

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.09.002
网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190301.1205.014.html>(2019-03-04)

高压氧和丹参酮ⅡA 联合治疗大鼠肾缺血-再灌注损伤的疗效观察*

宋 涛¹,陈宗平^{1△},田德美¹,刘 通¹,梁国标¹,谢智慧²,邹成洪¹,姚涪洪¹,黎 旭¹,许 强¹
(遵义医学院附属医院:1.泌尿外科;2.高压氧科,贵州遵义 563000)

[摘要] 目的 探讨高压氧和丹参酮ⅡA 联合治疗大鼠肾缺血-再灌注损伤(RIRI)的疗效。方法 选取 SD 大鼠 120 只,分为 RIRI 组(A 组)、高压氧治疗组(B 组)、丹参酮ⅡA 治疗组(C 组)、高压氧和丹参酮ⅡA 联合治疗组(D 组)、正常组(E 组)和假手术组(F 组),各组均为 20 只。各组观察期间均通过尾静脉在不同时间点采血(术前 1 h,术后 1、3、5、7、14、30、60、90 d)观察肾功能(肌酐、尿素氮)变化情况,取肾脏标本行 HE 染色、免疫组织化学检测层连蛋白(LN)、转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)的表达。观察各组大鼠的死亡情况,并行死因分析。结果 D 组肾功能的肌酐、尿素氮在术后第 1 天升高,第 1~3 天达高峰,第 5~14 天回落到基线水平,继而又缓慢上升,与其余各组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。D 组中位生存时间为 63 d,低于其余各组(A 组为 72 d),且差异有统计学意义($P<0.05$);A 组病死率为 55.00%,D 组病死率为 60.00%,与 E 组病死率(10.00%)比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。RIRI($RR=7.170, P=0.010, 95\%CI:1.587\sim 32.389$)与高压氧和丹参酮ⅡA 联合治疗($RR=8.735, P=0.005, 95\%CI:1.951\sim 39.114$)均是导致大鼠死亡的危险因素。D 组大鼠肾脏组织纤维化明显。结论 高压氧和丹参酮ⅡA 联合治疗大鼠 RIRI 早期有效,但对比单纯高压氧治疗、丹参酮ⅡA 治疗无明显优势,且增加了晚期治疗后大鼠的病死率。

[关键词] 肾;再灌注损伤;高压氧;丹参酮;联合治疗;大鼠
[中图法分类号] R722.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)09-1445-08

Effect of combination treatment of hyperbaric oxygen and tanshinone Ⅱ A on renal ischemia-reperfusion injury in rats*

SONG Tao¹,CHEN Zongping^{1△},TIAN Demei¹,LIU Tong¹,LIANG Guobiao¹,
XIE Zhihui²,ZOU Chenghong¹,YAO Yuhong¹,LI Xu¹,XU Qiang¹

(1. Department of Urology; 2. Department of Hyperbaric Oxygen, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the therapeutic effects of combination treatment of hyperbaric oxygen and tanshinone Ⅱ A on renal ischemia-reperfusion injury (RIRI) in rats. **Methods** 120 SD rats were randomly divided into the untreated group (group A), the hyperbaric oxygen treatment group (group B), the tanshinone Ⅱ A treatment group (group C), the hyperbaric oxygen and tanshinone Ⅱ A combination treatment group (group D), the normal group (group E) and the sham group (group F) after renal ischemia reperfusion with 20 rats in each group. During the observation period, blood samples were taken from the tail vein at different time points (1 hour before surgery, and 1, 3, 5, 7, 14, 30, 60, 90 days after surgery) to observe the renal function (creatinine and urea). Kidneys were taken for HE staining, and immunohistochemistry was used to measure the expression of LN and TGF- $\beta 1$. The survival and the cause were analyzed. **Results** The creatinine and urea of renal function in group D increased at the 1st day, peaked within 3 d (from the first to the third day), fell back to the baseline level from the fifth to the fourteenth day, and then slowly increased. There was a statistically significant difference between it and other groups ($P<0.05$). The median survival time for group D was 63 days which was lower than the other groups (72 days for group A), and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The mortality in group A was 55.00%, which in group D was 60.00%. Compared with group E, the mortality was 10.00%, and there was a statistically significant difference ($P<0.01$). RIRI ($RR=7.170, P=0.010, 95\%CI:1.587\sim 32.389$) and hyperbaric oxygen/tanshinone Ⅱ A combination ($RR=8.735, P=0.005, 95\%CI:1.951\sim 39.114$) were risk factors for death in rats. Renal fibrosis shows

* 基金项目:贵州省卫生厅基金(20120424);贵州省科技厅省长基金(51010106);贵州省科技厅联合基金(C-662);贵州省遵义市红花岗区技术应用资金支持(遵红科合工字[2016]14号)。 作者简介:宋涛(1992-),在读硕士研究生,主要从事肾缺血再灌注损伤的治疗。 △ 通信作者, E-mail:2404259310@qq.com。

obviously in group D. **Conclusion** Hyperbaric oxygen/tanshinone II A combination treatment is effective in the early treatment of RIRI in rats, but there is no significant advantage compared with hyperbaric oxygen therapy or tanshinone II A treatment separately. Also, it increases the mortality of ischemia-reperfusion.

[Key words] kidney; reperfusion injury; hyperbaric oxygenation; tanshinone; therapy; rat

