DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.026
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
176 2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)02-0176-03

急性肾功能衰竭中肾小管上皮细胞脱落及DNA损伤的意义

梁培禾,靳凤烁,岳 明,江 军,李彦峰 (第三军医大学附属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脱落及DNA损伤在急性肾功能衰竭(Acute renal failure, ARF)中的意义。方法 分别以5、10 ml/kg 50%甘油注射于Wistar大鼠后肢肌肉,造成不同程度的ARF,1、3、6、12、24、48、96 h测定血BUN、Cr;膀胱穿刺取尿液台盼蓝拒染法计数脱落细胞,单细胞凝胶电泳测定DNA损伤。结果 尿中脱落肾小管上皮活细胞计数及DNA损伤变化明显早于BUN、Cr,与肾功能相关;二者变化趋势相似,有一定相关性。结论 细胞脱落、DNA损伤是ARF肾小管上皮细胞损伤"多米诺骨牌"中的重要环节,其变化与损伤程度相关,有助于早期发现ARF的发生并判断其程度。

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;R692.502 文献标识码:A

Exfoliation and DNA damage of renal tubular epithelial cells in acute renal failure in rats

LIANG Pei-he, JIN Feng-shuo, YUE Ming, JIANG Jun, LI Yan-feng (Department of Urology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the role of tubular cell exfoliation and DNA damage in the development of aute renal failure (ARF), especially at the early stage. Methods ARF was induced by glycerol injection intramuscularly at different dosages in Wistar rats. Their blood and urine specimens were obtained 1、3、6、12、24、48、96 h after injection. Then Cr and BUN in serum were detected. Urinary exfoliated tubular cell counting and DNA damage were studied by trypan blue dye exclusion and single cell gel electrophoresis assay (SCGE) respectively. Results After glycerol injection, the significant changes of exfoliated tubular cell count and DNA damage presented earlier than Cr and BUN in serum. Their tendencies were similar and showed positive relationship with the degree of renal function damage. Conclusions The results suggest that cell exfoliation and DNA damage are important mechanisms of tubular cell injury in ARF. They can be used not only to find ARF at the early stage but also to evaluate the degree of ARF.

Key words: renal failure, acute; 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,病死率超过50%[1],发病初期采取有效措施是救治的关键,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。我们曾报道[2] ARF早期尿脱落肾小管上皮活细胞计数有一定预警诊断价值,本实验在此基础上进一步观察了细胞脱落与肾功能损害的相关性及脱落细胞DNA损伤情况。

1 材料与方法

1.1 动物模型

Wistar大鼠126只,体重(200±20) g,随机分为大、小剂量及对照组各42只。2%戊巴比妥钠1.5 ml/kg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;对照组以生盐水10 ml/kg代替;此后于1、3、6、12、24、48、96 h取血标本测定BUN、Cr,膀胱穿刺抽取尿液进行以下实验。

1.2 尿脱落肾小管上皮细胞计数

采用台盼蓝拒染法,方法见文献[2]。

1.3 脱落肾小管上皮细胞DNA损伤测定

尿液离心1 500 r/min, 5 min,弃上清,加0.1 mol/L PBS制成浓度为(2.5~3.0)×10^5/ml细胞悬液。采用单细胞凝胶电泳(SCGE)技术测定DNA损伤[3]。

结果测定:Olympus BX-60荧光显微镜下随机选取5个×400视野,每视野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,并据尾长及目测DNA迁移量(与尾长、尾部荧光强度等成正比)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。

1.4 统计学分析

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,用Excel软件进行t检验,计数资料用χ^2检验。

2 结果

2.1 肾功能变化

动物注射甘油约1 h后排出酱油样尿,大剂量组尿色深于小剂量组,15 h后转清。同对照组相比,大、小剂量组BUN、Cr均有显著升高,其中Cr变化较早,两实验组均在6 h显著升高;两实验组间亦呈现出明显差异,表明肾功能受损程度不同。

2.2 尿脱落细胞计数

甘油注射后尿中出现大量肾小管脱落细胞,大多仍保持活性,两实验组计数1 h即有明显变化,二者间也存在一定差异,见表1。

基金项目:全军"九五"医药卫生重点课题资助项目(96L053)
作者简介:梁培禾(1972-),男,山西平遥县人,硕士,主治医师,主要从事急性肾衰方面的研究。电话:(023)68715137
收稿日期:2001-02-26;修回日期:2001-10-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　甘油注射后三组大鼠尿肾小管上皮细胞计数($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of the count of tubular cells in urine after glycerol injection($\bar{x}\pm s$)

