论著

文章编号:1000-5404(2006)15-1588-03

# 创伤性急性肾衰时肾脏分离肾小管上皮细胞DNA损伤的意义

梁培禾,靳风烁,张克勤,李彦锋,葛成国 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042)

**提 要:目的** 探讨肾小管上皮细胞DNA损伤在急性肾功能衰竭(acute renal failure, ARF)中的意义。**方法** Wistar大鼠108只,等分为大、小剂量及对照组,分别于后肢肌肉注射10、5 ml/kg 50%甘油及10 ml/kg生理盐水。于1、3、6、12、24、48 h测定血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、肌酐(creatinine, Cr),取肾脏分离肾小管上皮细胞,单细胞凝胶电泳(single cell gel electrophoresis, SCGE)技术测定DNA损伤。**结果** 两实验组BUN、Cr分别于12、6 h起较对照组显著升高($P<0.05$, $P<0.01$),两实验组间BUN和Cr分别在12 h和24 h起出现显著差异($P<0.05$, $P<0.01$),表明肾功能受损程度不同。肾脏分离肾小管上皮细胞DNA损伤对甘油注射呈现剂量和时间依赖性,其变化趋势与尿脱落细胞DNA损伤相似,但损伤程度较轻。**结论** DNA损伤、细胞脱落及凋亡等变化参与了肾小管上皮细胞的损伤,是ARF病理生理变化过程"多米诺骨牌"中的重要环节,在预防或及时阻断其发生在ARF的救治中有重要意义。

**关键词**:急性肾功能衰竭;肾小管上皮细胞脱落;DNA损伤

**中图法分类号**:R322.61;R329.24;R692.5 **文献标识码**:A

# DNA damage of renal tubular epithelial cells in acute renal failure

LIANG Pei-he, JIN Feng-shuo, ZHANG Ke-qin, LI Yan-feng, GE Cheng-guo (Department of Urology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract: Objective** To investigate the role of DNA damage in the development of acute renal failure (ARF), especially at the early stage. **Methods** ARF of different degree was induced by intramuscular injection of 10, 5 ml/kg glycerol or physiological saline to 108 Wistar rats ($n=36$ for each treatment). Cr and BUN in serum were detected at 1, 3, 6, 12, 24 and 48 h after injection. At the same time, DNA damage of tubular cells isolated from kidney and exfoliative tubular cells in urine were assayed by single cell gel electrophoresis assay (SCGE). **Results** After glycerol injection, BUN and Cr increased significantly with statistical difference among groups. The DNA damage in the tubular cells of two glycerol treated groups presented earlier than Cr and BUN in serum. The DNA damage of tubular cells showed a dose- and time-dependent manner with glycerol dose and positive relationship to the degree of renal function damage. But the DNA damage was more serious in urinary exfoliative tubular cells. **Conclusion** The results suggest that cell exfoliation and DNA damage are important mechanisms of tubular cell injury in ARF, and their prevention and blocking may play an important role in the treatment of ARF.

**Key words**: acute renal failure; renal tubular epithelial cell exfoliation; DNA damage

急性肾功能衰竭(acute renal failure, ARF)是常见的危急重症。在进行肾脏移植、心血管手术,或发生感染性休克、失血性休克及创伤等的患者中,其发生并不少见。有文献报道这些患者一旦发生ARF,即使有先进的透析和ICU支持治疗,病死率仍高达25%~90%。而在外科操作如出现并发症并导致患者死亡的情况中,大多数可见ARF的参与,因而对其早期病理生理改变,尤其是肾小管上皮细胞损伤的研究具有重要意义[1]。传统的观点认为,ARF最常见的病理类型是"急性肾小管坏死(acute tubular necrosis, ATN)",即狭义的ARF。但近年研究表明,脱落、凋亡等坏死以外的肾小管上皮细胞丢失途径在ARF中有重要意义[2,3]。我们曾对脱落、凋亡及坏死等不同形式的肾小管上皮细胞损伤在ARF中的意义加以研究,并发现尿脱落活细胞中DNA损伤严重,且与肾功能损害相关[3]。本实验则在以往研究基础上,由肾脏直接分离肾小管上皮细胞并对DNA损伤进行了研究,以探讨其在ARF发病机制中的意义。

