



抗肿瘤坏死因子- α 单克隆抗体减轻肾脏缺血再灌注损伤的实验研究

肾缺血再灌注损伤在临床中较为常见。近年来,关于肿瘤坏死因子- α (TNF- α)在缺血再灌注损伤中的作用逐渐受到重视,其单克隆抗体对于脑、骨骼肌、肠等组织缺血再灌注损伤的保护作用已经有学者进行了较为详尽的研究[1][2],但有关其对肾缺血再灌注的作用,目前国内尚未见报道。本实验的目的旨在探讨抗肿瘤坏死因子- α 单克隆抗体(anti-TNF- α mAb)对缺血再灌注损伤的减轻作用,为临床缺血再灌注损伤的预防和治疗提供新的思路和方法。

1 材料和方法

1.1 试剂

鼠anti-TNF- α mAb与双抗体夹心酶联免疫吸附试剂盒均由美国RD公司提供,细胞凋亡检测试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.2 实验动物及分组

健康雄性SD大鼠50只(南方医院实验动物中心提供),体质量(200 \pm 5) g。随机分为A组(治疗组)、B组(非治疗组)和C组(假手术组),其中A、B组各20只,C组10只。

1.3 动物模型的建立

术前3%戊巴比妥钠(1 mg/kg·b.w.)腹腔注射麻醉,麻醉成功后,按无菌手术操作。取上腹部横切口,分离左肾动脉,无损伤微动脉夹夹闭60 min后恢复灌流,同时切除右肾。A组于再灌注前5 min经尾静脉注射anti-TNF- α mAb(0.1mg/kg·b.w.);B组于再灌注前5 min经静脉注射等量生理盐水;C组仅作麻醉、开腹,不阻断血流。

1.4 观察指标及方法

血肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)水平:于缺血前和再灌注后24 h取静脉血,应用Olympus AU800全自动生化分析仪(日本)进行分析,判定肾功能改变情况。血浆TNF- α 水平:分别于缺血前、缺血末和再灌注后30、60、120、240 min取静脉血,采用双抗体夹心酶联免疫吸附法测定,按试剂盒使用说明操作。肾组织形态学改变:再灌注后24 h取肾脏组织,10%中性缓冲甲醛固定,石蜡包埋,切成4 μ m厚的切片,HE染色,用普通光学显微镜检查形态学改变情况;肾组织超微结构变化:再灌注后24 h取肾脏组织,戊二醛固定,制成超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,透射电镜观察;肾组织细胞凋亡情况:再灌注后24 h取肾脏组织,10%中性缓冲甲醛固定,细胞凋亡检测试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供,按使用说明操作,细胞核呈棕黄色者为阳性细胞。

1.5 统计方法

采用SPSS10.0软件处理,行方差分析,组间比较采用LSD法。

2 结果

2.1 肾缺血再灌注后血浆Cr、BUN水平

再灌注后24 h, A组和B组的Cr、BUN均升高, B组显著高于C组($P<0.01$), 但A组显著低于B组($P<0.01$) (表1)。

表 1 各组大鼠缺血前与再灌注后 24 h 血浆 Cr、BUN 水平($\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Cr and BUN levels in the plasma before ischemia and 24 h after reperfusion (*Mean* \pm *SD*)

Group	n	Before ischemia		24 h after reperfusion	
		Cr ($\mu\text{mol/L}$)	BUN (mmol/L)	Cr ($\mu\text{mol/L}$)	BUN (mmol/L)
A	20	48.6 \pm 7.8	9.0 \pm 1.1	147.6 \pm 23.6*	18.6 \pm 2.4*
B	20	47.8 \pm 7.6	8.9 \pm 1.2	357.8 \pm 46.8 [#]	46.4 \pm 6.4 [#]
C	10	48.1 \pm 8.3	8.8 \pm 1.3	47.7 \pm 7.8	9.1 \pm 1.3

* $P<0.01$ vs group B (control); [#] $P<0.01$ vs group C (sham)

