文章编号:1000-5404(2014)24-2467-04

论著

蛋白结合硫酸吲哚酚损伤红细胞膜

韦杏雪[1],吴 军[2],梁 新[1],丁 瑜[1],袁发焕[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院:肾内科,重庆市肾脏病研究所,全军肾脏病中心[1],健康管理科[2])

[摘要] **目的** 研究蛋白结合硫酸吲哚酚对红细胞寿命的影响及作用机制。**方法** 以4%白蛋白结合不同浓度的硫酸吲哚酚孵育0.4%红细胞悬液48 h,采用流式细胞仪检测红细胞体积,Annexin-V-FITC凋亡试剂盒检测红细胞表面磷脂酰丝氨酸的标记率,钙离子荧光探针(Fluo3/AM)检测红细胞内Ca^{2+}浓度,酶标分析仪检测红细胞的溶血率,采用SPSS 18.0统计软件进行统计分析。**结果** 4%白蛋白结合硫酸吲哚酚孵育0.4%红细胞悬液48 h后,随硫酸吲哚酚浓度逐渐增加,红细胞体积逐渐变小[(1603.33±8.50)*vs*(742.67±14.04),$P<0.05$],红细胞表面磷脂酰丝氨酸的标记率[(0.26±0.06)*vs*(10.32±1.64),$P<0.05$]、红细胞内Ca^{2+}浓度以及溶血率逐渐增加,与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$),呈剂量依赖性;当细胞外Ca^{2+}缺乏时,硫酸吲哚酚对红细胞的这种损伤效应明显降低。**结论** 4%白蛋白结合硫酸吲哚酚通过增加钙内流而损伤红细胞,促进红细胞衰亡,是尿毒症患者贫血的发生机制之一,清除蛋白结合毒素有助于改善贫血。

[关键词] 红细胞衰亡;硫酸吲哚酚;蛋白结合毒素;钙离子
[中图法分类号] R331.141;R362;R363.21 [文献标志码] A

Albumin-bound indoxyl sulfate damages erythrocytes *in vitro*

Wei Xingxue[1], Wu Jun[2], Liang Xin[1], Ding Yu[1], Yuan Fahuan[1] ([1]Department of Nephrology, Center of Renal Diseases, Chongqing Institute of Renal Diseases, [2]Department of Health Management, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of albumin-bound indoxyl sulfate on erythrocytes and related mechanism. **Methods** Different concentrations of indoxyl sulfate were bound to 4% albumin. Erythrocytes with 0.4% hematocrit were prepared from normal adults. Forward scatter was used to estimate erythrocyte volume. Phosphatidylserine-exposure from annexin V binding was used to check eryptosis. Erythrocyte intracellular free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) was detected by Fluo3-fluorescence and assayed by flow cytometry. Hemolysis from hemoglobin release was estimated with an enzyme-mark analyzer. Statistical analysis was made with SPSS18.0 software. **Results** Exposure to albumin-bound indoxyl sulfate for 48 hours significantly decreased erythrocyte volume (1603.33±8.50 *vs* 742.67±14.04, $P<0.05$), and increased eryptosis (0.26±0.06 *vs* 10.32±1.64, $P<0.05$), $[Ca^{2+}]_i$ and hemolysis ratio in a dose-dependent manner ($P<0.05$). The damage effect of albumin-bound indoxyl sulfate on erythrocytes was weakened in the absence of Ca^{2+} in the supernatant. **Conclusion** Albumin-bound indoxyl sulfate induces eryptosis through calcium influx, which is an important mechanism of anemia in uremic patients. Eliminating albumin-bound indoxyl sulfate might alleviate renal anemia.

