

• 论著 •

p21 对缺血-再灌注损伤后肾小管上皮细胞演变的影响

李开龙 王建民 丁涵露 赵玲 宋瑞华 陈林

【摘要】 目的 探讨 p21 对缺血-再灌注损伤(IRI)后肾小管上皮细胞演变的影响。**方法** 选择低龄(2 个月龄)和高龄(12 个月龄)p21(+/+)和 p21(-/-)鼠,建立左肾 IRI 模型。于 IRI 后 0、1、3、7 d 及 1、3、6 个月光镜下观察肾小管组织学变化,采用免疫组化法检测肾小管上皮细胞增殖细胞核抗原(PCNA)表达,组织化学染色观察肾小管上皮细胞衰老相关 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)活力,末端脱氧核糖转移酶介导的生物素化脱氧尿嘧啶核苷酸标记技术(TUNEL)检测肾小管上皮细胞凋亡。**结果** IRI 后 0 d,肾小管以坏死为主,高龄鼠比低龄鼠严重,p21(-/-)鼠比 p21(+/+)鼠严重(P 均 <0.05)。肾小管上皮细胞凋亡在 IRI 1 d 后出现,7 d 达高峰,且高龄鼠比低龄鼠明显,p21(-/-)鼠比 p21(+/+)鼠明显(P 均 <0.05)。低龄鼠 IRI 后 1 个月出现 SA- β -gal 染色阳性的肾小管上皮细胞,而对侧肾此时未见衰老细胞,3 和 6 个月时衰老的肾小管上皮细胞显著增多,且 p21(+/+)鼠比 p21(-/-)鼠明显(P 均 <0.05);p21(+/+)高龄鼠 IRI 后 0 d 双肾即可见大量的 SA- β -gal 染色阳性肾小管上皮细胞,且较 p21(-/-)鼠显著增多(P 均 <0.05),但 1 d 后,p21(+/+)和 p21(-/-)鼠 IRI 肾衰老细胞均明显减少(P 均 <0.05),1 个月后又呈进行性增加,且 p21(+/+)鼠始终比 p21(-/-)鼠严重。高龄和低龄 p21(+/+)鼠 PCNA 阳性染色细胞出现的几率差异无显著性(P 均 >0.05),但低龄鼠细胞增殖能力要强于高龄鼠;而 p21(-/-)鼠的细胞增殖能力明显强于 p21(+/+)鼠,低龄鼠更为显著(P 均 <0.05)。对高龄鼠 IRI 后 1 d 细胞衰老和凋亡进行相关分析显示,二者呈显著负相关[p21(+/+)鼠: $r=-0.82, P<0.001$;p21(-/-)鼠: $r=-0.76, P<0.001$]。**结论** ①IRI 可促进正常肾小管上皮细胞衰老的进程;②已经进入衰老状态的肾小管上皮细胞在遭受 IRI 刺激后,更易走向死亡[坏死和(或)凋亡];③p21 在 IRI 所致肾小管上皮细胞演变过程中发挥重要的调控作用。

【关键词】 衰老; 肾小管上皮细胞; p21; 缺血-再灌注损伤

Effect of p21 on the changes in renal tubular epithelial cells after ischemia/reperfusion injury of kidney LI Kai-long*, WANG Jian-min, DING Han-lu, ZHAO Ling, SONG Rui-hua, CHEN Lin. * Center of Medical Molecular Genetics, State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Trauma Center of PLA, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China
Corresponding author: CHEN Lin (Email:linchen70@163.com)

