

·论著·

宫内急性缺血缺氧后胎鼠肾脏钙离子 腺苷三磷酸酶动态变化的研究

吴捷¹,郎慧丽²,魏克伦¹

(1. 中国医科大学第二临床学院儿科,辽宁 * 沈阳 110004; 2. 抚顺矿务局总医院儿科,辽宁 * 抚顺 113008)

[摘要] 目的 研究宫内急性缺血缺氧后(HI)胎鼠肾脏钙离子腺苷三磷酸酶(Ca^{2+} -ATPase)的动态变化,探索围产期窒息后肾损伤发生细胞内钙超载的机制。方法 通过钳夹孕21 d大鼠供应子宫的动静脉血管,制成胎鼠宫内不同程度HI模型和HI后再灌注不同时间模型。采用化学方法测定胎鼠肾脏细胞膜和线粒体 Ca^{2+} -ATPase的活性变化。结果 假手术组胎肾细胞膜和线粒体 Ca^{2+} -ATPase活性分别为(7.476 ± 0.353)和(3.470 ± 0.270)微摩尔磷/毫克蛋白·小时($\mu\text{mol. Pi/mgprot. h}$),宫内HI 15 min后 Ca^{2+} -ATPase活性均明显减弱,分别为(6.411 ± 0.210)和(2.886 ± 0.245) $\mu\text{mol. Pi/mgprot. h}$, ($P < 0.01$);与缺血15 min时比较,宫内缺血45 min时酶活性减弱更明显,分别为(5.772 ± 0.177)和(2.500 ± 0.282) $\mu\text{mol. Pi/mgprot. h}$, ($P < 0.05$)。缺血15 min再灌注过程中,细胞膜和线粒体 Ca^{2+} -ATPase活性与缺血时比较继续减弱,8 h时最低,分别为(5.513 ± 0.197)和(2.411 ± 0.197) $\mu\text{mol. Pi/mgprot. h}$, ($P < 0.01$),15 h时均明显回升,至24 h时细胞膜 Ca^{2+} -ATPase活性已接近假手术组($P > 0.05$),但线粒体 Ca^{2+} -ATPase活性(3.234 ± 0.143) $\mu\text{mol. Pi/mgprot. h}$,仍低于假手术组($P < 0.05$)。结论 宫内HI后胎肾 Ca^{2+} -ATPase活性的降低是发生细胞内钙超载导致肾损伤的重要机制。

[关键词] 缺血缺氧;胎肾;钙离子腺苷三磷酸酶;大鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2001)03-0227-05

Dynamic Changes in Renal Ca^{2+} -ATPase Activity after Acute Intrauterine Ischemia in Fetal Rats

WU Jie, LANG Hui-Li, WEI Ke-Lun

Department of Pediatrics, Second Clinical College, China Medical University, Shenyang 110004, China

Abstract: **Objective** To study the dynamic changes in renal Ca^{2+} -ATPase after acute intrauterine ischemia in fetal rats, and to explore the underlying mechanism of intracellular Ca^{2+} overload secondary to perinatal asphyxia. **Methods**

A rat model of acute intrauterine ischemia was developed using different degrees of clamping of the vessels supplying blood to the uterus. A graded reperfusion model was made by reperusing the uterine vessels for different lengths of time after clamping. The activity of Ca^{2+} -ATPase in cell membranes and mitochondrial fractions in fetal rat kidneys was assayed biochemically. **Results** Ca^{2+} -ATPase activity in cell membranes and mitochondria in the shamoperated group was (7.476 ± 0.353) and (3.470 ± 0.270) $\mu\text{mol. Pi/mgprot. h}$ respectively. Activities in both fractions decreased after 15 minutes of ischemia [(6.411 ± 0.210) and (2.886 ± 0.245) $\mu\text{mol. Pi/mgprot. h}$ respectively; $P < 0.01$] and continued to decrease after 45 minutes [(5.772 ± 0.177) and (2.500 ± 0.282) $\mu\text{mol. Pi/mgprot. h}$ respectively; $P < 0.05$]. During the reperfusion stage (after 15 minutes of ischemia), activities continued to decrease reaching a nadir after

8 hours [(5.513 ± 0.197) and (2.411 ± 0.197) μmol. Pi/ mgprot. h respectively]. There was significant difference between the 8-hour reperfusion group and the 15 - minute ischemia group ($P < 0.01$). After 15 h of reperfusion enzyme activity levels began to increase. By 24 hours, the activity of Ca^{2+} -ATPase in cell membranes had increased to normal levels, but the activity in mitochondria was still low compared with the 15 - minute ischemia group [(3.234 ± 0.143) and (2.886 ± 0.245) μmol. Pi/ mgprot. h respectively; $P < 0.05$]. **Conclusions** Ca^{2+} -ATPase activity decreases in the fetal kidney after acute intrauterine ischemia. Dynamic changes in Ca^{2+} -ATPase activity may explain the intracellular Ca^{2+} overload leading to hypoxic-ischemic renal injury.

