

连续性静脉-静脉血液滤过治疗山羊挤压综合征模型的建立*

唐 怡, 张 凌, 杨莹莹, 赵宇亮, 付 平[△]

四川大学华西医院 肾脏内科(成都 610041)

【摘要】 目的 建立山羊挤压综合征(CS)动物模型,并探讨连续性静脉-静脉血液滤过(CVVH)治疗对肾功能及肾组织病理变化的影响。**方法** 12只山羊随机分为对照组、CS模型组、CVVH治疗组,每组4只。CS模型组与CVVH治疗组山羊于后肢肌肉注射50%甘油生理盐水溶液10 mL/kg建立CS模型(对照组注射等量生理盐水),1、2、8、12、24 h后检测血清肌酸激酶(sCK)和肌酐(sCr),以sCK>1 000 U/L,同时sCr>2倍对照值判断为造模成功。造模1 h后,CVVH治疗组于造模对侧股静脉留置单针双腔导管建立血管通路,采用智能化床旁肾脏替代治疗机进行CVVH治疗。血流量为100 mL/min,置换液流速为35 mL/(kg·h),以前稀释法输入,治疗23 h后(第24 h)处死动物,留取肾组织标本,光镜、电镜下观察肾组织病理组织结构变化;采用免疫组化染色检查caspase12蛋白表达变化及TUNEL染色对细胞凋亡进行检测。**结果** 造模山羊均于注射甘油后1 h内出现酱油色小便,尿量较对照组明显减少。CS模型组与CVVH治疗组造模1 h后血清sCr及sCK较对照组升高,差异有统计学意义($P<0.05$),提示造模成功。行CVVH治疗23 h(第24 h),sCK、sCr水平低于CS模型组($P<0.05$)。光镜下CS模型组肾组织可见急性肾小管坏死表现,肾间质水肿,肾小球基本正常。电镜下模型组可见小管上皮细胞明显的染色质聚集,线粒体肿胀,内质网扩张等早期细胞凋亡征象,CVVH治疗组表现较轻。CS模型组及CVVH治疗组caspase12表达高于对照组($P<0.001$),CVVH治疗组caspase12表达低于CS模型组($P<0.05$)。TUNEL染色证实CS模型组山羊肾组织细胞凋亡比例明显增高,CVVH治疗组较模型组凋亡比例少。**结论** 通过肌肉注射50%甘油生理盐水溶液可建立山羊CS模型,早期行CVVH治疗可减缓肾功能恶化,减轻肾小管上皮细胞凋亡程度。

【关键词】 挤压综合征 山羊模型 急性肾损伤 连续性静脉-静脉血液滤过

Continuous Veno-venous Hemofiltration in Goat Model with Crush Syndrome TANG Yi, ZHANG Ling, YANG Ying-ying, ZHAO Yu-liang, FU Ping[△]. Department of Nephrology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: fupinghx@163.com

【Abstract】 Objective Crush syndrome (CS) is a common critical condition. This study aimed to establish a crush syndrome goat model through muscle injection of glycerol and test the effect of continuous veno-venous hemofiltration (CVVH). **Methods** 12 male goats at 12-15 months age were randomly assigned into control, model, and CVVH groups. After 2 weeks of normal feeding, the goats were weighed and stripped off foods for 24 h. Goats in the model and CVVH groups were then injected with 50% glycerol at hind legs. Diagnosis of CS was established based on serum creatine kinase (CK) > 1 000 U/L and serum creatinine (sCr) > 2 times of standard. No intervention was given to goats in the control group. A catheter was planted to get blood access. CVVH was administered using a Prisma-flex machine, with blood flow being set at 100 mL/min and replacement fluid with pre-dilution at 35 mL/(kg·h). After 23 h of treatment, the goats were sacrificed. Plasma and kidney samples were taken. **Results** Bloody urine hyperkalemia and decrease of urine volume were found in all of the goats injected with glycerol. Serum CK and sCr increased 1 h after the injection compared with the controls. After 23 h of CVVH treatment, serum CK and sCr decreased compared with goats in the model group. The light microscope revealed manifestation of tubular necrosis and interstitial edema, but the glomeruli were almost normal. The electronic microscope found prominent signs of cell apoptosis, such as chromatin aggregation, mitochondrial swelling, and endoplasmic reticulum expansion. Caspase12 expression in the goats with CS was significantly higher than that in the controls. The CVVH treated goats had lower level of expression than those in the model group ($P<0.05$). TUNEL staining identified a higher proportion of renal cell apoptosis in the goats in the model group compared with

* 国家自然科学基金(No. 81270818)资助

[△] 通讯作者, E-mail: fupinghx@163.com

those in the CVVH group. **Conclusion** Muscle injection with glycerol can induce CS in goats. Early CVVH intervention improves renal function and alleviates renal tubular cell apoptosis.