2.2 血浆TNF- α 水平

肾脏缺血前、缺血末, 各组TNF- α 水平无差异。B组再灌注30 min后开始升高, 120 min时达到高峰; A组TNF- α 升高不明显(表2)

表 2 各组大鼠血浆缺血前和再灌注后 TNF- α 水平 (ng/L, $\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Plasma TNF- α levels before ischemia and after reperfusion (ng/L, *Mean* \pm *SD*)

Group	n	Before ischemia	After reperfusion (min)				
			0	30	60	120	240
A	20	25 \pm 6	24 \pm 7	27 \pm 9	29 \pm 10*	38 \pm 19*	32 \pm 16*
B	20	24 \pm 7	26 \pm 8	28 \pm 10	333 \pm 87 [#]	685 \pm 137 [#]	386 \pm 129 [#]
C	10	25 \pm 9	26 \pm 10	27 \pm 11	25 \pm 11	27 \pm 12	26 \pm 11

* $P<0.01$ vs group B (control); [#] $P<0.01$ vs group C (sham)

2.3 大鼠肾缺血再灌注时肾组织形态学改变

C组为正常肾组织表现。B组肉眼可见肾皮质较苍白, 肾髓质淤血色暗; 光镜下肾小管上皮细胞肿胀, 界限不清, 并可见程度不同的空泡变性及片状坏死, 间质充血、水肿、炎细胞浸润。A组肾脏外观与正常肾相似; 光镜下肾小管上皮细胞无明显肿胀, 也无明显变性和坏死, 间质无明显改变及炎细胞浸润。

2.4 肾组织超微结构变化

C组肾小球毛细血管、滤过屏障、近曲小管上皮细胞和细胞器结构正常。B组肾小球滤过膜增厚, 内皮细胞缺损, 孔隙增宽, 基底膜肿胀, 足细胞突起肿胀不均匀, 部分突起断裂, 肾小囊腔增宽, 腔内有中等电子致密物质; 肾小管上皮细胞核膜不清楚, 有致密物质附着, 细胞间隙增宽, 细胞连接破坏, 线粒体肿胀、断嵴、脱颗粒, 部分粗面内质网扩张, 胞质中有大量空泡样变性(图 1)。A组未见明显损伤(图 2)。



图1 B组肾脏组织的超微结构(TEM, 原放大倍数: $\times 15\ 000$)

Fig.1 Ultrastructure of the renal tissue in group B (TEM, original magnification: $\times 15\ 000$)

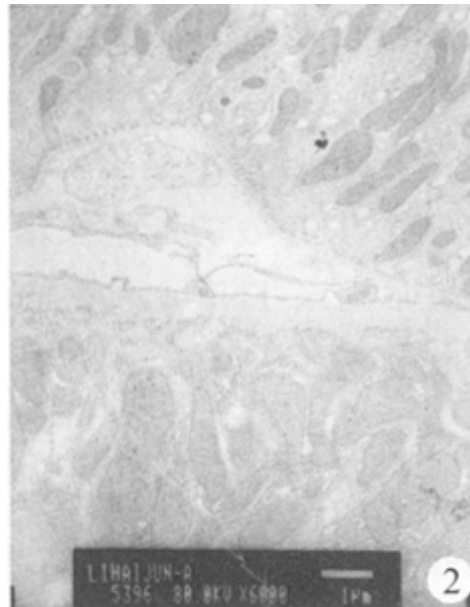


图2 A组肾脏组织的超微结构(TEM, 原放大倍数: $\times 6\ 000$)

Fig.2 Ultrastructure of the renal tissue in group A (TEM, original magnification: $\times 6\ 000$)

2.5 肾缺血再灌注后细胞凋亡情况

采用TUNEL法检测显示: C组肾组织中很少出现凋亡小体; B组肾组织中见大量凋亡小体; A组肾组织中凋亡小体数显著少于B组, 尤其是肾小管减少最明显。

3 讨论

近年来, 国内外许多学者研究发现, $\text{TNF-}\alpha$ 与缺血再灌注损伤密切相关[3~5]。 $\text{TNF-}\alpha$ 是细胞因子家族中最强效的炎症介质, 通过与两种特定的膜结合受体TNF受体1和TNF受体2结合发挥生物学作用。 $\text{TNF-}\alpha$ 大量表达