【Abstract】 Objective To investigate the contribution of p21 gene in renal tubular epithelial cells in p21(+/+) and p21(-/-) mice of young and old ages at different times after kidney ischemia/reperfusion injury(IRI). **Methods** In p21(+/+) and p21(-/-) male mice at the ages of 2 and 12 months the kidneys were made ischemic by clamping the left renal artery for 45 minutes followed by declamping. On 0, 1, 3 and 7 days, 1, 3 and 6 months after reflow, renal tissue was processed for pathological study, determination of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), apoptosis and senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) analysis, using hematoxylin and eosin staining, immunohistochemistry, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin in situ nick-end labeling (TUNEL), and histochemical staining, respectively. **Results** Renal tubule necrosis and cell apoptosis were more severe in p21(-/-) mice and old mice as compared with p21(+/+) mice and young mice (both $P<0.05$), respectively. In young p21(+/+) mice, occasionally faint staining for SA- β -gal activity began to appear after 1 month, and significantly increased 3 and 6 months after IRI ($P<0.05$), but there was no positive staining for SA- β -gal in the contralateral kidney or both kidneys in p21(-/-) mice at any time. Another manner of the expression of SA- β -gal was detected in aged p21(+/+) mice, as both kidneys showed intensely positive staining for SA- β -gal at 0 day after IRI, it then subsided notably on 1 day in the IRI kidney ($P<0.05$), but increased again at 3 months, though still less intense than the contralateral kidney, albeit more intense than the young mice at the same time ($P<0.05$). Three months after IRI, in both the IRI kidney and the contralateral kidney, positive staining for SA- β -gal almost reached the same level. On the contrary, only occasional faint staining for SA- β -gal activity was observed in aged p21(-/-) mice at any time. No significant difference in positive staining of nuclear PCNA was found between in young and aged p21(+/+) mice ($P>0.05$), although the numbers of positively stained nuclear PCNA were more in number in young mice than in aged mice. But in p21(-/-) mice, significantly more cells were positively stained for PCNA, especially in young mice and in IRI kidneys ($P<0.05$). Correlation analysis between senescent and apoptotic cells in aged mice made at 1 day after IRI showed striking negative correlation between both of them [p21(+/+) mice: $r=-0.82, P<0.001$; p21(-/-) mice: $r=-0.76, P<0.001$]. **Conclusion** IRI can promote the senescence process of normal tubular cells, and can accelerate death (necrosis and apoptosis) process of senescent tubular cells. p21 gene may play an important role in the senescence changes in tubular epithelial cells after kidney ischemia/reperfusion injury.

【Key words】 senescence; renal tubular epithelial cell; p21; ischemia/reperfusion injury

缺血-再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, IRI)不仅可以引起组织器官的急性损伤^[1],而且会对组织器官功能和形态产生长期的损害作用,移植肾功能的延迟恢复和长期改变即是典型的代表,有关机制并不清楚^[2]。细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 p21 是重要的细胞周期调节基因,是引起 G1 期阻滞的直接原因。p21 在 IRI 后肾小管上皮细胞^[3,4]和衰老的肾小管上皮细胞^[5,6]均出现高表达,因此,我们推测 p21 可能对 IRI 后肾小管上皮细胞的演变有着重要调控作用。本研究以高龄(12 个月龄)和低龄(2 个月龄)p21(+ / +)和 p21(- / -)鼠为对象,通过观察左肾 IRI 后早期和后期肾小管上皮细胞的演变,探讨 p21 对这种演变的调控作用,揭示 IRI 对组织器官产生长期效应(long-term effects)的可能机制,为其防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物:p21(- / -)鼠从美国 NIH 引进,在大坪医院野战外科研究所实验动物中心(符合国家 SPF 级实验动物标准)饲养和进行同系繁殖。实验用鼠为 p21(- / -)与 C57 鼠交配获得,取鉴定后的 p21(+ / +)和 p21(- / -)鼠各 70 只,均为雄性,其中各组低龄和高龄鼠各 35 只。低龄和高龄 p21(+ / +)鼠平均体重为(21.62 ± 4.05)g 和(32.20 ± 8.66)g,低龄和高龄 p21(- / -)鼠平均体重为(26.02 ± 6.40)g 和(35.76 ± 5.93)g。

1.2 主要试剂和仪器:衰老相关 β-半乳糖苷酶(senescence associated β-galactosidase, SA-β-gal)染色试剂盒(Sigma 公司);ApoAlert DNA 片段检测试剂盒(BD 公司);鼠抗增殖细胞核抗原(PCNA)单克隆抗体(单抗)和荧光素标记的山羊抗鼠免疫球蛋白 IgG(Chemicon 公司);冰冻切片机(CM1850, Laica, 德国)。

1.3 动物模型和组织标本制备:建立鼠左侧肾脏 IRI 模型:参照 Supavekin 等^[7]的方法进行。以质量分数为 2.5%的阿伏丁(Avertin, 0.016 ml/g)腹腔

注射麻醉鼠,无菌条件下左背侧 1.5 cm 纵形切口入腹腔,游离左肾动脉,无创动脉夹阻断血流 45 min 后开放动脉夹,观察肾脏,恢复灌注后关闭腹腔,制成 IRI 模型。两组动物中高龄和低龄鼠分别在 IRI 后 0、1、3、7 d 及 1、3 和 6 个月各处死 5 只,收集肾脏标本。麻醉鼠后,腹部正中切口入腹腔,离断腹主动脉充分放血处死动物,收集双肾,剥离肾包膜,矢状纵行剖开肾脏,用含二乙基焦磷酸胺(DEPC)的磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗肾脏 1 min 后,一半肾组织经丙酮固定、蔗糖脱水后作冰冻切片(厚 4 μm),置-70 °C 冰箱冻存,进行组织化学染色和免疫组化染色;另一半肾组织经体积分数为 4%的多聚甲醛固定后石蜡包埋,并进行苏木素-伊红(HE)染色。

