

细胞膜泵活性在急性肾衰竭致多器官损伤中的机制

韩瑞 李宝亮 牛春雨 张玉平 侯亚利 赵自刚

【摘要】 目的 观察急性肾衰竭(ARF)致多器官损伤家兔肾、心肌、胰腺细胞膜泵活性的变化,探讨 ARF 致多器官损伤的作用机制。方法 将 42 只家兔按随机数字表法分为对照组、HgCl₂ 组和甘油组,后两组再分为 12、24、48 h 3 个亚组,每组 6 只。以皮下注射 1% HgCl₂(1.3 ml/kg)或肌肉注射 50% 甘油(10 ml/kg)分别复制 ARF 模型。各组分别于不同时间点留取肾、心肌、胰腺组织并制备组织匀浆,采用定磷法检测上清液中的 ATP 酶活性。结果 与对照组比较,两个 ARF 模型组肾组织匀浆 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性均随 ARF 病情程度加重而逐渐降低,于 48 h 达最低水平〔HgCl₂ 组分别为(0.84±0.16)、(0.52±0.17)、(0.45±0.09) μmol·mg⁻¹·h⁻¹,甘油组分别为(0.85±0.22)、(0.49±0.21)、(0.54±0.17) μmol·mg⁻¹·h⁻¹〕;心肌和胰腺组织匀浆 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶、Mg²⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性也逐渐降低,48 h 时达最低〔心肌 HgCl₂ 组分别为(0.56±0.11)、(0.51±0.19)、(0.55±0.19)、(0.37±0.19) μmol·mg⁻¹·h⁻¹,甘油组分别为(0.52±0.19)、(0.62±0.10)、(0.61±0.16)、(0.54±0.10) μmol·mg⁻¹·h⁻¹;胰腺 HgCl₂ 组分别为(0.81±0.12)、(0.71±0.15)、(0.73±0.18)、(0.62±0.16) μmol·mg⁻¹·h⁻¹,甘油组分别为(0.72±0.13)、(0.57±0.18)、(0.66±0.14)、(0.59±0.23) μmol·mg⁻¹·h⁻¹〕,与对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 ARF 致心肌、胰腺损伤的机制与组织细胞膜泵活性降低有关。

【关键词】 肾衰竭,急性; 细胞膜泵; 心肌; 胰腺; 多器官功能障碍综合征

Mechanism of multiple organ injury subsequent to acute renal failure with respect to membrane pump activity in rabbits HAN Rui, LI Bao-liang, NIU Chun-yu, ZHANG Yu-ping, HOU Ya-li, ZHAO Zi-gang. Department of Pathophysiology, Hebei North University, Zhangjiakou 075029, Hebei, China
Corresponding author: ZHAO Zi-gang, Email: zzghyl@126.com

【Abstract】 Objective To observe the changes in membrane pump activity of kidney, myocardium and pancreas in rabbits with acute renal failure (ARF) in rabbits, and inquire into the mechanism of multiple organ injury subsequent to ARF. **Methods** Forty-two rabbits were randomly divided into control group, HgCl₂ group and glycerine group, and the latter two groups were subdivided into 12, 24, 48-hour subgroups, with 6 rabbits in each group. The ARF model was reproduced by hypodermic injection 1% HgCl₂ (1.3 ml/kg) in HgCl₂ group, or intramuscularly injection 50% glycerine (10 ml/kg) in glycerine group, respectively. At different time points, the kidney, myocardium and pancreas were harvested, and homogenates of them were prepared. The ATPase activities of different organ homogenates were determined. **Results** It showed that the activities of Na⁺-K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase, Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase of renal homogenate in two model groups were reduced gradually with worsening of renal function, and they became lowest at 48 hours [(0.84±0.16), (0.52±0.17), (0.45±0.09) μmol·mg⁻¹·h⁻¹ in HgCl₂ group; (0.85±0.22), (0.49±0.21), (0.54±0.17) μmol·mg⁻¹·h⁻¹ in glycerine group]. The respective activities of Na⁺-K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase, Mg²⁺-ATPase, Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase of myocardium and pancreas homogenates in two model groups were reduced gradually following depression of renal function, and they became lowest at 48 hours [(0.56±0.11), (0.51±0.19), (0.55±0.19), (0.37±0.19) μmol·mg⁻¹·h⁻¹ in HgCl₂ group and (0.52±0.19), (0.62±0.10), (0.61±0.16), (0.54±0.10) μmol·mg⁻¹·h⁻¹ in myocardium homogenate of glycerine group; (0.81±0.12), (0.71±0.15), (0.73±0.18), (0.62±0.16) μmol·mg⁻¹·h⁻¹ in HgCl₂ group and (0.72±0.13), (0.57±0.18), (0.66±0.14), (0.59±0.23) μmol·mg⁻¹·h⁻¹ in pancreas homogenate of glycerine group], there was statistical difference compared with control group ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** The mechanism of myocardial and pancreatic injury subsequent to ARF might be related to reduction of the activity of cell membrane pump.