Group	Cell count($\times 10^6$)	Time after glycerol injection(h)						
		1($n=6$)	3($n=6$)	6($n=6$)	12($n=6$)	24($n=6$)	48($n=6$)	96($n=6$)
Large dosage	Total cells(T)	0.66±0.10$^{\Delta\Delta}$	6.16±0.97$^{\Delta\Delta}$	24.86±5.45$^{**\Delta\Delta}$	11.30±2.59$^{*\Delta\Delta}$	7.02±2.27$^{**\Delta\Delta}$	2.02±0.55$^{**\Delta\Delta}$	0.60±0.30$^{*\Delta}$
	Vital cells(V)	0.40±0.08$^{\Delta\Delta}$	3.16±0.67$^{\Delta\Delta}$	12.48±2.31$^{*\Delta\Delta}$	6.03±1.74$^{\Delta\Delta}$	3.80±1.36$^{*\Delta\Delta}$	1.29±0.33$^{**\Delta\Delta}$	0.37±0.17$^{*\Delta\Delta}$
	%	60.15	51.39	50.21	53.35	54.09	63.86	61.67
Small dosage	Vital cells(T)	0.58±0.17$^{\Delta}$	5.22±1.42$^{\Delta\Delta}$	15.98±2.38$^{\Delta\Delta}$	7.68±2.29$^{\Delta\Delta}$	3.68±0.80$^{\Delta\Delta}$	0.74±0.10$^{\Delta\Delta}$	0.23±0.10
	Vital cells(V)	0.35±0.11$^{\Delta\Delta}$	3.37±1.09$^{\Delta\Delta}$	9.17±1.63$^{\Delta\Delta}$	4.16±1.31$^{\Delta\Delta}$	2.15±0.41$^{\Delta\Delta}$	0.52±0.08$^{\Delta\Delta}$	0.17±0.07$^{\Delta\Delta}$
	%	61.51	64.60	57.35	54.19	58.37	70.07	74.29
Control	Total cells(T)	0.15±0.10	0.16±0.07	0.14±0.18	0.14±0.16	0.12±0.07	0.13±0.14	0.14±0.13
	Vital cells(V)	0.005±0.01	0	0	0	0	0.0025±0.005	0
		3.39	0	0	0	0	1.96	0

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* small dosage group; $^{\Delta}$: $P<0.05$, $^{\Delta\Delta}$: $P<0.01$ *vs* control

2.3　脱落细胞 DNA 损伤测定

对照动物尿中脱落细胞极少, 小剂量组 1 h、大剂量组 48 h 及两组 96 h 点则未能收集到足够的尿液标本, 故均未进行实验。结果显示: 脱落细胞 DNA 损伤变化趋势与其计数相似, 亦与甘油注射呈明显剂量和时间依赖性见图 1, 2、表 2～4。

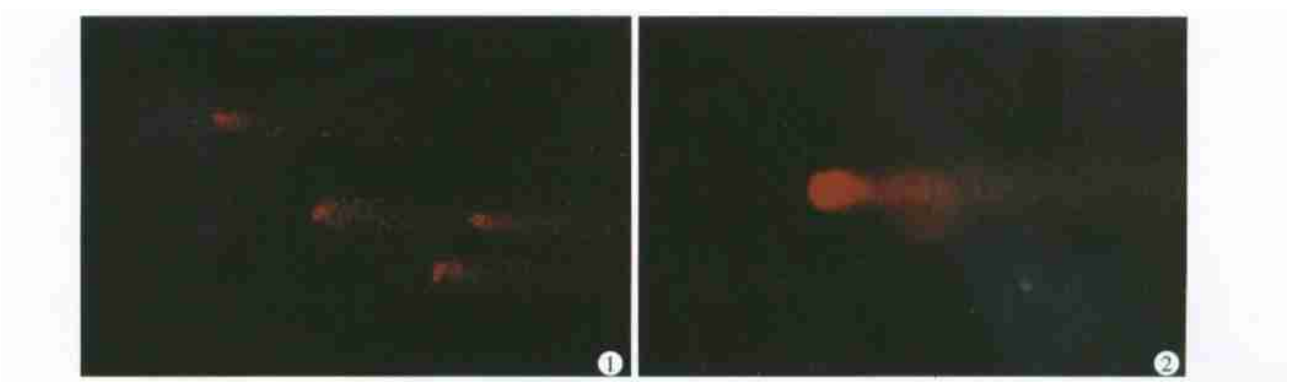


图 1　大剂量组甘油注射后 **6 h** 尿脱落细胞 **DNA** 损伤严重, 大量迁移至细胞外, 甚至可见"彗星"头部碎裂　(EB×200)