肾缺血-再灌注损伤 (renal ischemia-reperfusion injury, RIRI) 是临床常见的病理生理过程, 其发生的常见原因有休克后微循环再通、肾移植、肾挤压伤、体外冲击波碎石、阻断肾蒂的肾手术等^[1]。RIRI 的病理生理学复杂, 主要表现为近端肾小管细胞损伤, 丢失和炎症, 导致组织损伤和功能障碍^[2-3]。因此, 如何减轻或避免 RIRI 已成为临床医生必须高度重视的问题。目前 RIRI 的发病机制尚未彻底阐明, 可能是多因素共同作用的结果。其中自由基的生成, 细胞内钙超载, 中性粒细胞的激活及线粒体损伤、细胞内多种酶的激活、血管内皮细胞损伤等细胞代谢紊乱相互作用, 造成损伤的恶性循环是其关键所在^[4-5]。RIRI 是临床上导致缺血性急性肾衰竭 (acute renal failure, ARF) 的主要原因之一, 病死率很高, 即便存活的患者亦会产生不同程度的慢性肾功能损害^[6]。缺血再灌注后发生的肾微循环障碍和肾血管活性受损是 RIRI 发生的关键因素, RIRI 可维持肾动脉血流量 (RABF) 下降并阻碍 RIRI 的完全恢复^[7-8]。通过 RIRI 病理生理机制的持续进展来识别潜在的治疗干预, 目前相关研究证明采取不同治疗措施对 RIRI 治疗有一定效果^[9-13], 但对 RIRI 的治疗并未得到根本解决。高压氧是一种对多种疾病治疗均有理想效果的方法。对高压氧作用机制的研究发现, 高压氧可提高血氧浓度, 改善各脏器组织氧的供应, 改善组织代谢, 促进细胞损伤的修复^[14-15]。丹参酮 II A 是中药丹参的活性成分之一, 具有广泛的抗 RIRI 作用^[16]。其作用机制同样表现为: 对缺氧缺血所致炎症反应的抑制作用、抗纤维化作用、改善能量代谢、清除自由基、减轻钙超载、抗凋亡作用、影响热休克蛋白表达、改善血液流变学及微循环状况^[17-18]。但是二者联合治疗 RIRI 的疗效少见报道。层连蛋白 (laminin, LN) 参与构成肾小球及肾小管基底膜, 对维持肾脏正常结构有重要作用, 当 RIRI 时, 肾小球及肾小管基底膜受损时, 其表达亦受损; 转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 是一个多功能细胞因子, 哺乳动物 TGF- β 共有 3 种, 其中 TGF- β 1 在肾脏水平最高, 且最具有生物活性, 是由两条相同的含 112 个氨基酸的亚单位通过二硫键连接成的二聚体, 是由多种细胞分泌的、具有多重生物学效应的细胞因子, 对细胞增殖、分化、凋亡及免疫功能具有重要的调节作用, 在损伤后组织的修复与重塑、多种疾病的纤维化中起重要作用。既往研究证明纤维细胞在包括慢性肾脏病 (CKD) 在内的多种疾病中发挥重要作用, 促进组织纤维化^[19-21]。本文主要通过对比肾功能的变化、检测

LN、TGF- β 1 的表达及病死率来评价高压氧、丹参酮 II A 联合治疗大鼠 RIRI 的治疗效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组与模型建造 SD 大鼠 120 只, 体重 200~300 g, 清洁级, 雌雄不限 (购自陆军军医大学动物实验中心), 分为 RIRI 组 (A 组), 高压氧治疗组 (B 组), 丹参酮 II A 治疗组 (C 组), 高压氧和丹参酮 II A 联合治疗组 (D 组), 正常组 (E 组), 假手术组 (F 组), 每组均为 20 只; 各组术前均通过尾静脉采血 1~2 mL, 检测血尿素和肌酐。称重大鼠后以 20% 水合氯醛按剂量 0.1 mL/100 g 采用腹腔内注射麻醉, 将大鼠仰卧位固定于手术台上, 按无菌操作原则手术。A、B、C、D 组均开腹用无损伤血管夹夹闭双肾动静脉 1 h 后开放血流, E 组不做处理; F 组仅模拟手术操作过程, 但不夹闭肾动脉, 各组术后均腹腔内注射长效青霉素 12.5 万单位/只预防感染, 关闭腹腔。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法 D 组在开放血流前 5 min 通过尾静脉注射丹参酮 II A 磺酸钠注射液 (剂量按 5 mg/kg, 购自上海第一生化制药有限公司), 开放血流后行高压氧治疗 (高压氧治疗操作方法: 将实验动物置于高压氧舱内, 纯氧洗舱 5 min, 升压 5 min 至 0.2 MPa (2ATA), 稳压吸氧 40 min, 减压 10 min。高压氧处理时持续通风, 氧流量维持在 1 L/min, 舱内氧浓度在 98% 以上)。术后第 1、2、3 天再行高压氧、丹参酮 II A 联合治疗共 4 次。B 组单纯用高压氧治疗 (方法同上)。C 组单纯用丹参酮 II A 治疗 (方法同上)。A、E、F 组不用治疗, 直接观察。

1.2.2 标本采集 术后 1、3、5、7、14、30、60、90 d 各组分别通过尾静脉采血 1~2 mL 后离心取上清液检测血尿素和肌酐。其间观察各组的死亡数并记录具体死亡时间, 解剖大鼠观察各器官, 尤其是肾脏的病理变化情况, 分析死亡原因, 并在术后 90 d 将各组存活大鼠处死, 取肾脏标本 4% 多聚甲醛固定, 按石蜡切片制作过程 (固定、脱水、透明、包埋) 制作蜡块以备 HE 染色及免疫组化用。

1.2.3 肾功能检测 血液标本经离心后取上清液于本院检验科进行肾功能检测, 采用全自动生化分析仪检测 (OLYM-PUS AU5400) 测定血液中尿素氮及肌酐水平。

1.2.4 苏木素-伊红 (HE) 染色 将 4% 多聚甲醛固定的各组肾组织标本石蜡块进行切片 (厚度为 5 μ m), 常规脱蜡至水, 行 HE 染色, 中性树胶封片, 显微镜下观察。

1.2.5 免疫组织化学检测 (1)将肾组织石蜡切片(5 μm)常规脱蜡至水,二甲苯Ⅰ10 min,二甲苯Ⅱ10 min,无水乙醇5 min,95%乙醇5 min,80%乙醇5 min,75%乙醇5 min。(2)磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.2~7.4)冲洗3次,每次5 min。(3)切片至于3% H₂O₂ 室温10 min灭活内源性酶,重复步骤(2)。(4)切片置于柠檬酸盐缓冲液中微波炉中火10 min,中高火5 min进行抗原修复后冷却至室温,重复步骤(2)。(5)5%山羊血清封闭10 min,甩去多余液体,滴加兔抗LN多克隆抗体(1:200,武汉博士德生物有限公司)40 μL,同时用PBS代替一抗作阴性对照,置于4℃冰箱过夜(约18 h)。(6)将过夜标本置于37℃恒温箱复温40 min,重复步骤(2)。(7)滴加抗兔二抗(武汉博士德生物有限公司)40 μL,再次置于37℃恒温箱孵育30 min,重复步骤(2)。(8)DAB显微镜下显色约10 s,自来水终止并冲洗10 min。(9)HE染色5 min,自来水冲洗10 min,置于1%盐酸化乙醇分化3 s,自来水冲洗5 min。(10)按如下顺序进行脱水透明,75%乙醇5 min,80%乙醇5 min,95%乙醇5 min,无水乙醇5 min,二甲苯Ⅱ10 min,二甲苯Ⅰ10 min。(11)干燥后中性树胶封片固定;用Leica图像分析系统进行分析,每张切片随机采取4个视野,用IPP图像分析软件测量每一视野阳性染色区域的平均吸光度(A)作半定量分析。TGF-β1检测方法同上。