【Key words】 Acute renal failure; Membrane pump; Myocardium; pancreas; Multiple organ dysfunction syndrome

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.12.010

基金项目:河北省科技支撑计划(06276102D-17);河北省教育厅科研基金(2006306);河北省张家口市科技局计划项目(061159)

作者单位:075029 张家口,河北北方学院病理生理教研室

通信作者:赵自刚,Email:zzghyl@126.com

急性肾衰竭(ARF)是临床常见的危重病理过程^[1],由于其发生发展导致的内环境紊乱常诱发其他器官功能障碍,导致多器官功能障碍综合征(MODS),病死率高^[2]。本课题组前期的研究表明,

以汞中毒和甘油挤压所致 ARF 兔可出现血清心肌酶水平增高^[3]、胰岛素水平降低^[4],提示 ARF 可诱发心肌、胰腺损伤;其作用机制与 ARF 引起心肌、胰腺的自由基损伤加重、一氧化氮释放增多有关^[4-5]。为进一步阐明这种作用的本质,本研究中通过注射 HgCl₂、甘油分别制备 ARF 兔模型,从组织细胞膜泵角度探讨 ARF 致心肌、胰腺损伤的作用机制,有利于揭示组织细胞膜活性的共性作用。

1 材料与方 法

1.1 实验动物分组:42 只纯种白兔,体重 1.5~2.5 kg,雌雄不限,由河北北方学院动物中心提供,动物合格证号:SCXK(京)2006-001。按随机数字表法分为对照组、HgCl₂ 组、甘油组,后两组再分为 12、24、48 h 3 个时间点亚组,每组 6 只。

1.2 模型复制及标本制备:皮下注射 1% 的 HgCl₂ (1.3 ml/kg)或肌肉注射 50% 的甘油(10 ml/kg)分别复制兔 ARF 模型;对照组给予等量生理盐水。分别于注射 HgCl₂ 或甘油 12、24、48 h,经兔耳缘静脉注射乌拉坦(1 g/kg)全身麻醉,留取肾、心、胰腺制备组织匀浆,离心取上清液;-80 ℃下冷冻待测。实验过程中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 检测指标及方法:采用考马斯亮蓝法进行匀浆蛋白定量。采用定磷法检测肾、心肌及胰腺组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶、Mg²⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性(以每小时每毫克组织蛋白

中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为 1 个 ATP 酶活性单位),严格按试剂盒(购自南京建成生物工程研究所)说明书操作。

1.4 统计学处理:采用 SPSS 16.0 统计软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析及 t 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肾组织匀浆膜泵活性变化(表 1):HgCl₂ 组与甘油组肾组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性在制模后各时间点均显著低于对照组(P<0.05 或 P<0.01),但组内比较无明显差异(均 P>0.05);而肾组织 Ca²⁺-ATP 酶活性在 24 h、48 h 均显著低于对照组及本组 12 h(P<0.05 或 P<0.01)。Mg²⁺-ATP 酶活性仅甘油组 48 h 显著低于对照组(P<0.05)。HgCl₂ 组与甘油组肾组织 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性在 48 h 均显著低于对照组,且 HgCl₂ 组在 48 h 显著低于 12 h 及 24 h,甘油组在 48 h 显著低于 24 h(P<0.05 或 P<0.01)。

2.2 心肌组织匀浆膜泵活性变化(表 1):HgCl₂ 组与甘油组心肌组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性 48 h 时均显著低于对照组以及本组 12 h,甘油组 24 h 低于 12 h 及 HgCl₂ 组 12 h(P<0.05 或 P<0.01)。HgCl₂ 组与甘油组心肌组织 Ca²⁺-ATP 酶活性在 24 h、48 h 均显著低于对照组及本组 12 h,且甘油组 12 h 低于 HgCl₂ 组 12 h(P<0.05 或 P<0.01);而