【Key words】 Crush syndrome Goat model Acute kidney injury Continuous veno-venous hemofiltration

挤压综合征(crush syndrome, CS)是指四肢或躯干肌肉较为丰富的部位受到长时间挤压等造成肌肉组织的缺血性坏死,同时伴有肌红蛋白尿及高钾血症为特点的急性肾损伤(AKI)^[1]。CS常发生于地震、海啸及战争等灾害事件中,是继灾害直接致死的第二位死因,死亡率可高达 50%^[2]。横纹肌溶解是 CS 的主要病理生理基础,而肌红蛋白则是其关键致病蛋白。肌红蛋白为大分子物质,不能被常规的血液透析方式清除。连续性肾脏替代治疗(continuous reno-renal replacement therapy, CRRT)技术目前已广泛应用于 CS 的救治,而其中连续性静脉-静脉血液滤过(continuous veno-venous hemofiltration, CVVH)是当前国内外运用最多的治疗模式,能通过对流的方式有效清除体内的中大分子^[3]。我们在 5·12 汶川大地震中救治 CS 的结果提示, CVVH 疗效显著,与 1999 年 Marmara 大地震救治中以间歇性血液透析为主的治疗模式相比, CVVH 能显著降低患者的病死率(10% vs. 17%)^[4-6]。并且我们在前瞻性病例系列研究中发现, CVVH 具有快速有效清除 CS 患者体内肌红蛋白的独特优势,所有患者均保肢成功,且肾脏功能完全恢复^[4]。

目前, CS 导致肾损伤的确切机制并未完全阐明。研究表明,细胞凋亡在 AKI 的发生和发展过程中也起到了重要的作用^[7]。D'Agnillo 等^[8]在体外实验中发现肌红蛋白可通过氧化应激激活 caspase3 而导致牛大动脉的内皮细胞凋亡。也有学者通过建立小鼠 CS 模型,证实 CS 可诱导内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS),从而引起肾小管上皮细胞的凋亡。然而, CS 的临床过程非常复杂,体外研究及小动物模型并不能完全模拟其全部过程, CVVH 也不能应用于小动物模型的干预,而更接近临床的大动物模型的建立更是鲜有报道。因此,本研究旨在通过建立 CS 山羊模型,对造模成功的 CS 山羊进行 CVVH 干预,观察 CVVH 对于肾小管上皮细胞凋亡的影响,以期 CVVH 治疗 CS 提供新的动物模型及理论基础。

1 材料与方法

1.1 动物分组及山羊 CS 模型的制备

雄性杂交山羊购于四川大学实验动物中心,体质量 19~21 kg, 12~15 月龄,实验前至少 2 周在恒温环境下以标准化实验日粮饲养,不限饮水。将山羊随机分为 3 组:①对照组;②CS 模型组;③CVVH 治疗组。每组 4 只。普通饮食 2 周以后,动物称重,消毒, CS 模型组和 CVVH 治疗组山羊禁食 24 h 后,后肢肌肉内注射 50% 甘油生理盐水溶液(10 mL/kg)建立 CS 模型,对照组山羊相同部位注射等量生理盐水。注射甘油后测定血清肌酐激酶(sCK)和血肌酐(sCr),以 sCK>1 000 U/L,同时 sCr>2 倍对照值判断为造模成功。然后全身麻醉(安泰酮 0.10~0.15 mL/kg 肌肉注射诱导,10%水合氯醛间断静脉注射维持),气管插管,心电监护,留置导尿,静脉补液。

1.2 CVVH 治疗

CS 模型建立 1 h 后, CVVH 治疗组以 Sledinger 法于造模大腿对侧股静脉留置儿童单针双腔导管建立血管通路,采用 Prisma-flex 型智能化床旁肾脏替代治疗机(瑞典)进行 CVVH 治疗。选用聚丙烯腈膜 AN-69/M60 型滤器(膜面积为 0.6 m²),血流量 100 mL/min,血液滤过置换液(成都青山利康)流速 35 mL/(kg·h),前稀释法输入(置换液在滤器前输入)。计划治疗时间为 23 h。采用肝素抗凝法,含 5 000 U/L 肝素的生理盐水 1.5 L 预冲, CVVH 开始后给予肝素首剂 50 U/kg,后以 10 U/h 的速度持续静脉泵入。CS 模型组及对照组不做治疗处理。

