

## · 论著 ·

## 循环骤停大鼠肾集合管水通道蛋白 2 的表达

王勇 高林林 陈卫民 刘金钢

**【摘要】** 目的 探讨循环骤停对肾集合管水通道蛋白 2(AQP2)蛋白及基因表达的抑制作用。方法 将 40 只大鼠随机分为两组,20 只大鼠通过窒息法建立循环骤停-复苏模型(复苏组),按自主循环恢复后又分为 1 h 和 3 h 亚组;另 20 只只行机械通气但不建立窒息模型大鼠作为对照组,每组 10 只。分别于不同时间点取材,检测血肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)。同时取部分肾脏,应用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)及逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)分别检测 AQP2 蛋白及基因表达。结果 各组动物复苏时间、SCr、BUN 比较差异无统计学意义。复苏后 1 h 和 3 h AQP2 蛋白及 mRNA 表达较对照组相应时间点明显下降(蛋白表达:1 h 为  $38.35 \pm 2.08$  比  $41.06 \pm 1.04$ , 3 h 为  $31.89 \pm 1.57$  比  $41.45 \pm 0.58$ ; mRNA 表达:1 h 为  $0.61 \pm 0.13$  比  $0.87 \pm 0.14$ , 3 h 为  $0.54 \pm 0.11$  比  $0.85 \pm 0.12$ ,  $P$  均  $< 0.01$ ),且复苏后 3 h AQP2 蛋白及 mRNA 表达较 1 h 进一步下降( $P$  均  $< 0.01$ )。结论 循环骤停会导致肾 AQP2 蛋白、基因表达下调,这一改变早于 SCr、BUN 改变。

**【关键词】** 循环骤停; 水通道蛋白 2; 心肺复苏

**Expression of renal aquaporin 2 after circulatory arrest** WANG Yong\*, GAO Lin-lin, CHEN Wei-min, LIU Jin-gang. \* Department of Anesthesia, Shengjing Hospital Affiliated China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning, China

**【Abstract】** **Objective** To investigate the inhibition of renal aquaporin 2 (AQP2) and AQP2 mRNA expression due to circulatory arrest. **Methods** Forty rats were randomized into two groups. The circulatory arrest-resuscitation model was reproduced in resuscitation group (20 rats). Rats in control group were subjected to the same procedure but only received mechanical ventilation without asphyxia and resuscitation (20 rats). Rats in each group were divided into 1-hour group and 3-hour group randomly (10 rats in each group). Serum creatinine (SCr) and blood urine nitrogen (BUN) concentrations were determined in every rat. Medulla of kidney in every rat was isolated for the determination of AQP2 and AQP2 mRNA expression with Western blotting and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** There were no differences in resuscitation time, SCr and BUN concentrations between resuscitation and control groups. The AQP2 protein and mRNA expression in resuscitation 1-hour and 3-hour groups were significantly decreased compared with those in control group at the same time points [protein:  $38.35 \pm 2.08$  vs.  $41.06 \pm 1.04$  (1-hour),  $31.89 \pm 1.57$  vs.  $41.45 \pm 0.58$  (3-hour); mRNA:  $0.61 \pm 0.13$  vs.  $0.87 \pm 0.14$  (1-hour),  $0.54 \pm 0.11$  vs.  $0.85 \pm 0.12$  (3-hour), all  $P < 0.01$ ], and they were further lowered in resuscitation 3-hour group (both  $P < 0.01$ ). **Conclusion** Circulatory arrest would lead to down regulation of renal AQP2 and AQP2 mRNA expression. These changes appear earlier than those of SCr and BUN.