1.3 统计学处理 用SPSS17.0统计软件进行处理。各组病死率采用确切概率法;记录大鼠死亡时间进行Log-rank生存分析,用Logistic回归分析危险因素;血尿素、肌酐数据及病理学检测指标通过分析处理后

均按 $\bar{x}\pm s$ 记录,行方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同时间点各组大鼠血肌酐水平比较 各组大鼠肌酐值基线为(36.23±4.74)mmol/L;E、F组肌酐比较差异无统计学意义($P>0.05$)。在RIRI术后1 d肌酐迅速升高,其中A组最高[(274.00±126.60)mmol/L],与B、C、D组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。在术后3 d时B、C、D组肌酐迅速下降接近正常基线,术后5~7 d恢复正常,A组肌酐在术后3 d后缓慢下降,术后5 d后迅速下降,至术后14 d之后缓慢升高,E、F组保持不变,D组术后90 d升高最明显,与各组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表1。

2.2 不同时间点各组大鼠尿素氮水平比较 各组大鼠血尿素氮基线为(6.51±0.68)μmol/L,在RIRI术后1 d A、B、C、D组大鼠血尿素氮较E组均明显升高,其中A组最高[(31.21±12.80)μmol/L],其他依次为C、B、D组,与E、F组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。E、F组大鼠血尿素氮水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。在RIRI术后3 d时B、C、D组大鼠血尿素氮均明显下降,而A组大鼠血尿素氮继续升高,在术后3 d达到高峰[(35.60±23.25)μmol/L],与B、C、D组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。各组血尿素氮均在术后14 d基本恢复正常;除E、F组外,其余各组大鼠血尿素氮在术后14 d再次缓慢升高或降低,在术后90 d时D组升高明显[(10.55±0.24)μmol/L],与其余各组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表2。

表 1 各组大鼠不同时间点血肌酐水平比较($\bar{x}\pm s$,mmol/L)

组别	术前 1 h		术后 1 d		术后 3 d		术后 5 d		术后 7 d	
	<i>n</i>	血肌酐	<i>n</i>	血肌酐	<i>n</i>	血肌酐	<i>n</i>	血肌酐	<i>n</i>	血肌酐
A 组	20	34.50±3.46	20	274.00±126.60 ^c	19	222.00±208.40 ^c	17	82.58±34.71 ^{cd}	17	48.94±7.47 ^{cd}
B 组	20	34.35±3.27	20	205.70±68.73 ^{ac}	20	65.20±29.83 ^{acd}	20	46.00±7.03 ^{acd}	20	42.20±7.05 ^{abcd}
C 组	20	36.80±6.44	19	147.30±31.26 ^{ac}	18	54.68±11.39 ^{cd}	17	46.47±11.20 ^{acd}	17	45.47±7.48 ^{bed}
D 组	20	37.05±5.45	18	173.30±49.65 ^c	18	53.67±11.84 ^{acd}	17	45.00±8.03 ^{acd}	14	37.79±3.40 ^{ad}
E 组	20	36.75±4.36	20	36.30±3.37 ^{ab}	20	37.35±2.72 ^{ab}	20	37.40±5.59 ^{ab}	20	36.95±3.55 ^a
F 组	20	36.50±3.91	19	36.42±13.70 ^{ab}	19	38.16±2.67 ^{ab}	18	38.27±5.03 ^{ab}	17	37.88±3.60 ^a

续表 1 各组大鼠不同时间点血肌酐水平比较($\bar{x}\pm s$,mmol/L)

组别	术后 14 d		术后 30 d		术后 60 d		术后 90 d	
	<i>n</i>	血肌酐	<i>n</i>	血肌酐	<i>n</i>	血肌酐	<i>n</i>	血肌酐
A 组	16	42.81±5.68 ^{cd}	15	46.53±4.19 ^{cd}	13	48.77±2.80 ^c	9	53.80±2.20 ^{cd}
B 组	19	41.00±4.89 ^{cd}	18	44.06±4.43 ^{bed}	17	45.24±2.33 ^{abc}	17	48.00±2.12 ^{abcd}
C 组	17	40.88±4.73 ^{cd}	17	42.71±3.14 ^{abcd}	16	45.50±2.53 ^{abcd}	15	50.67±2.23 ^{abcd}
D 组	14	40.14±4.31 ^d	14	50.50±2.79 ^{acd}	11	58.82±1.47 ^{acd}	8	75.13±3.91 ^{acd}
E 组	20	37.90±3.82 ^{ab}	20	37.10±3.75 ^{ab}	20	37.50±2.31 ^{ab}	18	37.20±2.12 ^{ab}
F 组	17	37.23±2.68 ^a	17	36.41±3.14 ^{ab}	16	37.56±4.05 ^{ab}	16	37.43±3.33 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与同时时间点A组比较;^b: $P<0.05$,与同时时间点D组比较;^c: $P<0.05$,与同组术前1 h比较;^d: $P<0.05$,与同组术后1 d比较

