

· 实验研究 ·

磷酸肌酸预处理对大鼠肾缺血-再灌注所致肺损伤的影响

许辉 疏树华 王迪 谢春林 柴小青 潘建辉

【摘要】 目的 探讨磷酸肌酸预处理对大鼠肾缺血-再灌注所致肺损伤的影响。方法 SPF 级雄性 SD 大鼠 45 只, 8~10 周龄, 体重 180~220 g, 采用随机数字表法, 将其分为三组: 假手术组 (S 组)、肾脏缺血-再灌注组 (IR 组) 和磷酸肌酸预处理组 (PCr 组), 每组 15 只。S 组仅游离肾蒂并行右肾切除术。IR 组和 PCr 组在 S 组基础上制备肾缺血-再灌注模型。PCr 组于缺血前 30 min 尾静脉注射磷酸肌酸钠 150 mg/kg, IR 组于同时点注射等容量生理盐水。再灌注 6 h 后于同时段经左心室采集动脉血样, 血气分析记录 PaO₂, 检测血清丙二醛 (MDA) 浓度和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性。Fluo-3 AM 染色经流式细胞仪检测肺泡巨噬细胞内 Ca²⁺ 浓度。取肺组织, HE 染色, 光学显微镜下观察肺组织病理结果, 测定肺组织湿重/干重 (W/D) 比值。膜联蛋白 V/碘化丙锭 (Annexin V/PI) 双染经流式细胞仪检测肺组织细胞凋亡比例。**结果** 与 S 组比较, IR 组和 PCr 组 PaO₂ 明显降低, MDA 浓度明显升高, SOD 活性明显减弱, 肺泡巨噬细胞 Ca²⁺ 浓度明显升高, 肺 W/D 比明显增大, 肺组织病理学损伤程度明显加重, 肺组织细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$)。与 IR 组比较, PCr 组 PaO₂ 明显升高, MDA 浓度明显降低, SOD 活性明显增强, 肺泡巨噬细胞 Ca²⁺ 浓度明显降低, 肺 W/D 比明显减小, 肺组织病理学损伤程度明显减轻, 肺组织细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.05$)。**结论** 磷酸肌酸预处理可有效减轻大鼠肾缺血-再灌注诱发的肺损伤, 其机制可能与抑制氧化应激, 降低细胞凋亡及钙离子超载有关。

【关键词】 磷酸肌酸; 肾缺血-再灌注; 肺损伤; 凋亡; 钙离子超载

Effects of phosphocreatine preconditioning on lung injury induced by renal ischemia-reperfusion in rats XU Hui, SHU Shuhua, WANG Di, XIE Chunlin, CHAI Xiaoqing, PAN Jianhui. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of USTC, Division of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230001, China

Corresponding author: SHU Shuhua, Email: sshhf@189.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effects of phosphocreatine preconditioning on lung injury induced by renal ischemia-reperfusion (IR) in rats. **Methods** Forty-five SPF male Sprague-Dawley rats, aged 8 - 10 weeks, weighing 180 - 220 g, were randomly divided into 3 groups using a random number table: sham operation group (group S), renal IR group (group IR), and phosphocreatine preconditioning group (group PCr), 15 cases in each group. The rats in group S received dissociation of renal pedicles and right nephrectomy, on top of which renal IR model was prepared in group IR and group PCr. phosphocreatine 150 mg/kg was injected in group PCr for 30 minutes before ischemia, where as rats in group S and group I/R received the normal saline at the same time. The blood samples were obtained from left ventricle at 6 hours after reperfusion, the arterial blood gas analysis was performed in order to determined the oxygen partial pressure (PaO₂). Serum levels of malondialdehyde (MDA) and the activity of superoxide dismutase (SOD) were also determined. Fluo 3-AM staining and flow cytometry were used to measure the concentration of alveolar macrophage calcium ions. The lung tissue was obtained with HE staining for determination of microscope examination of pathologic changes, and weight/dry (W/D) ratio were also determined. The lung tissue cell apoptotic rate was measured by Annexin V/PI apoptosis detection reagent staining and flow cytometry. Fluo 3-AM staining and flow cytometry were used to measure the concentration of alveolar macrophage calcium ions. **Results** Compared with group S, the histopathological damages, W/D ratio, lung tissue cell apoptotic rate, the serum levels of MDA and the concentration of alveolar macrophage

