维普资讯 http://www.cqvip.com

重庆医科大学学报 1993年第18卷第4期

肾功能损害病人尿对大鼠脑、肾 K^+-pNPPase活力影响的探讨

临床生物化学教研室 王继红
生物化学教研室 欧阳恒静

提 要 K^+-pNPPase（钾激活对硝基苯磷酸酶）为钠泵的一部分。肾功能损害病人尿及正常人尿经SephadexG-25脱盐后，加入K^+-pNPPase活力测定体系，发现两组尿对酶活力有明显抑制作用，且病人尿的抑制作用明显低于正常人组

关键词 K^+-pNPPase；肾功能损害；尿毒症
中图分类号 Q55

临床上早已注意到尿毒症病人的症状轻重未必和血清中积累的尿素、肌酐、尿酸等小分子物质成比例[1]。1972年Babb[2]等提出"中分子假说"，认为血液中某些中分子量物质的积聚可能和晚期尿毒症的多种并发症有关。把中分子物质作为尿毒症的毒性物质已引起人们关注，学者们认为它是今后可望获得成果的一个领域[3]。Na^+、K^+—ATP酶的抑制和中枢神经系统的离子运送障碍是中分子的神经毒性作用的可能机制之一；而K^+-pNPPase（钾激活对硝基苯磷酸酶）能代表Na^+、K^+-ATP酶系统的部份活性也早已被普遍承认[4-8]。本文在以K^+-pNPPase为手段观察多种类型肝炎病人尿对鼠脑、肾组织该酶活力影响工作[9]的基础上，用同样方法观察肾功能损害病人尿对大鼠脑、肾K^+-pNPPase活力的影响，以探讨其作为肾功能检查新方法的可能。

材料和方法

1. 对象

（1） 肾功能损害组（加病人尿组）13例；随机抽取附一院住院病人，年龄19—66岁，平均年龄36.7岁，其中男11例，女2例。尿毒症2例，慢性肾炎8例，高血压心脏病伴肾衰、紫癜性肾炎、流行性出血热各1例，所有病人均有不同程度的肾功能损害，血尿素氮，肌酐都异常增高。

（2） 正常人组（加正常人尿组）9例，随机抽取无心、肝、肾及其它疾病的正常人，年龄11—48岁，平均32.7岁，其中男7例，女2例。9人尿常规，血尿素氮，肌酐检查均正常。

2. 方法

（1） K^+-pNPPase的制备

取体重250—300g雄性S·D大鼠，迅速断头处死，头部立即置液氮中速冻10min后剥离全脑，低温下快速剥离肾。脑、肾组织分别打成匀浆，按K·Ahmed[10]方法制备Na^+、K^+-ATPase。脑组织酶制剂取自脂蛋白部份，肾取自R_2部分。酶制剂小瓶分装，置−80℃保存。酶制剂经用Ouabain抑制试验等手段检测证明符合实验要求。

（2） 尿样处理

分别收集病人及正常人晨尿，取10ml加入Sephadex-G25柱（20×160mm）。用0.002M Tris-HCl pH7.4缓冲液洗脱。收集蓝葡聚糖2000（M.W200万）以后，溴酚红（M.W510）红色以前洗脱液，尿稀释度相当于1:75。当日测定加洗脱液后酶活力。

（3） K^+-pNPPase活力测定

参照Liu[4]方法略加修改。介质I含5mMMg-

维普资讯 http://www.cqvip.com

Cl_2, 20mM Tris-HCL（pH7.4），测得的酶活力代表Mg^{2+}—pNPPase活力。介质Ⅱ除含介质Ⅰ成份外，还加有10mmKCL，所测得的酶活力减去介质Ⅰ体系酶活力即为K^+-pNPPase活力，酶活力测定总体积2ml，酶用量约100—200ug蛋白质，尿洗脱液用量相当于原尿液0.1ml，反应以加入5mM PNPP（对硝基苯磷酸）开始，置37℃保温6min，立即加入50%三氯醋酸以终止反应。离心，取上清液1ml，加0.5MTris2ml显色，410nm比色。酶活力用uMPNP·mg蛋白$^{-1}$·小时$^{-1}$表示。全部实验皆做重复测定，每一样本均同时做样品空白。同批标准液12次测得E410值C·V<5%。酶时间进程曲线显示在2—12min内，酶活力与保温时间呈良好线性关系。