Key words: Ischemia hypoxia; Fetal kidney; Ca^{2+} - ATPase; Rat

新生儿窒息是新生儿死亡和伤残的主要病因之一。本病致死致残的主要原因是窒息缺氧造成多脏器(心、脑、肾等)损伤所致。Perlman 等^[1]报道,窒息新生儿约 70%合并不同程度的脏器损伤,其中肾损伤的发生率最高,为 50%,可见肾损伤在新生儿窒息的防治中,应加重视。从新生儿窒息发生时间上看,主要发生在宫内,约 80~90%在产前或产时^[2]。因此,探索宫内窘迫时胎儿是否已发生肾损伤及其机制,无疑对新生儿窒息后肾损伤的防治有重要意义。本研究利用宫内窘迫胎鼠模型,旨在研究胎肾细胞膜与线粒体钙离子腺苷三磷酸酶(Ca^{2+} -ATPase)活性在宫内缺血缺氧(HI)及再灌注过程中的动态变化,并进一步探索窒息后肾损伤发生细胞内钙超载的深层机制。

1 材料与方法

1.1 材料

Wistar 大鼠,平均体重(250 ± 20) g,雌雄比为 4:1,由中国医科大学附属二院动物实验室提供。主要试剂:组织匀浆介质:由蔗糖,Tris-HCL 及 EDTA 配制而成;各种酶测定试剂盒及总蛋白定量试剂均购自南京建成生物工程研究所。主要仪器:法国原装 S-P500 紫外光可见光连续分光光谱分析仪。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备 孕 21 日龄大鼠制备:将大鼠按雌雄比 4:1 放置在同一鼠笼中喂养,自合笼后第 2 天起每日用浸湿生理盐水的棉签在雌鼠阴道内旋转 1~2 周,将棉签上的阴道分泌物均匀涂在滴有生理盐水的载玻片上,光学显微镜下(100×)见到精子为妊娠第 1 天;此时便与雄鼠分开,单独喂养至第 21 天。

宫内不同程度 HI 模型的制备:孕龄达 21 d 的

孕鼠,用 5%戊巴比妥钠(0.1 ml/100 g 体重)腹腔麻醉后,下腹消毒后正中切口,迅速找到一侧供应子宫的动静脉血管,以动脉夹钳夹,钳夹时间分别为 15,25,35,45 min;以对侧宫角内未钳夹的胎鼠为对照组(假手术组),钳夹时间内暂时关腹以维持恒定温度。宫内不同程度 HI 及再灌注后不同时间模型的制备:钳夹动静脉血管 15 min 后,取出动脉夹关腹,分别再灌注 1,4,8,15 及 24 h。造模后立即剖宫取胎鼠,断头处死后取胎肾,于液氮中保存。

1.2.2 检测方法 取胎肾称重,每份样本重 100~120 mg,约 3~5 只胎肾,各组均为 10~12 份样本。将肾组织分别匀浆后,加匀浆介质配成 10%的组织匀浆。按说明书方法,将 10%组织匀浆用低温离心机离心 5~10 min(500 r/min),取上清液以 5 000 r/min 的速度离心 15 min,取少许沉淀物涂片,光学显微镜下证实为细胞膜,然后将上清再次离心 15 min(12 000 r/min),取少许沉淀物涂片经中性红-詹纳斯绿 B 染液染色后,光学显微镜下见沉淀被染为亮绿色颗粒即为线粒体。用冰冷的匀浆介质混悬提取的细胞膜及线粒体,超声匀浆后制成混悬液,酶活力测定用 Muszberk 法^[3]。

1.2.3 结果分析与统计学处理 用 SPSS 统计软件,两组间比较用 t 检验。

2 结果

2.1 宫内 HI 及再灌注过程中胎肾细胞膜 Ca^{2+} -ATPase 活性的变化

与假手术组比较,宫内 HI 15 min 后可见细胞膜 Ca^{2+} -ATPase 活性显著减弱($P < 0.01$);随着宫内 HI 程度的加重, Ca^{2+} -ATPase 活性逐渐减弱,与缺血 15 min 时比较,宫内缺血 35 min 与 45 min 时 Ca^{2+} -ATPase 活性减弱更明显($P < 0.05$),见表 1。缺血 15 min 后再灌注过程中,细胞