[**Key words**] eryptosis; indoxyl sulfate; albumin-bound toxin; calcium

Corresponding author: Yuan Fahuan, E-mail: yuanfh023@126.com

肾性贫血是指因慢性肾功能衰竭(chronic renal failure,CRF)所导致的贫血。其发生机制非常复杂,包括肾脏促红细胞生成素(EPO)产生相对不足、尿毒症毒素对红细胞的破坏和对骨髓生成红细胞的抑制以及因消化道症状而导致的营养物质摄入和消化吸收障碍等[1]。贫血能导致各组织器官缺氧,能增加心脏负荷、诱发心绞痛、心肌变性、心肌收缩力下降,甚至心力

[通信作者] 袁发焕,E-mail:yuanfh023@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141106.1622.031.html(2014-11-06)

衰竭[2];而心力衰竭又会加速肾功能恶化速度,肾衰、贫血、心衰3种病理生理状态形成恶性循环,严重影响患者的生活质量和预后[3]。Portoles等[4]报道的西班牙肾性贫血发病率-病死率(MAR)前瞻性多中心研究(1 428例)明确贫血是患者存活率和住院率的独立危险因子。以往研究表明正常人平均红细胞寿命为100~120 d[5],而CRF患者红细胞寿命仅40~60 d,但CRF患者红细胞寿命缩短的详细机制却并不清楚。近年研究发现,红细胞在衰老之前,会出现类似于有核细胞凋亡现象,因为红细胞缺乏诱导细胞程序性凋亡的细胞核、线粒体、重要细胞器,因此红细胞缺乏凋亡的一些特征(如核质浓缩、线粒体膜电位消失)。红细胞衰亡(eryptosis)这一概念[6],用来描述与有核细胞凋亡相区别的红细胞程序化自杀性死亡。目前检测红细胞衰亡主要有以下方法[7]:①利用前向散射光强度(forward scatter,FSC)检测红细胞体积变化;②利用Annexin V检测红细胞表面磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine,PS)外露程度;③利用Fluo3 fluorescence检测细胞内Ca^{2+}浓度。

慢性肾脏病(chronic kidney disease,CKD)3~5期患者红细胞PS的外露程度与红细胞寿命之间呈负相关,表明PS在CKD患者红细胞衰亡的发生机制中起重要作用[8-10]。但什么原因导致CKD患者红细胞PS外露仍不清楚,推测是某类毒素所致。Mario等研究发现血液透析并不能改善CRF患者红细胞PS外露程度,提示血透不能清除导致PS高表达的毒素,进而推测这些毒素可能是大分子物质或者与蛋白高度结合的小分子物质[11]。尿毒症患者血清硫酸吲哚酚(indoxyl sulfate,IS)浓度是正常人50~90倍,IS浓度在300~1 000 μmol/L呈剂量依赖性[12]。IS主要来源于食物中的色氨酸,经肠道艾希菌属作用生成吲哚后被吸收入血,运至肝脏经氧化和硫酸化而成IS,是一种与蛋白高度结合尿毒症毒素[13],常规血液净化治疗不能将其有效清除[14]。本研究拟观察蛋白结合IS对红细胞的寿命影响,以探讨蛋白结合IS与肾性贫血的关系,为是否需要采取措施以清除蛋白结合毒素提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验细胞及主要材料

抗凝血采血管(乙二胺四乙酸)采集成年非吸烟健康志愿者外周静脉全血离心洗涤红细胞。IS、人血白蛋白(human serum albumin,HSA)、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙烷磺酸(HEPES)购于美国Sigma公司,Annexin-V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、钙离子荧光探针(Fluo3/AM)、HBSS购于碧云天生物技术研究所,乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(EGTA)购于上海生工,NaCl、KCl、$MgSO_4$、glucose、$CaCl_2$、PBS购于第三军医大学中心实验室。按文献[15]方法配制林格液(含NaCl 125 mmol/L、KCl 5 mmol/L、$MgSO_4$ 1 mmol/L、HEPES 32 mmol/L、glucose 5 mmol/L、$CaCl_2$ 1 mmol/L)。IS浓度参考欧洲尿毒素研究组(EUTox)尿毒素清单中CKD患者血清浓度[12]。

1.2 红细胞培养及实验分组

林格液孵育红细胞使其终浓度为0.4%红细胞悬液,分成6组($n=3$):4% HAS组(对照组),4% HSA+IS组(62.5、125、250、500、1 000 μmol/L),置于37 ℃、5% CO_2培养箱中孵育48 h;Ca^{2+}阴性林格液:以1 mmol/L EGTA代替$CaCl_2$[15]。