Fig 1　In Large dosage group, DNA damage of exfoliative renal tubular cells at 6 h after glycerol injection was serious. A great quantity of DNA migrated to the outside of the cells and the broken head of comets can be seen　(EB×200)

图 2　小剂量组甘油注射后 **6 h** 尿脱落细胞 **DNA** 损伤较重, 但大量"彗星"头部形状仍保持完整　(EB×200)

Fig 2　In small dosage group, DNA damage of exfoliative renal tubular cells was serious but most of the comets had intact heads　(EB×200)

表 2　甘油注射后尿脱落细胞 **DNA** 损伤分级计数($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Cell count according to the grade of DNA damage($\bar{x}\pm s$)

	n	Degree of damage				
		No damage	Gently damage	Middling damage	Heavy damage	Completely damage
Large dosage						
1 h	3	6.0±1.73	8.7±2.09	11.3±2.08	17.3±2.08	6.7±1.53
3 h*	4	1.5±0.58	3.5±1.29	7.25±1.26	25±3.16	12.75±1.26
6 h**	4	0	0.25±0.5	1±0.82	26±1.41	22.75±1.71
12 h**	3	0.3±0.58	2±1.73	5.3±1.15	24.7±2.08	17.7±2.08
24 h**	3	1.7±0.58	3.7±1.16	9.7±1.53	22.7±0.58	12.3±2.08
Small dosage						
3 h	4	10±1.83	5.8±1.71	8.5±0.58	19.5±1.91	6.3±0.5
6 h	3	5.3±1.53	1.7±0.58	10.7±1.53	17.3±1.15	15±1
12 h	3	9.3±1.53	5.3±1.53	12±1	17.3±2.52	6±1
24 h	4	12±2.45	9.8±0.96	11.8±1.5	13.5±1.73	3±0.82
48 h	3	16.7±2.08	17.7±2.08	6.7±1.53	7.3±0.58	0.7±0.58

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* small dosage group

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 3 甘油注射后尿脱落细胞 DNA 损伤率(%)

Tab 3 The rate of cells of DNA damage (The rate of comet cells)(%)

Group	Time after glycerol injection(h)					
	1	3	6	12	24	48
Large dosage	88.0	97.0	100.0	99.4	96.6	
Small dosage		80.0	89.4	81.4	76.0	66.6

表 4 甘油注射后尿脱落细胞 DNA 损伤慧星平均尾长(μm, $\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Changes of DNA migration (Average comet tail length)(μm, $\bar{x}\pm s$)

Group	Time after glycerol injection(h)					
	1	3	6	12	24	48
Large dosage	66.51±9.70	91.71±10.66*	117.94±16.64	104.05±14.22*	88.47±16.82*	
Small dosage		66.95±9.47	89.34±13.53	64.76±7.08	51.46±9.79	37.67±7.56

*: $P<0.05$ *vs* small dosage group

3 讨论

ARF 救治的关键在于早期肾小管上皮细胞发生功能性损害时能及时采取有效措施,避免发展为器质性肾衰。关于 ARF 预警诊断曾有学者对尿液中 NAG 酶、β 微球蛋白及影像学检查进行研究,但变异较大;近期还有报道血肌酸激酶含量对挤压综合征诊断具有较高价值[4],但其只能相对可靠地表明有肌肉损毁,与 ARF 无必然联系。我们曾在前期实验中发现,ARF 早期尿中脱落肾小管上皮活细胞计数变化早于经典指标 BUN、Cr,是良好的预警诊断指标[2]。本实验进一步发现脱落细胞计数随肾功能受损程度的不同而出现显著差异,不仅有助于及时发现 ARF 的发生,而且对程度判断也有一定意义,具有较大的优越性。

肾小管上皮细胞的脱落同坏死、凋亡等其它损伤形式一样,可导致肾小管基底膜裸露、转运功能丧失、梗阻及小管液回漏等发生,最终表现为肾功能的受损。由于机体的代偿作用,BUN、Cr 变化相对滞后,而细胞脱落则可直接反映小管损伤情况,这也是其作为预警诊断指标的理论依据。