1.4 观察内容和检测指标

1.4.1 肾组织学观察:参照 Megyesi 等^[4]方法稍作改进。光镜下观察 IRI 后肾小管坏死的变化,将肾小管坏死程度分为 0~3 级:0 级为无坏死;1 级为坏死局限在皮质 1/3 范围内,主要在近曲小管的 S3 段;2 级为坏死超出皮质的 2/3 范围;3 级为坏死波及皮质全层。

1.4.2 肾小管上皮细胞凋亡、增殖、衰老检测均采用冰冻切片(厚 4 μm)。

1.4.2.1 凋亡检测:用末端脱氧核糖转移酶介导的生物素化脱氧尿嘧啶缺刻标记技术(TUNEL),采用 ApoAlert DNA 片段检测试剂盒,按操作说明书进行,荧光显微镜下观察,在(520 ± 20)nm 滤光波长下调亡细胞核染成强绿色荧光,620 nm 观察所有细胞胞质染成红色。

1.4.2.2 增殖检测:冰冻切片干燥后,用 4 °C 丙酮固定 4 min、干燥,经抗原修复、体积分数为 3%的过氧化氢(H₂O₂)-甲醇溶液除去内源性过氧化物酶后,加鼠抗 PCNA 单抗(工作浓度 1:100),阴性对照加 PBS,4 °C 过夜。冰 PBS 洗 2 次 × 10 min,加荧光素标记的山羊抗鼠免疫球蛋白 IgG(工作浓度 1:50),室温孵育 1 h,室温 PBS 洗 2 次 × 10 min,中性树胶封片,荧光显微镜下观察,绿色荧光示 PCNA 阳性。

1.4.2.3 衰老检测:用组织化学染色法,在 pH 6.0 条件下 X-gal 染色 16 h 检测衰老相关 SA-β-gal 活性,pH 7.4 条件下,所有组织 SA-β-gal 活性均为阴性(作为对照)。具体步骤按染色试剂盒操作说明书进行。伊红复染后光学显微镜下观察,衰老细胞染成靛蓝色或紫蓝色。

1.4.2.4 结果分析:细胞凋亡、PCNA 和 SA-β-gal

基金项目:教育部“长江学者奖励计划”特聘教授配套经费资助

作者单位:400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军创伤中心,创伤、烧伤、复合伤国家重点实验室临床分子遗传研究室(李开龙,王建民,赵玲,宋瑞华,陈林);400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所(李开龙,丁涵露)

通讯作者:陈林,教授,博士研究生导师,教育部“长江学者奖励计划”特聘教授(Email:linchen70@163.com)

作者简介:李开龙(1966-),男(汉族),湖北省广水市人,博士研究生,副教授,副主任医师,主要从事肾小管和肾间质疾病发病机制与防治的研究,发表论文 33 篇(Email:likailong1966@21cn.com)。

染色结果采用半定量计分法:0 分为无阳性信号出现;1 分为偶见阳性染色信号;2 分为局灶性阳性染色信号出现;3 分为弥漫性阳性染色信号出现。每份标本均随机选择 10 个高倍视野,计算平均值作为计量资料。

1.5 统计学处理:统计学分析采用 SPSS 8.0 统计软件包进行统计学处理,计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组资料间和同组多个时间点资料间比较,方差齐者采用 One - Way ANOVA 分析;组间两两比较采用 LSD 法。对方差不齐者采用 Tamhane 分析,对有相关趋势的变量进行线性回归分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 左肾 IRI 后肾小管变化(表 1):IRI 后 0、1 和 3 d 肾小管以坏死为主,高龄鼠比低龄鼠严重,同龄 p21(-/-)鼠比 p21(+/+)鼠严重(P 均 <0.05 ,彩色插页图 1);IRI 后 7 d 逐渐减轻,IRI 1 个月后逐渐消失,对侧肾无明显组织学异常(资料未列出)。

表 1 左肾 IRI 后肾小管坏死的评估($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 1 Evaluation of renal tubular necrosis in left kidney after IRI($\bar{x}\pm s, n=5$) 分