1.3 实验方法

1%红细胞悬液分别接种于24孔培养板,加入4% HSA+IS,对照组加入等体积4% HSA,反应液总体积0.5 mL,红细胞容积比为0.4%。置于37 ℃、5% CO_2培养箱中48 h,光镜下观察红细胞形态,流式细胞仪检测红细胞体积(FSC)和红细胞PS标记率及红细胞内Ca^{2+}荧光强度,酶标分析仪检测红细胞溶血率。从全血采集、红细胞制备、实验分组到各指标检测整个实验重复3次。

1.4 流式细胞仪检测PS标记率和FSC

红细胞在相应的实验条件下孵育48 h后,各孔收集100 μL红细胞悬液,室温1 000 r/min离心5 min,弃上清液,用PBS洗涤细胞,重复1次,各孔加入195 μL Annexin V-FITC结合液重悬细胞,再加入5 μL Annexin V-FITC室温避光孵育10 min后1 000 r/min离心5 min,弃上清,加入190 μL Annexin V-FITC结合液重悬细胞,激发波长488 nm、发射波长530 nm进行流式细胞仪检测PS标记率和FSC。

1.5 流式细胞仪检测红细胞内Ca^{2+}浓度

红细胞在相应的实验条件下孵育48 h后,各孔收集100 μL红细胞悬液,室温1 000 r/min离心5 min,弃上清液,用HBSS洗涤细胞,重复2次,各管中分别加入100 μL Fluo3/AM使其终浓度5 μmol/L,在37 ℃、5% CO_2培养箱中避光孵育30 min,用HBSS洗涤3遍,洗涤后孵育20 min,激发波长488 nm、发射波长530 nm进行流式细胞仪检测。

1.6 酶标分析仪检测上清液吸光度计算溶血率

红细胞在相应的实验条件下孵育48 h后,从各孔中收集0.5 mL红细胞悬液置于塑料管;以4% HSA离心后上清液作为阴性对照组;取红细胞悬液置于-20 ℃ 2 h使其全部溶血作为阳性对照组。各组室温1 000 r/min离心5 min,吸取上清液100 μL置于96孔板,检测各组405 nm处的吸光度值[$D(405)$]。根据公式计算:溶血率=[样品管$D(405)$值-阴性对照管$D(405)$值]/[阳性对照管$D(405)$值-阴性对照管$D(405)$值]×100%。

1.7 统计学分析

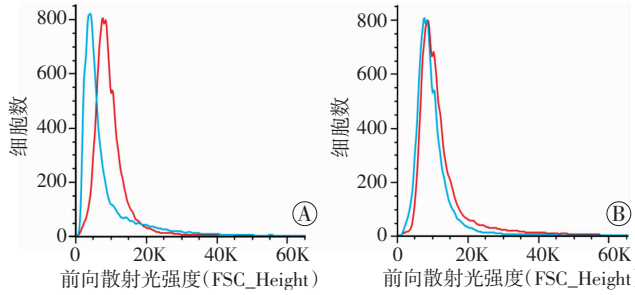
计量资料数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 18.0统计软件,多组间差异比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 4%白蛋白结合硫酸吲哚酚对红细胞体积影响

流式细胞仪检测FSC,红细胞体积随IS浓度增加逐渐变小

(图 1A、表 1)；当细胞外无 Ca^{2+} 时，红细胞体积随 IS 浓度增加而变小的程度显著减轻(图 1B、表 1)。



红色：对照组；蓝色：实验组；A：4% HSA + 1 000 μmol/L IS 组；B：Ca^{2+} 阴性 4% HSA + 1 000 μmol/L IS 组

图 1 白蛋白结合硫酸吲哚酚对红细胞体积影响

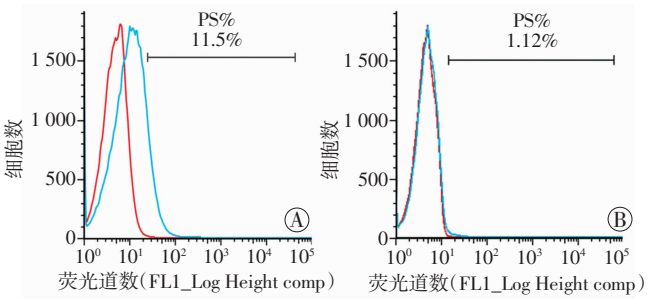
表 1 白蛋白结合硫酸吲哚酚作用 48 h 后红细胞 FSC ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	Ca^{2+} 阳性 FSC	Ca^{2+} 阴性 FSC
对照组	1 603.33 ± 8.50	1 595.66 ± 6.02
4% HSA + 62.5 μmol/L IS	1 517.33 ± 15.63[a]	1 583.00 ± 7.81
4% HSA + 125 μmol/L IS	1 489.66 ± 8.02[a]	1 563.00 ± 5.57[a]
4% HSA + 250 μmol/L IS	1 361.00 ± 13.75[a]	1 512.67 ± 11.59[a]
4% HSA + 500 μmol/L IS	877.33 ± 23.02[a]	1 477.67 ± 8.02[a]
4% HSA + 1 000 μmol/L IS	742.67 ± 14.04[a]	1 462.00 ± 12.49[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较