膜 Ca^{2+} - ATPase 活性继续减弱;与缺血 15 min 时比较,再灌注 4 h 减弱明显 ($P < 0.05$),8 h 时最低 ($P < 0.01$),15 h 时明显回升至缺血时水平 ($P > 0.05$)。至 24 h 时 Ca^{2+} - ATPase 活性已接近假手术组 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.2 宫内 HI 及再灌注过程中胎肾线粒体 Ca^{2+} - ATPase 活性的变化

与假手术组比较,宫内 HI 15 min 后可见线粒体 Ca^{2+} - ATPase 活性显著减弱 ($P < 0.01$);随着宫

内 HI 程度的加重, Ca^{2+} - ATPase 活性逐渐减弱,与缺血 15 min 时比较,宫内缺血 45 min 时 Ca^{2+} - ATPase 活性减弱更明显 ($P < 0.05$),见表 1。缺血 15 min 后再灌注过程中,线粒体 Ca^{2+} - ATPase 活性继续减弱,与缺血 15 min 时比较,再灌注 4 h 开始明显减弱 ($P < 0.01$),8 h 时最低 ($P < 0.01$),15 h 时明显回升,超过缺血时水平 ($P < 0.01$),但直至 24 h Ca^{2+} - ATPase 活性仍低于假手术组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 宫内不同程度 HI 后胎肾细胞膜和线粒体 Ca^{2+} - ATP 酶的变化

Table 1 Changes of Ca^{2+} - ATPase activity in cell membranes and mitochondria in fetal rat kidneys after intrauterine ischemia in different degrees ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol. Pi/mgprot. h}$)

分组	胎肾细胞膜 Ca^{2+} - ATP 酶的变化	胎肾线粒体 Ca^{2+} - ATP 酶的变化
假手术组	7.476 \pm 0.353	3.470 \pm 0.270
缺血 15 min	6.411 \pm 0.210 ^a	2.886 \pm 0.245 ^a
缺血 25 min	6.146 \pm 0.160 ^{a,c}	2.754 \pm 0.260 ^{a,c}
缺血 35 min	5.627 \pm 0.134 ^{a,b}	2.651 \pm 0.298 ^{a,c}
缺血 45 min	5.772 \pm 0.177 ^{a,b}	2.500 \pm 0.282 ^{a,b}

注:a 与假手术组比较 $P < 0.01$; b 与缺血 15 min 比较 $P < 0.05$; c 与缺血 15 min 比较 $P > 0.05$

表 2 宫内 HI 15 min 后再灌注 24 h 内细胞膜和线粒体 Ca^{2+} - ATP 酶的变化

Table 2 Changes of Ca^{2+} - ATPase activity in cell membranes and mitochondria in fetal rat kidneys during the reperfusion stage (after 15 min of intrauterine ischemia) ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol. Pi/mgprot. h}$)

分组	细胞膜 Ca^{2+} - ATP 酶	线粒体 Ca^{2+} - ATP 酶
假手术组	7.476 \pm 0.353	3.470 \pm 0.270
缺血 15 min	6.411 \pm 0.210 ^a	2.886 \pm 0.245
再灌注 1 h	6.016 \pm 0.213 ^{a,d}	2.937 \pm 0.367 ^{a,d}
再灌注 4 h	5.799 \pm 0.190 ^{a,e}	2.552 \pm 0.279 ^{a,f}
再灌注 8 h	5.513 \pm 0.197 ^{a,f}	2.411 \pm 0.197 ^{a,f}
再灌注 15 h	6.070 \pm 0.311 ^{a,d}	3.219 \pm 0.225 ^{b,f}
再灌注 24 h	7.080 \pm 0.331 ^{c,f}	3.234 \pm 0.143 ^{b,f}

注:a 与假手术组比较 $P < 0.01$; b 与假手术组比较 $P < 0.05$; c 与假手术组比较 $P > 0.05$; d 与缺血 15 min 组比较 $P > 0.05$; e 与缺血 15 min 组比较 $P < 0.05$; f 与缺血 15 min 相比较 $P < 0.01$

3 讨论

目前在 HI 性肾损伤发生机制的研究中,比较公认的是细胞内 Ca^{2+} 的升高^[4],即细胞内钙超载。细胞内发生钙超载后,通过一系列改变,如氧自由基损伤^[5]、细胞凋亡^[6]等,而引起线粒体功能抑制,膜磷脂降解及蛋白质分解,而引起细胞损伤和死亡。因此,钙超载被普遍认为是细胞损伤和坏死的一个特征,是导致细胞死亡的“最后共同途径”^[7]。