**【Key words】** cardiac arrest; aquaporin 2; cardiopulmonary resuscitation

循环骤停是临床上最为严重的一种病理状态,也是临床上各种疾病终末期患者死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。目前心肺复苏(CPR)是解决这类问题唯一的办法,复苏成功率为 5%~60%<sup>[2]</sup>。然而复苏后治疗中几乎都会出现不同程度的多器官功能障碍,且有效循环停止时间越长,这种损伤越严重<sup>[3]</sup>。包括肾脏在内的内脏器官,在 CPR 过程中受到损伤比较严重,其恢复程度对于评价 CPR 的预后具有重要帮助。临床上 CPR 后肾功能异常早期多表现为尿量异

常,目前就这一现象出现的机制尚缺乏足够的理论依据。近期研究发现:水通道蛋白(AQP)是调节肾脏尿量变化的主要蛋白<sup>[4]</sup>。本研究中通过探讨 CPR 后肾集合管 AQP2 表达的异常,对这一现象进行分析,报告如下。

## 1 材料与方法

**1.1 主要实验试剂:** AQP2 一抗为兔抗 AQP2 (catalog No. BA0649, 武汉博士德公司产品);二抗为羊抗兔 IgG (product No. A3687, 美国 Sigma 公司); $\Phi$ X174-Hinc II digest DNA Marker [TaKaRa 生物工程(大连)有限公司, code No. D3406A]; 盐酸肾上腺素注射液(上海和丰制药有限公司)。

**1.2 动物分组及模型制备:** 雄性成年 Wistar 大鼠, 体重 220~280 g, 由中国医科大学实验动物中心提

基金项目:辽宁省教育厅科研基金资助项目(2004D282)

作者单位:110004 辽宁沈阳,中国医科大学盛京医院麻醉科(王勇,高林林,陈卫民),普通外科(刘金钢)

作者简介:王勇(1975-),辽宁省人,医学博士,讲师,Email: wangy54321@hotmail.com。

供。40 只大鼠按随机数字表法分两组,每组再分1 h 和3 h亚组。参照 Liachenko 法制备大鼠窒息心搏骤停 CPR 模型,术中监测心电图(ECG)、体温、心率(HR),灯照调节体温达(37.0±0.5)℃。气管切开接呼吸机,频率 42 次/min;使动脉血二氧化碳分压(PaCO<sub>2</sub>)35~45 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa);右股静脉置管。窒息前 5 min 予维库溴铵 0.1 g/kg 防止窒息过程中自主呼吸恢复。窒息时断开呼吸机,夹闭气管导管。自主循环停止 8 min 后开始复苏,心脏按压频率 160 次/min,同时匀速给予复苏合剂(碳酸氢钠 1 mmol/kg+肾上腺素 50 μg/kg+生理盐水 5 ml/kg)。

**1.3 标准:**自主循环停止指标为心脏停搏或平均动脉压(MAP)<10 mm Hg;自主循环恢复(ROSC)指标为 ECG 出现规律性自主 HR,MAP>60 mm Hg。记录复苏组大鼠复苏成功时间。

**1.4 检测指标及方法**

**1.4.1 取材:**ROSC 1 h 和 3 h 分别取下腔静脉血静置,离心后检测血肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)。取右侧肾脏快速置于液氮内,并转移至-80℃冰箱待测 AQP2 蛋白及 AQP2 mRNA 表达变化。

**1.4.2 AQP2 蛋白表达检测:**采用蛋白质免疫印迹法(Western blotting),在肾组织标本加入 6 倍体积的细胞裂解液 A 中匀浆,4℃下 17 500 r/min (离心半径 9 cm)离心 1.5~2.0 h,上清液为胞质蛋白样品。沉淀(为膜成分)中加入 1 ml 细胞裂解液 B,在冰水中匀浆,超声粉碎 2~3 次,每次 20 s,间隔 20 s,静置过夜(4℃)后,再次离心 1~2 h,取上清液为胞膜蛋白样品。用 Lowry 法进行蛋白定量;各取样品 50 μl 进行蛋白定量,以浓度最低管为基准,调节蛋白浓度,加 5×样品缓冲液,煮沸 3~5 min。按顺序过胶、转膜、扫描。

