

# 抗肿瘤坏死因子-琢单克隆抗体减轻肾脏缺血再灌注损伤的实验研究

韩述岭<sup>1</sup>袁立新<sup>1</sup>袁俊杰<sup>1</sup>袁方银<sup>2</sup>袁小友<sup>1</sup>袁小煦勇<sup>1</sup>袁海涛<sup>1</sup>袁谦<sup>1</sup>第一军医大学南方医院<sup>1</sup>肾移植科袁<sup>2</sup>检验科袁广东广州510515冤

**摘要**目的 研究抗肿瘤坏死因子-琢单克隆抗体 anti-TNF-琢mAb 对肾脏缺血再灌注损伤的作用遥方法 SD大鼠50只随机分为A组渊治疗组冤B组渊非治疗组冤C组渊假手术组冤其中A组建立肾缺血再灌注模型遥A组于再灌注前5min经尾静脉注射 anti-TNF-琢mAb 渊.1mg/kg b.w.冤B组于再灌注前5min经尾静脉注射等量生理盐水C组仅作麻醉开腹袁阻断血流遥采用全自动生化分析仪酶联免疫吸附实验渊LISA冤免疫染色冤UNEL法及电镜分别测定或观察血肌酐渊尿素氮冤血浆 TNF-琢肾组织病理改变肾细胞凋亡情况及超微结构改变遥结果 A组血肌酐渊尿素氮冤血浆 TNF-琢水平显著低于B组渊P<0.01冤肾组织形态学及超微结构无明显改变细胞凋亡显著减少遥结论 anti-TNF-琢mAb能有效减轻肾脏缺血再灌注损伤袁缓解肾功能下降遥

**关键词**抗体袁单克隆袁肿瘤坏死因子袁局部缺血袁肾袁再灌注损伤袁疾病模型袁动物

中图分类号 R322.35;R329.24;R619.9 文献标识码 文章编号 000-2588(2003)04-0332-03

## Effect of anti-tumor necrosis factor-琢 monoclonal antibody in alleviating renal ischemia-reperfusion injury

HANShu-ling<sup>1</sup>, YULi-xin<sup>1</sup>, MAJun-jie<sup>1</sup>, ZENGFang-yin<sup>2</sup>, LIUXiao-you<sup>1</sup>, SUNXu-yong<sup>1</sup>, SHANHai-tao<sup>1</sup>, YUAN Qian<sup>1</sup>

Departments of Kidney Transplantation<sup>1</sup> and Clinical Laboratory<sup>2</sup>, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract:** Objective To investigate the effect of anti-tumor necrosis factor-琢 monoclonal antibody (anti-TNF-琢mAb) in alleviating renal ischemia-reperfusion injury. Methods Fifty normal male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups, namely group A that was subjected to ischemia-reperfusion injury with intravenous administration of anti-TNF-琢mAb (0.1mg/kg b.w.) 5min before reperfusion (treatment group), group B with the same injury followed by saline administration in the same manner (control group), and group C with only anesthesia and laparotomy but not ischemia (sham operation group). Routine assays were performed for testing the level of blood creatine (Cr), blood urea nitrogen (BUN), plasma TNF-琢 and the cell apoptosis. Ultrastructure of the kidney was also observed. Results Renal ischemia-reperfusion resulted in significant increase of the level of Cr, BUN and TNF-琢 in the plasma (P<0.01), but these effects were offset by administration of anti-TNF-琢mAb (P<0.01). In group B, widespread pathological changes and cell apoptosis were observed in the renal tissue following renal ischemia-reperfusion injury, while similar changes were scarcely visible in group A due to the protective effect of intravenous administration of anti-TNF-琢mAb 5min before reperfusion. Conclusion Renal ischemia-reperfusion injury can be alleviated by anti-TNF-琢mAb treatment.