（4） 蛋白质测定

按专用于膜及膜蛋白测定改良Lowry氏法[11]测定，标准为牛血清白蛋白。

3. 材料

所用试剂除pNPP为E·merk产品外，其余皆为国产分析纯试剂。比色用岛津UV—120分光光度计。

结　果

一、鼠脑、肾K^+-pNPPase活力测定

分别测定鼠脑、肾组织酶制剂在未加尿，以及加病人尿，正常人尿层析液后酶活力，结果见表1。

表1　尿对K^+－pNPP酶活力的影响

分组	酶活力($\bar{X}\pm S$)		P值	
	脑	肾	脑	肾
未加尿组 ($n=5$)	13.33±1.9	5.00±1.0		
加病人尿组 ($n=13$)	7.15±2.5	2.91±1.9	<0.001	<0.05
加正常人尿组 ($n=9$)	4.72±2.4	1.77±1.5	<0.001	<0.001

注：酶活力用uMPNP·mg蛋白$^{-1}$·h^{-1}

结果显示，无论鼠脑或肾组织的酶活力未加尿组明显高于加尿两组，而加尿两组中，正常人组酶活力都低于病人组；各组脑酶活力都高于肾组织酶活力。提示尿层析液能降低K^+-pNPPase活力，而正常人尿对酶活力的影响程度大于病人尿的作用。

将加尿两组酶活力分别与未加尿组进行脑与脑、肾与肾的比较，t检验结果见表1，表现为正常人组与未加尿组脑酶活力差异p值小于0.001，肾P值小于0.001，病人组与未加尿组脑酶活力差异P值小于0.001，肾酶P值小于0.05，即各组间酶活力降低均有统计学显著性差异。

病人组与正常人组脑酶活力比较，$P<0.025$，差别有显著性。两组肾酶活力比较，差别无显著性。

二、酶活力抑制百分率的计算

每一样品测得值按I%＝（1－Vi/V_0）×100%计算酶活力抑制百分率。（公式中Vi＝加尿组酶活力，V_0＝未加尿组酶活力）以表示尿对酶活力的抑制程度，结果见表2。

表2　尿对K^+－pNPP酶活力的抑制率(I%)

	脑($\bar{X}\pm S$)	肾($\bar{X}\pm S$)
加正常人尿组 ($n=9$)	65.41±14.49	65.76±23.25
加病人尿组 ($n=12$)	49.73±13.45	55.09±14.00

表2显示，正常人尿对脑、肾组织酶活力的抑制程度均大于病人尿的抑制作用。统计分析两组间I%差异，脑酶$P<0.005$，肾

维普资讯 http://www.cqvip.com

$P<0.05$，均有统计学显著性。

方差分析正常人、病人、未加尿三组脑与肾酶活力差异，正常人组 $P<0.0068$，病人组和未加尿组P值均$<0.000^{1}$，即三组都有统计学非常显著性差异，说明脑、肾酶制剂有差别。

讨　论

尿毒症病人血清中有毒性中分子量物质（分子量500—5000）积聚，而且中分子的浓度与尿毒症中毒症状的严重性有直接关系等已得到普遍承认[1-3,12-13]。自"中分子假说"提出后，学者们在中分子性质以及用血液透析、血液滤过，尤其是腹膜透析法清除血中分子物质方面做了大量工作。通过测定含中分子物质尿层析液对K^+-pNPPase活力的影响，间接了解中分子物质的排泄情况，较直接测定血中中分子物质含量的方法简便，尿标本较血标本容易获得。进一步改进实验条件，简化酶制剂提取方法，本法可望用于临床。