甘油模型主要用于模拟创伤性 ARF 或挤压综合征,其机制是[4~6]:①纹肌溶解释出肌红蛋白从肾小球滤过,与肾小管上皮细胞刷状缘特异性结合位点结合,进入细胞产生毒性作用,铁释放和自由基形成发挥着中心作用;②血红素清除一氧化氮及激活肾素-血管紧张素系统、儿茶酚胺等导致缺血效应;③肌红蛋白及脱落细胞形成管型导致肾小管梗阻。上述因素,尤其是自由基对 DNA 损伤作用较大;同时,我们还在以往实验中发现 ARF 早期肾小管上皮细胞存在"能量供应短缺,膜 Na^+-K^+-ATP 酶活性下降-粘附分子异常、骨架结构紊乱-脱落"的"链式反应",这些都与 DNA 正常结构和功能的维持存在着密切关系。基于此点,我们利用 SCGE 技术对 ARF 时脱落肾小管上皮细胞 DNA 损伤进行了研究。

SCGE 又称彗星试验(Comet assay),可在单细胞水平上检测 DNA 损伤,分中性和碱性法两种,本实验采用了灵敏度极高的碱性法[3]。

实验发现脱落的小管上皮细胞 DNA 损伤严重,彗星细胞比例、分级计数及尾长等指标均呈明显剂量和时间依赖性,说明 DNA 损伤确实参与了细胞的损伤,并能直接反映损伤程度。

自由基在 ARF 甘油模型中具有重要意义,它可直接攻击细胞 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,这可能是 DNA 严重损伤的主要原因。

肾小管上皮细胞脱落变化趋势与 DNA 损伤接近,表现出显著的相关性。可见,二者诱发因素有一定交叉作用,在细胞损伤中发挥重要作用。此外,我们曾报道[7]凋亡是肾小管上皮细胞丢失的另一重要途径,而细胞脱落与 DNA 损伤都是凋亡的重要诱因,同时 DNA 断裂也是凋亡的生化变化过程之一。可见,ARF 的发生类似于串联、并联排列的多米诺骨牌,细胞脱落、DNA 损伤等既是损伤的表现亦是进一步损伤发生的原因。

但是我们在实验中也发现,细胞脱落变化与 DNA 损伤并不完色一致,DNA 损伤两实验组间差异不及脱落细胞明显,其中损伤率差异无显著性,推测可能有以下因素:①二者启动因素既相互交叉又不尽相同;②损伤触发后的发展过程中,除直接的 DNA 损伤外还有部分损伤发生在细胞脱落的下游;③我们采用的是碱性 SCGE,显示的是综合作用造成的 DNA 损伤。

ARF 的治疗原则是尽早阻断导致其发生的病理生理过程(Patho-physiologic cascade)[4],本实验提示,肾小管上皮细胞损伤的多米诺效应在早期阻断将有益于防止 ARF 的发生,若发展至后期,由于多条损伤途径的触发,无疑会增加救治的困难。这也正是肾小管上皮细胞脱落作为预警诊断指标的价值所在。

参考文献:

[1] Jander A, Kaluzynska A, Czupryniak A, *et al*. A role of hemodialysis in the treatment of acute renal failure in children less than 5 years of age[J]. Pol Merkuriusz Lek, 2000, 8(46): 278-279.

[2] 岳 明, 靳风烁, 方玉华, 等. 尿中肾小管上皮活细胞计数对创伤性急性肾功能衰竭的预警诊断作用[J]. 中华创伤杂志, 1999, 15(1): 21-23.

[3] 梁培禾, 靳风烁, 贾思远, 等. 单细胞凝胶电泳技术操作[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(1): 116-117.

[4] Vanholder R, Sever M S, Erek E, *et al*. Acute renal failure related to the crush syndrome: towards an era of seismo-nephrology[J]. Nephrol Dial Transplant, 2000, 15: 1 517-1 521.

[5] Gburek J, Osada J. Hemoglobin binding sites on renal brush-border membranes[J]. Biochimie, 2000, 82(12): 1 135-1 142.

[6] Visweswaran P, Guntupalli J. Rhabdomyolysis[J]. Crit Care Clin, 1999, 15(2): 415-428.

[7] 靳风烁, 梁培禾, 岳 明, 等. 急性肾功能衰竭时肾小管上皮细胞凋亡及其意义[J]. 中华创伤杂志, 2000, 16(9): 529-531.

(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net