DOI:10.12089/jca.2019.01.014

基金项目:国家自然科学基金(81503080);安徽省公益性技术应用研究联动计划项目(1604f0804019)

作者单位:230001 合肥市,中国科学技术大学附属第一医院 安徽省立医院麻醉科

通信作者:疏树华,Email: sshhf@189.cn

calcium ions were significant increased ($P < 0.05$), whereas the PaO_2 and the activity of SOD were significantly decreased in group IR and group PCr ($P < 0.05$). Compared with group IR, the histopathological damages, W/D ratio, lung tissue cell apoptotic rate, the serum levels of MDA and the concentration of alveolar macrophage calcium ions were significant decreased ($P < 0.05$), whereas the PaO_2 and the activity of SOD were significantly increased in group PCr ($P < 0.05$). **Conclusion** Phosphocreatine preconditioning can attenuate lung injury induced by renal I/R, the mechanism is related to inhibit oxidative stress, and reduce cell apoptosis and calcium overload.

【 Key words 】 Phosphocreatine; Renal ischemia-reperfusion; Lung injury; Apoptosis; Calcium overload

肾缺血-再灌注(RIR)损伤是休克复苏、肾移植和心血管手术等过程常见的病理现象。RIR 所致的原位肾损伤很少独立出现,往往伴随着远隔脏器的病理性损伤和功能障碍^[1]。肺脏拥有巨大的毛细血管网络,对于 RIR 引起的氧化应激和循环促炎因子更为敏感,容易并发急性肺损伤,其病理特征主要表现为中性粒细胞浸润,肺泡上皮细胞和毛细血管内皮细胞屏障功能损害等^[2]。磷酸肌酸是人体内重要的高能磷酸化合物。研究表明,外源性磷酸肌酸可有效减轻心肌、肝、脑等局部脏器的缺血-再灌注损伤^[3-5]。而目前关于磷酸肌酸是否可减轻 RIR 所导致的肺损伤尚不明确。因此本研究拟探讨磷酸肌酸预处理对大鼠肾缺血-再灌注所致肺损伤的影响及其可能的机制。

材料与方 法

实验动物与分组 SPF 级雄性 SD 大鼠 45 只,8~10 周龄,体重 180~220 g,由安徽医科大学实验动物中心提供,采用随机数字表法分为三组:假手术组(S 组)、肾脏缺血-再灌注组(IR 组)和磷酸肌酸预处理组(PCr 组),每组 15 只。

肾缺血-再灌注损伤模型的制备 参照文献[6]介绍的方法制备大鼠肾缺血-再灌注模型。麻醉前禁食 6 h,自由饮水。腹腔注射 10%水合氯醛 300 mg/kg 麻醉大鼠,温水热敷扩张尾静脉后穿刺,置 14G 套管针用于给药,电热毯及灯源照射维持体温 37~38 ℃。俯卧位固定后适当垫高腹部,备皮,碘伏消毒,分别于双侧背部肾区做长度约 2 cm 的纵行切口,切开腰背筋膜后打开腹膜后间隙,钝性分离脂肪组织后游离双侧肾蒂。使用无损伤微动脉夹夹闭左侧肾蒂并行右肾切除术,观察左侧肾脏迅速由鲜红色转变成苍白色,后渐变为暗红色,证明缺血成功。45 min 后松开动脉夹,肾脏又由暗红色转变成鲜红色,证明再灌注损伤模型制备成功。S 组仅游离肾蒂并行右肾切除术。IR 组和 PCr 组制备肾缺血-再灌注模型。PCr 组于缺血前 30 min 尾

静脉注射磷酸肌酸钠(批号:20141101) 150 mg/kg, S 组和 IR 组于同时点注射等容量生理盐水。

血气分析、血清 MDA 浓度和 SOD 活性检测 再灌注 6 h 后同时段处死大鼠,开胸后缓慢将注射器刺入左心室,抽取 3 ml 动脉血液,1 ml 用于血气分析,记录 PaO_2 ,余血样 1 500 r/min 离心,维持 10 min,取上层血清,-80 ℃ 保存。分别采用硫代巴比妥法和黄嘌呤氧化酶法测定血清 MDA 浓度和 SOD 活性。