作者简介:梁培禾(1972-),男,山西省平遥县人,硕士,主治医师,主要从事泌尿系统创伤和泌尿生殖系统肿瘤方面的研究。电话:(023)66319944

通讯作者:靳风烁,电话:(023)68757364

收稿日期:2005-07-11;修回日期:2006-01-19

## 1　材料与方法

### 1.1　动物模型

Wistar 大鼠 108 只，雌雄不拘，体质量(200 ± 20) g(由本院实验动物中心提供)，分为大、小剂量及对照组各 36 只，禁食 12 h 后 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉，大剂量组 10 ml/kg，小剂量组 5 ml/kg 分双侧后肢肌肉注射 50% 甘油诱导 ARF；对照组以生理盐水 10 ml/kg 代替。此后动物自由摄食进水。

### 1.2　标本采集与实验

各组动物于甘油注射后 1、3、6、12、24、48 h 取血标本测定血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、肌酐(creatinine, Cr)，每次 6 只。同时取肾脏，每次 5 只，按文献[3,4]的方法分离肾小管上皮细胞制成(2.5 ~ 3.0) × $10^5$/ml PBS 悬液，并进行 SCGE 检测，简要步骤如下：①100 μl 1.0% 正常熔点琼脂糖(NMA) PBS 凝胶铺于磨砂载玻片上，4 ℃，10 min 固化；②37 ℃，细胞 PBS 悬液与低熔点琼脂糖(LMA) PBS 凝胶混匀，75 μl 铺于第 1 层 NMA 上(细胞终浓度 130/μl，LMA 0.6%)，固化；③同前铺第 3 层无细胞 0.6% LMA，固化；④浸入细胞裂解液 4 ℃，2 h；⑤水平电泳槽，高 pH 电泳缓冲液浸泡 20 min；⑥低温(<15 ℃)，300 mA，25 V，电泳 20 min；⑦pH 7.5，0.4 mol/L Tris 浸洗，5 min × 3 次；⑧20 mg/L 溴化乙啶染色 15 min；⑨Olympus BX-60 荧光显微镜下选取 5 个 × 400 视野，每个视野观察 10 个细胞，计算有拖尾细胞(彗星)比例，目镜测微尺测定彗星尾长，并根据尾长及目测 DNA 迁移量(与尾长、尾部荧光强度成正比)将损伤分为无损伤(无拖尾)、轻、中、重度和完全损伤(彗头碎裂，荧光弱，DNA 全部逸出细胞外)5 级，分别计数。

### 1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 Excel 2000 统计软件进行 $t$ 检验，计数资料用 $\chi^2$ 检验。

## 2　结果

### 2.1　肾功能变化

动物注射甘油后约 1 h 排出酱油样尿，大剂量组尿色深于小剂量组，15 h 后转清。与对照组比较，大、小剂量组 BUN、Cr 均有显著升高，Cr 变化较早，两组均在 6 h 起显著升高，BUN 则于 12 h 起显著升高($P<0.05$，$P<0.01$)。大、小剂量组间 BUN 和 Cr 也分别在 12 h 和 24 h 起出现显著差异($P<0.05$，$P<0.01$)。见表 1、2。表明肾功能受损程度不同[3,5]。

### 2.2　肾脏分离肾小管上皮细胞 DNA 损伤测定

甘油注射后早期即可见分离肾小管上皮细胞 DNA 损伤明显，呈现一定时间和甘油剂量依赖性，变化趋势与文献[3]报道相似，但损伤程度较尿脱落细胞轻。见表 3 ~ 5。

**表 1　甘油注射后 3 组大鼠血 BUN 变化情况($C_B$/mmol/L · $L^{-1}$，$\bar{x} \pm s$)**

| 组别 | 甘油注射后时间($t$/h) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 3 | 6 | 12 | 24 | 48 |
| 大剂量组 | 6.02 ± 0.98 | 6.63 ± 1.66 | 7.12 ± 1.41 | 9.78 ± 2.86$^{ac}$ | 27.92 ± 7.83$^{bd}$ | 56.22 ± 14.40$^{bd}$ |
| 小剂量组 | 5.68 ± 1.13 | 5.95 ± 0.95 | 6.17 ± 1.00 | 6.75 ± 0.93 | 14.00 ± 2.23$^{d}$ | 29.73 ± 5.60$^{d}$ |
| 对照组 | 5.70 ± 1.39 | 5.90 ± 1.20 | 5.73 ± 0.78 | 6.38 ± 0.95 | 5.53 ± 0.77 | 5.72 ± 0.92 |

