cells during hypothermic storage

NIU Qiang¹, ZHU Your-hua^{1*}, YU Chang-hu¹, LUO Ming¹, MIAO Ming-yong² (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, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the influence of a self-designed multiple organ preservation solution, namely Shanghai multi-organ preservation solution (SMO), on the apoptosis of canine renal cortical cells during cold storage and the related mechanism. **Methods:** Canine kidneys were freshly perfused and separately stored with cold (0-4 °C) SMO, hypertonic adenine citrate solution (HC-A), and University of Wisconsin solution (UW solution) (the latter 2 as control). At defined time points during storage, the morphologic changes of renal cortical samples were observed; apoptosis of renal cortical cell was determined by TUNEL; changes of malondialdehyde (MDA) in cortex homogenate were measured by thiobarbituric acid method; and the activity of superoxide dismutase (SOD) was determined by xanthine oxidase method. **Results:** Pathologic assessments indicated that the kidney damage was similar in 3 groups within 24 h. The kidney tubular cell swelling and necrosis in SMO group and UW group were slighter than those in HC-A group after stored for 2 days. With the prolongation of storage time, apoptosis increased in all groups, with the apoptotic index of SMO group significantly lower than that of HC-A group ($P < 0.05$). The levels of cortical MDA increased with storage time, and that in SMO group was significantly lower than that in HC-A group ($P < 0.05$). The activities of cortical SOD were similar in the 3 groups. **Conclusion:** SMO solution can improve the efficiency for protection of renal cortex, which might be associated with the decrease of cells apoptosis and inhibition of lipid peroxidation injury.

[KEY WORDS] organ preservation; reactive oxygen species; hypothermia; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(10):1059-1062]

器官保存质量是影响移植物长期存活的重要因素。研制国产多器官保存液是我国器官保存研究的重点。在既往研究的基础上^[1,2],结合国外多器官保存液的优点,我们配制了新型多器官保存液——SMO 保存液(Shanghai multi-organ preservation solution),它以组氨酸/盐酸组氨酸为缓冲系统,以多种氨基酸和川芎嗪作为细胞保护成分,渗透压为 350 mOsm/L, pH 值为 7.3。本实验通过观察 SMO

液对犬肾低温保存期间皮质形态学、细胞凋亡和脂质过氧化损伤的变化,并以高渗枸橼酸盐腺嘌呤

[基金项目] 上海市科委基金(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。现在上海中医药大学曙光医院泌尿外科,上海 200021。

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

(HC-A)保存液及 UW 保存液(University of Wisconsin solution)为对照,研究 SMO 液对肾皮质低温缺氧损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 杂种犬(第二军医大学实验动物中心提供),雌雄不限,体质量 15 kg 左右,随机分为 HC-A 液组($n=6$)、UW 液组($n=6$)和 SMO 液组($n=6$)。

1.2 主要试剂和仪器 TUNEL 法细胞凋亡检测试剂盒(Boehringer Mannheim 公司),蛋白酶 K(Sigma 公司)。丙二醛(MDA)及超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所),考马斯亮蓝液(上海化学试剂公司)、BSA(Amersco 公司生产,上海生工公司分装)。所用保存液由第二军医大学长征医院药学部配制(SMO 液和 HC-A 液)或购买(UW 液),3种保存液的组分参见文献^[3]。动物外科手术器械一套(上海手术器械厂),超薄切片机(上海仪器厂),电热恒温水浴箱(上海医疗器械公司),岛津 3000 型分光光度计(岛津公司),普通光学显微镜(上海光学仪器公司)。

1.3 犬肾单纯低温保存模型的制备 静推戊巴比妥钠 30 mg/kg,麻醉实验犬。采用腹部正中切口,分别切除双肾,冰生理盐水中降温,分别以 SMO 液和 HC-A 液(或 UW 液)灌洗,灌注压 100 cmH₂O(1 cmH₂O=0.098 kPa),灌至肾脏颜色变苍白,浸入无菌的相应保存液 0~4 保存。保存期间在不同的观察时间点,按光镜病理要求取肾皮质标本,并制备石蜡切片。