后,可通过直接对细胞毒作用、收缩血管以降低肾脏血流及聚集中性粒细胞和单核细胞等作用,导致肾细胞凋亡、肾小球纤维蛋白沉积、白蛋白滤过增加、滤过率下降、中性粒细胞浸润等,而这些因素可进一步加重肾脏损伤[3][6][7]。TNF- α 还可能进一步导致缺血再灌注损伤后出现肾脏失去功能和细胞死亡,而采用特异性阻断TNF- α 产生和/或活性的方法有可能会减轻其引起的破坏性结果[3][8][9][10]。

本研究在建立肾缺血再灌注大鼠模型的基础上,观察了血浆TNF- α 水平与再灌注损伤之间的关系,以及其单克隆抗体对再灌注损伤的影响。非治疗组大鼠肾脏血流被阻断1 h恢复灌流后24 h, Cr和BUN显著升高,肾组织发生了显著的病理改变,超微结构明显改变,细胞大量凋亡,并趋向于坏死;而治疗组于再灌注前5 min经尾静脉注射anti-TNF- α mAb,恢复灌流后24 h, Cr和BUN显著低于非治疗组,肾组织结构接近正常组织,病理改变不明显,电镜观察显示超微结构无明显改变,仅出现少许凋亡细胞。本实验结果表明, anti-TNF- α mAb对缺血再灌注造成的肾功能下降有显著的缓解作用,对肾组织损伤有明确的保护作用。经过anti-TNF- α mAb治疗后,缺血再灌注后血浆TNF- α 水平显著低于非治疗组,说明其有效地抑制了TNF- α 的产生及活性。本研究还表明,缺血再灌注后血浆TNF- α 水平显著升高,提示与缺血再灌注损伤密切相关,这与国内外的有关报道相符[4][6][11]。

本实验结果提示, TNF- α 在大鼠肾缺血再灌注时发挥了重要作用, anti-TNF- α mAb可以显著降低血浆TNF- α 水平,减轻肾缺血再灌注损伤,缓解肾功能下降,是预防和减轻肾缺血再灌注损伤的有效方法之一,同时也为人肾脏移植和损伤性急性肾功能衰竭中出现的类似损伤的治疗提供了新思路。

(责任编辑:黄开颜)

参考文献:

- [1] 刘清和, 张兆辉, 余绍祖. 抗肿瘤坏死因子- α 单克隆抗体对局灶脑缺血作用的初步研究[J]. 中国神经精神疾病杂志 (Chin J Nerv Ment Dis), 1999, 25(3): 169-70.
- [2] 郭平凡, 陈福真. 抗肿瘤坏死因子- α 单克隆抗体减轻骨骼肌缺血再灌注损伤的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2002, 19(1): 72-3.
- Guo PF, Chen FZ. Experimental study on anti TNF alpha monoclonal antibody attenuating skeletal muscle ischemia reperfusion injury[J]. Chin J Exp Surg, 2002, 19(1): 72-3.
- [3] Meldrum KK, Meldrum DR, Meng X, et al. TNF-alpha-dependent bilateral renal injury is induced by unilateral renal ischemia-reperfusion[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 282(2): H540-6.
- [4] Serteser M, Koken T, Kahraman A, et al. Changes in hepatic TNF- alpha levels, antioxidant status, and oxidation products after renal ischemia/reperfusion injury in mice [J]. J Surg Res, 2002, 107(2): 234-40.
- Burne MJ, Elghandour A, Haq M, et al. IL-1 and TNF independent pathways mediate ICAM-1/VCAM-1 up-regulation in ischemia reperfusion injury[J]. J Leukoc Biol, 2001, 70(2): 192-8.
- [6] Donnahoo KK, Shames BD, Harken AH, et al. Role of tumor necrosis factor in renal ischemia and reperfusion injury[J]. J Urol, 1999, 162(1): 196-203.
- [7] Lieberthal W, Koh JS, Levine JS. Necrosis and apoptosis in acute renal failure [J]. Semin Nephrol, 1998, 18(5): 505-18.
- [8] Tullius SG, Nieminen-Kelha M, Buelow R, et al. Inhibition of ischemia/reperfusion injury and chronic graft deterioration by a single-donor treatment with cobalt-protoporphyrin for the induction of heme oxygenase-1[J]. Transplantation, 2002, 74(5): 591-8.
- [9] Donnahoo KK, Meldrum DR, Shenkar R, et al. Early renal ischemia, with or without reperfusion, activates NF kappa B and increases TNF-alpha bioactivity in the kidney[J]. J Urol, 2000, 163(4): 1328-32.
- [10] Meldrum DR, Donnahoo KK. Role of TNF in mediating renal insufficiency following