肺泡巨噬细胞 Ca^{2+} 浓度 再灌注 6 h 后处死大鼠,结扎右主支气管,气管切开后,1 ml 4 ℃ 预冷 PBS 溶液缓慢行右肺灌洗 4 次,灌洗过程中棉签轻柔按摩右肺,控制灌洗液回收率 >80%。收取的灌洗液注入 EB 管,150 r/min 离心,弃上清,加入红细胞裂解液混匀细胞,冰上孵育 5 min,4 ℃ 预冷 PBS 溶液洗涤 2 次后,RPMI 1640 培养液重悬,将细胞悬液置于含盖玻片的培养板中,并于 5% CO_2 细胞培养箱 37 ℃ 培养 4 h,胰酶消化液吹打并收集贴壁细胞以分离肺泡巨噬细胞。150 r/min 离心,弃上清,1 ml 4 ℃ 预冷 PBS 溶液重悬,调整细胞计数为 $(0.5 \sim 1) \times 10^6$,1 ml Hank 平衡盐溶液重悬。取 500 μl 细胞悬液和 Fluo 3-AM 工作液(浓度 2 $\mu\text{mol/L}$)混匀,置入 CO_2 培养箱中 37 ℃ 孵育 60 min,150 r/min 离心,弃上清,加入 500 μl 染色缓冲液室温孵育 20 min,100 r/min 离心,弃上清,200 μl Hank 平衡盐溶液重悬,设定流式细胞仪激发波长 488 nm,发射波长 525 nm,通过荧光强度来反映肺泡巨噬细胞 Ca^{2+} 浓度。

肺湿重/干重(W/D)比值 再灌注 6 h 后处死大鼠,取右下肺叶,冲洗干净后纱布吸干表面水分,用干燥锡纸包裹标本,称量肺湿重(W),置入 80 ℃ 恒温烤箱 48 h,称重肺干重(D),计算肺 W/D 比值。

肺组织病理学 取约 1 cm×1 cm×1 cm 大小右上叶肺组织,10%中性福尔马林 4 ℃ 固定,常规脱水、透明,石蜡包埋后连续冠状切片,厚度约 3 μm ,HE 染色,光镜下观察肺组织病理学结果。

肺组织细胞凋亡 取约 1 cm×1 cm×1 cm 大小的右中叶肺组织,加入 1 ml 4 ℃ 预冷 PBS 溶液,缓慢研磨成细胞悬液,200 目滤网过滤,150 r/min 离心,弃上清,4 ℃ 预冷 PBS 溶液洗涤 2 次,调整细胞计数为(0.5~1)×10⁶,1×Annexin V Binding buffer 重悬细胞,分别加入 5 μl AnnexinV 和 5 μl PI 后室温避光孵育 15 min,通过流式细胞仪检测肺组织细胞凋亡情况,将 Q1 象限(AnnexinV-FITC)⁺/PI⁻区域的细胞定义为坏死细胞,Q2 象限(AnnexinV-FITC)⁺/PI⁺区域的细胞定义为晚期凋亡细胞,Q3 象限(AnnexinV-FITC)⁻/PI⁺区域的细胞定义为早期凋亡细胞,Q4 象限(AnnexinV-FITC)⁻/PI⁻区域的细胞定义为活细胞。

统计分析 使用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计处理。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

与 S 组比较,IR 组和 PCr 组 PaO₂ 明显降低,MDA 浓度明显升高,SOD 活性明显减弱,肺泡巨噬细胞 Ca²⁺ 浓度明显升高,肺 W/D 比值明显增大($P < 0.05$)。与 IR 组比较,PCr 组 PaO₂ 明显升高,MDA 浓度明显降低,SOD 活性明显增强,肺泡巨噬细胞 Ca²⁺ 浓度明显降低,肺 W/D 比明显减小($P < 0.05$) (表 1)。