1.3 标本收集及一般检测指标

各组每 2 h 监测动脉血气(Abbott i-STAT 便携血气分析仪,美国)。在造模后 1 h、2 h、8 h、12 h、24 h 采血检测 sCK(免疫发光法,罗氏免疫发光分析仪 E610,瑞士)、sCr(比色法,罗氏 cobas8000 全自动生化分析仪,瑞士)水平;造模前及造模后 1 h 床旁超声检查,观察山羊造模处大腿肌肉组织肌纹理的变化;存活山羊于造模 24 h 后处死,获取肾脏标本,常规进行肾组织包埋、切片,HE 染色光镜下观察组织病理学改变、电镜下观察肾小管上皮细胞超微结构变化。

1.4 免疫组化染色检测 caspase12 蛋白表达

行肾小管上皮细胞内质网应激标志蛋白 caspase12 常规免疫组化染色。采用 caspase12 抗体(Santa Cruz, CS, USA)1:100 染色。用 Image-Proplus 程序(Media Cybernetics, MD, USA)分析 PBS 染色区域得到各组动物肾脏组织 caspase12 蛋白表达水平,了解组织细胞的应激和凋亡。Caspase12 作为凋亡途径之一,其激活与内质网发生应激有关,caspase12 被激活后进入细胞液激活其他 caspase 家族成员完成凋亡途径。Caspase12 表达升高,则肾小管上皮细胞凋亡加重。

1.5 TUNEL 染色检测肾小管上皮细胞凋亡

TUNEL 染色对细胞凋亡进行检测^[9]。采用 TUNEL 细胞凋亡试剂盒(Roche, 瑞士)进行 TUNEL 染色。并用 Image-Proplus 软件分析各组肾组织 PBAS 染色区域以了解凋亡程度。TUNEL

染色阳性的比例,可判断肾小管上皮细胞凋亡的严重程度。

1.6 统计学方法

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间均数比较采用 t 检验,多组间均数比较采用 ANOVA 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 山羊 CS 模型

造模后 1 h 山羊迅速出现酱油色小便,尿量减少,sCr 及 sCK 水平明显升高,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1),同时床旁超声提示山羊造模处大腿肌肉出现明显的肌纹理紊乱,肌肉溶解现象(图 1),提示造模成功。

2.2 CVVH 治疗情况

表 1 3 组动物 sCr 及 sCK 水平变化情况($n=12$)

Table 1 Changes in serum level of sCr and sCK in the experimental goats ($n=12$)

	sCr ($\mu\text{mol/L}$)			sCK (U/L)		
	Control group	Model group	CVVH group	Control group	Model group	CVVH group
0 h	42 \pm 5	40 \pm 3	42 \pm 7	238 \pm 37	267 \pm 41	252 \pm 35
1 h	42 \pm 4	81 \pm 11*	80 \pm 12*	256 \pm 41	1 200 \pm 105*	1 256 \pm 156*
2 h	41 \pm 5	90 \pm 10*	91 \pm 9*	249 \pm 45	3 400 \pm 378*	3 214 \pm 461*
8 h	42 \pm 7	120 \pm 15**#	95 \pm 11*	275 \pm 33	6 527 \pm 851**#	3 421 \pm 538*
12 h	41 \pm 4	140 \pm 12**#	97 \pm 9*	236 \pm 29	88 928 \pm 7 562**#	4 589 \pm 672*
24 h	40 \pm 6	185 \pm 14**#	100 \pm 12*	285 \pm 42	12 589 \pm 2 361**#	3 485 \pm 369*

* $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. CVVH group

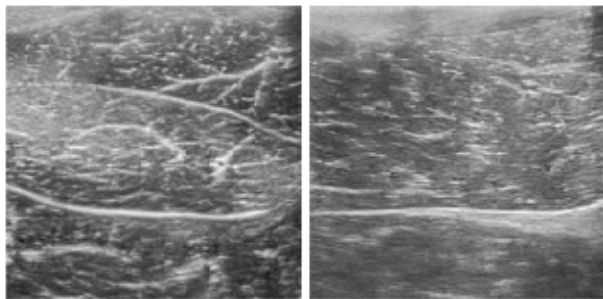


图 1 注射甘油 0 h(对照组)和 1 h 山羊肌肉超声图像

Fig 1 Ultrasonography of the muscle 0 h (control group) and 1 h after glycerol injection