Na^+、K^+-ATPase是细胞质膜主动转运Na^+、K^+的酶复合物，其作用机理一般概括如图1[14]。K^+-pNPPase代表反应的

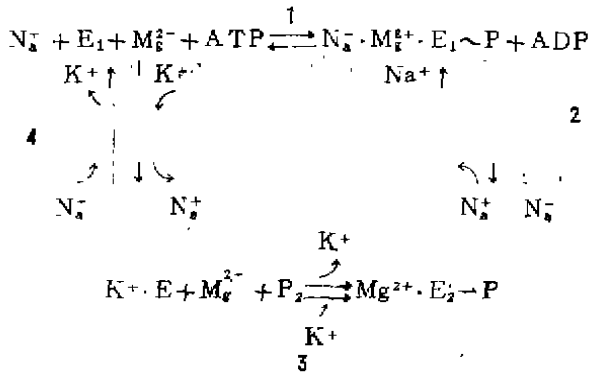


图1　Na^+K^+-ATPase作用机理

第3步，即形成的E_2-P在K^+激活下，将磷酸水解。pNPP（对硝基苯磷酸）为酶的少数几种人工合成底料之一[15]。纯化的Na^+K^+-ATPase酶制剂具有K^+-pNPPase活性，两酶不仅在各组织中平行分布，且纯化过程中比活性等比提高[16]。测定K^+-$pNPP_{ase}$活性较测Na^+、K^+-ATP_{ase}活性的试剂便宜，底物稳定，操作简便。因此不少学者用K^+-$pNPP_{ase}$作为研究钠泵的特异而灵敏的探针[4]。本实验首次把K^+-$pNPP_{ase}$活力测定用于肾功能损害病人的检测。通过酶活性的抑制程度了解病情应比测定尿素氮、肌酐等化学法灵敏，特异性高。

正常人与病人尿对K^+-$pNPP_{ase}$均有抑制作用，且病人尿的抑制率低于正常人（脑$P<0.005$，肾$P<0.05$），提示两组尿液中都存在着能使K^+-$pNPP_{ase}$活性降低的中分子量的物质，支持了①中分子物质可能是正常代谢废物[1]；②中分子物质与Na^+K^+-ATP_{ase}受抑制有关的假设。病人尿对K^+-$pNPP_{ase}$的抑制作用小于正常人尿的抑制作用，可能是由于肾功能损害，肾脏处理排泄中分子毒性物质的能力降低，而尿中排泄出的中分子毒性物质减少，血中毒性物质积聚所致，需进一步探讨。

肾功能损害严重的病人，酶抑制百分率均在50%以下，而正常人和肾功能损害轻的病人酶抑制百分率均大于50%，即抑制程度与病情呈负相关。通过进一步证实后，本法可望用于临床判断肾功能损害程度。

脑、肾组织来源的酶存在非常显著性差异（方差分析P均小于0.01），是由于两组

维普资讯 http://www.cqvip.com

酶来源差差异造成（脑酶取自膜蛋白部分，而肾酶则取自R_2部分，前者纯度高于后者，因为ATP_{ase}主要存在于膜蛋白部分），还是酶本身具有组织特异性需再研究。实验中脑酶活性较肾酶高，且稳定、重复性好，故实验宜以脑脂蛋白部分作为酶制剂。

参 考 文 献

[1] 蔡祝辉，等．上海第一医学院学报 1982；9(6)：407

[2] Babb AL，et al. Trams Am Soc Artif Interm Organs 1972；18：98

[3] 王三南．国外医学 临床生物化学与检验学分册1986；31，24

[4] Liu MS，et al. Biochem Med 1981；25：315

[5] K. Nagal，et al. J. Biochem 1966；59：295

[6] T. Onji，et al. Biochem. Biophs. Res. Comm. 1980；96：799

[7] H. Yoshida，et al. Biochim Biophs Acta 1969；171：178

[8] J. D. Robinson，Biochemistry 1969，8：3348

[9] 欧阳恒静，等．重庆医科大学学报 1989；14：100

[10] Ahmed K. et al. Biochim Biophs Acta 1964；93：606

[11] Markwell MAK，et al. And Biochem 1978；87：206

[12] 毕增琪，等．国外医学内科学分册 1985；12：455

[13] Ad C Schoots，et al. Chin chem 1982；28：45

[14] William J B Jr. Biochemistry 1986；25：7155

[15] Dahl JL，et al. Annu Rev Biochem 1974；43：327

[16] Kazuonagai，et al. J. Biochem 1965；59：295

（收稿日期 1993—06—11）

EFFECTS OF K^+-pNPPase ACTIVITY IN RAT BRAIN AND KIDNEY BY THE URINE FROM PATIENTS WITH RENAL FUNCTION INJURY

Wang Jihong, et al

Dept. of Clinical Biochemistry

We find that K^+-PNPPase from brain of rats is inhibited by the urine of patients with renal function injury, and of the normal people, desalted through a sephadex G-25 column.

The percentage of inhibition showed as I%[I% = (1—vi/vo)×100%] was 49.73±18.45 (n=13) from patients. The control was 65.41±14.49 (n=9).

It showed that the inhibition of patients urine was less marked than that of the normal people, $P<0.025$

KEY WORDS K^+-PNPPase; renal function injury; Uremia