文章编号:1000-5404(2013)07-0661-04

论著

肥胖患者皮肤组织钠、钾离子浓度的检测及临床意义

宋媛媛,王 非,李 强,王利娟,闫振成,倪银星,何洪波,杨建江,祝之明 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所高血压内分泌科,全军高血压代谢病中心,重庆市高血压研究所)

[摘要] **目的** 测定肥胖患者皮屑中钠、钾离子浓度及皮肤组织钠、钾转运相关蛋白的表达,并探讨其临床意义。**方法** 招募127例重庆地区自愿者,并以体质指数(BMI)和腰围(WC)值,将其分为肥胖、超重、健康组和腹型肥胖、健康组,刮取研究对象双前臂内侧皮屑,用消化液(1.5 mL×65%硝酸和0.5 mL×70%高氯酸)加热溶解后,使用火焰原子分光光度计检测溶液中钠、钾的含量;提取小鼠及人皮肤组织蛋白,用蛋白印迹法检测糖皮质激素受体、醛固酮受体、Na^+-K^+-ATP酶表达。**结果** 在最适反应条件下,本方法的相对标准偏差在0.34~1.45,回收率为93.1%~107.2%;肥胖组与健康组相比,皮屑钠、钾值均有显著性差异($P=0.002$,0.000),肥胖组与超重组比差异也有显著性($P=0.002$,0.000),超重组与健康组比较均无差异。Western blot检测小鼠和人皮肤组织中糖皮质激素受体、醛固酮受体、Na^+-K^+-ATP酶3种蛋白均有表达。**结论** 应用火焰原子分光光度计测量肥胖者皮屑钠、钾含量明显升高,可简易地反映临床肥胖患者组织电解质变化,钠、钾转运相关的3种蛋白在小鼠和人皮肤组织中均有表达。

[关键词] 火焰原子吸收光谱法;原子分光光度计;皮肤;钠;钾
[中图法分类号] R322.99; R446.1; R589.2 [文献标志码] A

Skin contents of sodium and potassium and their clinical significance in obesity

Song Yuanyuan, Wang Fei, Li Qiang, Wang Lijuan, Yan Zhencheng, Ni Yinxing, He Hongbo, Yang Jianjiang, Zhu Zhiming (Center for Hypertension and Metabolic Diseases, Department of Hypertension and Endocrinology, Chongqing Institute of Hypertension, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the concentrations of sodium and potassium in the dander from obese patients, and the expression of sodium- and potassium-related transporters at skin tissue, and to explore their clinical significance. **Methods** A total of 127 volunteers, 75 females and 52 male with an average age of 52.83±6.11 (ranging from 40 to 60) were recruited from Chongqing region. The volunteers were divided into normal weight ($n=50$), overweight ($n=56$) and obese group ($n=21$) by their body mass index (BMI), or non-abdominal obesity ($n=81$) and abdominal obesity group ($n=46$) by their waist circumference (WC). Dander scraped from medial forearm of subjects was digested by heated solution (1.5 ml 65% nitric acid and 0.5ml 70% perchloric acid), then the concentration of sodium and potassium in the solution was detected by flame atomic spectrophotometry. Glucocorticoid-receptor, aldosterone receptor and Na^+-K^+-ATP enzyme in skin tissue samples from C57 mice and from human during operation were detected by Western blotting. **Results** At optimal reaction conditions, our method obtained a relative standard deviation ranging from 0.34 to 1.45 and a recovery rate ranging from 93.1% to 107.2%. Obese group had a significantly higher contents of sodium ($P=0.002$) and potassium ($P=0.000$) when compared with normal weight group and overweight group. However, no significant difference was observed between normal weight group and overweight group. Western blotting showed that glucocorticoid-receptor, aldosterone receptor and Na^+-K^+-ATP enzyme were all expressed at mice and human skin tissue. **Conclusion** We establish the method to determine the dander contents of sodium and potassium from human skin tissue, and find increased concentrations of sodium and

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2012CB517805)
[通信作者] 祝之明,电话:(023)68767849,E-mail:zhuzm@yahoo.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130312.1339.005.html(2013-03-12)

potassium in dander form obese subjects, suggesting that our method can easily reflect the tissue electrolyte change of obesity. Sodium and potassium transporter-related proteins are all expressed in mouse and human skin tissue.