时间	p21(+/+)鼠		p21(-/-)鼠	
	低龄	高龄	低龄	高龄
IRI 后 0 d	1.7±0.7	2.4±0.6*	2.0±0.3 [△]	2.8±0.4* [△]
IRI 后 1 d	1.8±0.8	2.1±0.8*	2.2±0.4 [△]	2.8±0.6* [△]
IRI 后 3 d	1.2±0.5	1.8±0.8*	1.6±0.3 [△]	2.3±0.5* [△]
IRI 后 7 d	0.8±0.7	1.0±0.7*	1.2±0.2 [△]	1.6±0.2 [△]
IRI 后 1 个月	0.2±0.1	0.3±0.1	0.5±0.1 [△]	0.9±0.2 [△]
IRI 后 3 个月	0	0	0	0.2±0
IRI 后 6 个月	-	-	0	0.2±0

注:与相同基因型和相同时间点的低龄鼠比较;* $P<0.05$;

与 p21(+/+)鼠相同年龄和相同时间点比较;[△] $P<0.05$

2.2 肾小管上皮细胞凋亡、衰老和增殖变化(表 2):

表 2 左肾 IRI 后肾小管上皮细胞凋亡、增殖和衰老变化($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Tubular cell apoptosis, proliferation and senescence in left kidney after IRI($\bar{x}\pm s, n=5$) 分

时间	细胞凋亡				细胞增殖				细胞衰老			
	低龄鼠		高龄鼠		低龄鼠		高龄鼠		低龄鼠		高龄鼠	
	p21(-/-)	p21(+/+)	p21(-/-)	p21(+/+)	p21(-/-)	p21(+/+)	p21(-/-)	p21(+/+)	p21(-/-)	p21(+/+)	p21(-/-)	p21(+/+)
IRI 后 0 d	0	0	0.4±0 [△] *	0.2±0*	0	0	0	-	-	-	1.5±0.4 [△] *	2.8±0.9*
IRI 后 1 d	0.3±0	0.2±0	0.9±0.2 [△] *	0.6±0.2*	0.2±0	0	0.1±0	-	-	-	0.9±0.3 ^{#△} *	1.4±0.2 [#] *
IRI 后 3 d	0.8±0.1 [△]	0.5±0.1	1.7±0.2 [△] *	1.3±0.5*	0.2±0	0	0.2±0	0.0±0	-	-	0.8±0.3 [△] *	1.6±0.3*
IRI 后 7 d	1.6±0.3 [△]	1.2±0.3	2.6±0.4 [△] *	2.1±0.9*	1.4±0.2 [△]	0.8±0.2	0.9±0.2 [△] *	0.5±0.2	-	-	0.8±0.2 [△] *	1.5±0.1*
IRI 后 1 个月	0.9±0.2 [△]	0.5±0.2	1.8±0.3 [△] *	1.4±0.6*	1.7±0.2 [△]	0.9±0.2	1.1±0.1 [△] *	0.7±0.1	0.6±0.3 [△]	0.9±0.4	0.9±0.2 [△] *	1.6±0.7*
IRI 后 3 个月	0.3±0	0.2±0.1	0.6±0.1*	0.6±0.3*	1.2±0.3	0.9±0.3	0.8±0.1*	0.6±0.1	0.8±0.2 [△]	1.2±0.7	1.0±0.5 [△]	2.8±0.8*
IRI 后 6 个月	0.3±0.1	0.2±0	0.4±0	0.3±0.1	0.8±0.4	0.6±0.4	0.6±0.1	0.4±0.1	0.7±0.1 [△]	1.3±0.5	1.2±0.4 [△]	2.7±0.4*

注:与相同基因型和相同时间点的低龄鼠比较;* $P<0.05$;与 p21(+/+)鼠相同年龄和相同时间点比较;[△] $P<0.05$ 与相同年龄和相同基因型鼠 IRI 后 0 d 比较;[#] $P<0.05$