表 1 急性肾衰竭兔制模后各时间点肾、心、胰腺组织匀浆 ATP 酶活性的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶(μmol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹)			Ca ²⁺ -ATP 酶(μmol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹)		
		肾	心	胰腺	肾	心	胰腺
对照组	6	1.22±0.09	0.76±0.07	1.99±0.32	0.93±0.08	0.99±0.20	1.14±0.32
HgCl ₂ 组	12 h	0.96±0.17 ^a	0.69±0.13	1.32±0.36 ^b	0.90±0.14	1.10±0.21	1.09±0.20
	24 h	0.92±0.20 ^b	0.75±0.05	0.84±0.33 ^{bd}	0.64±0.13 ^{ac}	0.54±0.16 ^{bd}	0.92±0.15
	48 h	0.84±0.16 ^b	0.56±0.11 ^{bf}	0.81±0.12 ^{bd}	0.52±0.17 ^{bd}	0.51±0.19 ^{bd}	0.71±0.15 ^{bc}
甘油组	12 h	0.96±0.22 ^a	0.80±0.16	1.21±0.14 ^b	0.82±0.23	0.84±0.17 ^e	1.00±0.37
	24 h	0.99±0.18 ^a	0.65±0.09 ^{ce}	0.79±0.08 ^{bd}	0.64±0.20 ^a	0.57±0.15 ^{bd}	0.67±0.24 ^{bc}
	48 h	0.85±0.22 ^b	0.52±0.19 ^{bd}	0.72±0.13 ^{bd}	0.49±0.21 ^{bd}	0.62±0.10 ^{bd}	0.57±0.18 ^{bd}
组别	动物数	Mg ²⁺ -ATP 酶(μmol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹)			Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -ATP 酶(μmol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹)		
		肾	心	胰腺	肾	心	胰腺
对照组	6	0.99±0.11	0.91±0.05	1.42±0.28	0.77±0.11	1.04±0.20	1.07±0.22
HgCl ₂ 组	12 h	0.77±0.17	0.72±0.13 ^a	1.19±0.29	0.79±0.22	0.90±0.15	1.02±0.14
	24 h	0.84±0.15	0.54±0.19 ^b	0.81±0.18 ^{bc}	0.74±0.28	0.47±0.15 ^{bd}	0.70±0.26 ^{bd}
	48 h	0.83±0.20	0.55±0.19 ^b	0.73±0.18 ^{bd}	0.45±0.09 ^{bde}	0.37±0.19 ^{bd}	0.62±0.16 ^{bd}
甘油组	12 h	0.90±0.22	0.55±0.14 ^b	1.24±0.16	0.82±0.23	0.84±0.09 ^e	1.04±0.18
	24 h	0.84±0.25	0.58±0.15 ^b	0.67±0.11 ^{bd}	0.63±0.23	0.40±0.17 ^{bd}	0.74±0.18 ^{ac}
	48 h	0.72±0.24 ^a	0.61±0.16 ^b	0.66±0.14 ^{bd}	0.54±0.17 ^{ee}	0.54±0.10 ^{bd}	0.59±0.23 ^{bd}

注:与对照组比较,^aP<0.05,^bP<0.01;与本组 12 h 比较,^cP<0.05,^dP<0.01;与本组 24 h 比较,^eP<0.05,^fP<0.01;与 HgCl₂ 组同期比较,^aP<0.05

Mg²⁺-ATP 酶活性在各时间点均显著低于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。HgCl₂ 组 24 h、48 h 与甘油组各时间点心肌组织 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性均显著低对照组,且两组 24 h、48 h 时均显著低于本组 12 h ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 胰腺组织匀浆膜泵活性变化(表 1): HgCl₂ 组与甘油组胰腺组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性在各时间点均显著低于对照组,且两组 24 h、48 h 均低于 12 h (均 $P < 0.01$)。HgCl₂ 组 48 h 及甘油组 24 h、48 h 胰腺组织 Ca²⁺-ATP 酶活性均显著低于对照组及本组 12 h;且两组 24 h 和 48 h Mg²⁺-ATP 酶活性均显著低于对照组及本组 12 h ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。HgCl₂ 组及甘油组 24 h、48 h 胰腺组织 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性均显著低于对照组和本组 12 h ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

随着透析疗法用于 ARF 患者的不断增加,直接死于 ARF 本身的病例在显著减少^[6-7],但严重创伤、大面积烧伤、大手术等外科病因和脓毒症所致 ARF 的病死率仍高达 50% 以上,主要原因是 ARF 引起了其他重要器官损伤并导致 MODS。因此,对于 ARF 发生发展过程中诱发 MODS 的机制以及防治的研究,仍然是当前的重要课题。本研究在课题组前期研究证实 ARF 可导致心肌、胰腺损伤的基础上^[3-5],进一步观察了 ARF 时组织细胞膜泵活性的变化,从能量及离子代谢等方面探讨其作用机制。