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与小剂量组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与对照组比较

**表 2　甘油注射后 3 组大鼠血 Cr 变化情况($C_B$/μmol · $L^{-1}$，$\bar{x} \pm s$)**

| 组别 | 甘油注射后时间($t$/h) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 3 | 6 | 12 | 24 | 48 |
| 大剂量组 | 56.08 ± 18.59 | 67.80 ± 12.12 | 72.80 ± 9.23$^{c}$ | 84.12 ± 10.42$^{c}$ | 229.27 ± 34.68$^{ac}$ | 284.88 ± 57.00$^{c}$ |
| 小剂量组 | 56.88 ± 5.79 | 60.58 ± 8.50 | 67.07 ± 7.50$^{c}$ | 74.17 ± 7.26$^{b}$ | 152.5 ± 19.07$^{c}$ | 253.42 ± 40.18$^{c}$ |
| 对照组 | 58.98 ± 11.01 | 59.20 ± 8.29 | 51.43 ± 9.38 | 57.8 ± 12.37 | 56.8 ± 7.15 | 61.55 ± 7.18 |

a：$P<0.01$，与小剂量组比较；b：$P<0.05$，c：$P<0.01$，与对照组比较

**表 3　甘油注射后肾脏分离肾小管上皮细胞 DNA 损伤分级计数($\bar{x} \pm s$)**

| 组别 | 损伤分级 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 无损伤 | 轻度损伤 | 中度损伤 | 重度损伤 | 完全损伤 |
| 大剂量组 | | | | | |
| 1 h$^{d}$ | 11.6 ± 1.3 | 11.2 ± 2.4 | 12.6 ± 1.7 | 11.4 ± 1.3 | 3.2 ± 0.8 |
| 3 h$^{ad}$ | 5.8 ± 1.9 | 8.2 ± 1.3 | 12.8 ± 3.6 | 17.6 ± 2.3 | 5.6 ± 1.7 |
| 6 h$^{bd}$ | 1.0 ± 0.7 | 2.2 ± 0.8 | 4.6 ± 2.2 | 31.6 ± 2.0 | 10.6 ± 1.9 |
| 12 h$^{ad}$ | 2.4 ± 0.9 | 5.8 ± 0.8 | 9.6 ± 3.2 | 25.8 ± 2.6 | 6.4 ± 2.5 |
| 24 h$^{ad}$ | 5.2 ± 1.6 | 9.4 ± 0.9 | 13.0 ± 2.0 | 19.2 ± 2.3 | 3.2 ± 1.5 |
| 48 h$^{d}$ | 11.2 ± 1.9 | 14.8 ± 1.6 | 11.8 ± 1.3 | 10.8 ± 1.3 | 1.4 ± 0.5 |
| 小剂量组 | | | | | |
| 1 h$^{d}$ | 19.8 ± 1.6 | 17.2 ± 1.3 | 7.2 ± 1.8 | 5.4 ± 1.1 | 0.4 ± 0.2 |
| 3 h$^{d}$ | 17.8 ± 1.3 | 10.4 ± 1.7 | 9.8 ± 1.5 | 11.0 ± 0.7 | 1.0 ± 0.3 |
| 6 h$^{d}$ | 10.2 ± 1.3 | 4.6 ± 1.3 | 14.2 ± 1.3 | 17.0 ± 1.0 | 4.0 ± 0.5 |
| 12 h$^{d}$ | 12.6 ± 1.9 | 7.8 ± 1.8 | 12.6 ± 1.1 | 14.6 ± 2.3 | 2.4 ± 0.5 |
| 24 h$^{d}$ | 15.0 ± 2.5 | 12.0 ± 1.6 | 12.0 ± 1.4 | 10.6 ± 1.8 | 0.4 ± 0.2 |
| 48 h$^{d}$ | 19.2 ± 1.5 | 19.6 ± 1.8 | 7.2 ± 1.3 | 3.8 ± 0.8 | 0.2 ± 0.2 |
| 对照组 | | | | | |
| 1 h | 41.6 ± 1.5 | 7.6 ± 1.5 | 0.6 ± 0.5 | 0.2 ± 0.4 | 0 ± 0 |
| 3 h | 42.4 ± 1.7 | 7.4 ± 1.5 | 0.2 ± 0.4 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |
| 6 h | 43.0 ± 2.0 | 6.6 ± 2.1 | 0.4 ± 0.5 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |
| 12 h | 45.4 ± 1.1 | 4.4 ± 1.1 | 0.2 ± 0.4 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |
| 24 h | 44.2 ± 2.2 | 5.4 ± 2.3 | 0.4 ± 0.5 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |
| 48 h | 43.4 ± 0.9 | 6.4 ± 1.1 | 0.2 ± 0.4 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与小剂量组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与对照组比较