1.4 低温保存后犬肾皮质细胞凋亡的检测 4 μ m 石蜡组织切片,常规脱蜡、水化,蛋白酶 K(20 μ g/ml)消化(37 $^{\circ}$ C,15~20 min),切片用蒸馏水洗 4 次共 2 min,滴加含 2%过氧化氢的 PBS 液,室温下放置 5 min,使内源性过氧化氢酶失活,1 \times PBS 洗,3 min \times 3 次,切片浸入含有 TdT 的缓冲液 15 min,准备洋地黄毒苷配基结合位点,将携带报告酶(过氧化氢酶)的抗洋地黄毒苷抗体溶液滴在切片上,光学显微镜下观察是否有阳性凋亡细胞,最后封片。凋亡结果判定标准:光镜下凋亡细胞呈棕黄色颗粒状,颗粒位于凋亡细胞核内。计算出每 5 个随机 400 倍视野中发生凋亡的细胞数平均值,作为凋亡指数。

1.5 低温保存后犬肾皮质 MDA 和 SOD 测定 低温保存期间取皮质标本,称量,制备匀浆,考马斯亮蓝法测定其蛋白浓度,应用硫代巴比妥酸法测定各

保存液组肾皮质 MDA 含量的改变,应用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性变化,具体测定步骤按试剂盒使用说明进行。

1.6 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 犬肾皮质低温保存期间光镜检查结果 光镜下 HC-A 液组保存 24 h 肾小球、肾小管结构基本完整,肾小管上皮细胞少量肿胀变性;48 h 后肾小管上皮广泛中重度空泡样改变,多处小灶状坏死,间质明显水肿,细胞解离分开,刷状缘损害明显,基底膜裸露;72 h 后肾小管上皮呈广泛点、大片状坏死,曲管结构不清(图 1A)。UW 液组、SMO 液组光镜所见:保存 24 h,肾组织结构轮廓清晰,少量肾小管轻度浊肿变性;保存 48 h 后,肾小管上皮细胞小灶状坏死,间质轻度水肿,刷状缘破坏;72 h 后肾小管上皮广泛且严重的浊肿变性,部分细胞破碎、坏死(图 1B、1C)。

2.2 犬肾皮质低温保存期间细胞凋亡水平的改变 保存期间肾皮质细胞凋亡逐渐增加,镜下可见远曲和近曲小管凋亡细胞核染为棕黄色。保存初期凋亡细胞常单个出现、散在分布,保存 48 h 后凋亡细胞数量增加,常呈局灶性分布于多个近曲或远曲小管。保存当天(2 h) SMO 液组、HC-A 液组和 UW 液组细胞凋亡发生于相似的低水平(2%~3%),凋亡指数无明显差异。随保存时间的延长,SMO 液组细胞凋亡在保存第 1、2 天内缓慢增加,保存第 3 天 SMO 液组凋亡指数可以达到(17.0 \pm 2.7)%,而 HC-A 液组细胞凋亡增加迅速,保存第 3 天凋亡指数为(22.0 \pm 2.1)%;低温保存的第 1~3 天 SMO 液组凋亡指数均显著低于 HC-A 液组($P < 0.05$)。而低温保存各时点,UW 液组与 SMO 液组细胞凋亡指数变化相似,两组差别不显著。见图 2 和表 1。

2.3 低温保存期间犬肾 MDA 含量和 SOD 活性变化 随低温保存时间延长,SMO 组、UW 组和 HC-A 组肾皮质 MDA 含量增加。SMO 液组皮质中 MDA 含量增加较缓慢,而 HC-A 液组肾皮质 MDA 含量增加较迅速,在保存 24~72 h 内 SMO 液组 MDA 含量显著低于 HC-A 液组($P < 0.05$)。UW 液组和 SMO 液组低温保存期间 MDA 增加趋势相似,且两组间差异不明显(表 2)。低温保存各时点,SMO 液组和 UW 液组 SOD 活性改变与 HC-A 液组相似,3 组间差异无统计学意义(表 2)。