**1.4.3 AQP2 mRNA 表达检测:**采用异硫氰酸胍-酚-氯仿-异戊醇法提取肾组织总 RNA,按总 RNA 提取试剂盒(美国 Promega 公司生产)说明书要求进行。常规提取 RNA,进行逆转录,逆转录反应体积 20 μl,总 RNA 0.5 μg,22 U 鸟成髓细胞性白血病病毒(AMV),50 μmol 寡脱氧胸苷酸(Oligo-dT)15,1 mmol 脱氧核苷三磷酸(dNTPs),20 U RNA 酶抑制剂。聚合酶链反应(PCR)扩增:反应总体积 25 μl,cDNA 3 μl,各引物均 0.1 μl,dNTP 0.02 mmol/L,10×buffer 2.5 μl,Taq 聚合酶 1 U。PCR 产物分析:取 PCR 反应产物 10 μl,在质量分数为 2%琼脂糖凝胶中电泳,用 ΦX174-Hinc II 作为相对分子质量标

准,溴化乙锭染色后紫外灯下观察逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)扩增产物并拍照。计算机凝胶成像分析系统分析曲线下峰面积,计算出 PCR 产物密度含量,用目的基因扩增量与内参照基因扩增量的比值表示所检测基因的相对表达量。AQP2 反义链 5'-GCA TCG GCA TCC TGG TTC-3',正义链 5'-GCT GTG GCG TTG TTG TGG-3';β-肌动蛋白(β-actin)反义链 5'-CAC CCT GTG CTG CTC ACC GAG GCC-3',正义链 5'-CCA CAC AGA TGA CTT GCG CTC AGG-3'。

**1.5 统计学处理:**应用 SPSS 11.5 统计软件包进行数据处理,数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示;AQP2 蛋白及 mRNA 表达采用多因素方差分析(one-way ANOVA);其他计量资料采用成组 t 检验;P<0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 各组复苏时间、SCr、BUN(表 1):**对照组大鼠未进行窒息。复苏组大鼠均成功复苏,并顺利完成实验。复苏组中 1 h 与 3 h 间复苏时间比较差异无统计学意义(P>0.05)。对照组与复苏组各时间点间 SCr、BUN 水平比较差异亦均无统计学意义(P均>0.05)。

**表 1 两组大鼠复苏时间及 SCr 和 BUN 比较( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	时间	动物数	复苏时间(s)	SCr(μmol/L)	BUN(mmol/L)
对照组	1 h	10		23.60±1.95	8.54±0.58
	3 h	10		27.80±8.17	7.94±0.85
复苏组	1 h	10	215.0±31.9	26.00±3.32	8.57±1.50
	3 h	10	222.2±33.5	26.80±7.19	9.81±1.11

注:空白为无此项

**2.2 各组肾组织 AQP2 蛋白及 mRNA 表达(图 1,图 2;表 2):**对照组中 1 h 及 3 h 间 AQP2 的蛋白及 mRNA 表达比较差异均无统计学意义。复苏组 3 h AQP2 的蛋白及 mRNA 表达均较 1 h 明显下降(P均<0.01)。复苏组 1 h 和 3 h 较对照组相应时间点的 AQP2 蛋白及 mRNA 表达均明显下降,差异具有统计学意义(P均<0.01)。

**表 2 复苏后不同时间点肾组织 AQP2 蛋白及 mRNA 表达变化( $\bar{x} \pm s$ )** A 值

组别	时间	动物数	AQP2 蛋白	AQP2 mRNA
对照组	1 h	10	41.06±1.04	0.87±0.14
	3 h	10	41.45±0.58	0.85±0.12
复苏组	1 h	10	38.35±2.08 <sup>b</sup>	0.61±0.13 <sup>b</sup>
	3 h	10	31.89±1.57 <sup>ab</sup>	0.54±0.11 <sup>ab</sup>