Left: 0 h; Right: 1 h

造模成功后立即置管行 CVVH 治疗,治疗开始后 1 h、7 h、11 h、23 h 行动脉血气分析,干预 23 h 后停机,治疗实际完成剂量为(29.10 \pm 6.12)mL/(kg·h)。CVVH 治疗 11 h 后,3 组动物的血钾水平差异无统计学意义[对照组(3.9 \pm 0.4)mmol/L,模型组(4.6 \pm 0.3)mmol/L, CVVH 组(4.0 \pm 0.2)mmol/L, $P=0.301$];3 组的动脉血 pH 值差异有统

计学意义(对照组 7.38 \pm 0.05,模型组 7.21 \pm 0.08, CVVH 组 7.37 \pm 0.02, $P=0.008$),模型组 pH 值低于其他两组(与对照组相比 $P=0.009$,与 CVVH 组相比 $P=0.006$),而 CVVH 组 pH 值与对照组相比差异无统计学意义($P=0.816$)。整个 CVVH 治疗过程中未出现滤器及管路凝血、山羊出血、低血压等不良事件。24 h 内无实验动物死亡。

2.3 CVVH 治疗对 sCr 及 sCK 的影响

由表 1 可见,对照组 sCr 及 sCK 各观察时间点无明显变化,CS 模型组山羊 sCr 及 sCK 不断增高,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),而 CVVH 治疗组在治疗 7、11、23 h, sCr 及 sCK 未再继续增加,与对照组和 CS 模型组的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 CVVH 治疗 23 h 后组织病理学的改变

光镜下(图 2),对照组(A)肾脏组织标本未见明显异常;CS 模型组(B)肾组织小管上皮细胞坏死脱落、刷状缘消失,肾间质炎症细胞浸润,肾小球基本正常;CVVH 治疗组(C)肾组织病理学改变轻于 CS 模型组。

电镜下(图 3),对照组肾小管上皮细胞无明显异常;CS 模型组肾小管上皮细胞内出现明显的核固缩、染色体聚集、线粒体肿胀、内质网扩张等细胞凋亡早期表现;CVVH 治疗组肾小管上皮细胞凋亡表现较 CS 模型组稍轻。

2.5 CVVH 治疗 23 h 后对肾组织 caspase12 蛋白表达的影响

Caspase12 免疫组化染色(图 4)显示:CS 模型

组(0.34 ± 0.02)及 CVVH 治疗组 caspase12 表达(0.28 ± 0.04)高于对照组(0.11 ± 0.02 , $P < 0.001$),而 CVVH 治疗组 caspase12 表达低于 CS 模型组($P = 0.021$)。

2.6 CVVH 治疗 23 h 后对肾组织凋亡的影响

TUNEL 染色显示(图 5):CS 模型组肾小管凋亡细胞增加,凋亡细胞所占比例($3.27\% \pm 0.31\%$)高于对照组($0.06\% \pm 0.02\%$)及 CVVH 治疗组