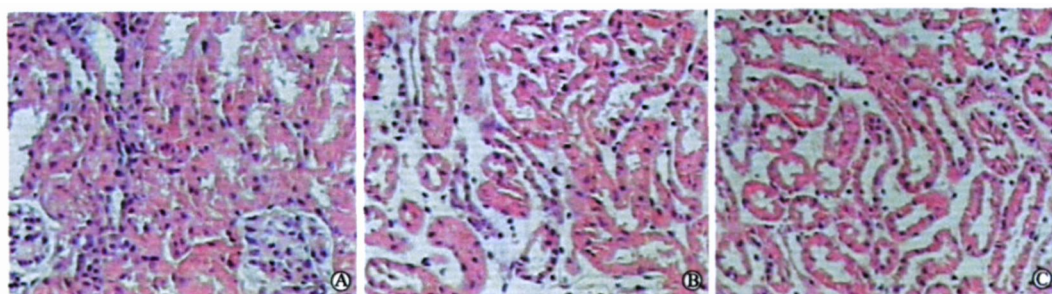


图 1 经 HC-A 液、UW 液和 SMO 液保存 72 h 后肾皮质的光镜下改变

Fig 1 Pathologic changes of cortical cells after 72 h cold storage in HC-A, UW and SMO solutions($\times 100$)

A, B, C: After 72 h storage in HC-A, UW and SMO solutions, respectively

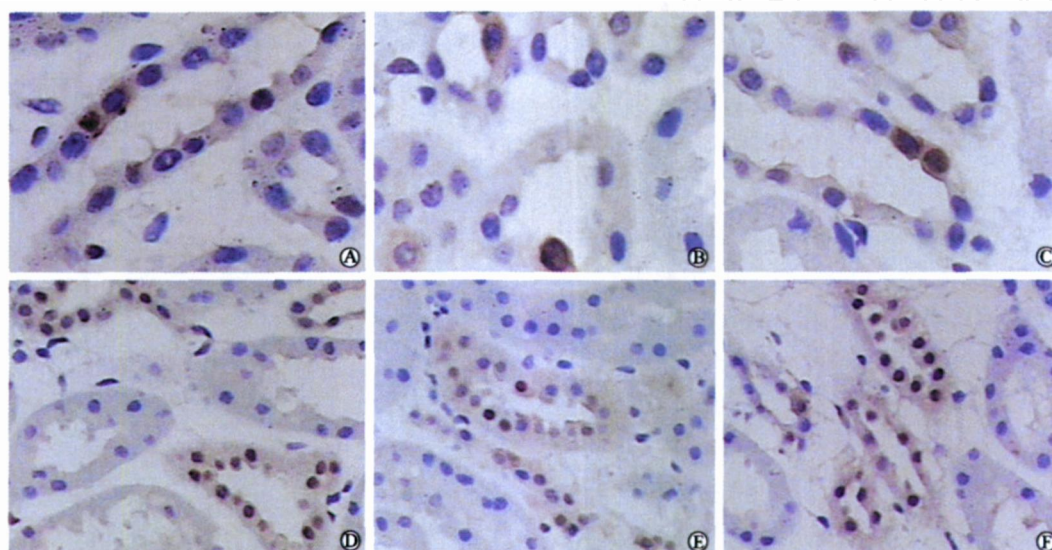


图 2 HC-A 液、UW 液和 SMO 液保存肾皮质 24 h 和 48 h 后的细胞凋亡变化

Fig 2 Changes of cortical cells apoptosis after 24 h and 48 h cold storage in HC-A, UW and SMO solutions

A, B, C: After 24 h storage in HC-A, UW and SMO solutions, respectively($\times 400$); D, E, F: After 48 h storage in HC-A, UW and SMO solutions, respectively ($\times 100$)