注:与本组 1 h 比较,<sup>a</sup>P<0.01;与对照组同期比较,<sup>b</sup>P<0.01

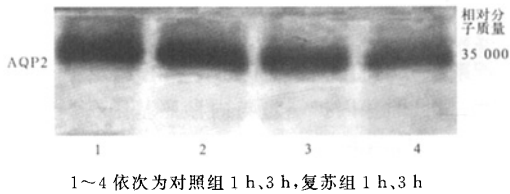


图 1 Western blotting 法检测各组大鼠肾组织 AQP2 蛋白表达

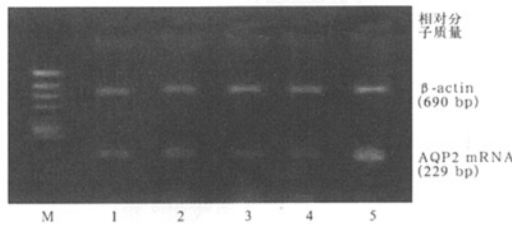


图 2 RT-PCR 法检测各组大鼠肾组织 AQP2 mRNA 表达

### 3 讨论

窒息导致的心搏骤停与循环原因导致的心搏骤停具有不同的病理生理基础。窒息导致的心搏骤停中细胞缺氧、高碳酸血症发生较早,细胞能量储备基本耗尽,因此复苏后并发症更加严重<sup>[5]</sup>。在心搏骤停的病理生理过程中,缺血/再灌注损伤是细胞损伤的主要机制<sup>[6-7]</sup>。肾脏损伤可以通过尿液成分的变化被发现,可以相对灵敏地反映内脏器官损伤,其损伤程度的早期判断对于指导复苏后治疗具有重要意义。肾功能损伤的临床表现常需要经过少尿期、多尿期和恢复期等几个不同的阶段,以往对其发生机制的解释主要是与肾小管的损伤和修复有关。通过对 AQP 功能的研究发现,这一现象应该主要与肾小管上皮细胞 AQP 表达变化有关。

通过研究发现,肾脏对于自由水的主要调节部位在集合管<sup>[8]</sup>。集合管的 AQP 表达变化对于肾脏水代谢功能作用至关重要<sup>[9]</sup>。AQP2 是 AQPs 家族成员之一,主要分布于集合管主细胞管腔膜及细胞内囊泡中,是一种抗利尿激素 (ADH) 敏感性 AQP, AQP2 表达及穿梭调节与集合管处水重吸收量的调节密切相关<sup>[10-12]</sup>。成年人的肾脏每日重吸收 150~200 L 液体,即原尿中 99% 的水分被重吸收,其中 AQP2 起重要作用。一旦 AQP2 的作用受到抑制,人体短期内就会出现明显的代谢异常<sup>[13-14]</sup>。

本实验复苏组中不同通气时间动物的复苏时间并无明显差异,说明造成的肾脏缺血、乏氧程度并无明显差异。通过检测肾功能指标也发现,复苏后短期

内 SCr、BUN 并无明显差异。出现这一现象可能与 SCr、BUN 的形成有关,因为循环骤停后细胞有氧代谢都停止,有效循环恢复早期肾脏缺血及再灌注损伤不可能马上表现出来。但肾功能无异常并不能否定肾脏的损伤,肾脏细胞同样需要有氧代谢。进一步通过检测 AQP2 蛋白及基因表达发现,复苏后 1 h AQP2 蛋白及基因表达均出现明显下降,且随时间延长这一变化更加明显;对照组 AQP2 蛋白、基因表达并无明显变化。由此可见,肾脏有效循环停止对于肾脏 AQP2 表达具有明显影响,且蛋白及基因表达出现同步变化。肾小管对于乏氧、pH 值改变、重金属等比较敏感,因此早期即出现异常,而这一改变应该完全由乏氧引起,与内环境的损伤无关。

而肾功能衰竭通常需要经历 3 个不同的病理生理阶段,即少尿、无尿期;多尿期;恢复期。因此尿量、尿液成分的变化对于反映肾功能恢复的预后具有重要意义。针对 AQP2 表达的变化,目前认为有几种可能机制:①肾缺血对肾集合管上皮细胞的直接损伤。AQP2 是膜蛋白,主要存在于肾集合管上皮细胞,细胞坏死会造成大量膜蛋白从细胞膜崩解、释放,因而肾内 AQP2 表达下降。②再灌注后自由基等细胞因子的作用<sup>[8]</sup>。③集合管上皮细胞自身作用。