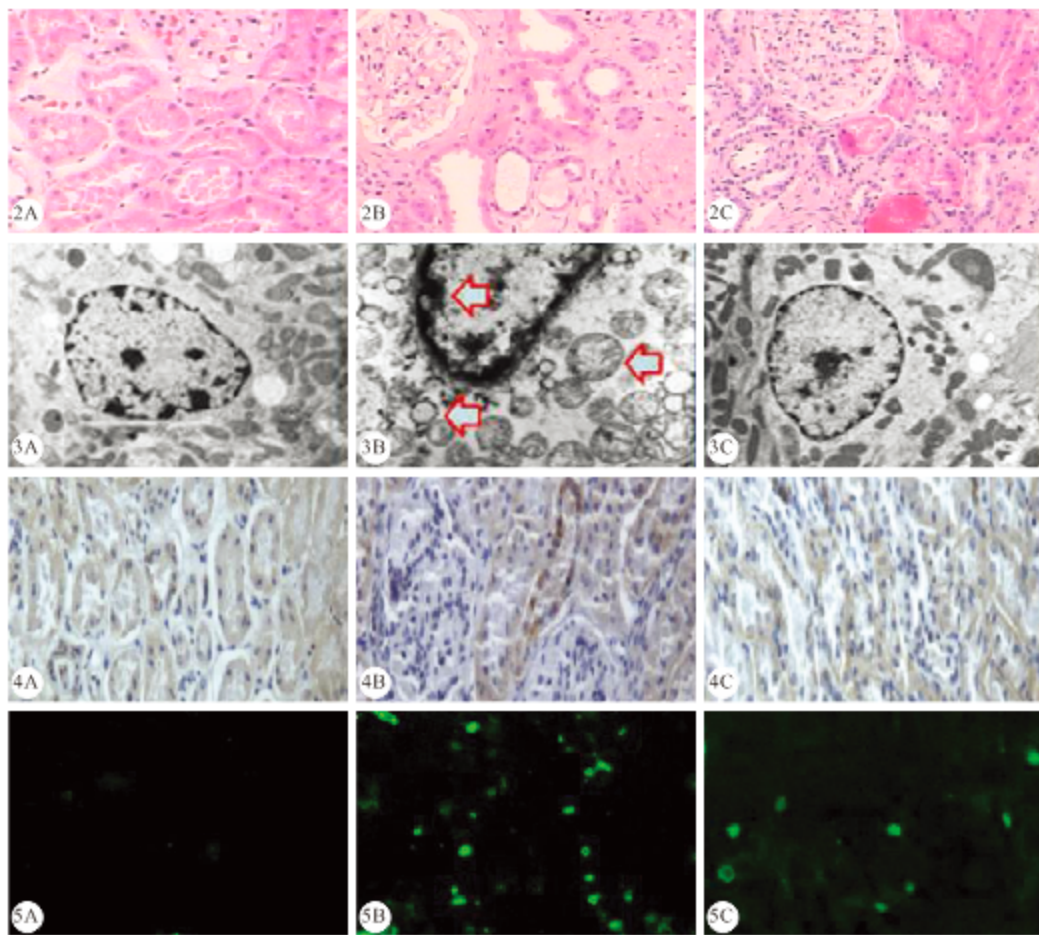


图 2 肾组织 HE 染色。×200 图 3 肾组织电镜下观察。×1 000 图 4 造模 24 h 后肾组织 caspase12 免疫组化染色。×200

图 5 肾组织 TUNEL 染色。×200

Fig 2 HE staining of renal tissues. ×200 Fig 3 Kidney tissue under electronic microscope (arrows indicated chromatin condensation, mitochondria swelling and endoplasmic reticulum expansion). ×10 000 Fig 4 Immunohistochemistry staining of caspase12 in renal tissues 24 h after the establishment of CS model. ×200 Fig 5 TUNEL staining of kidney tissues. ×200

A: Control group; B: Model group; C: CVVH group

($1.68\% \pm 0.43\%$, $P < 0.05$)。

3 讨论

本研究通过肌肉注射甘油的方式建立 CS 模型,结果发现,肌肉注射甘油后,山羊 sCK 和 sCr 水平在短期内迅速上升,提示造模成功。造模成功后对山羊建立血液净化血管通路手术操作方便,

CVVH 顺利进行,有利于该 CS 模型用于更广泛的科学研究。

AKI 是 CS 最常见的并发症,而肾小管上皮细胞凋亡在 AKI 的发生与发展中的作用越来越受到关注。横纹肌发生溶解后释放肌红蛋白(相对分子量 17.8×10^3)入血,后者可被肾小球滤过,并被肾小管上皮细胞内吞。过量的肌红蛋白除了可能形

成管型堵塞肾小管外,对肾小管上皮细胞还存在直接的损伤作用^[10]。越来越多的研究发现,肌红蛋白可通过引起肾小管上皮细胞凋亡造成肾功能的损伤。尽管细胞凋亡可被一系列因素调节,但目前没有良好的方式能够阻断或挽救肾小管上皮细胞凋亡过程。因此,通过血液净化的方式,直接清除肌红蛋白,可从根本上去除病因,从而减轻小管上皮细胞的损伤。本研究结果也发现,接受 CVVH 治疗组的 CS 山羊,治疗 23 h 后,与未接受 CVVH 治疗的 CS 山羊相比,组织学上已可见有明显的保护作用。