光镜下,S 组肺泡大小均匀一致,结构完整,肺

泡腔清晰,未见充血,肺组织结构基本完整,可见少量炎性细胞浸润;IR 组大鼠肺泡壁增厚,水肿,可见大量中性粒细胞,肺泡腔内可见较多红细胞及炎性渗出液。肺间质明显增生,可见大量炎性细胞浸润;PCr 组大鼠肺泡间隔增宽,毛细血管未见明显充血,小部分肺泡腔可见红细胞及炎性渗出液,肺间质炎性细胞浸润明显减少(图 1)。

与 S 组比较,IR 组和 PCr 组肺组织细胞凋亡率明显升高($P < 0.05$);与 IR 组比较,PCr 组肺组织细胞凋亡率明显降低($P < 0.05$) (图 2,表 2)。

讨 论

本研究参考文献[6],选择于夹闭左侧肾蒂的同时切除右肾的方法制备肾缺血-再灌注模型,该方法可避免靶肾缺血-再灌注期间对侧肾的代偿作用,更接近临床上肾移植的病理生理状态。本研究结果显示,缺血-再灌注和磷酸肌酸预处理大鼠在肾缺血-再灌注后,PaO₂ 明显降低,肺含水量明显增加,肺组织明显发生病理学损伤,提示肾缺血-再灌注诱发肺损伤模型制备成功。

正常情况下,磷脂酰丝氨酸(PS)位于细胞膜的内侧,但在早期凋亡的细胞中,PS 可翻转到细胞膜的表面^[7]。Annexin V 是一种磷脂结合蛋白,可通过细胞外侧暴露的 PS 与凋亡早期细胞的胞膜结合。PI 可透过凋亡晚期和坏死细胞的细胞膜而使细胞核染红。因此,Annexin V 与 PI 联合使用时,可准确反映细胞凋亡的发生情况^[8]。本研究参考文

表 1 三组大鼠再灌注 6 h 后 PaO₂、MDA、SOD、Ca²⁺ 和 W/D 的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	PaO ₂ (mmHg)	MDA (μmol/L)	SOD (U/ml)	Ca ²⁺	W/D
S 组	15	103.3±10.8	4.99±0.47	64.84±2.70	4.91±1.42	3.23±0.35
IR 组	15	80.1±14.3 ^a	10.74±1.57 ^a	51.54±5.57 ^a	10.76±2.75 ^a	4.81±0.37 ^a
PCr 组	15	88.5±11.5 ^{ab}	8.95±1.09 ^{ab}	57.67±4.74 ^{ab}	7.58±2.27 ^{ab}	3.83±0.49 ^{ab}

注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$;与 IR 组比较,^b $P < 0.05$

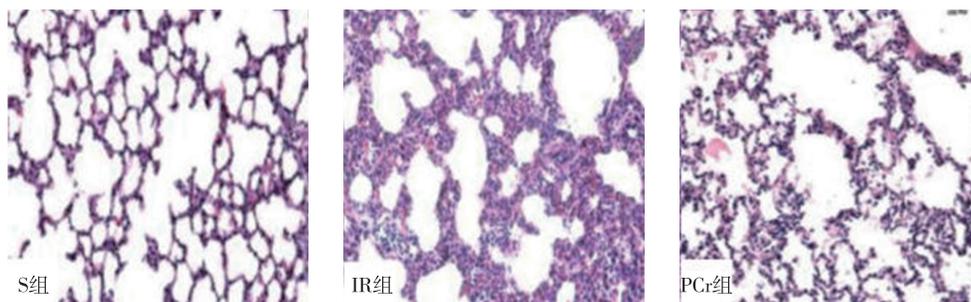


图 1 三组大鼠再灌注 6 h 后肺组织 HE 染色图(×200)