肾脏 AQP2 表达变化是 CPR 过程中内脏器官受损程度的反映。单纯通过药物改变肾脏 AQP2 表达虽能短期改善肾脏水代谢功能,但对改善 CPR 预后似乎无明显临床意义,只有通过改善各内脏器官微循环的方法才能真正改善患者预后。

### 参考文献

- [1] Xiao F. Bench to bedside: brain edema and cerebral resuscitation; the present and future[J]. Acad Emerg Med, 2002, 9(9): 933-946.
- [2] 詹红, 马中富, 梁艳冰, 等. 序贯性气道开放对紧急心肺复苏及其预后的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(4): 240-241.
- [3] Xiao F, Arnold T C, Zhang S, et al. Cerebral cortical aquaporin-4 expression in brain edema following cardiac arrest in rats[J]. Acad Emerg Med, 2004, 11(10): 1001-1007.
- [4] King L S, Kozono D, Agre P. From structure to disease; the evolving tale of aquaporin biology[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004, 5(9): 687-698.
- [5] Vaagenes P, Safar P, Diven W, et al. Brain enzyme levels in CSF after cardiac arrest and resuscitation in dogs; markers of damage and predictors of outcome[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1988, 8(2): 262-275.
- [6] Chen C J, Cheng F C, Liao S L, et al. Effects of naloxone on lactate, pyruvate metabolism and antioxidant enzyme activity in rat cerebral ischemia/reperfusion[J]. Neurosci Lett, 2000, 287(2): 113-116.
- [7] 董文斌, 陈红英, 陈书琴, 等. 白细胞介素-1 受体拮抗剂对新生鼠窒息后肾损伤保护作用的动态研究[J]. 中国危重病急救医

- 学, 2005, 17(10): 623-625.
- [8] Sohn E J, Kang D G, Lee H S. Protective effects of glycyrrhizin on gentamicin-induced acute renal failure in rats [J]. *Pharmacol Toxicol*, 2003, 93(3): 116-122.
- [9] Gong H, Wang W, Kwon T H, et al. Reduced renal expression of AQP2, p-AQP2 and AQP3 in haemorrhagic shock-induced acute renal failure [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2003, 18(12): 2551-2559.
- [10] Sabolic I, Katsura T, Verbavatz J M, et al. The AQP2 water channel: effect of vasopressin treatment, microtubule disruption, and distribution in neonatal rats [J]. *J Membr Biol*, 1995, 143(3): 165-175.
- [11] Knepper M A, Verbalis J G, Nielsen S. Role of aquaporins in water balance disorders [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1997, 6(4): 367-371.
- [12] Amlal H, Sheriff S, Soleimani M. Upregulation of collecting duct aquaporin-2 by metabolic acidosis: role of vasopressin [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286 (5): C1019-1030.
- [13] Brown D, Katsura T, Gustafson C E. Cellular mechanisms of aquaporin trafficking [J]. *Am J Physiol*, 1998, 275 (3 pt 2): F328-331.
- [14] Hasler U, Mordasini D, Bens M, et al. Long term regulation of aquaporin-2 expression in vasopressin-responsive renal collecting duct principal cells [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(12): 10379-10386.

(收稿日期: 2007-10-03 修回日期: 2008-04-01)

(本文编辑: 李银平)

## • 基层园地 •

## 心肺复苏术中薄弱环节及实施对策的体会

梁凤 阿里木江 郭慧

【关键词】 心肺复苏; 治疗对策; 薄弱环节

现代心肺复苏(CPR)的目标是:不但能使猝死者心脏复跳,同时能够存活出院,并尽量减少中枢神经系统后遗症。早期高质量的 CPR 是实现这一目标的关键,我们在实践中有如下体会。

## 1 CPR 中的薄弱环节及对策

1.1 开放气道:过去要求一旦发现患者无反应,在检查生命体征、判断病情后再开放气道。新指南则明确:在发现患者无反应后先开放气道,再检查生命体征;在 CPR 全程均应保续气道开放。