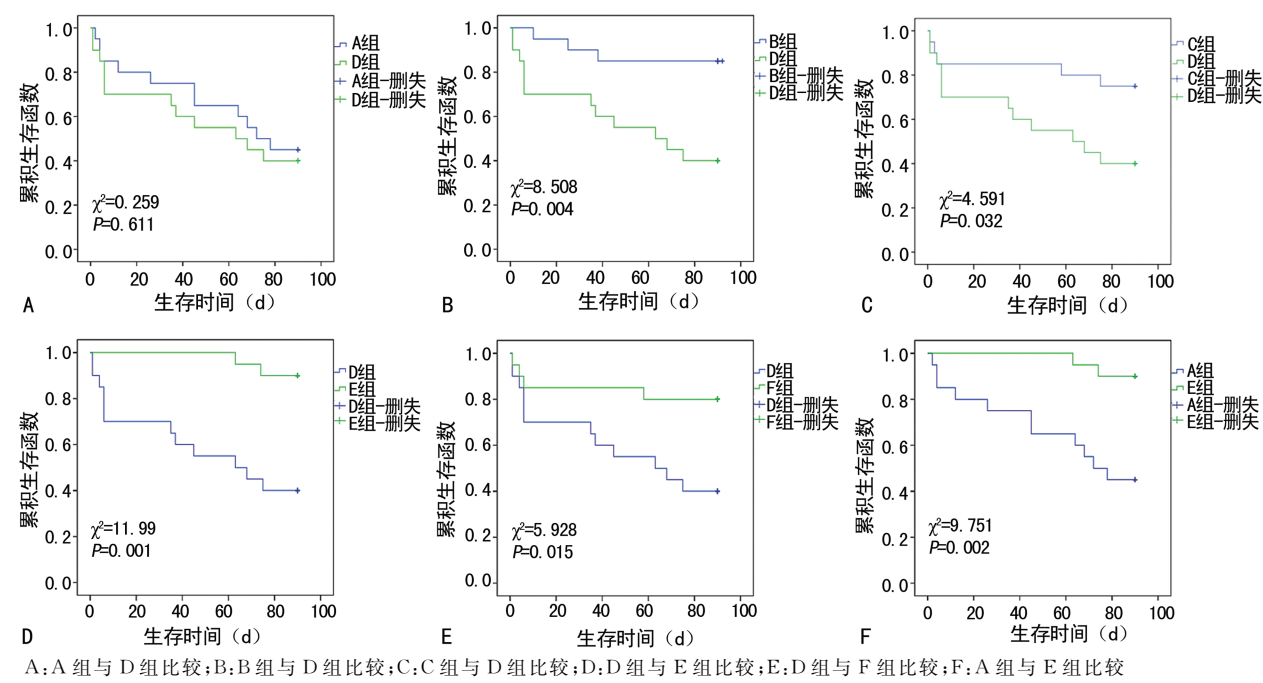


图 1 D 组大鼠与其余各组大鼠的生存曲线比较

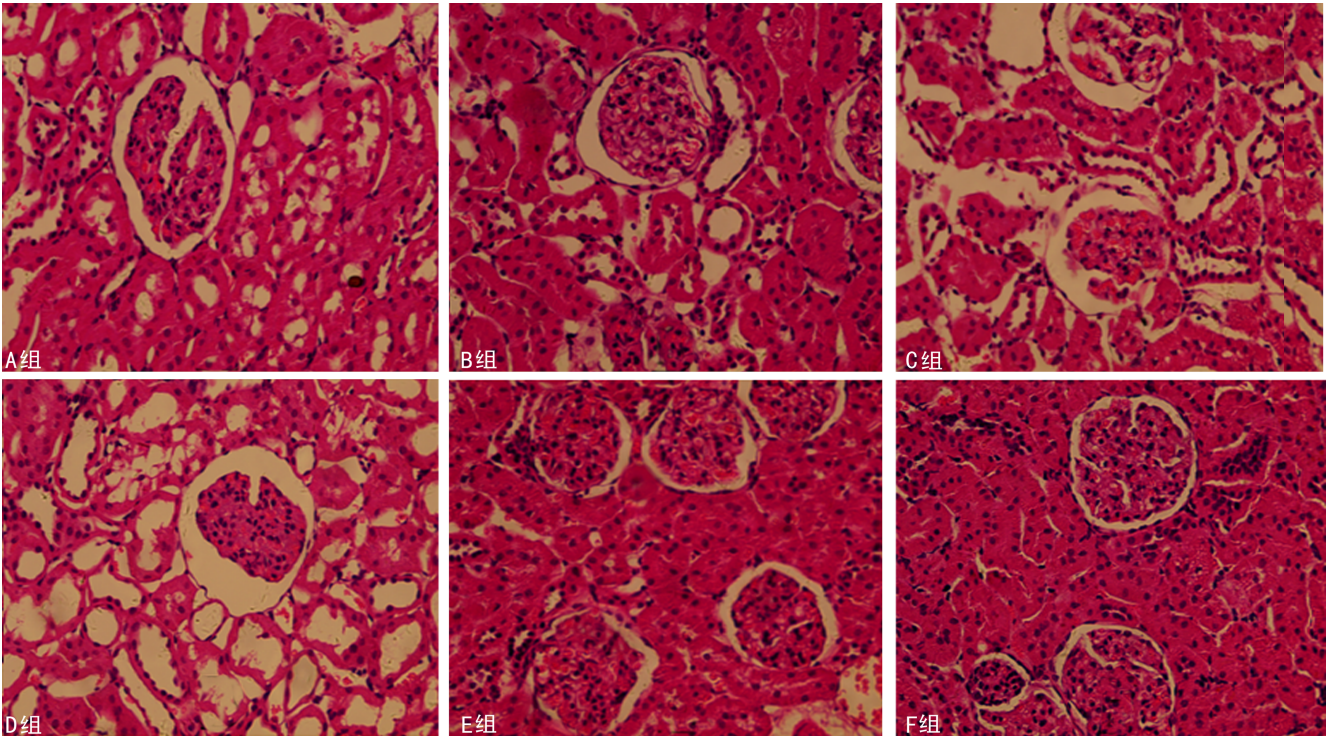


图 2 各组大鼠病理改变(HE,×400)

表 2 各组大鼠不同时间点尿素氮水平比较($\bar{x}\pm s,\mu\text{mol/L}$)

组别	术前 1 h		术后 1 d		术后 3 d		术后 5 d		术后 7 d	
	n	尿素氮	n	尿素氮	n	尿素氮	n	尿素氮	n	尿素氮
A 组	20	6.68±1.44	20	31.21±12.80 ^c	19	35.60±23.25 ^c	17	19.38±9.74 ^{cd}	17	7.36±1.18 ^d
B 组	20	6.39±0.27	20	23.24±12.64 ^c	20	10.60±7.56 ^{acd}	20	9.91±12.13 ^{ad}	20	6.45±0.98 ^{ad}
C 组	20	6.63±0.26	19	24.52±11.42 ^c	18	11.52±5.62 ^{acd}	17	7.87±2.31 ^{acd}	17	6.93±1.61 ^d
D 组	20	6.68±0.59	18	20.15±12.18 ^{ac}	18	9.01±1.31 ^{acd}	17	8.02±1.33 ^{acde}	14	6.25±1.24 ^{ad}
E 组	20	6.36±0.16	20	6.47±0.21 ^{ab}	20	6.47±0.37 ^{ab}	20	6.35±0.68 ^{ab}	20	6.65±0.61 ^a
F 组	20	6.42±0.37	19	6.38±0.15 ^{ab}	19	6.44±0.39 ^{ab}	18	6.44±0.60 ^{ab}	17	6.58±0.63 ^a