2.2 4% 白蛋白结合硫酸吲哚酚对红细胞表面 PS 影响

流式细胞仪检测红细胞表面 PS 标记率，红细胞 PS 标记率随 IS 浓度增加逐渐增加，且呈剂量依赖性，与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$，图 2A、表 2)；当细胞外无 Ca^{2+} 时，红细胞 PS 标记率随 IS 浓度增加而轻度增加，与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$，图 2B、表 2)。



红色：对照组；蓝色：实验组；A：4% HSA + 1 000 μmol/L IS 组；B：Ca^{2+} 阴性 4% HSA + 1 000 μmol/L IS 组

图 2 白蛋白结合硫酸吲哚酚对红细胞表面 PS 的影响

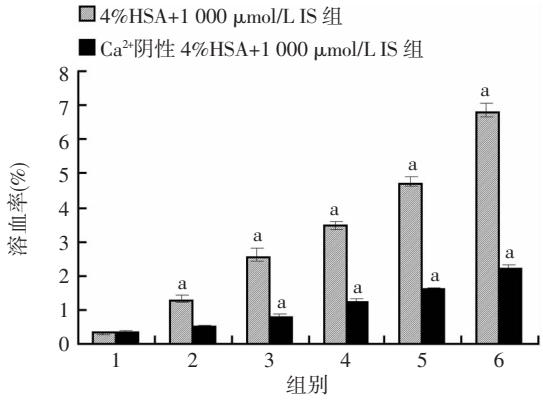
表 2 白蛋白结合硫酸吲哚酚作用 48 h 后红细胞 PS 标记率 ($n=3$, %, $\bar{x}\pm s$)

组别	Ca^{2+} 阳性 PS 标计率(%)	Ca^{2+} 阴性 PS 标计率(%)
对照组	0.26 ± 0.06	0.57 ± 0.05
4% HSA + 62.5 μmol/LIS	1.51 ± 0.27	0.65 ± 0.37
4% HSA + 125 μmol/LIS	1.73 ± 0.23[a]	0.74 ± 0.35[a]
4% HSA + 250 μmol/LIS	2.99 ± 0.51[a]	0.77 ± 0.08[a]
4% HSA + 500 μmol/LIS	4.78 ± 0.36[a]	0.82 ± 0.06[a]
4% HSA + 1 000 μmol/LIS	10.32 ± 1.64[a]	1.10 ± 0.26[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较

2.3 4% 白蛋白结合硫酸吲哚酚对红细胞溶血率的影响

酶标分析仪检测上清液吸光度计算溶血率，红细胞溶血率随 IS 浓度增加逐渐增加，呈剂量依赖性，与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$，图 3)；当细胞外无 Ca^{2+} 时，溶血率随 IS 浓度增加而轻度增加，与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$，图 3)。

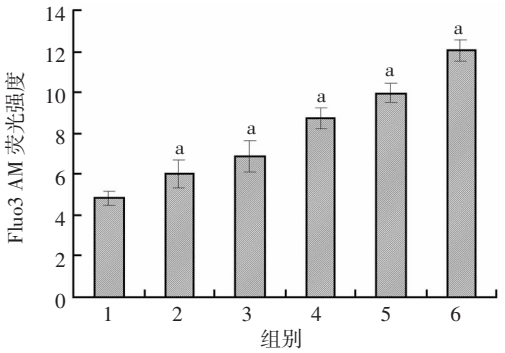


1：对照组；2：4% HSA + 62.5 μmol/LIS；3：4% HSA + 125 μmol/LIS；4：4% HSA + 250 μmol/LIS；5：4% HSA + 500 μmol/LIS；6：4% HSA + 1 000 μmol/LIS a：$P<0.05$，与对照组比较