**Key words:** antibody monoclonal; tumor necrosis factor; kidney; ischemia; reperfusion injury; disease models, animal

肾缺血再灌注损伤在临床中较为常见遥近年来关于肿瘤坏死因子-琢TNF-琢在缺血再灌注损伤中的作用逐渐受到重视袁其单克隆抗体对于脑尧骨骼肌尧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遥但是有关其对肾缺血再灌注的作用袁目前国内尚未见报道遥本实验的目的旨在探讨抗肿瘤坏死因子-琢单克隆抗体 anti-TNF-琢mAb 对缺血再灌注损伤的减轻作用袁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遥

### 1 材料和方法

#### 1.1 试剂

鼠 anti-TNF-琢mAb 与双抗体夹心酶联免疫吸附试剂盒均由美国 RD 公司提供袁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遥

#### 1.2 实验动物及分组

健康雄性 SD 大鼠 50 只 渊南方医院实验动物中心提供冤 渊质量渊00 依冤 随机分为 A 组渊治疗组冤 B 组渊非治疗组冤 C 组渊假手术组冤 其中 A 组各 20 只袁 B 组 10 只遥

#### 1.3 动物模型的建立

收稿日期 002-11-08

基金项目 广东省科技攻关项目 渊KM05101S冤

Supported by Key Research Project of Guangdong Province (2KM05101S)

作者简介 韩述岭 974-冤男 袁天津人 第一军医大学在读硕士研究生

电话 20-61641750

术前 3% 戊巴比妥钠 100 mg/kg 腹腔注射麻醉成功后按无菌手术操作遥取上腹部横切口分离左肾动脉袁无损伤微动脉夹夹闭 60min 后恢复灌流袁同时切除右肾遥 A 组于再灌注前 5min 经尾静脉注射 anti-TNF-琢 mAb 1.1 mg/kg 遥 B 组于再灌注前 5 min 经静脉注射等量生理盐水遥 C 组仅作麻醉尧开腹袁阻断血流遥

1.4 观察指标及方法

血肌酐渊Cr)尧尿素氮渊BUN)水平于缺血前和再灌注后 24 h 取静脉血袁应用 Olympus AU800 全自动生化分析仪渊日本)进行分析袁判定肾功能改变情况遥血浆 TNF-琢水平分别于缺血前尧缺血末和再灌注后 30尧60尧120尧240 min 取静脉血袁采用双抗体夹心酶联免疫吸附法测定袁按试剂盒使用说明操作遥肾组织形态学改变遥再灌注后 24 h 取肾脏组织袁0% 中性缓冲甲醛固定袁石蜡包埋袁切成 4 滋m 厚的切片袁E 染色袁用普通光学显微镜检查形态学改变情况尧肾组织超微结构变化遥再灌注后 24 h 取肾脏组织袁戊二醛固定袁制成超薄切片袁醋酸铀和柠檬酸铅双重染色袁透射电镜观察尧肾组织细胞凋亡情况遥再灌注后 24 h 取肾脏组织袁0% 中性缓冲甲醛固定袁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袁按使用说明操作袁细胞核呈棕黄色者为阳性细胞遥

1.5 统计方法

采用 SPSS10.0 软件处理袁行方差分析袁组间比较采用 LSD 法遥

2 结果

2.1 肾缺血再灌注后血浆 Cr尧BUN 水平

再灌注后 24 h 袁 A 组和 B 组的 Cr尧BUN 均升高袁 B 组显著高于 C 组渊<0.01)袁但 A 组显著低于 B 组渊<0.01)袁见表 1 遥

表 1 各组大鼠缺血前与再灌注后 24 h 血浆 Cr尧BUN 水平渊渊依) 渊依) 渊依)

Tab.1 Cr and BUN levels in the plasma before ischemia and 24 h after reperfusion (Mean 依) D)

Group	n	Before ischemia		24 h after reperfusion	
		Cr (滋mol/L)	BUN (mmol/L)	Cr (滋mol/L)	BUN (mmol/L)
A	20	48.6 依 8	9.0 依 1	147.6 依 3.6*	18.6 依 4.4*
B	20	47.8 依 6	8.9 依 2	357.8 依 6.8#	46.4 依 4.4#
C	10	48.1 依 3	8.8 依 3	47.7 依 8	9.1 依 3

\*P<0.01 vs group B (control); #P<0.01 vs group C (sham)

2.2 血浆 TNF-琢水平

肾脏缺血前尧缺血末袁各组 TNF-琢水平无差异遥 B 组再灌注 30min 后开始升高袁 20min 时达到高峰曰 A 组 TNF-琢升高不明显渊表 2 冤

表 2 各组大鼠血浆缺血前和再灌注后 TNF-琢水平渊g/L, 依) 渊依)