表 1 低温保存期间肾皮质细胞凋亡指数的改变

Tab 1 Apoptosis index of kidney cortical cells in cold storage

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

Group	Storage time (t/h)				
	2	24	48	72	96
HC-A	2.3 \pm 0.4	11.5 \pm 1.5 *	18.3 \pm 2.7 *	22.0 \pm 2.1 *	22.5 \pm 3.5
UW	2.1 \pm 0.7	6.2 \pm 0.9	11.3 \pm 2.2	15.2 \pm 3.5	19.3 \pm 3.1
SMO	2.5 \pm 0.5	7.4 \pm 1.2	12.1 \pm 1.6	17.0 \pm 2.7	20.8 \pm 4.1

* $P < 0.05$ vs SMO group

3 讨论

凋亡在低温保存期间的细胞死亡中占有较大的比重,影响心脏低温保存后的功能^[4]。肾脏低温保存中,细胞凋亡也造成功能性肾小管上皮细胞数量减少、肾小管基底膜裸露,成为移植肾功能延迟恢复的病理生理基础^[5]。抑制低温保存期间细胞凋亡的发

生可以提高器官保存效果平均。本实验证实 SMO 液组皮质细胞保存 72 h 后平均凋亡指数达到 17%,而 HC-A 液组凋亡指数随保存时间延长较快增加,72 h 后可达到 22%。低温保存同一时点,SMO 液组凋亡指数显著低于 HC-A 液组,而与 UW 液组无明显差异,说明 SMO 液能抑制低温保存期间肾皮质细胞凋亡,保存效果好于 HC-A 液而与 UW 液相当。

表2 低温保存期间肾皮质 MDA 含量及 SOD 活性的改变

Tab 2 Changes of MDA and SOD contents in renal cortex during cold storage

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

Group	MDA ($mB/nmol \cdot mg^{-1}$)				SOD ($zB/U \cdot mg^{-1}$)			
	0 h	24 h	48 h	72 h	0 h	24 h	48 h	72 h
HC-A	0.47 \pm 0.12	0.61 \pm 0.06	0.66 \pm 0.09	0.68 \pm 0.07	136.6 \pm 46.2	162.5 \pm 28.7	135.7 \pm 27.1	150.8 \pm 59.3
UW	0.49 \pm 0.10	0.51 \pm 0.05 *	0.53 \pm 0.11 *	0.57 \pm 0.10 *	127.2 \pm 25.3	178.5 \pm 31.0	125.1 \pm 21.2	149.1 \pm 27.4
SMO	0.47 \pm 0.11	0.50 \pm 0.04 *	0.56 \pm 0.07 *	0.60 \pm 0.06 *	126.2 \pm 26.8	182.1 \pm 39.4	134.0 \pm 22.3	152.1 \pm 26.5

* $P < 0.05$ vs HC-A group

低温保存期间细胞凋亡与反应性氧族(ROS)对肾皮质细胞的损伤有关^[6]。ROS 损伤部位主要是线粒体膜,增加线粒体通透性(MPT),而 MPT 同时可以增加 ROS 的生成,二者相互促进,导致线粒体释放细胞色素 C,细胞出现凋亡样改变^[7,8]。测定组织中 MDA 的含量可反映 ROS 损伤的程度,我们发现随低温缺氧时间延长,各组肾皮质 MDA 含量增加。SMO 液组和 UW 液组低温保存期间 MDA 增加不明显且两组间差异不显著,而 HC-A 液组肾皮质 MDA 含量增加最明显。在保存 1~3 d 内 SMO 液组 MDA 含量显著低于 HC-A 液组($P < 0.05$)。认为 SMO 液能够抑制 ROS 的损伤,从而抑制凋亡的发生,提高犬肾保存效果。