CVVH 是目前国内外使用最多的连续性血液净化模式之一,已广泛应用于危重症的救治中^[3]。CVVH 能平稳、持续的控制患者的容量状态,维持水电解质酸碱平衡,起到肾脏替代与支持的作用。Rocon^[11]指出,在理想状态下,CVVH 对于肌红蛋白的理论筛选系数为 0.4~0.6,临床研究中其平均筛选系数为 0.11~0.28。相比于间歇性普通血液透析,CVVH 可能通过清除肌红蛋白而起到直接的肾脏保护作用。CVVH 过程中筛选系数的下降可能与肌红蛋白浓度本身下降,滤过膜功能降低及滤器凝血等原因有关,因此我们主张尽可能的多次更换滤器以提高肌红蛋白的筛选系数^[11,12]。本研究结果显示,进行 CVVH 干预的 CS 山羊在治疗 7 h 后较 CS 组 sCr 及 sCK 明显降低,其后 sCr 及 sCK 水平持续低于 CS 模型组。CVVH 治疗 23 h 与 CS 模型组相比,肾小管上皮细胞凋亡更轻,且内质网应激标志蛋白 caspase12 表达量更低,提示 CVVH 可改善 CS 山羊肾功能的损伤,减轻肾小管上皮细胞凋亡及内质网应激水平。

本研究中置换液流速 35 mL/(kg·h),并采用前稀释的方法补充置换液。理论上讲,前稀释方式可能降低肌红蛋白清除率。然而,Uchino 等^[3]比较了前稀释及后稀释两种方式对滤器寿命、氮质血症控制的影响发现,后稀释可能缩短滤器寿命,且对尿素和肌酐每日的改变情况并无明显优势。同时,关于肾脏替代治疗(CRRT)剂量的选择仍存在广泛争议,现有的临床研究并未显示出大剂量的优势^[13,14]。关于 CVVH 的剂量选择需结合患者的具体病情,我们的临床经验发现,CS 患者常出现严重的脓毒血症、脓毒性休克等并发症,适当的提高治疗

剂量或可更好地控制疾病的进展。

参 考 文 献

- Gonzalez D. Crush syndrome. *Crit Care Med*, 2005; 33 (1 Suppl):S34-S41.
- 刘芳,付平,陶冶等.地震灾害后挤压综合征及急性肾功能衰竭救治——汶川地震特稿. *中国实用内科杂志*, 2008; 28(7):598-600.
- Uchino S, Bellomo R, Morimatsu H, *et al.* Continuous renal replacement therapy: a worldwide practice survey. The beginning and ending supportive therapy for the kidney (B. E. S. T. kidney) investigators. *Intensive Care Med*, 2007; 33(9): 1563-1570.
- Zhang L, Kang Y, Fu P, *et al.* Myoglobin clearance by continuous venous-venous haemofiltration in rhabdomyolysis with acute kidney injury: a case series. *Injury*, 2012; 43(5): 619-623.
- Amyot SL, Leblanc M, Thibeault Y, *et al.* Myoglobin clearance and removal during continuous venovenous hemofiltration. *Intensive Care Med*, 1999; 25(10): 1169-1172.
- 付平,刘芳,陶冶等.多学科联合救治地震灾害后挤压综合征合并急性肾损伤. *中华内科杂志*, 2008; 47(9): 708-710.
- Havasi A, Borkan SC. Apoptosis and acute kidney injury. *Kidney Int*, 2011; 80(1): 29-40.
- D'Agnillo F, Alayash AI. A role for the myoglobin redox cycle in the induction of endothelial cell apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 2002; 33(8): 1153-1164.
- 杨莹莹,张凌,付平等.蜂毒肽致急性肾损伤山羊模型的建立及连续性肾脏替代治疗干预. *四川大学学报(医学版)*, 2014; 45(3): 414-418.
- Bosch X, Poch E, Grau JM. Rhabdomyolysis and acute kidney injury. *N Engl J Med*, 2009; 361(1): 62-72.
- Ronco C. Extracorporeal therapies in acute rhabdomyolysis and myoglobin clearance. *Crit Care*, 2005; 9(2): 141-142.
- Amyot SL, Leblanc M, Thibeault Y, *et al.* Myoglobin clearance and removal during continuous venovenous hemofiltration. *Intensive Care Med*, 1999; 25(10): 1169-1172.
- Bellomo R, Cass A, Cole L, *et al.* Intensity of continuous renal replacement therapy in critically ill patients. *N Engl J Med*, 2009; 361(17): 1627-1638.
- Palevsky PM, Zhang JH, O'Connor TZ, *et al.* Intensity of renal support in critically ill patients with acute kidney injury. *N Engl J Med*, 2008; 359(1): 7-20.

(2015-02-25 收稿, 2015-06-30 修回)

编辑 沈进