图 3 白蛋白结合硫酸吲哚酚对红细胞溶血率影响

2.4 4% 白蛋白结合硫酸吲哚酚对红细胞内 Ca^{2+} 浓度影响

流式细胞仪检测红细胞内 Ca^{2+} 荧光强度，红细胞内 Ca^{2+} 荧光强度随 IS 浓度增加逐渐增加，呈剂量依赖性，与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$，图 4)。



1：对照组；2：4% HSA + 62.5 μmol/LIS；3：4% HSA + 125 μmol/LIS；4：4% HSA + 250 μmol/LIS；5：4% HSA + 500 μmol/LIS；6：4% HSA + 1 000 μmol/LIS a：$P<0.05$，与对照组比较

图 4 白蛋白结合硫酸吲哚酚对红细胞内 Ca^{2+} 浓度影响

3 讨论

本研究发现白蛋白结合的 IS 可导致红细胞膜皱缩、红细胞表面 PS 外露增加，溶血率增加，红细胞内 Ca^{2+} 浓度增加，这些都是红细胞衰亡的标志，随着白蛋白结合 IS 浓度增加，红细胞衰亡逐渐增多，说明白蛋白结合的 IS 能呈剂量依赖性地诱导红细胞衰亡。

以往研究表明，红细胞非选择性 Ca^{2+} 通道激活可

导致红细胞体积变小,激活环氧合酶(cyclooxygenase,COX),在PEG_2合成酶的共同作用下,以由磷脂酶A2(PLA_2)降解膜磷脂产生的花生四烯酸为底物合成PGE_2,PGE_2激活红细胞膜上离子通道,导致细胞中Ca^{2+}浓度增加[5],细胞质中Ca^{2+}浓度的增加刺激Ca^{2+}敏感K^+通道,随后K^+流出细胞外,细胞膜的超极化,膜内外电压梯度改变,Cl^-外流,细胞丢失KCl,水渗透性外流,红细胞皱缩,加速红细胞的衰亡进程[5]。红细胞表面蛋白被PKC磷酸化[5],PKC的激活可以刺激红细胞Ca^{2+}进入红细胞。细胞中的Ca^{2+}激活细胞膜上的混转酶(scramblase),后者将红细胞膜内部的PS转移到细胞表面[5],引发细胞皱缩、细胞膜囊泡化[16],红细胞质膜结构及功能的改变,导致红细胞变性,脆性增加,红细胞溶血和寿命缩短[17]。此外红细胞表面PS与内皮细胞CXCL16/SR-PSO相互作用,红细胞黏附于血管壁,干扰微循环,促进血栓形成。CRF患者血液中红细胞PS外露显著增加,红细胞寿命缩短,从循环的血液中迅速清除,是肾性贫血病因之一。进一步研究证实正常人红细胞与CRF患者血浆一起孵育时,红细胞PS外露明显增加,而CRF患者红细胞输给正常人,红细胞寿命正常,表明CRF患者红细胞PS的高表达与血浆中的某些因子相关,血液透析并不能改善CRF患者红细胞PS外露程度,推测这些毒素可能是血透不能清除的大分子物质或者与蛋白高度结合的小分子物质[16]。以往的研究主要是探讨水溶性小分子尿毒症毒素如:钒酸、丙烯醛、丙酮醛等对红细胞衰亡的影响[10,18],关于蛋白结合尿毒症毒素对红细胞寿命影响的研究国内外报道较少。

本研究发现经过白蛋白结合IS处理了的红细胞,红细胞内Ca^{2+}浓度随IS浓度增加逐渐增加,呈剂量依赖性。红细胞内Ca^{2+}超负荷,诱导细胞内K^+及水分子外流,红细胞皱缩,表面积与容积比值下降,变形能力降低,容易被脾脏(脾索开口仅有0.5~1.0 μm)扣押,进而被吞噬细胞吞噬。当细胞外液无Ca^{2+}时,白蛋白结合IS诱导红细胞衰亡的作用显著减弱,说明红细胞衰亡依赖细胞外Ca^{2+}的存在,当细胞外Ca^{2+}缺乏时,由细胞外进入红细胞的Ca^{2+}减少,红细胞内Ca^{2+}增加介导的红细胞衰亡作用减轻。本研究发现白蛋白结合IS诱导红细胞衰亡的作用虽然显著减弱,但仍显著高于正常对照组,提示白蛋白结合IS诱导红细胞衰亡的机制,除了钙通道机制外,还有其他机制存在。