续表 2 各组不同时间点尿素氮的变化($\bar{x}\pm s,\mu\text{mol/L}$)

组别	术后 14 d		术后 30 d		术后 60 d		术后 90 d	
	<i>n</i>	尿素氮	<i>n</i>	尿素氮	<i>n</i>	尿素氮	<i>n</i>	尿素氮
A 组	16	6.32±0.81 ^d	15	6.84±0.45 ^d	13	7.35±0.14 ^d	9	8.37±0.15 ^{cd}
B 组	19	5.90±0.72 ^{bcd}	18	6.39±0.33 ^{abd}	17	7.14±0.10 ^{abcd}	17	8.14±0.097 ^{abcd}
C 组	17	6.17±0.81 ^{cd}	17	5.82±0.95 ^{abcd}	16	7.07±0.17 ^{abcd}	15	8.41±0.40 ^{bcd}
D 组	14	6.65±0.57 ^{ad}	14	7.41±0.21 ^{acd}	11	8.64±0.32 ^{acd}	8	10.55±0.24 ^{acd}
E 组	20	6.46±0.80	20	6.69±0.38 ^{ab}	20	6.70±0.90 ^{ab}	18	6.53±0.42 ^{ab}
F 组	17	6.35±0.47 ^a	17	6.69±0.38 ^{ab}	16	6.49±0.28 ^{ab}	16	6.35±0.25 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与同时时间点 A 组比较;^b: $P<0.05$,与同时时间点 D 组比较;^c: $P<0.05$,与同组术前 1 h 比较;^d: $P<0.05$,与同组术后 1 d 比较

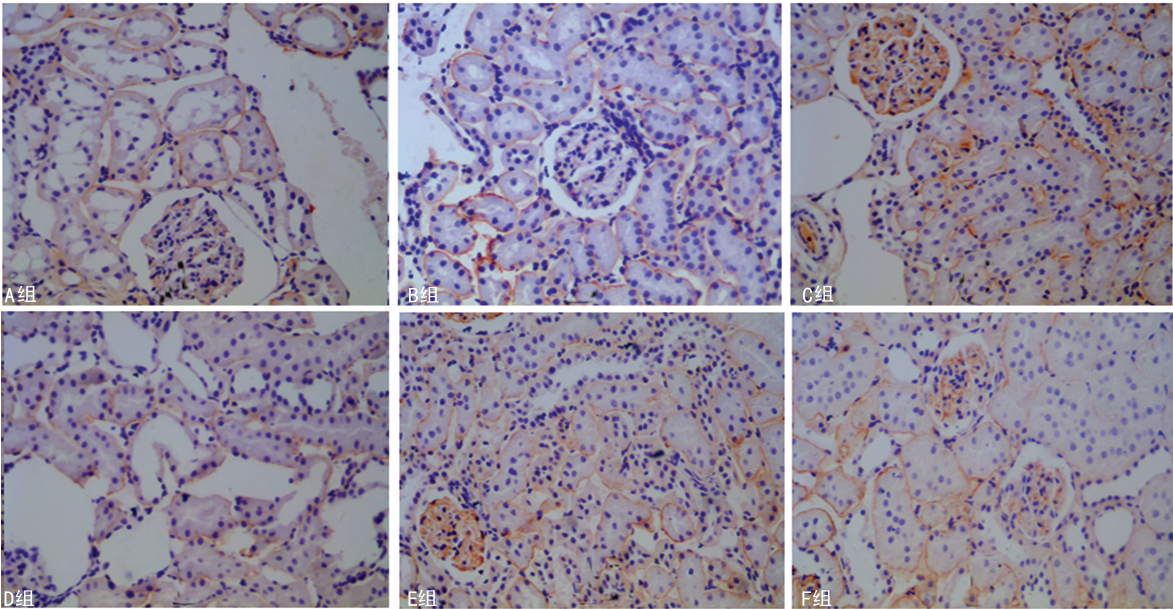


图 3 各组大鼠 LN 蛋白表达(图中黄色区域为表达部分,×400)

2.3 各组大鼠死亡情况 本研究中大鼠共死亡 37 只,其中 A 组 11 只,分别死于 RIRI 术后 2、4、4、12、26、45、45、64、68、72、78 d;B 组 3 只(15.00%),分别死于 RIRI 术后 10、25、38 d;C 组 5 只(25.00%),分别死于 RIRI 术后 1、3、4、58、75 d;D 组 12 只(60.00%),分别死于 RIRI 术后 1、1、4、6、6、6、35、37、45、63、68、75 d;E 组 2 只(10.00%),分别死于术后 63、74 d;F 组 4 只(20.00%),分别死于术后 1、4、6、58 d。A 组大鼠病死率为 55.00%,D 组大鼠病死率为 60.00%,与 E 组病死率 10.00%比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。将不同处理策略对大鼠生存率的影响进行 Cox 回归模型分析,提示 RIRI($RR=7.170$, $P=0.010$,95%CI:1.587~32.389)、高压氧和丹参酮ⅡA 联合治疗($RR=8.735$, $P=0.005$,95%CI:1.951~39.114)均是大鼠死亡的危险因素,即:发生 RIRI 导致大鼠死亡风险是未发生 RIRI 的 7.170 倍,高压氧和丹参酮ⅡA 联合治疗导致大鼠死亡风险是 E 组的 8.735 倍。

2.4 D 组大鼠与其余各组大鼠的生存曲线比较 采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,并用 Log-rank 检验比较 D 组与其余各组大鼠生存曲线。D 组与 A 组

的中位生存时间分别是 63、72 d,两组比较差异无统计学意义($\chi^2=0.259$, $P=0.611$),见图 3A;B、C、E、F 组中位生存时间均大于 90 d,与 D 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1B~F。