[**Key words**] flame atomic absorption spectrometry; atomic spectrophotometer; skin; sodium; potassium

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2012CB517805). Corresponding author: Zhu Zhiming, Tel: 86-23-68767849, E-mail: zhuzm@yahoo.com

肥胖尤其是腹型肥胖是冠心病、高血压、肾功能不全发生、发展的主要危险因素。肥胖导致组织钠水潴留[1],这也是肥胖性高血压的一个重要病因。文献报道摄入盐过量时,其皮肤可将钠储存起来并充当非活性钠的储存器[2]。降低非活性钠的储存能力可能导致高血压[3],检测皮肤钠量可评估全身钠的容量或长期钠的摄入[4]。目前,皮肤间隙钠的测量方法主要有灰烬法[5]和核磁共振法[6]。两种方法的结果均与非活性钠储存器(皮肤组织间隙)的相关性良好。但灰烬法需皮肤活检,取材受到限制;核磁共振法价格昂贵,难以在临床广泛应用。肥胖患者组织钾是否有变化目前还不清楚,现微透析法可监测组织间隙钾离子的浓度[7],但因价格昂贵和可行性等原因不适用于临床实验。因皮肤是人体最大的器官,又是除肾脏之外人体排钠、钾的第二大器官,故对皮肤钠、钾的研究有临床意义。研究报道钠离子转运与糖皮质激素受体(GR)[8-9]、醛固酮受体(MR)[10]、钠-钾-ATP[11]的表达有关,而皮肤存在哪些钠、钾离子的转运蛋白尚不清楚,且目前临床尚无检测肥胖患者组织钠、钾变化的实用方法。本研究通过检测皮屑中钠、钾水平以反映组织钠、钾的变化,并进一步分析其与肥胖的关系,为探索肥胖性高血压的病理生理特征提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2012年2-6月招募重庆地区40~60岁社区人群,签署知情同意书后,排除糖尿病、周围神经病变、皮肤病、使用利尿剂或阿托品等影响排汗药物者,共计纳入127例受试者,其中女性75例(59%),40~60(52.83±6.11)岁。根据中国肥胖标准,按体质指数[BMI=体质量(kg)/身高^2(m^2)],将受试者分为3组:健康组(18 kg/m^2≤BMI<24 kg/m^2)、超重组(24 kg/m^2≤BMI<28 kg/m^2)、肥胖组(BMI≥28 kg/m^2),据此得到健康组50例,BMI为(21.84±1.40) kg/m^2,超重组56例,BMI为(25.80±1.20)kg/m^2,肥胖组21例,BMI为(30.09±1.54)kg/m^2。按腰围(WC:男性≥90 cm,女性≥85 cm),将受试者分为健康组和腹型肥胖组,据此得到健康组81例,腰围为(77±6) cm,腹型肥胖组46例,腰围为(93±6) cm。

1.2 仪器和试剂

SP-350系列原子吸收分光光度计(上海光谱仪器有限公司),KD系列电子秤BN-100。仪器工作条件:测定波长:钠589 nm、钾766.5 nm,狭缝宽度:钠0.2 nm、钾0.7 nm,灯电流3.00 mA,焰气类型C2H2,空气流量6.0 L/min,乙炔流量1.2 L/min,燃烧器高度7.50 cm。

1.3 溶液的配制及校准曲线的绘制

在配制标准使用液时,氯化钠母液(1 000 mg/L)和氯化钾母液(100 mg/L)分别用1%硝酸逐渐稀释成0、0.1、0.3、0.6、0.9 mg/L和0、0.01、0.03、0.06、0.09 mg/L浓度梯度的溶液,并用原子分光光度计在(589 nm波长处测钠,766 nm波长处测钾)以质量浓度(C)对光密度做工作曲线并求回归方程:钠离子浓度C(mg/L):A=0.160 5 C^2+0.862 6 C+0.001 4,相关系数R=0.999 76;钾离子浓度C(mg/L):A=0.272 1 C^2+0.278 3 C+0.000 8,相关系数R=0.999 95。两者回归方程相关系数达到该设备要求的工作状态(相关系数>0.999)。