肾小管上皮细胞凋亡在 IRI 1 d 后开始出现,7 d 达高峰,而且高龄鼠比低龄鼠明显、p21(-/-)鼠比 p21(+/+)鼠明显(P 均 <0.05 ,彩色插页图 2)。低龄鼠在 IRI 后 1 个月出现 SA- β -gal 染色阳性肾小管上皮细胞,而对侧肾未见衰老细胞,3 个月和 6 个月时衰老的肾小管上皮细胞显著增多,且 p21(+/+)鼠比 p21(-/-)鼠明显(P 均 <0.05 ,彩色插页图 3)。高龄 p21(+/+)鼠 IRI 后 0 d 双肾即可见到大量的 SA- β -gal 染色阳性肾小管上皮细胞,且较高龄 p21(-/-)鼠显著增多(P 均 <0.05),但 IRI 1 d 后,p21(+/+)鼠和 p21(-/-)鼠 IRI 肾衰老细胞均明显减少(P 均 <0.05 ,彩色插页图 4),1 个月后又呈进行性增加,并且 p21(+/+)鼠始终比 p21(-/-)鼠严重。高龄和低龄 p21(+/+)鼠 PCNA 阳性染色细胞出现的几率差异均无显著性(P 均 >0.05),但低龄鼠细胞增殖能力要强于高龄鼠,而 p21(-/-)鼠的细胞增殖能力明显强于 p21(+/+)鼠、且低龄鼠更为显著($P<0.05$,彩色插页图 5)。

2.3 肾小管上皮细胞 SA- β -gal 染色阳性信号与 TUNEL 阳性信号之间相关性分析:高龄鼠 IRI 后 1 d 二者呈显著负相关[p21(+/+)鼠: $r=-0.82$, $P<0.001$;p21(-/-)鼠: $r=-0.76$, $P<0.001$]。

3 讨论

肾小管坏死和肾小管上皮细胞凋亡是 IRI 引起急性肾脏功能丢失的主要病理基础^[1,3,4,8];p21 表达上调、抑制细胞周期进展则有利于损伤细胞暂时逃避死亡而进行损伤修复,但同时也可能因细胞周期抑制导致 IRI 后远期细胞衰老发生几率增加^[6,7,9],从而引起肾脏功能和结构的慢性丢失。近年来,通过采用不同的肾脏 IRI 模型,对 p21 在细胞凋亡和细

胞周期调控中的作用进行了研究^[7,10],发现肾脏 IRI 后,肾小管上皮细胞 p21 的表达上调,而且这种表达上调与其上游基因 p53 的诱导有关。p21 基因和蛋白的高表达引起细胞周期破坏和 G1 期阻滞,p21 蛋白还可以结合和抑制 PCNA,从而抑制细胞增殖。Megyesi 等^[4]的研究发现,p21(-/-)鼠双肾 IRI 后早期,肾脏病理表现以肾小管和肾间质坏死为主,细胞凋亡在 1 周后达到高峰,肾脏 PCNA 表达比野生鼠的肾明显,范围更广泛。表明 p21 基因敲除后,细胞周期开放不适宜、G1 期阻滞松懈,最终导致细胞死亡(坏死和凋亡)加剧,可见 p21 对 IRI 后急性肾脏损害具有一定的保护作用,细胞周期协调与否是急性肾功能衰竭发生的重要决定因素^[11]。

另一方面,p21 基因具有促进慢性肾功能衰竭(chronic renal failure,CRF)进展的作用。Megyesi 等^[12]在研究部分肾切除引起的进行性肾功能不全时发现,野生鼠部分肾切除后,可出现 CRF 特征性的功能和形态学变化,p21(-/-)鼠在部分肾切除后则不会发生 CRF,提示,控制 p21 的功能可能有利于改善甚至阻止终末期肾病的进展,但作者没有提及肾小管上皮细胞衰老在肾功能不全发生中的可能作用,因为理论上野生鼠衰老的肾小管上皮细胞可能较 p21(-/-)鼠更为严重,这可能是野生鼠易于发生肾功能不全的原因之一。这可以从 Ding 等^[5]的研究结果中得到启示,他们通过观察高龄大鼠肾小管间质纤维化时肾小管上皮细胞衰老以及转化生长因子- β 1(TGF- β 1)和 p21WAF1/CIP1 蛋白表达的变化,发现高龄大鼠肾小管间质纤维化时,小管上皮细胞衰老以及 TGF- β 1 和 p21WAF1/CIP1 蛋白表达均维持在高水平,提示肾小管上皮细胞衰老可能与 p21 的高表达有关。本研究发现,IRI 后早期肾小管以坏死为主,高龄鼠比低龄鼠严重,p21(-/-)鼠比 p21(+/-)鼠严重;肾小管上皮细胞凋亡也表现为高龄鼠比低龄鼠明显以及 p21(-/-)鼠比 p21(+/-)鼠明显的模式;而在细胞增殖方面则呈现出 p21(-/-)鼠强于 p21(+/-)鼠,低龄鼠强于高龄鼠的特征,与 Megyesi 等^[4]报道一致。表明 p21 基因敲除后对细胞周期的抑制松懈,细胞受损伤后逃避死亡的能力降低,所以 p21(-/-)鼠坏死和凋亡的细胞比 p21(+/-)鼠多,而细胞增殖能力也因细胞周期抑制的解除得到增强。高龄鼠 IRI 后 0 d 双肾均可见大量衰老细胞,并且 p21(+/-)鼠比 p21(-/-)鼠多,说明存在自然衰老的肾小管上皮细胞,p21 基因敲除对自然衰老的肾小管上皮细胞