2.5 各组大鼠 HE 染色切片 与 E 组比较,A 组可见肾小管上皮细胞空泡改变,肾小管可见细胞脱落,管腔内可见蛋白管型;而 B、C 组仅少见肾小管细胞脱落,未见蛋白管型;D 组可见肾小管细胞脱落,肾脏组织纤维化,见图 2。

2.6 各组大鼠 LN、TGF- β 1 表达水平比较 LN 的表达在各组中依次升高,E、F 组表达最强,两组比较差异无统计学意义($P>0.05$),E、F 组与其余各组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);在 A 组表达最低,其与 B、C 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);D 组与 B、C、E、F 组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。TGF- β 1 在 E、F 组中表达最低,两组比较差异无统计学意义($P>0.05$);在 D 组中表达最强,与其余各组比较差异均有统计学意义($P<0.05$),C 组与其余各组比较差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 3。在不同治疗组中,可看到 LN 在各组中随着各组肾脏损伤的程度不同,LN 的表达也各不相同,LN

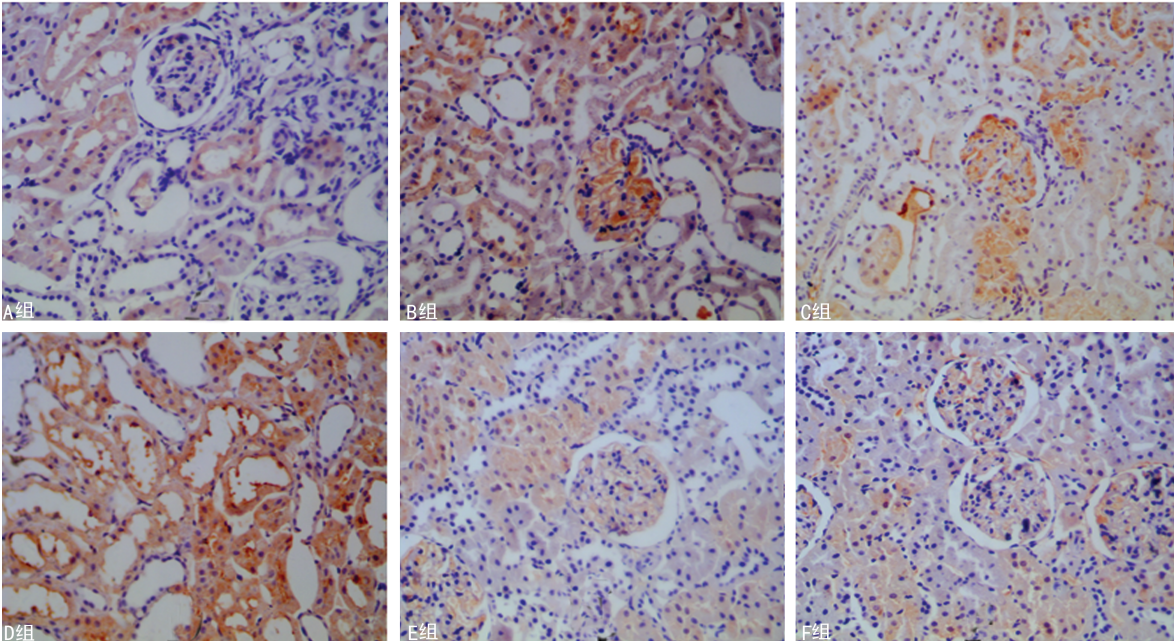


图 4 各组大鼠 TGF-β1 蛋白表达(图中黄色区域为表达部分,×400)

主要表达与肾小管基底膜,E 组可见肾脏 LN 表达连续,表达较强,而在 A 组,其表达不连续且表达较弱,甚至不表达,见图 3。TGF-β1 主要表达与肾小球及肾小管,E 组表达较少,A 组表达较强,D 组表达最强,且组织纤维化严重,失去正常肾脏形态,见图 4。

表 3 LN、TGF-β1 在各组的表达 OD 值(±s)

组别	视野(个)	LN	TGF-β1
A 组	36	0.002 07±0.002 38 ^{ab}	0.011 26±0.015 02 ^{ac}
B 组	68	0.003 65±0.002 92 ^a	0.011 05±0.016 90 ^{ac}
C 组	60	0.004 52±0.002 64 ^a	0.005 58±0.003 15 ^a
D 组	32	0.002 87±0.003 94 ^{ab}	0.018 85±0.016 18 ^{cd}
E 组	64	0.016 23±0.011 35	0.005 02±0.004 39
F 组	72	0.015 65±0.019 14	0.004 73±0.006 23

^a: $P<0.05$,与 E 组比较;^b: $P<0.05$,与 B、C 组比较;^c: $P<0.05$,与 C 组比较;^d: $P<0.05$,与 A 组比较

3 讨 论

RIRI 是临床常见的病理生理过程,是引起急性肾损伤的重要原因之一,主要表现为肾功能下降,肾小球滤过功能受损,血尿素氮和肌酐迅速升高,水、电解质和酸碱平衡紊乱^[22];其病理表现主要为肾小管细胞水肿,上皮细胞脱落及空泡形成^[23]。通过实验建立 RIRI 模型,发现血肌酐及血尿素氮在损伤后急剧升高,病理检查可见肾小管上皮细胞脱落,肾小管空泡形成,这与既往研究实验结果相符。RIRI 已越来越受到临床的关注,大量实验已证实多种药物对 RIRI 治疗有效,但既往实验多主要研究短期药物疗效,对远期肾脏功能恢复情况及存活情况研究甚少。高压氧及丹参酮 II A 是已被证实治疗 RIRI 有效的药物,二者联合治疗对 RIRI 是否有效,长期治疗对 RIRI 后