1.2 人工呼吸:过去要求术者深吸一口气向患者口中用力吹气,持续 2 s 以上。而新指南则要求术者正常吸气,向患者口内匀速吹气,持续 1 s,见胸廓起伏即可<sup>[1]</sup>。而目前的现状仍以徒手复苏为主,基本不能实现口对口人工呼吸。用无氧源的球囊-面罩通气 2 s 以上与气管插管通气效果相似(IIa)<sup>[2]</sup>,建议普及应用。

1.3 建立人工气道:在医师插管的同时请麻醉科医师会诊协助是切实的做法,同时应进行气管插管技术的培训。

1.4 胸外心脏按压:按压应连续、快速用力,保证频率和深度符合指南要求。按压解除阶段有一短暂停顿,使胸廓充分复位,增加回心血量及心室肌灌注<sup>[3]</sup>。单

人 CPR 按压/通气比改为 30:2<sup>[1]</sup>。

1.5 除颤:有除颤心律者应首选除颤。指南要求对心室纤颤或多行性室性心动过速除颤只 1 次,双向波,200 J,非同步直流电复律。除颤后立即行 CPR,先胸外按压。CPR 和除颤何者为先曾是争议的焦点,沈洪等<sup>[4]</sup>曾认为,早期电除颤是抢救患者生命的关键一环。目前认为,胸外按压和人工通气在复苏中凸现出和除颤相当的重要性<sup>[5]</sup>。

1.6 窒息:首先应尽快解除窒息,若呼吸停止,立即行环甲膜穿刺。对窒息者盲目进行人工呼吸是无效的。窒息时若普通吸痰管难以到达,可用纤维支气管镜完成。

## 2 与院前 CPR 相关的薄弱环节及对策

2.1 院前急救出诊资料:我国院外急救资料报告缺乏规范化,应建立院前急救患者登记表,主要包括:收到呼叫、出车、到达现场、第一次进行 CPR 和除颤的时间和地点,自主循环恢复(ROSC)或停止院外复苏的时间点以及简要病情;其次,应保持时间的一致性。

2.2 院前急救配备:急诊专业人员至少医生、护士各 1 名。基本设备应有氧气、人工呼吸球囊-面罩、喉镜、气管插管、心电除颤监护仪及急救药品等。在院前实施 BLS 的基础上,创造条件强化院前高级生命支持(ALS)技术。尽早展开 ALS 可提高 CPR 成功率。

## 3 院前与院内复苏的衔接

医护人员到达现场后,应对猝死者就地行 CPR,充分体现“黄金 1 h”及“三环理论”(院前-急诊-重症加强治疗病房)<sup>[6]</sup>。待 ROSC 即可转往医院。转运中严密监测生命体征,必要时持续 CPR,保证院前与院内复苏的有效衔接,以提高 CPR 成功率及最终存活率。

## 参考文献

- [1] 沈洪,蒋健.中国心肺复苏关注的问题——回顾国际《心肺复苏及心血管急救指南 2005》的修订[J].*中国危重病急救医学*, 2006, 18(4): 193-194.
- [2] 沈洪.扫描 2005 国际心肺复苏与心血管急救指南会议(2)——基本生命支持:简单却最为主要的核心内容[J].*中国危重病急救医学*, 2005, 17(5): 257-258.
- [3] 杨铁城,李春盛.心肺复苏研究进展[J].*中华急诊医学杂志*, 2006, 15(2): 188-190.
- [4] 沈洪,何志杰.心搏骤停的最有效治疗——早期电除颤[J].*中华急诊医学杂志*, 2003, 12(7): 501-502.
- [5] Wanchun Tang,方向韶.心肺复苏研究的现状和对策[J].*中华急诊医学杂志*, 2007, 16(1): 7-9.
- [6] 沈伟锋,于建新,江现玉.以“三环理论”为指导建设我国急诊医疗服务体系[J].*中华医院管理杂志*, 2004, 20(10): 595-597.

(收稿日期: 2007-09-17)

(本文编辑: 李银平)

作者单位: 831511 新疆阜康准东石油职工医院急诊科

作者简介: 梁凤(1967-),女(汉族),四川省人,主治医师, Email: langf885@sina.com.