综上所述,蛋白结合尿毒症毒素IS呈浓度依赖性诱导红细胞衰亡,使红细胞寿命缩短,这种效应主要通过细胞外Ca^{2+}内流机制起作用,清除慢性肾功能衰竭患者的蛋白结合IS,对改善肾性贫血可能有益。

参考文献:

[1] Ruedin P, Dickenmann M, Martin P Y, *et al*. Management of renal anemia in patients with chronic kidney disease: the role of the general practitioner[J]. Rev Med Suisse, 2012, 8(323): 70-73.

[2] Palmer S C, Navaneethan S D, Craig J C, *et al*. Meta-analysis: erythropoiesis-stimulating agents in patients with chronic kidney disease [J]. Ann Intern Med, 2010, 153(1): 23-33.

[3] Staude H, Jeske S, Schmitz K, *et al*. Cardiovascular risk and mineral bone disorder in patients with chronic kidney disease[J]. Kidney Blood Press Res, 2013, 37(1): 68-83.

[4] Lang F, Gulbins E, Lerche H, *et al*. Eryptosis, a window to systemic disease[J]. Cell Physiol Biochem, 2008, 22(5/6): 373-380.

[5] Lang F, Gulbins E, Lang P A, *et al*. Ceramide in suicidal death of erythrocytes[J]. Cell Physiol Biochem, 2010, 26(1): 21-28.

[6] Lang F, Qadri S M. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes[J]. Blood Purif, 2012, 33(1/3): 125-130.

[7] Abed M, Artunc F, Alzoubi K, *et al*. Suicidal erythrocyte death in end-stage renal disease[J]. J Mol Med (Berl), 2014, 92(8): 871-879.

[8] Popolo A, Autore G, Pinto A, *et al*. Oxidative stress in patients with cardiovascular disease and chronic renal failure[J]. Free Radic Res, 2013, 47(5): 346-356.

[9] Nguyen D B, Wagner-Britz L, Maia S, *et al*. Regulation of phosphatidylserine exposure in red blood cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2011, 28(5): 847-856.

[10] Lang E, Qadri S M, Lang F. Killing me softly - suicidal erythrocyte death[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(8): 1236-1243.

[11] Akiyama Y, Kikuchi K, Saigusa D, *et al*. Indoxyl Sulfate down-regulates SLCO4C1 transporter through up-regulation of GATA3[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e66518.

[12] Duranton F, Cohen G, De-Smet R, *et al*. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins[J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23 (7): 1258-1270.

[13] Vanholder R, Schepers E, Pletinck A, *et al*. An update on protein-bound uremic retention solutes[J]. J Ren Nutr, 2012, 22(1): 90-94.

[14] Basile C, Libutti P, Di-Turo A L, *et al*. Removal of uraemic retention solutes in standard bicarbonate haemodialysis and long-hour slow-flow bicarbonate haemodialysis[J]. Nephrol Dial Transplant, 2011, 26(4): 1296-1303.

[15] Abed M, Herrmann T, Alzoubi K, *et al*. Tannic acid induced suicidal erythrocyte death[J]. Cell Physiol Biochem,2013, 32(4): 1106-1116.

[16] 王瑜, 刘兴顺. 红细胞衰老及程序性死亡机制[J]. 中国实验血液学杂志, 2014, 22(4): 1124-1128.

[17] Voelkl J, Alzoubi K, Mamar A K, *et al*. Stimulation of suicidal erythrocyte death by increased extracellular phosphate concentrations [J]. Kidney Blood Press Res, 2013, 38(1): 42-51.

[18] Ahmed M S, Langer H, Abed M, *et al*. The uremic toxin acrolein promotes suicidal erythrocyte death[J]. Kidney Blood Press Res, 2013, 37(2/3): 158-167.

(**收稿**:2014-07-22;**修回**:2014-09-02)

(编辑 龙 亮)