大鼠存活的影响鲜见报道。

本实验主要通过检测肾脏滤过功能(血肌酐、尿素氮的变化),对各组大鼠病死率、生存分析、病理图片检查及免疫组织化学测定 LN、TGF-β1 的表达评估治疗效果。高压氧的主要生理作用是将溶解在血浆中的氧气量增加到足以支持组织的水平,而减少需要提取由血红蛋白携带的氧气。其具有许多有益的生化效应^[24]。高压氧治疗可以减轻 RIRI 后血浆肌酐的增加、肾小球滤过率(GFR)的恶化和组织病理损伤,抑制细胞凋亡促进肾小管再生从而改善肾脏功能^[14-15],通过实验本研究发现高压氧治疗后肾脏滤过功能短期内得到明显改善,继续观察至损伤后 90 d,发现血肌酐及血尿素氮均有较小幅度的缓慢升高,但对大鼠生存率无明显改变,其病死率较小;病理检查发现肾小管上皮细胞脱落、空泡较 A 组少,这与既往研究结果相符。丹参酮 II A 具有对缺氧缺血所致炎症反应的抑制作用,改善能量代谢、清除自由基、减轻钙超载、抗凋亡作用、影响热休克蛋白表达、改善血流变学及微循环状况^[21-24],实验可以证明在 RIRI 后丹参酮 II A 可以抑制血肌酐、尿素氮的升高,改善肾功能及维持肾脏正常结构;远期仍有小幅度的血肌酐尿素氮升高,但大鼠存活率仍高于 A 组,丹参酮 II A 治疗有效。高压氧和丹参酮 II A 联合治疗后肾脏滤过功能在短期内明显改善,但与单纯高压氧及丹参酮 II A 治疗无明显优势;在损伤后 90 d 组大鼠血肌酐、尿素氮缓慢上升,与 B、C 组有明显差异;通过比较大鼠生存曲线发现 D 组大鼠生存率低于 B、C 组,观察病理图片见肾脏组织破坏过重,肾小管萎缩,肾脏纤维化,可以证明高压氧和丹参酮 II A 联合治疗较单纯高压氧及丹参酮 II A 治疗远期疗效较差,且增加病死

率。通过免疫组织化学检测 LN、TGF- β 1 的表达,发现在 RIRI 后 LN 表达减少而 TGF- β 1 表达增强,既往实验证实 LN 主要表达与肾小管及肾小球基底膜,维持肾脏正常结构;TGF- β 1 可抑制细胞外基质的降解来促进纤维化,最近的研究也证实了 TGF- β 1 能够将纤维细胞导入各种受伤器官中^[21-22],导致器官纤维化。本实验与上述研究相符,观察各组 LN 的表达,发现在 B、C 组 LN 表达较 A 组表达增强,而 D 组表达较少,与 A 组无明显差异,可以证明联合治疗后肾脏组织的损伤未得到纠正与保护。观察 TGF- β 1 的表达可见 D 组表达明显增强,其病理图片纤维化严重,与既往实验结果相符,可以证明联合治疗后 TGF- β 1 的表达增强促进纤维化形成。通过比较不同治疗方法与大鼠生存状态的关系可以发现 RIRI 未治疗及高压氧和丹参酮 II A 联合治疗是大鼠死亡的危险因素,且高压氧和丹参酮 II A 联合治疗的危险度强于 RIRI 未治疗。

高压氧、丹参酮均对 RIRI 治疗有效,二者联合治疗早期效果较好,但预后较差。本次实验均在早期予以治疗,后期观察其疗效,各组在肾功能恢复正常后再次出现缓慢升高,其中 D 组升高较为明显,对于 D 组肾脏滤过功能恢复正常后出现缓慢升高的趋势,本研究考虑可能是肾脏健存肾单位负荷过重,晚期功能受损引起。BRICKER 等^[25]提出的矫枉失衡学说(Trade-off Hypothesis)是指机体产生的某种代偿机制在发挥维持某种溶质平衡的适应性反应的同时,对其他系统产生有害作用,导致机体内环境紊乱;在肾脏发生损伤时肾脏通过加强健存肾单位的功能维持机体的平衡,从而加重肾单位的负荷,导致晚期肾单位因过度滤过,硬化而丧失功能^[26]。推测在损伤发生后,高压氧和丹参酮 II A 联合治疗早期促进健存肾单位的滤过,肾功能改善较为明显,二者联合治疗使健存肾单位负荷过重,在远期健存肾单位受到损害,从而导致肌酐、尿素氮的逐渐升高,远期病死率增加。在健存肾单位受损的过程中通过促进 TGF- β 1 表达增强,抑制小管细胞的增殖并诱导其凋亡及细胞外基质的降解,促进纤维化,从而导致远期肾脏滤过功能受损并加重其病死率,但相关机制尚需进一步实验证明。

本次试验主要存在的局限性:(1)试验过程中,仅在大鼠出现伤亡时取肾标本及在观察结束时即术后 90 d 处死存活大鼠取肾标本了解肾脏的病理改变,存在一定的局限性,如能在术后 14、30、60 d 分别行存活大鼠肾穿刺活检,了解肾脏的病理改变,也许更加合理;(2)试验主要采用血肌酐及血尿素氮评估 RIRI 的指标,对于 RIRI 是否导致其他病变尚不明确,对病死率的分析也存在一定限制。

综上所述,在 RIRI 后肾脏滤过功能及形态结构发生改变,肾功能严重受损。单纯高压氧治疗能够增加大鼠 RIRI 后存活率,高压氧和丹参酮 II A 联合治疗大鼠 RIRI 与单纯高压氧、单纯丹参酮 II A 治疗比较,并无明显优势,且联合治疗增加了大鼠的病死率。

参考文献

- [1] ZHANG J, YAO Y, XIAO F, et al. Administration of dexamethasone protects mice against ischemia/reperfusion induced renal injury by suppressing PI3K/AKT signaling [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(11): 2366-2375.
- [2] BONVENTRE J V, YANG L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(11): 4210-4221.
- [3] ELTZSCHIG H K, ECKLE T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation [J]. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1391-1401.
- [4] MIZUTANI A, OKAJIMA K, UCHIBA M, et al. Antithrombin reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation through promotion of prostacyclin production [J]. *Blood*, 2003, 101(8): 3029-3036.
- [5] ISAKA Y, SUZUKI C, ABE T, et al. Bcl-2 protects tubular epithelial cells from ischemia/reperfusion injury by dual mechanisms [J]. *Transplant Proc*, 2009, 41(1): 52-54.
- [6] SHARPLES E J, PATEL N, BROWN P, et al. Erythropoietin protects the kidney against the injury and dysfunction caused by ischemia-reperfusion [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(8): 2115-2124.
- [7] PECHMAN K R, DE MIGUEL C, LUND H, et al. Recovery from renal ischemia-reperfusion injury is associated with altered renal hemodynamics, blunted pressure natriuresis, and sodium-sensitive hypertension [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009, 297(5): 1358-1363.
- [8] REGNER K R, ROMAN R J. Role of medullary blood flow in the pathogenesis of renal ischemia-reperfusion injury [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2012, 21(1): 33-38.
- [9] BURNE M J, DANIELS F, GHANDOUR A E, et al. Identification of the CD4⁺ T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(9): 1283-1290.
- [10] LAI L W, YONG K C, IGARASHI S, et al. A sphingosine-1-phosphate type 1 receptor agonist inhibits the early T-cell transient following renal ischemia-reperfusion injury [J]. *Kidney Int*, 2007, 71(12): 1223-1231.
- [11] LEE H T, KIM M, KIM M, et al. Isoflurane protects against renal ischemia and reperfusion injury and modulates leukocyte infiltration in mice [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 293(3): 713-722.