1.4 样品的采集

采集前受试者双前臂先用肥皂清洗2遍,再用去离子水冲洗前臂,擦干,待皮肤彻底干透后用消毒刀片先刮去皮肤表面汗毛,再在前臂内侧轻轻刮取皮屑约5 mg,并用电子秤取(3.0±0.1)mg,溶解待测。

1.5 测定方法

取各样品稀释溶液,照原子吸收分光光度法在上述工作条件下分别测定皮屑中的钠、钾离子浓度(μg/L)。

1.6 Western blot检测GR、MR、Na^+-K^+-ATP蛋白表达

凝胶扫描成像系统(Gel Doc 2000,美国Bio-Rad公司),TritonX-100(上海生工生物工程有限公司),PVDF膜(NEC,日本),盐皮质激素受体(MR),糖皮质激素受体(GR)和Na^+-K^+-ATP酶抗体(美国Santa Cruze公司),以GAPDH为内参。取C57小鼠和皮肤科手术患者的皮肤组织,提取组织总蛋白,上样50 μg,经10% SDS-PAG E电泳后转移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭1 h,加入鼠抗(1∶1 000稀释)4 ℃过夜。TBST漂洗3次,加入HRP标记的二抗(1∶1 000,用0.01 mol/L PBST配制)室温孵育2 h。TBST漂洗3次,ECL化学发光显色系统显色,X线片压片曝光,凝胶成像系统分析结果。

1.7 统计学分析

计量数据用$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件行多样本单因素方差分析比较健康、超重和肥胖患者间皮屑中钠、钾值的差异。组间比较采用t检验,分析腹型肥胖和健康人群皮屑

钠、钾值的变化。采用 Pearson 相关性分析皮屑中钠、钾与 BMI、腰围的相关性。

2 结果

2.1 皮屑钠、钾测定的方法学评价

2.1.1 加标回收率 加标回收率=(加标试样测定值-试样测定值)/加标量×100%。测定时用4份样本分别加入30 μL Na标准溶液进行测定,得到方法的回收率为93.1%~107.2%,达到仪器测量要求。见表1。

表1 皮屑钠、钾回收率检测

样品编号	本底值(μg/L)	加标量(μg/L)	加标测量值(μg/L)	回收率(%)
1	34.3	300	345.3	103.6
2	63.2	300	342.5	93.1
3	72.7	300	394.4	107.2
4	24.3	300	327.6	101.1

2.1.2 精密度 将所测样本随机抽取7份,每份平行测定7次,相对标准偏差(RSD)值均小于5%,方法的精密度在允许范围内。见表2。

表2 皮屑钠、钾精密度检测

样品编号	$\bar{x} \pm s$(μg/L)	RSD(%)
1	246.1±0.8	0.34
2	385.2±3.3	0.97
3	149.8±1.6	1.10
4	460.8±3.1	0.77
5	109.2±1.6	1.45
6	120.7±0.2	0.21
7	116.6±1.4	1.20

2.2 肥胖患者皮屑钠、钾离子浓度的变化

2.2.1 按BMI分组 肥胖组皮屑钠、钾离子浓度含量[(95.84±9.32)、(54.99±5.78)μg/L]显著高于健康组[(67.40±5.00)、(33.27±3.02)μg/L,$P<0.01$]和超重组[(67.07±4.21)、(32.27±2.86)μg/L,$P<0.01$],而超重组和健康组比较无差异($P>0.05$)。

2.2.2 按WC分组 统计学分析结果显示皮屑钠、钾离子浓度检测健康组和肥胖组比较均无统计学差异($P>0.05$)。

2.3 皮屑钠、钾与BMI和腰围的相关性

皮屑钠离子浓度与BMI显性相关($r=0.196$,$P=0.027$),与腰围显性相关($r=0.202$,$P=0.023$)。皮屑钾离子浓度与BMI显性相关($r=0.180$,$P=0.043$),与腰围无显性相关($r=0.157$,$P=0.078$)。