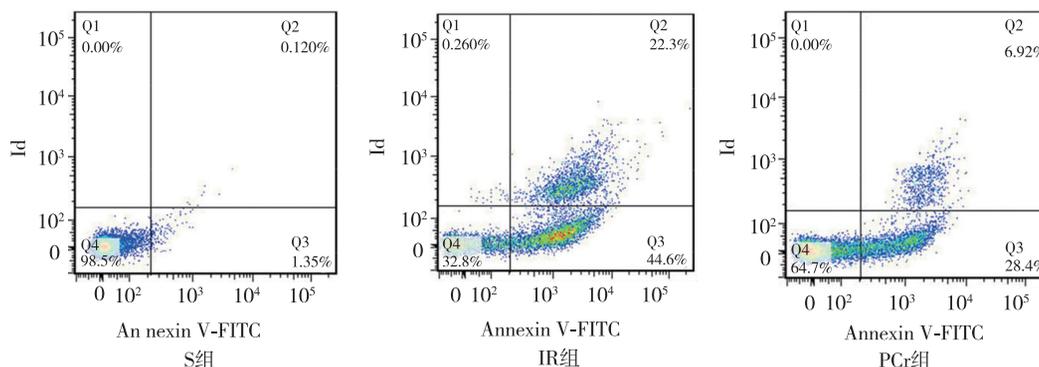


图 2 三组大鼠肺组织细胞凋亡图

表 2 三组大鼠再灌注 6 h 后肺组织细胞凋亡率的比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	活细胞	早期凋亡细胞	晚期凋亡细胞
S 组	15	97.57±1.01	2.43±1.03	0
IR 组	15	43.63±5.14 ^a	33.70±6.32 ^a	22.67±5.93 ^a
PCr 组	15	67.45±6.92 ^{ab}	23.12±6.45 ^{ab}	9.42±4.08 ^b

注:与 S 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 IR 组比较, ^b $P < 0.05$

献[9]并结合预实验结果,选择于缺血前 30 min 尾静脉注射磷酸肌酸钠 150 mg/kg。结果显示,尾静脉注射磷酸肌酸钠后,PaO₂ 明显升高,肺含水量明显降低,肺组织病理学损伤减轻,肺组织细胞凋亡率明显下降,显示外源性磷酸肌酸可能通过抑制组织细胞凋亡,减轻大鼠肾缺血-再灌注所致肺损伤。

肾缺血-再灌注病理过程中,组织和血浆脂质过氧化反应明显增强,导致细胞结构损伤和功能代谢障碍,从而诱发细胞坏死与凋亡。MDA 是膜脂质过氧化反应的产物,可有效评估机体脂质过氧化反应的程度。SOD 是生物体内重要的抗氧化酶,其活性反映机体清除氧自由基的能力^[10]。磷酸肌酸作为体内重要的载体物质,在机体遭遇缺血缺氧刺激时,可通过“磷酸肌酸穿梭”实现将线粒体的能量转移至细胞质来维持细胞的正常代谢,从而减少机体氧自由基的释放^[11]。本研究结果显示,肾缺血-再灌注后大鼠血清 MDA 浓度明显升高,SOD 活性明显减弱,提示肾缺血-再灌注加重了机体脂质过氧化反应,而磷酸肌酸预处理大鼠上述变化程度明显减轻,显示外源性磷酸肌酸预处理可有效抑制机体脂质过氧化反应,提高机体抗氧化能力,一定程度上保持机体组织细胞氧化和抗氧化反应的平衡。

肺泡巨噬细胞是肺脏自我保护的第一道防线,具有吞噬、提呈抗原和免疫调节等作用。在缺血-再

灌注损伤的病理过程中,能量代谢障碍发挥着重要的始动作用。随着细胞内 ATP 的下降,肺泡巨噬细胞内的钙离子浓度不断增加,钙离子超载可刺激细胞膜内部的 PS 转移到细胞表面,从而使细胞膜表面结构紊乱,影响肺泡巨噬细胞功能^[12]。磷酸肌酸可通过在线粒体膜间隙生成能量,为细胞膜上的离子通道、肌质网上的钙离子通道以及肌动、肌球蛋白收缩直接供能,维持细胞高能磷酸水平^[13]。本研究结果显示,与假手术组大鼠比较,缺血-再灌注大鼠肺泡巨噬细胞钙离子浓度明显升高,而磷酸肌酸预处理大鼠所检测的肺泡巨噬细胞钙离子浓度较缺血-再灌注大鼠明显下降,显示缺血期补充外源性磷酸肌酸可有效抑制钙离子向细胞内转移,减低钙离子超负荷的作用。