- [12] LI L, HUANG L, SUNG S S, et al. NKT cell activation mediates neutrophil IFN- γ production and renal ischemia-reperfusion injury[J]. *J Immunol*, 2007, 178(9): 5899-5911.
- [13] ZHAO Z, GUAN R, SONG S, et al. Sinomenine protects mice against ischemia reperfusion induced renal injury by attenuating inflammatory response and tubular cell apoptosis[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(9): 1702-1712.
- [14] WANG F, YU G, LIU S Y, et al. Hydrogen-rich saline protects against renal ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *J Surg Res*, 2011, 167(2): 339-344.
- [15] ILHAN H, EROGLU M, INAL V, et al. Hyperbaric Oxygen Therapy alleviates oxidative stress and tissue injury in renal ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Ren Fail*, 2012, 34(10): 1305-1308.
- [16] JIANG C M, ZHU W, YAN X, et al. Rescue therapy with Tanshinone II A hinders transition of acute kidney injury to chronic kidney disease via targeting GSK3 β [J]. *Sci Rep*, 2016(6): 36698.
- [17] HU H L, ZHAI C L, QIAN G, et al. Protective effects of tanshinone II A on myocardial ischemia reperfusion injury by reducing oxidative stress, HMGB1 expression, and inflammatory reaction[J]. *Pharm Biol*, 2015, 53(12): 1752-1758.
- [18] DAI J P, ZHU D X, SHENG J T, et al. Inhibition of tanshinone II A, salvianolic acid a and salvianolic acid B on areca nut extract-induced oral submucous fibrosis in vitro[J]. *Molecules*, 2015, 20(4): 6794-6807.
- [19] ZHAN C Y, TANG J H, ZHOU D X, et al. Effects of tanshinone II A on the transforming growth factor β 1/Smad signaling pathway in rat cardiac fibroblasts[J]. *Indian J Pharmacol*, 2014, 46(6): 633-638.
- [20] GU J, LI H L, WU H Y, et al. Sodium tanshinone II A sulfonate attenuates radiation-induced fibrosis damage in cardiac fibroblasts[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2014, 16(9): 941-952.
- [21] KISSELEVA T, KÖCKRITZ-BLICKWEDE K M, REICHART D, et al. Fibrocyte-like cells recruited to the spleen support innate and adaptive immune responses to acute injury or infection[J]. *J Mol Med*, 2011, 89(10): 997-1013.
- [22] HOFF U, LUKITSCH I, CHAYKOVSKA L, et al. Inhibition of 20-HETE synthesis and action protects the kidney from ischemia/reperfusion injury[J]. *Kidney Int*, 2011, 79(1): 57-65.
- [23] MIGITA H, YOSHITAKE S, TANQE Y, et al. Hyperbaric Oxygen therapy suppresses apoptosis and promotes renal tubular regeneration after renal ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Nephrourol Mon*, 2016, 8(1): e34421.
- [24] GILL A L, BELL C N. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes[J]. *QJM*, 2004, 97(7): 385-395.
- [25] BRICKER N S, MORRIN P A, KIME S W Jr. The pathologic physiology of chronic Bright's disease. An exposition of the "intact nephron hypothesis"[J]. *Am J Med*, 1960, 28(1): 77-98.
- [26] BRICKER NS. On the pathogenesis of the uremic state. An exposition of the "trade-off hypothesis"[J]. *N Engl J Med*, 1972, 286(20): 1093-1099.

(收稿日期: 2018-08-18 修回日期: 2018-12-23)

(上接第 1444 页)

- [5] BOSHRA V, MOUSTAFA A M. Effect of preischemic treatment with fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor- α ligand, on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *J Mol Histol*, 2011, 42(2): 113-122.
- [6] YUAN J, MO H D, LUO J, et al. PPAR α activation alleviates damage to the cytoskeleton during acute myocardial ischemia/reperfusion in rats[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5): 7218-7226.
- [7] SUKHOTNIK I, NISSIMOV N, BEN SHAHAR Y, et al. Fenofibrate reduces intestinal damage and improves intestinal recovery following intestinal ischemia-reperfusion injury in a rat[J]. *Pediatr Surg Int*, 2016, 32(12): 1193-1200.
- [8] LV J, WANG X, LIU S Y, et al. Protective effect of Fenofibrate in renal ischemia reperfusion injury: Involved in suppressing kinase 2 (JAK2)/transcription 3 (STAT3)/p53 signaling activation[J]. *Pathol Biol (Paris)*, 2015, 63(6): 236-242.
- [9] OU L L, LIN S Q, SONG B, et al. The mechanisms of graphene-based materials-induced programmed cell death: a review of apoptosis, autophagy, and programmed necrosis[J]. *Int J Nanomedicine*, 2017(12): 6633-6646.
- [10] NIE C, LUO Y, ZHAO X, et al. Caspase-9 mediates Puma activation in UCN-01-induced apoptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(10): e1495.
- [11] CORREA F, SOTO V, ZAZUETA C. Mitochondrial permeability transition relevance for apoptotic triggering in the post-ischemic heart[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(4): 787-798.
- [12] YANG Y, JIANG S, DONG Y S, et al. Melatonin prevents cell death and mitochondrial dysfunction via a SIRT1-dependent mechanism during ischemic-stroke in mice[J]. *J Pineal Res*, 2015, 58(1): 61-70.

(收稿日期: 2018-08-20 修回日期: 2018-12-25)