也有一定抑制作用;低龄鼠 IRI 后 1 个月开始出现衰老细胞,3 个月和 6 个月显著增多,且 p21(+/-)鼠明显多于 p21(-/-)鼠,说明 IRI 具有加速肾小管上皮细胞衰老进程的作用,p21 基因敲除对 IRI 诱导的肾小管上皮细胞具有更为明显的抑制作用。IRI 加速肾小管上皮细胞衰老进程的作用可能是 IRI 长期效应的机制之一,因为肾小管上皮细胞衰老是肾脏结构和功能慢性丢失的重要原因。研究证实,移植肾功能延迟和丢失与肾脏老化,尤其是与肾小管上皮细胞衰老直接相关,IRI 后肾脏功能的恢复与肾小管上皮细胞衰老呈显著负相关^[4,6,13]。本研究中还发现,高龄鼠自然衰老的肾小管上皮细胞在 IRI 后 1 d 显著减少,细胞凋亡与衰老呈显著负相关,提示 IRI 有促进衰老细胞向凋亡转化的作用。损伤和应激诱导衰老细胞向凋亡转化在其他体细胞也有报道,初步研究发现衰老细胞凋亡与细胞凋亡蛋白酶半胱天冬酶-3 表达上调有关^[14-16]。

本研究中初步发现,IRI 不仅可以引起急性期肾小管坏死和肾小管上皮细胞凋亡,而且有诱导后期肾小管上皮细胞衰老的作用,后者可能是 IRI 长期效应的重要机制之一;IRI 还可以促进自然衰老的肾小管上皮细胞向凋亡转归;p21 对细胞周期的调控可能对 IRI 后肾小管上皮细胞演变产生重要影响。进一步研究 IRI 后 p21 调节肾小管上皮细胞演变信号通路及其可能的干预措施,有可能寻求到防治 IRI 引起肾脏急、慢性结构和功能丢失的新策略。

参考文献:

- 1 孙桂芝,周同,张玉梅,等. 树突状细胞在肾缺血-再灌注损伤中的分布与作用[J]. 中国危重病急救医学,2003,15:726-729.
- 2 Gueller F, Gwinner W, Schwarz A, et al. Long-term effects of acute ischemia and reperfusion injury[J]. *Kidney Int*, 2004, 66: 523-527.
- 3 李开龙, 陈林. p53 在肾脏缺血再灌注损伤发生机制中的作用[J]. 国外医学泌尿系统分册, 2005, 25: 241-246.
- 4 Megyesi J, Andrade L, Vieira J M, et al. Positive effect of the induction of p21WAF1/CIP1 on the course of ischemic acute renal failure[J]. *Kidney Int*, 2001, 60: 2164-2172.
- 5 Ding G, Franki N, Kapasi A A, et al. Tubular cell senescence and expression of TGF- β 1 and p21(WAF1/CIP1) in tubulointerstitial fibrosis of aging rats[J]. *Exp Mol Pathol*, 2001, 70: 43-53.
- 6 Chkhotua A, Shohat M, Tobar A, et al. Replicative senescence in organ transplantation - mechanisms and significance[J]. *Transplant Immunol*, 2002, 9: 165-171.
- 7 Supavekin S, Zhang W, Kucherlapati R, et al. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion[J]. *Kid Intern*, 2003, 63: 1714-1724.
- 8 夏安周, 张召辉, 邢淑华. 银杏叶提取物对肾缺血-再灌注后细胞凋亡的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11: 212-214.