Tab.2 Plasma TNF-琢 levels before ischemia and after reperfusion (ng/L, Mean 依) D)

Group	n	Before ischemia	After reperfusion (min)				
			0	30	60	120	240
A	20	25 依 6	24 依 6	27 依 6	29 依 0*	38 依 9*	32 依 6*
B	20	24 依 6	26 依 6	28 依 0	333 依 7#	685 依 37#	386 依 29#
C	10	25 依 6	26 依 0	27 依 1	25 依 1	27 依 2	26 依 1

\*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遥 B 组肉眼可见肾皮质较苍白尧髓质淤血色暗曰光镜下肾小管上皮细胞肿胀袁界限不清袁并可可见程度不同的空泡变性及片状坏死袁间质充血尧水肿尧炎细胞浸润遥 A 组肾脏外观与正常肾相似曰光镜下肾小管上皮细胞无明显肿胀袁也无明显变性和坏死袁间质无明显改变及炎细胞浸润遥

2.4 肾组织超微结构变化

C 组肾小球毛细血管滤过屏障尧近曲小管上皮细胞和细胞器结构正常遥 B 组肾小球滤过膜增厚袁内皮细胞缺损袁孔隙增宽袁基底膜肿胀袁细胞突起肿胀不均匀尧部分突起断裂尧肾小囊腔增宽袁腔内有中等电子致密物质曰肾小管上皮细胞核膜不清楚袁有致密物质附着袁细胞间隙增宽袁细胞连接破坏袁线粒体肿胀尧断嵴尧脱颗粒尧部分粗面内质网扩张袁胞质中有大量空泡样变性渊图 1 冤遥 A 组未见明显损伤渊图 2 冤

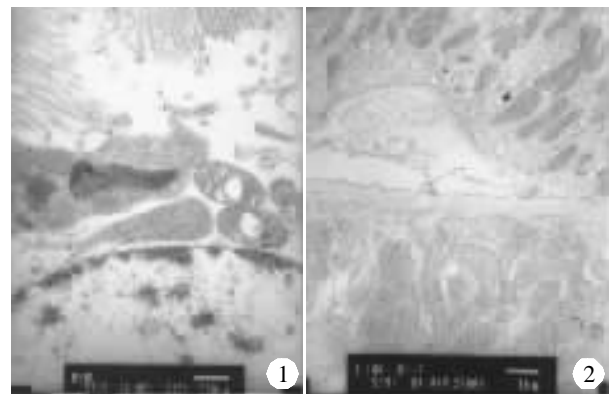


图 1 B 组肾脏组织的超微结构渊TEM)袁放大倍数渊伊) 5 000 冤  
Fig.1 Ultrastructure of the renal tissue in group B (TEM, original magnification: 伊 5000)

图 2 A 组肾脏组织的超微结构渊TEM)袁放大倍数渊伊) 5 000 冤  
Fig.2 Ultrastructure of the renal tissue in group A (TEM, original magnification: 伊 5000)

2.5 肾缺血再灌注后细胞凋亡情况

采用 TUNEL 法检测显示院 A 组肾组织中很少出现凋亡小体曰 B 组肾组织中见大量凋亡小体曰 C 组肾

组织中凋亡小体数显著少于 B 组袁尤其是肾小管减少最明显遥

3 讨论

近年来袁国内外许多学者研究发现袁TNF-琢与缺血再灌注损伤密切相关遥TNF-琢是细胞因子家族中最强效的炎症介质袁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遥TNF-琢大量表达后袁可通过直接的细胞毒作用尧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袁导致肾细胞凋亡尧肾小球纤维蛋白沉积尧蛋白滤过增加尧滤过率下降尧中性粒细胞浸润等袁这些因素可进一步加重肾脏损伤遥TNF-琢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袁而采用特异性阻断 TNF-琢产生和 / 或活性的方法有可能会减轻其引起的破坏性结果遥