SMO 液含有多种直接抑制 ROS 损伤和保护线粒体功能的成分,比如它使用组氨酸缓冲系统,酸碱缓冲能力强,有效抑制细胞内酸中毒,组氨酸可以结合氧自由基,抑制脂质过氧化损伤^[9,10];含有 L-精氨酸可以提高保存期间线粒体的活性,增加 ATP 的生成^[11];川芎嗪具有钙离子拮抗作用,能够抑制低温保存期间钙超载造成的线粒体通透性改变,减少 ROS 的生成;研究证实川芎嗪能减少缺血再灌注损伤导致的大鼠肾脏细胞凋亡^[12],和缺血性损伤导致的大鼠视网膜细胞凋亡^[13]。可见 SMO 液具有较强的抗凋亡活性,能够抑制低温保存期间凋亡的发生。实验证明保存期间不同保存液组肾皮质 SOD 酶活性改变无明显差异,低温诱导的 ROS 的损伤作用不受 SOD 酶活性改变的影响,可能是由于 SOD 酶的作用底物是超氧化物阴离子(O_2^-),而低温保存期间产生的 ROS 主要是可螯合铁离子催化生成的高反应性氧族:氢氧自由基($\cdot OH$)和铁离子氧^[7,14]。

本实验发现 SMO 保存液能够减少保存期间肾皮质细胞凋亡,提高保存效果,其机制可能与 SMO 液含有多种抑制低温诱导的 ROS 损伤的成分有关。认为保存期间 SMO 液抑制肾皮质细胞凋亡的效果强于 HC-A 液,而与 UW 液无明显差异,且该保存液具有成分简单、价格低廉、使用方便等特点,因此

具有临床应用前景。

[参考文献]

- [1] 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,1999,20:341-345.
- [2] 张昊,何长民.HC-A液用于尸体肾脏保存2000例总结[J].中华泌尿外科杂志,2003,24:1-4.
- [3] 牛强,朱有华,缪明永,等.SMO液对低温下肾皮质线粒体功能的保护作用[J].第二军医大学学报,2006,27:196-199.
- [4] Thomas N, Alexander AF, Jutta S, et al. Changes in the preserved heart that limit the length of preservation[J]. J Heart Lung Transplant, 2002, 21:590-599.
- [5] Jani A, Ljubanovic D, Faubel S, et al. Caspase inhibition prevents the increase in caspase-3, -2, -8 and -9 activity and apoptosis in the cold ischemic mouse kidney[J]. Am J Transplant, 2004, 4:1246-1254.
- [6] Rauen U, de Groot H. Cold-induced release of reactive oxygen species as a decisive mediator of hypothermia injury to cultured liver cells[J]. Free Radic Biol Med, 1998, 24:1316-1323.
- [7] Rauen U, Petrat F, Sustmann R, et al. Iron-induced mitochondrial permeability transition in cultured hepatocytes[J]. J Hepatol, 2004, 40:607-615.
- [8] Zhuang J, Dinsdale D, Cohen GM. Apoptosis in human monocytic THP.1 cells, results in the release of cytochrome c from mitochondria prior to their ultracondensation, formation of outer membrane discontinuities and reduction in inner membrane potential[J]. Cell Death Differ, 1998, 5:953-962.
- [9] Delmas-Beavieux MC, Callis JL, Clerc M, et al. ³¹P NMR studies of rat liver cold preservation with histidine-buffered lactobionate solution[J]. Cryobiology, 1993, 30:551-561.
- [10] Vinnikova A, Kukreja RC, Hess ML. Singlet oxygen-induced inhibition of cardiac sarcolemmal $Na^+ - K^+$ ATPase[J]. J Mol Cell Cardiol, 1992, 24:465-470.
- [11] Peralta C, Serafin A, Fernandez-Zabalegui L, et al. Liver ischemic preconditioning: a new strategy for the prevention of ischemia-reperfusion injury[J]. Transplant Proc, 2003, 35:1800-1802.
- [12] 孙立江,李玉军,石景森.川芎嗪对缺血再灌注损伤肾细胞凋亡的影响[J].第四军医大学学报,2002,23:1683-1685.
- [13] 李锦新,吉琼梅,马宁芳,等.川芎嗪对大鼠视网膜缺血后细胞凋亡的影响[J].广州医学院学报,2002,30:13-15.
- [14] Rauen U, de Groot H. New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury[J]. J Invest Med, 2004, 52:299-309.

[收稿日期] 2006-02-28

[修回日期] 2006-08-25

[本文编辑] 贾泽军,邓晓群