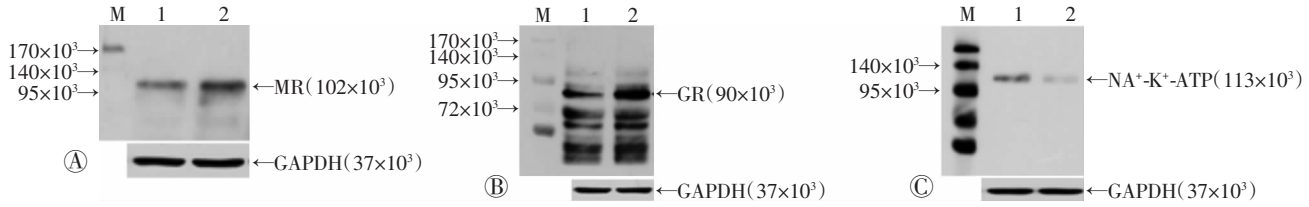
2.4 C57小鼠和人皮肤钠、钾转运相关蛋白的表达

Western blot检测显示,C57小鼠和人的皮肤组织中有糖皮质激素受体、醛固酮受体、Na^+-K^+-ATP酶抗体3种蛋白的表达(图1)。

3 讨论

肥胖是心血管代谢病的主要危险因素,腹型肥胖以内脏脂肪增多为特征,可增强醛固酮产生[12],使肥胖患者出现钠水潴留、低钾血症等临床表现。人体在摄入盐过量时,其皮肤可将钠储存起来并充当非活性钠的储存器[2],降低非活性钠的储存能力可能导致高血压[2]。许多研究证实,肥胖患者易发生高血压,交感神经和肾素-血管紧张素-醛固酮系统的激活被认为是肥胖时钠水潴留的主要机制[13-14],但肥胖并发钠水潴留至今仍缺乏直接证据。

因皮肤是人体最大的器官,又是除肾脏之外人体排钠、钾的第二大器官,故对皮肤钠、钾的研究有临床意义。皮屑是皮肤表皮的代谢产物,其中的钠、钾变化在一定程度反应皮肤组织钠、钾代谢的情况。目前尚无皮屑中检测钠、钾离子浓度的方法报道,我们首先建立了应用火焰原子分光光度计测量皮屑中钠、钾离子浓度的方法。在分析皮屑钠时,由于其质量轻,样本收集困难,为防止样本的浪费,必须严格控制试剂、器皿、实验用水等以免污染,使用纯度较高的优级纯试剂和去离子水可满足分析的要求。以往研究报道汗液中含钠[15],前臂局部汗液钠离子浓度是皮屑中钠离子浓度的10 000倍左右,所以在皮屑收集的过程中应控制环境温度和注意受试者前臂皮温的变化,观察有无皮肤潮湿,避免收集的样本因掺杂汗液而使实验结果受到影响。



M:标准;1:C57小鼠;2:人 A:MR受体;B:GR受体;C:Na^+-K^+-ATP酶

图1 Western blot检测MR、GR、Na^+-K^+-ATP在皮肤组织的表达

肥胖致钠水潴留,主要表现为皮肤间隙钠以无水钠的形式存在,无水钠的保留是盐皮质激素过量时保持体液平衡所必不可少的[16];健康人群高盐饮食不会诱导体液潴留,因为人体皮肤间隙有渗透压非活性钠的储存[17];有报道降低非活性钠的储存能力可能与高血压的发生有关。本研究显示肥胖者皮屑钠离子浓度高于超重组及健康组这一结果,提示肥胖者皮肤间隙钠储存能力较超重组和健康组降低,而皮肤间隙非活性钠储存能力的降低和盐皮质激素过量可能是导致钠水潴留的原因之一。皮屑钾离子浓度检测结果发现皮屑钾离子浓度与皮屑中钠离子浓度、BMI正相关。本文肥胖组皮屑钾离子浓度高于超重组和健康组,皮肤间隙钾离子浓度变化考虑与钠离子浓度的变化可能有关。本研究也发现如按WC是否达到腹型肥胖进行分组,则未显示皮屑钠、钾变化与肥胖的相关性,提示肥胖的类型对皮肤钠、钾的变化有影响,但其机制尚不清楚。另肥胖患者临床分型在本研究中用BMI和腰围,今后工作将用CT或腹部超声以鉴别假性腹型肥胖。