本研究在建立肾缺血再灌注大鼠模型的基础上袁观察了血浆 TNF-琢水平与再灌注损伤之间的关系袁以及其单克隆抗体对再灌注损伤的影响遥非治疗组大鼠肾脏血流被阻断 1 h 恢复灌流后 24 h 袁Cr 和 BUN 显著升高袁组织发生了显著的病理改变袁超微结构明显改变袁细胞大量凋亡袁并趋向于坏死袁而治疗组于再灌注前 5min 经尾静脉注射 anti-TNF-琢mAb 袁恢复灌流后 24 h 袁Cr 和 BUN 显著低于非治疗组袁肾组织结构接近正常组织袁病理改变不明显袁电镜观察显示超微结构无明显改变袁又出现少许凋亡细胞遥本实验结果表明袁anti-TNF-琢mAb 对缺血再灌注造成的肾功能下降有显著的缓解作用袁对肾组织损伤有明确的保护作用遥经过 anti-TNF-琢mAb 治疗后袁缺血再灌注后血浆 TNF-琢水平显著低于非治疗组袁说明其有效地抑制了 TNF-琢的产生及活性遥本研究还表明袁缺血再灌注后血浆 TNF-琢水平显著升高袁提示与缺血再灌注损伤密切相关袁这与国内外的有关报道相符遥

本实验结果提示袁TNF-琢在大鼠肾缺血再灌注时发挥了重要作用袁anti-TNF-琢mAb 可以显著降低血浆 TNF-琢水平袁减轻肾缺血再灌注损伤袁缓解肾功能下降袁是预防和减轻肾缺血再灌注损伤的有效方法之

一袁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遥

参考文献

咱暂 刘清和, 张兆辉, 余绍祖. 抗肿瘤坏死因子-琢单克隆抗体对局灶脑缺血作用的初步研究咱暂中国神经精神疾病杂志 (ChinJNerv MentDis), 1999, 25(3): 169-70.

咱暂 郭平凡, 陈福真. 抗肿瘤坏死因子-琢单克隆抗体减轻骨骼肌缺血再灌注损伤的研究咱暂中华实验外科杂志, 2002, 19(1): 72-3. GuoPF, ChenFZ. Experimental study on anti TNF $\alpha$  monoclonal antibody attenuating skeletal muscle ischemia reperfusion injury咱暂 ChinJExpSurg, 2002, 19(1): 72-3.

咱暂 MeldrumKK, MeldrumDR, MengX, et al. TNF-alpha-dependent bilateral renal injury is induced by unilateral renal ischemia-reperfusion咱暂 Am J Physiol HeartCircPhysiol, 2002, 282(2): H540-6.

咱暂 SerteserM, KokenT, KahramanA, et al. Changes in hepatic TNF-alpha levels, antioxidant status, and oxidation products after renal ischemia/reperfusion injury in mice咱暂 J Surg Res, 2002, 107(2): 234-40.

咱暂 BurneMJ, ElghandourA, HaqM, et al. IL-1 and TNF independent pathways mediate ICAM-1/VCAM-1 up-regulation in ischemia reperfusion injury咱暂 Leukoc Biol, 2001, 70(2): 192-8.

咱暂 DonnahooKK, ShamesBD, HarkenAH, et al. Role of tumor necrosis factor in renal ischemia and reperfusion injury咱暂 Urol, 1999, 162(1): 196-203.

咱暂 LieberthalW, KohJS, LevineJS. Necrosis and apoptosis in acute renal failure咱暂 Semin Nephrol, 1998, 18(5): 505-18.

咱暂 TulliusSG, Nieminen-KelhaM, BuelowR, 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咱暂 Transplantation, 2002, 74(5): 591-8.

咱暂 DonnahooKK, MeldrumDR, ShenkarR, et al. Early renal ischemia, with or without reperfusion, activates NF-kappa B and increases TNF-alpha bioactivity in the kidney咱暂 JUrol, 2000, 163(4): 1328-32.

咱暂 MeldrumDR, DonnahooKK. Role of TNF in mediating renal insufficiency following cardiac surgery: evidence of a postbypass cardio-renal syndrome咱暂 Surg Res, 1999, 85(2): 185-99.

咱暂 YassinMM, HarkinDW, BarrosAA, et al. Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction咱暂 WorldJSurg, 2002, 26(1): 115-21.

责任编辑 隋开颜 冤