在分别注射 HgCl₂ 和甘油制备 ARF 兔模型中,汞中毒反映了由重金属、毒素等造成的急性肾小管坏死引起的 ARF,甘油挤压显示了由肌红蛋白阻塞肾小管后引起的泌尿功能障碍以及由阻塞引起的肾小管缺血、缺氧和胆红素蛋白毒性所致肾小管坏死后的 ARF。因此,这两种模型基本能反映出临床上各种病因所致 ARF。ATP 酶为依赖 ATP 的膜结合蛋白酶,存在于组织细胞及细胞器的膜上,它们对建立跨膜的离子梯度,维持细胞膜电位、容量、体温、代谢以及营养的转运等生理活动具有重要作用,细胞的损伤程度与膜 ATP 酶活性高低极其相关^[8],提升组织细胞膜泵活性有利于器官保护^[9]。本研究表明,两个 ARF 模型组肾组织匀浆 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶、Mg²⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性在多个时间点均显著低于对照组,在组内随 ARF 程度加重而降低,提示组织细胞膜泵活性降低在肾组织细胞损伤的发病学中具有重要作用,其作

用机制除与毒性物质对肾组织细胞直接的损伤作用有关外,还可能与 ARF 所导致的内环境紊乱有关;同时针对心肌、胰腺组织细胞膜泵活性的研究还发现,整体上在 ARF 发生后,心肌和胰腺组织匀浆 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶、Mg²⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性也逐渐降低,说明膜泵活性降低是 ARF 致心肌、胰腺损伤的发病机制之一,其作用机制可能与 ARF 导致的水盐代谢障碍、酸碱失衡、能量代谢障碍等因素有关。肾、心肌、胰腺组织细胞膜泵活性降低,可进一步导致相关组织细胞内外的 Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺ 等离子转运过程受抑制^[10],引起细胞内外离子浓度分布异常,可出现细胞内高钾、钙超载等变化,发生细胞膜超极化等变化,又加重组织细胞功能障碍及形态学损伤。

本研究结果提示,细胞膜泵活性降低在 ARF 的发病学中具有重要作用,也是 ARF 诱发心肌、胰腺损伤的重要作用机制。同时提示在临床上应用提高组织细胞膜泵活性的药物,纠正细胞膜离子转运功能,对 ARF 导致的 MODS 具有干预作用。

参考文献

- [1] 赵自刚,牛春雨,张静,等. 肠系膜淋巴管结扎对二次打击大鼠肾小管上皮细胞凋亡的影响. 中国危重病急救医学, 2007, 19: 724-726.
- [2] 朱雪琦,王蕾,刘清泉,等. 血必净注射液对脓毒症大鼠肾保护作用的研究. 中国危重病急救医学, 2006, 18: 680-683.
- [3] 赵自刚,牛春雨,侯亚利,等. 心肌酶学变化在急性肾衰竭中的意义. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 109-110.
- [4] 赵自刚,牛春雨,侯亚利,等. 急性肾功能衰竭时胰腺形态与功能及自由基、一氧化氮的变化. 中国病理生理杂志, 2005, 21: 1599-1601.
- [5] 赵自刚,牛春雨,侯亚利,等. 氧自由基和一氧化氮在急性肾功能衰竭诱发多器官功能障碍综合征中的作用. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 756-759.
- [6] 马胜银,刘朝阳. 连续性肾脏替代疗法在治疗伴急性肾衰竭的多器官功能障碍综合征中的应用. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 97-99.
- [7] 余青春,任文杰,宋英华,等. 连续性血液净化治疗急性重症肾功能衰竭. 中国危重病急救医学, 2005, 17: 571.
- [8] Murphy E, Eisner DA. Regulation of intracellular and mitochondrial sodium in health and disease. Circ Res, 2009, 104: 292-303.
- [9] 樊贵,赵自刚,牛春雨,等. 正常淋巴液对内毒素休克大鼠肺组织髓过氧化物酶活及膜泵的作用研究. 中国危重病急救医学, 2006, 18: 721-723.
- [10] Garcés EO, Victorino JA, Veronese FV. Anticoagulation in continuous renal replacement therapies (CRRT). Rev Assoc Med Bras, 2007, 53: 451-455.

(收稿日期: 2010-05-15)

(本文编辑: 李银平)