**表 4　甘油注射后肾脏分离肾小管上皮细胞 DNA 损伤率(%)**

| 组别 | 甘油注射后时间($t$/h) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 3 | 6 | 12 | 24 | 48 |
| 大剂量组 | 76.8$^{d}$ | 88.4$^{bd}$ | 98.0$^{bd}$ | 95.2$^{bd}$ | 89.6$^{ad}$ | 77.6$^{d}$ |
| 小剂量组 | 60.4$^{c}$ | 64.4$^{c}$ | 79.6$^{d}$ | 74.8$^{d}$ | 70.0$^{d}$ | 61.6$^{c}$ |
| 对照组 | 16.8 | 15.2 | 14.0 | 9.2 | 11.6 | 13.2 |

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与小剂量组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与对照组比较

**表 5　甘油注射后肾脏分离肾小管上皮细胞 DNA 损伤彗星平均尾长($l$/μm，$\bar{x} \pm s$)**

| 组别 | 甘油注射后时间($t$/h) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 3 | 6 | 12 | 24 | 48 |
| 大剂量组 | 37.63 ± 2.79$^{ad}$ | 64.45 ± 3.11$^{bd}$ | 92.87 ± 4.92$^{bd}$ | 75.87 ± 3.31$^{bd}$ | 42.43 ± 5.11$^{ad}$ | 32.89 ± 4.66$^{ad}$ |
| 小剂量组 | 31.78 ± 4.23$^{d}$ | 41.73 ± 5.53$^{d}$ | 59.76 ± 5.20$^{d}$ | 51.56 ± 3.75$^{d}$ | 35.13 ± 1.40$^{d}$ | 26.11 ± 4.61$^{c}$ |
| 对照组 | 20.61 ± 3.89 | 20.25 ± 2.46 | 20.33 ± 1.33 | 20.19 ± 1.97 | 20.22 ± 2.93 | 20.30 ± 2.10 |

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与小剂量组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与对照组比较

## 3　讨论

我们曾在前期实验中对有望成为创伤性 ARF 预

警诊断指标的尿脱落肾小管上皮细胞计数进行研究的同时，发现其DNA损伤严重[3]。本实验在此基础上进一步发现ARF早期由肾脏直接分离肾小管上皮细胞即有明显DNA损伤，彗星细胞比例、分级计数及尾长等指标均对甘油注射呈现出剂量和时间依赖性，虽程度较轻，但变化趋势与细胞脱落及脱落细胞DNA损伤相似[3]，与损伤程度有一定相关性。可见，ARF发病过程中DNA损伤在细胞损伤中发挥了重要作用，作为不同的损伤形式或表现，与细胞脱落也存在一定联系。

研究显示，ARF中肾小管上皮细胞损伤有多种启动因素/途径，目前研究较多的有细胞能量供应改变、氧化应激、细胞内钙平衡的紊乱、脂质代谢异常等，构成了复杂的网络，甚至互为因果，既是损伤的表现又是进一步损伤发生的原因。创伤性ARF或挤压综合征经典的动物模型是肌肉注射高渗甘油，主要机制是横纹肌溶解释出肌红蛋白对肾小管上皮细胞产生毒性作用，其中自由基发挥了重要作用[6]。横纹肌溶解还可释放其他毒性物质，或刺激机体产生代谢产物、细胞因子及血管活性物质导致血流动力学改变、全身炎症反应等，加之肌肉部位大量组织液渗出，导致有效循环血容量的不足，使肾脏遭受缺血和/或再灌注及炎症反应等打击，造成能量代谢障碍及组织损伤的同时也促进了自由基生成。而细胞能量代谢障碍和自由基造成的细胞及细胞器膜脂质损伤除会使细胞钙隔离机制衰竭，形成钙超载，通过钙离子激活一些生物酶，诱导凋亡外，还能进一步干扰蛋白质流动、缔合，影响物质转运、能量转换、信息识别以及膜结合酶或受体功能发挥，又影响了自由基的产生、信号转导、$Ca^{2+}$平衡状态、线粒体功能及能量供应，以及细胞其他生命活动。正是这个复杂的网络最终导致了肾小管上皮细胞坏死、凋亡及脱落等形式的丢失。DNA正常结构和功能的维持直接、间接地受到这些因素的影响，如自由基可直接攻击细胞DNA分子中的碱基、核糖、磷酸二酯键，造成碱基与核糖氧化、链断裂或与蛋白质交联等多种类型的损伤；能量供应障碍则可导致细胞骨架、微管、中间丝等结构紊乱，细胞极性改变，$Na^+$-$K^+$-ATP酶重新分布及黏附分子表达异常，并进一步损害DNA正常结构及细胞在基底膜上的黏附，导致了细胞DNA损伤及脱落[7,8]。