组织的钠、钾转运与其相关的转运蛋白关系密切,研究中发现皮肤组织中几种与钠、钾离子转运密切相关的蛋白表达,但相关蛋白表达在肥胖者有何变化,及与皮肤组织钠、钾代谢有何关联的机制方面需进一步探讨。本研究也存在局限性和不足,人体皮屑受表皮角化程度的影响对检测结果有一定的影响,所以有关研究需要在动物实验中进一步证实。

综上所述,本研究首次建立应用火焰原子分光光度计检测人体皮屑中钠、钾离子浓度的方法,发现皮肤组织中有与钠离子转运相关的GR、MR、Na^+-K^+-ATP酶3种蛋白的表达,为进一步探讨肥胖患者血压升高的机制提供了依据。

参考文献:

[1] He F J, Burnier M, Macgregor G A. Nutrition in cardiovascular disease: salt in hypertension and heart failure[J]. Eur Heart J, 2011, 32(24): 3073-3080.

[2] Titze J, Lang R, Ilies C, *et al*. Osmotically inactive skin Na^+ storage in rats[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2003, 285(6): F1108-F1117.

[3] Titze J, Krause H, Hecht H, *et al*. Reduced osmotically inactive Na storage capacity and hypertension in the Dahl model[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002, 283(1): F134-F141.

[4] Titze J, Shakibaei M, Schafflhuber M, *et al*. Glycosaminoglycan polymerization may enable osmotically inactive Na^+ storage in the skin[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287(1): H203-H208.

[5] Titze J, Bauer K, Schafflhuber M, *et al*. Internal sodium balance in DOCA-salt rats: a body composition study[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2005, 289(4): F793-F802.

[6] Borthakur A, Mellon E, Niyogi S, *et al*. Sodium and T1rho MRI for molecular and diagnostic imaging of articular cartilage[J]. NMR Biomed, 2006, 19(7): 781-821.

[7] Mohr M, Nordsborg N, Nielsen J J, *et al*. Potassium kinetics in human muscle interstitium during repeated intense exercise in relation to fatigue[J]. Pflugers Arch, 2004, 448(4): 452-456.

[8] Sayegh R, Auerbach S D, Li X, *et al*. Glucocorticoid induction of epithelial sodium channel expression in lung and renal epithelia occurs *via* trans-activation of a hormone response element in the 5'-flanking region of the human epithelial sodium channel alpha subunit gene[J]. J Biol Chem, 1999, 274(18): 12431-12437.

[9] Pondugula S R, Raveendran N N, Ergonul Z, *et al*. Glucocorticoid regulation of genes in the amiloride-sensitive sodium transport pathway by semicircular canal duct epithelium of neonatal rat[J]. Physiol Genomics, 2006, 24(2): 114-123.

[10] Amin M S, Wang H W, Reza E, *et al*. Distribution of epithelial sodium channels and mineralocorticoid receptors in cardiovascular regulatory centers in rat brain[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005, 289(6): R1787-R1797.

[11] Kedzierska K, Bober J, Kwiatkowska E, *et al*. Oxidative stress and trace elements affect the activity of sodium transporting systems in a cellular membrane of a erythrocyte[J]. Ann Acad Med Stetin, 2008, 54(3): 105-114.

[12] Jansen P M, Danser J A, Spiering W, *et al*. Drug mechanisms to help in managing resistant hypertension in obesity[J]. Curr Hypertens Rep, 2010, 12(4): 220-225.

[13] Davy K P, Hall J E. Obesity and hypertension: two epidemics or one?[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004, 286(5): R803-R813.

[14] Mu S, Shimosawa T, Ogura S, *et al*. Epigenetic modulation of the renalβ-adrenergic-WNK4 pathway in salt-sensitive hypertension[J]. Nat Med, 2011, 17(5): 573-580.

[15] Baker L B, Stofan J R, Hamilton A A, *et al*. Comparison of regional patch collection *vs*. whole body washdown for measuring sweat sodium and potassium loss during exercise[J]. J Appl Physiol, 2009, 107(3): 887-895.

[16] Titze J. Water-free sodium accumulation[J]. Semin Dial, 2009, 22(3): 253-255.

[17] Heer M, Baisch F, Kropp J, *et al*. High dietary sodium chloride consumption may not induce body fluid retention in humans[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2000, 278(4): F585-F595.

(**收稿**:2012-12-04;**修回**:2013-01-15)

(编辑 吴培红)