胞浆中 Ca^{2+} 浓度平衡和稳定是 Ca^{2+} 跨细胞膜转运和细胞内“钙库”摄取和释放 Ca^{2+} 等过程动态平衡的结果^[8],在心肌细胞的研究表明,这一平衡过程 90% 依赖于 Ca^{2+} - ATPase^[9]。线粒体是细胞内最重要的“钙库”,它对细胞内 Ca^{2+} 浓度的稳定较内质网有更重要的作用。这是由于线粒体有强大的储钙功能,细胞内钙超载可激活线粒体的摄钙功能,这一主动摄钙过程是由位于线粒体膜上的 Ca^{2+} - ATPase 完成的。在缺血和乏氧条件下, Ca^{2+} 的正常跨膜转运和细胞内“钙库”的摄取和释放将失去平衡^[4]。

本研究显示,在宫内急性 HI 时,胎肾的细胞膜和线粒体的 Ca^{2+} - ATPase 活性均明显减弱,并随着缺血程度的加重而加重;再灌注开始后, Ca^{2+} - ATPase 的活性并未因氧供的恢复而恢复,相反在继续降低一段时间后才逐渐恢复。这就可以解释 Greene 等人^[5]的发现,他们的研究证实,在缺氧时肾脏上皮细胞内的 Ca^{2+} 仅是轻微增加,而在恢复氧供后,细胞内的 Ca^{2+} 浓度明显增加,这可能与再灌注后 Ca^{2+} - ATPase 活性的持续降低有关。造成 Ca^{2+} - ATPase 这种变化的原因在于,乏氧和再灌注后不断产生的氧自由基损伤了细胞膜和线粒体膜,使 Ca^{2+} - ATPase 活性不断降低,进一步导致细胞内的 Ca^{2+} 浓度明显增加。

台湾学者^[10]的研究发现,在代谢抑制的脑干培养细胞中,最先观察到的是线粒体释放 Ca^{2+} 增加,其次才是大量 Ca^{2+} 从细胞外流入细胞内。本研究也发现,与细胞膜比较,线粒体 Ca^{2+} - ATPase 的活性再灌注后降低更明显,恢复也相对缓慢。提示线

粒体功能较细胞膜更易受损,而且在引起细胞内 Ca^{2+} 浓度升高的过程中,线粒体摄取 Ca^{2+} 的功能障碍可能起着更为重要的作用。这可能是因为,线粒体是细胞呼吸和能量代谢的重要部位,对乏氧尤其敏感,因此在宫内 HI 后,线粒体 Ca^{2+} - ATPase 活性逐渐降低,进而失去其强大的储钙能力,导致线粒体内钙超载,而线粒体内 Ca^{2+} 聚集以及氧化应激反应能促发线粒体膜通透性的改变,内膜脂类骨架降解,阻止 ATP 产生并促发活性氧自由基产生^[7],加重了线粒体功能损伤。

总之,在众多学者的目光都集中到了细胞内 Ca^{2+} 的增加与细胞损伤之间关系的研究时,本研究突破了既往单纯研究 Ca^{2+} 通过细胞膜机制的障碍,同时深入探索了细胞内线粒体在缺血及再灌注过程中维持 Ca^{2+} 平衡能力的变化意义更大。只有这样才能探讨 HI 性肾损伤后细胞内钙超载的更深层机制,从而对今后阻断细胞内 Ca^{2+} 的升高的防治研究具有指导意义。

[参 考 文 献]

- [1] Perlman JM, Tack ED, Martin T. Acute systemic organ injury in term infants after asphyxia [J]. *Am J Dis Child*, 1989, 143(5): 617 - 620.
- [2] 金汉珍,黄德珉,关希吉. 实用新生儿学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1997, 624 - 631.
- [3] Muszberk L, Szabo T, Fesus L, et al. A highly sensitive method for the measurement of ATPase activity [J]. *Anal Biochem*, 1977, 77(2): 286 - 291.
- [4] Smith MW, Phelps PC, Trump BF. Injury - induced changes in cytosolic Ca^{2+} in individual rabbit proximal tubule cells [J]. *Am J Physiol*, 1992, 262(4 pt 2): F647 - F655.
- [5] Greene EL, Paller MS. Calcium and free radicals in hypoxia/ reoxygenation injury of renal epithelial cells [J]. *Am J Physiol*, 1994, 266(1 pt 2): F13 - F20.
- [6] 赵卫红,寿好长,闫福岭. 细胞凋亡 [M]. 河南:河南医科大学出版社, 1997: 15.
- [7] Kristian T, Siesjo BK. Calcium in ischemic cell death [J]. *Stroke*, 1998, 29(3): 705 - 718.
- [8] Bers DM. Ca^{2+} regulation in cardiac muscle [J]. *Med Sci Sport Exerc*, 1991, 23(12): 1157 - 1161.
- [9] Langer GA. Calcium and the heart exchange at the tissue, cell and organelle levels [J]. *FASEB J*, 1992, 6(3): 893 - 902.