cardiac surgery: evidence of a postbypass cardio-renal syndrome[J]. J Surg Res, 1999, 85 (2): 185-99.

[11] Yassin MM, Harkin DW, Barros AA, et al. Lower limb ischemia- reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction[J]. World J Surg, 2002, 26(1): 115-21.

参考文献:

[1] 刘清和, 张兆辉, 余绍祖. 抗肿瘤坏死因子- α 单克隆抗体对局灶脑缺血作用的初步研究[J]. 中国神经精神疾病杂志 (Chin J Nerv Ment Dis), 1999, 25(3): 169-70.

[2] 郭平凡, 陈福真. 抗肿瘤坏死因子- α 单克隆抗体减轻骨骼肌缺血再灌注损伤的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2002, 19(1): 72-3.

Guo PF, Chen FZ. Experimental study on anti TNF alpha monoclonal antibody attenuating skeletal muscle ischemia reperfusion injury[J]. Chin J Exp Surg, 2002, 19(1): 72-3.

[3] Meldrum KK, Meldrum DR, Meng X, et al. TNF-alpha-dependent bilateral renal injury is induced by unilateral renal ischemia- reperfusion[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 282(2): H540-6.

[4] Serteser M, Koken T, Kahraman A, et al. Changes in hepatic TNF- alpha levels, antioxidant status, and oxidation products after renal ischemia/reperfusion injury in mice [J]. J Surg Res, 2002, 107(2): 234-40.

Burne MJ, Elghandour A, Haq M, et al. IL-1 and TNF independent pathways mediate ICAM-1/VCAM-1 up-regulation in ischemia reperfusion injury[J]. J Leukoc Biol, 2001, 70(2): 192-8.

[6] Donnahoo KK, Shames BD, Harken AH, et al. Role of tumor necrosis factor in renal ischemia and reperfusion injury[J]. J Urol, 1999, 162(1): 196-203.

[7] Lieberthal W, Koh JS, Levine JS. Necrosis and apoptosis in acute renal failure [J]. Semin Nephrol, 1998, 18(5): 505-18.

[8] Tullius SG, Nieminen-Kelha M, Buelow R, et al. Inhibition of ischemia/reperfusion injury and chronic graft deterioration by a single-donor treatment with cobalt- protoporphyrin for the induction of heme oxygenase-1[J]. Transplantation, 2002, 74(5): 591-8.

[9] Donnahoo KK, Meldrum DR, Shenkar R, et al. Early renal ischemia, with or without reperfusion, activates NF kappa B and increases TNF-alpha bioactivity in the kidney[J]. J Urol, 2000, 163(4): 1328-32.

[10] Meldrum DR, Donnahoo KK. Role of TNF in mediating renal insufficiency following cardiac surgery: evidence of a postbypass cardio-renal syndrome[J]. J Surg Res, 1999, 85 (2): 185-99.

[11] Yassin MM, Harkin DW, Barros AA, et al. Lower limb ischemia- reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction[J]. World J Surg, 2002, 26(1): 115-21.