9 Campisi J. Aging, tumor suppression and cancer; high wire - act [J]. Mech Aging Dev, 2005, 126: 51 - 58.
 10 Nahas A M E, Bello A K. Chronic kidney disease; the global challenge [J]. Lancet, 2005, 365: 331 - 340.
 11 Price P M, Megyesi J, Safirstein R L. Cell cycle regulation; repair and regeneration in acute renal failure [J]. Semin Nephrol, 2003, 23: 449 - 459.
 12 Megyesi J, Price P M, Tamayo E, et al. The lack of a functional p21WAF1/CIP1 gene ameliorates progression to chronic renal failure [J]. Proc Acad Sci USA, 1999, 96: 10830 - 10835.
 13 Chkhotua A, Shapira Z, Tovar A, et al. Cellular senescence: a new marker of kidney function recovery after ischemic injury in

rats [J]. Transplant Proc, 2001, 33: 2910 - 2915.
 14 Hampel B, Malisan F, Niederegger H, et al. Differential regulation of apoptotic cell death in senescent human cells [J]. Exp Gerontol, 2004, 39: 1713 - 1721.
 15 Ohshima S. Apoptosis in stress - induced and spontaneously senescent human fibroblasts [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 324: 241 - 246.
 16 Unterluggauer H, Hampel B, Zwerschke W, et al. Senescence - associated cell death of human endothelial cells; the role of oxidative stress [J]. Exp Gerontol, 2003, 38: 1149 - 1160.

(收稿日期: 2005 - 04 - 11 修回日期: 2005 - 10 - 01)

(本文编辑: 李银平)

• 基层园地 •

血液灌流治疗重度有机磷农药中毒 82 例

谢后雨 陈海水 孙军 常建萍 叶红

【关键词】 中毒, 有机磷农药; 血液灌流; 综合治疗

为了探讨血液灌流(HP)治疗重度急性有机磷农药中毒(AOPP)的效果, 分析 2003 年 1 月—2005 年 1 月本院救治的 82 例重度 AOPP 患者疗效, 并与 2003 年前的 60 例单纯内科常规治疗者进行对照, 分析如下。

1 临床资料

1.1 病例: 治疗组 82 例中男 28 例, 女 54 例, 年龄 12~72 岁, 平均 36.5 岁。对照组 60 例中男 16 例, 女 44 例; 年龄 11~73 岁, 平均 34.6 岁。两组患者年龄、性别、服毒量和疾病严重程度比较, 差异均无显著性($P > 0.05$), 有可比性。

1.2 诊断标准: ①血清胆碱酯酶(ChE)活性 < 0.30 ; ②呼吸窘迫; ③动脉血氧饱和度 < 0.80 或氧合指数 ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) $< 200 \text{ mm Hg}$ ($1 \text{ mm Hg} = 0.133 \text{ kPa}$); ④昏迷; ⑤休克。①项为必备, 加上②、③两项中任一项与④、⑤两项中任一项, 即可诊断重度 AOPP。

1.3 治疗方法: 对照组采用内科常规治疗; 迅速洗胃至洗出液无农药味为止, 应用阿托品、解磷定、利尿剂、复能剂和脱水剂等对症治疗。治疗组在内科常规治疗基础上加上 HP 治疗, 灌流器为宁波

表 1 两组重度有机磷农药中毒患者疗效比较

组别	例数 (例)	恢复清醒时间 ($\bar{x} \pm s, d$)	机械通气时间 ($\bar{x} \pm s, d$)	ChE 活性恢复时间 ($\bar{x} \pm s, d$)	阿托品用量 ($\bar{x} \pm s, \text{mg}$)	住院时间 ($\bar{x} \pm s, d$)	治愈率 (%)	病死率 (%)
治疗组	82	1.86 ± 1.46 *	2.34 ± 1.43 *	5.11 ± 1.55 *	160.36 ± 26.72 **	8.43 ± 1.72 *	92.0 **	8.0 **
对照组	60	2.25 ± 1.32	4.21 ± 2.65	7.71 ± 2.42	201.67 ± 52.68	14.32 ± 7.98	61.7	38.3

注: 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

亚泰(160 g)和河北爱尔(150 g)活性炭灌流器, 灌流方法为先用 2 000 ml 肝素生理盐水(500 ml 生理盐水 + 10 mg 肝素)预冲管路和灌流器, 放置深静脉导管并固定, 连接动脉管道到动脉端, 开动血泵, 推注肝素首剂 0.8~1.0 mg/kg, 待血液流近静脉端时连接静脉端, 此时血流量为 50~100 ml/min, 并预防性推注抗过敏药地塞米松、葡萄糖酸钙等, 将血流量逐渐加到 180~240 ml/min, 追加肝素 10.0~15.0 mg/h, 灌流时间 2~4 h。