本研究的不足之处在于仅观察肾缺血-再灌注之后肺部损伤的进程,未进一步监测肾功能损害的情况,并且再灌注的时间点较为固定,下一步研究将继续探讨不同再灌注时间点下肾脏缺血-再灌注损伤的程度与所致远端肺损伤程度之间的相关性。

综上所述,外源性磷酸肌酸预处理可有效减轻大鼠肾缺血-再灌注诱发的肺损伤,其机制可能与减轻钙离子超载,抑制氧化应激和细胞凋亡有关。

参 考 文 献

- [1] Zhao H, Huang H, Alam A, et al. VEGF mitigates histone-induced pyroptosis in the remote liver injury associated with renal allograft ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Transplant*, 2018, 18(8): 1890-1903.
- [2] Zhu Q, He G, Wang J, et al. Protective effects of fenofibrate against acute lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in mice. *Sci Rep*, 2016, 6: 22044.
- [3] 邓小强, 陈珂, 姜徽, 等. 磷酸肌酸钠预先给药对 2 型糖尿病患者心肌缺血-再灌注损伤的影响. *临床麻醉学杂志*, 2015, 31(1): 9-11.

- [4] 邹宏运, 李元海, 张海涅, 等. 不同剂量磷酸肌酸钠预先给药对大鼠肝缺血再灌注损伤的影响. 中华麻醉学杂志, 2013, 33(5): 619-621.
- [5] Wang W, Wang Q, Yu W, et al. Efficacy of phosphocreatine pre-administration on XIAP and Smac in ischemic penumbra of rats with focal cerebral ischemia reperfusion injury. Acta Cir Bras, 2018, 33(2): 117-124.
- [6] 孔岚, 卢锡华. 羟考酮预给药对大鼠肾缺血-再灌注损伤的影响. 临床麻醉学杂志, 2017, 33(11): 1103-1106.
- [7] Hankins HM, Baldrige RD, Xu P, et al. Role of flippases, scramblases and transfer proteins in phosphatidylserine subcellular distribution. Traffic, 2015, 16(1): 35-47.
- [8] Abe J, Morrell C. Pyroptosis as a regulated form of necrosis: PI +/annexin V-/high caspase 1/low caspase 9 activity in cells = pyroptosis? Circ Res, 2016, 118(10): 1457-1460.
- [9] 孙小芬, 康芳, 沈玉君, 等. 磷酸肌酸后处理对大鼠脑缺血-再灌注损伤的影响. 临床麻醉学杂志, 2016, 32(3): 268-272.
- [10] Asgharzadeh F, Bargi R, Hosseini M, et al. Cardiac and renal fibrosis and oxidative stress balance in lipopolysaccharide-induced inflammation in male rats. ARYA atheroscler, 2018, 14(2): 71-77.
- [11] Ke-Wu D, Xu-Bo S, Ying-Xin Z, et al. The effect of exogenous creatine phosphate on myocardial injury after percutaneous coronary intervention. Angiology, 2015, 66(2): 163-168.
- [12] Lang E, Lang F. Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. Semin Cell Dev Biol, 2015, 39: 35-42.
- [13] Wang Y, Sun Y, Guo X, et al. Creatine phosphate disodium salt protects against Dox-induced cardiotoxicity by increasing calumenin. Med Mol Morphol, 2018, 51(2): 96-101.
- (收稿日期: 2018-02-04)

《临床麻醉学杂志》第一届青年编委名单

陈立建 方芳 高伟 龚亚红 桂波 华福洲 纪木火 金文杰 李佩盈 李 偲 李正迁
 林云 刘晓宇 刘艳红 刘洋 陆菡 罗洁 马璐璐 彭文平 彭宇明 任瑜 宋宗斌
 孙玉娥 唐君 田婕 田学馥 王彬 王春艳 王建设 王婷婷 王艳萍 王莹 肖锋
 徐志鹏 杨丽芳 杨万超 袁开明 张冯江 张涛 张伟 张雪 张益 张媛 赵磊
 郑跃英 朱娟 庄蕾