[10] Chen WH, Chu KC, Wu SJ, et al. Early metabolic inhibition - induced intracellular sodium and calcium increase in rat cerebellar gran-

ule cells [J]. J Physiol (Lond), 1999, 515 (Pt 1): 133 - 146.

(本文编辑:曹励之)

病例报告 ·

结节性硬化症 2 例

姜泓¹, 张义和²

(延安大学医学院附属医院 1. * 儿科; 2. * 胸外科, 陕西 * 延安 716000)

[中图分类号] R758.3 [文献标识码] E

例 1, 男, 9 月。以反复惊厥伴智力落后 4 月入院。患儿 5 个月时突然惊厥, 呈婴儿痉挛症样发作, 每天 10 余次。逐渐出现表情呆滞, 智力落后。查体: 神志清, 反应迟钝, 精神萎靡, 腹、背、臀部可见直径 10~20 mm 大小不等色素脱失斑, 无皮脂腺瘤。囟门平软。双眼水平位震颤。双肺呼吸音清晰, 心率 100 次/min, 律不齐, 可闻早搏 3 次/min。肝脾不大。四肢肌力、肌张力正常。双膝反射活跃, 巴氏征阳性, 脑膜刺激征阴性。脑电图示高峰节律紊乱; 头颅 CT 脑室周围有两处 2 mm × 2 mm, 2 mm × 3 mm 大小密度增高影; 胸片未见异常; 心脏及腹部超声正常; 心电图示: 偶发性室早; 眼底正常。诊断结节性硬化症。给鲁米那、强的松治疗 1 周, 无效。加氯硝基安定, 从 0.1 mg, 2 次/d 开始, 1 周后加至 0.1 mg, 3 次/d, 惊厥次数减少, 持续时间缩短, 家属要求出院。

例 2, 女, 1 岁, 以间断抽搐 10 余日入院。入院前 10 余天突然抽搐, 呈全身阵挛性发作, 每次 1~2 min, 共发作 6 次。其母有抽风史。查体: 神志清, 表情呆滞, 背部肩胛间区、臀部可见 2 mm × 3 mm 色素脱失斑, 无皮脂腺瘤。心肺无异常。肝脾不大。四肢肌力、肌张力正常。生理反射存在, 病理反射未引出。脑膜刺激征阴性。脑电图各导可见单个尖慢波及阵发性高幅节律; 头颅 CT 示左侧颞叶深部可见结节性钙化灶, 侧脑室壁亦见局限性高密度影; 心脏腹部超声未见异常; 心电图正常。本例以皮肤色素脱失斑及头颅 CT 典型表现为特征, 诊断后家

属要求出院。

讨论: 结节性硬化症为常染色体显性遗传, 外显率可变, 发病率 1/10 万^[1], 我科 1990 年至今仅有 2 例。该病隶属神经皮肤综合征, 可能与胚胎发育早期出现某些变异有关^[2]。病理表现为结缔组织异常增生, 主要侵犯大脑各部, 形成多发性结节, 在脑回表面隆起, 向脑室生长, 结节把正常脑皮层压薄, 造成严重损害, 致使惊厥难以控制。主要临床特点为惊厥, 智力低下及面部皮脂腺瘤^[1,2]。本文患儿均因年幼尚未出现皮脂腺瘤, 而以色素脱失斑为主要变化, 加之频繁抽搐, 智力低下、脑电图、脑 CT 的变化及阳性家族史, 诊断明确。治疗用氯硝基安定有较好的效果, 但此药有嗜睡, 共济失调, 易致婴儿流涎、流涕, 气管及支气管分泌物增多等副作用。因此, 用药应注意逐渐加量^[3]。1 例患儿心电图出现偶发性室早, 可能和心脏横纹肌增生损伤心脏传导系统而未达到心脏 B 超可识别的范围有关。

[参 考 文 献]

- [1] 左启华. 小儿神经系统疾病 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1981, 412 - 413.
- [2] 吴瑞萍, 胡亚美, 江载芳. 诸福棠实用儿科学 [M]. 第 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996, 1855.
- [3] 解学礼. 癫痫病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997, 465 - 466.

(本文编辑: 吉耕中)