1.4 统计学处理: 计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用 t 检验; 计数资料用 χ^2 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.5 结果(表 1): 治疗组恢复清醒时间、机械通气时间、ChE 活性恢复时间、住院时间均明显短于对照组, 治愈率明显高于对照组, 病死率明显低于对照组。

2 讨论

HP 是临床治疗急性中毒的常用血液净化方法之一, 主要适用中分子物质、小分子环状结构以及部分与血浆蛋白结合的大分子物质^[1]。有机磷农药在体内易与蛋白质结合, 且分子质量大、脂溶性

高, 如采用血液透析不易被清除, 而 HP 清除效果好^[2]。本组资料显示, HP 治疗组治愈率高, 病死率低, 患者恢复清醒时间、机械通气时间、ChE 活性恢复时间、住院时间均比对照组明显缩短, 阿托品总用量也明显减少。灌流器中的活性炭对阿托品也有吸附作用, 因此在 HP 时应调整阿托品剂量。

HP 的不良反应主要为灌流后出血倾向和灌流时血小板一过性减少和一过性低血压, 治疗时应用低分子肝素、补液、输血浆等都能很好地预防不良反应的发生。说明 HP 不但能快速清除体内有机磷农药, 而且该方法操作简单、成本低廉、不良反应少, 是救治重度 AOPP 的有效方法, 适合在基层医院应用。

参考文献:

1 彭月文, 黄耀立. 血液透析与灌流联合治疗急性重度药物中毒临床体会 [J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13: 19.
 2 桑栋, 顾瑞亚, 徐凤英, 等. 血液灌流抢救急性农药和药物中毒的疗效观察 [J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11: 308 - 309.

(收稿日期: 2005 - 06 - 02)

(本文编辑: 李银平)

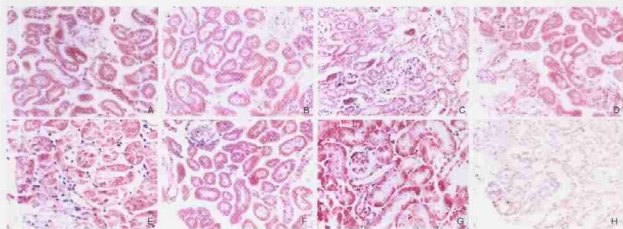
基金项目: 南京市科技计划基金资助项目 (200306049)

作者单位: 211500 江苏省南京市六合区人民医院

作者简介: 谢后雨 (1972 -), 男 (汉族), 安徽省人, 主治医师。

p21对缺血-再灌注损伤后肾小管上皮细胞演变的影响

(正文见606页)



A-D为p21(+/+)鼠(HE, ×200), E-H为p21(-/-)鼠(HE, ×400), A, C, E, G为低龄鼠, B, D, F, H为高龄鼠; A, B, E, F为右肾; C, D, G, H为左肾

图1 IRI后0 d肾脏形态学变化比较

Figure 1 Comparison of kidney morphology on day 0 after IRI



A, B为p21(+/+)鼠, C, D为p21(-/-)鼠, A, C为低龄鼠, B, D为高龄鼠

图2 IRI后7d肾小管上皮细胞凋亡的比较(TUNEL, ×200)

Figure 2 Comparison of cell apoptosis on day 7 after IRI (TUNEL, ×200)



A, B为p21(+/+)鼠, C, D为p21(-/-)鼠, A, C为IRI后0 d, B, D为IRI后1 d

图3 低龄鼠IRI后肾小管上皮细胞衰老的比较(X-gal, ×200)

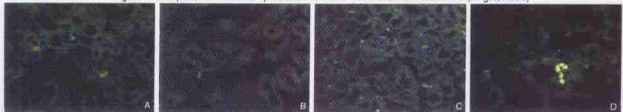
Figure 3 Comparison of tubular epithelial cell senescence of young mice after IRI (X-gal, ×200)



A, B为p21(+/+)鼠, C, D为p21(-/-)鼠, A, C为IRI后0 d, B, D为IRI后1 d

图4 高龄鼠IRI后肾小管上皮细胞衰老的比较(X-gal, ×200)

Figure 4 Comparison of tubular epithelial cell senescence of old mice after IRI (X-gal, ×200)



A, B为p21(+/+)鼠, C, D为p21(-/-)鼠, A, C为低龄鼠, B, D为高龄鼠

图5 IRI后1个月肾小管上皮细胞增殖的比较(免疫荧光, ×400)

Figure 5 Comparison of tubular epithelial cell proliferation 1 month after IRI (immunofluorescence, ×400)