本实验结果显示，在体的肾小管上皮细胞DNA损伤同发生ARF后脱落的肾小管上皮细胞一样，与凋亡的发生存在一定关联[5]。当肾小管上皮细胞DNA损伤后可直接影响复制、转录和蛋白质合成。如损伤因素持续存在，可出现以下情况[9]：①DNA损伤不能修复，小管上皮细胞坏死脱落，可导致寡细胞性间质纤维化，这可能是ARF后肾功能受到长期影响的机制之一；②部分修复或修复不完全，细胞发生凋亡，再生能力下降；如DNA损伤后p53发挥基因警卫作用，使DNA合成前期$G_1$期延长，修复受损DNA，如无法修复则激活凋亡基因转录，细胞发生凋亡[10]；③未完全修复之DNA诱导基因突变，导致肿瘤发生。

因此，DNA损伤不仅是创伤后ARF肾小管上皮细胞损伤的表现形式，也是造成进一步损伤的因素。

以上肾小管上皮细胞损伤因素并非创伤性ARF所特有的，多种原因的ARF中均可见它们的参与，这个由损伤因素构成的网络类似于复杂的串联、并联或循环排列的多米诺骨牌。不同原因的ARF中，多米诺骨牌排列可能具有一定相似性，最大的区别仅在于推倒的第一张牌不同，当骨牌开始大面积坍塌时，无论扶起中间哪一张都不能阻止最后一张的倒下。因此ARF应强调早期救治的重要性。

**参考文献：**


[1] CARMICHAEL P, CARMICHAEL A R. Acute renal failure in the surgical setting[J]. ANZ J Surg, 2003, 73(3): 144-153.

[2] DEVARAJAN P. Cellular and molecular derangements in acute tubular necrosis[J]. Curr Opin Pediatr, 2005, 17(2): 193-199.

[3] 梁培禾，靳风烁，岳 明，等. 急性肾功能衰竭中肾小管上皮细胞脱落及DNA损伤的意义[J]. 第三军医大学学报，2002，24(2)：176-178.

[4] ZAGER R A, BURKHART K M, GMUR D J. Postischemic proximal tubular resistance to oxidant stress and $Ca^{2+}$ ionophore-induced attack. Implications for reperfusion injury [J]. Lab Invest, 1995, 72(5): 592-600.

[5] 梁培禾，靳风烁，江 军，等. 大鼠急性肾功能衰竭时肾小管上皮细胞Fas、FasL表达的意义[J]. 创伤外科杂志，2003，5(2)：118-121.

[6] GUGLIELMINOTTI J, GUIDET B. Acute renal failure in rhabdomyolysis[J]. Minerva Anestesiol, 1999, 65(5): 250-255.

[7] WALD F A, FIGUEROA Y, ORIOLO A S, *et al*. Membrane repolarization is delayed in proximal tubules after ischemia-reperfusion: possible role of microtubule-organizing centers[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2003, 285(2): F230-F240.

[8] 郭啸华，杨俊伟. 细胞的极性与缺血性急性肾功能衰竭[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志，2000，9(2)：167-170.

[9] 李 瑛，刘志红，郭啸华，等. 马兜铃酸I致肾小管上皮细胞DNA损伤的实验研究[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志，2004，13(1)：7-12.

[10] MEGYESI J, SAFIRSTEIN R L, PRICE P M. Induction of p21 WAF1/CIP1/SDI1 in kidney tubule cells affects the course of cisplatin-induced acute renal failure[J]. J Clin Invest, 1998, 101(4): 777-782.


（编辑 栾 嘉）