DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.01.021

减压缺氧时大鼠红细胞变形性改变及其机制研究*

梁晚益** 罗德成 张国斌 高钰琪 (第三军医大学基础医学部病理生理学教研室) 重庆, 400038

提 要 目的:探讨减压缺氧时大鼠红细胞变形性的改变及其机制。方法:测定平原和减压缺氧条件下大鼠红细胞滤过指数(IF)、红细胞膜 ATPase活性、红细胞 ATP含量。结果:各缺氧组细胞 IF均较平原组升高,缺氧 14 d组虽有所下降,但仍高于对照组,缺氧 21 d组与 30 d组无明显差异;缺氧 1 d~7 d组 ATP含量下降,且与同期红细胞 IF呈显著负相关,缺氧各组红细胞 Na^+-K^+-ATPase、Ca^{2+}-ATPase活性均有不同程度明显下降,Mg^{2+}-ATPase活性仅缺氧 30 d组下降明显。结论:① 缺氧可致红细胞变形性损害,但其发生并非进行性,大约于缺氧后 3~4周达到一个较为稳定的水平;② 缺氧早期红细胞 ATP含量下降,整个缺氧过程中红细胞膜 ATPase活性降低在大鼠红细胞变形性损害中起重要作用。

关键词 红细胞变形性; ATPase活性;三磷酸腺苷;缺氧
中图法分类号 R594.3

近年来,缺氧血液动力学、流变学尤其是缺氧对红细胞的损伤以及红细胞增多和损伤后对心、肺的影响引起了许多学者的高度重视。缺氧一方面通过促进红细胞生成素的合成和释放,使体内红细胞大量增多,血球压积升高;另一方面缺氧对红细胞代谢、形态和功能亦有一定影响[1]。文献报道人和某些动物在缺氧时红细胞变形能力减弱,其在血粘度升高,微循环障碍中起一定作用[2]。本实验旨在研究缺氧大鼠红细胞变形性损伤规律及其机制,为改善机体在缺氧条件下血液流变特性,减轻心肺脑等器官的损害提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组及缺氧动物模型建立

选用 Wistar大鼠 72只(本校动物所提供),雌雄各半,体重 180~260 g,随机分为平原组(SL)、缺氧 1 d组(H_1)、缺氧 7 d组(H_7)、缺氧 14 d组(H_{14},每组 $n=12$),缺氧 21 d组(H_{21},$n=11$),缺氧 30 d组(H_{30},$n=13$),将缺氧组大鼠置低压舱内间断减压缺氧(模拟高原 5000 m,每天 8 h)。

1.2 血标本采集及指标测定

用 10%乌拉坦腹腔麻醉大鼠后取血,标本分装于下列各管:① 1.5 ml全血 ACD抗凝测定红细胞滤过指数;② 1 ml全血 ACD抗凝测红细胞 ATP含量;③ 2 ml全血 EDTA-Na_2(2mg/ml)抗凝测膜 ATPase活性。

1.2.1 红细胞滤过指数(Filtration Idex, IF) 称取分析纯 Tris 1.2114 g加生理盐水 100 ml,调 pH 7.4,真空抽滤,配成缓冲液,将抗凝血标本轻轻摇匀,加静脉用生理盐水后 1000~1500 r/min离心 5 min,反复洗涤 3次,每次仔细吸去白细胞,最后得压积红细胞,用上述缓冲液按 1∶9比例配红细胞悬液,用红细胞变形仪(中医研究院西苑医院)测红细胞 IF。IF值越大,红细胞变形性越差。

1.2.2 红细胞 ATP含量测定 用 ATP测定试剂盒(上海植物生理研究所提供)于 SHR-型化学发光仪上测红 ATP含量。

1.2.3 ATPase活性测定 按董伟[3]的方法制膜,刘斯奇法测 ATPase活性[4],改良 Lowry法测膜蛋白。酶活性以单位时间内单位蛋白分解 ATP而产生的磷的多少表示(μmol Pi/mg pr·h^{-1})。

1.3 统计学处理

采用我校数理统计教研究提供的 SPMR医用统计程序包进行单因素方差分析,结果以 $\bar{x}\pm s$表示,部分指标作相关分析。

2 结果

2.1 红细胞 IF及红细胞 ATP含量改变

红细胞 IF于缺氧 1 d组即显著高于平原组($P<0.05$),缺氧 7 d组较 1 d组进一步升高并达到峰值($P<0.01$),14 d组虽较 7 d组明显降低,但仍显著高于平原组,且随缺氧时间延长再度升高,缺氧 21 d组与 30 d组 IF无明显差异。缺氧 1 d~7 d组 ATP含量较平原对照组显著下降($P<0.001$),且与同期 IF呈显著负相关,相关系数 r分别为 -0.6358($P<0.01$)、-0.7044($P<0.001$),以后各组 ATP含量恢复接近平原对照组,见表 1。

表 1 红细胞滤过指数(IF)及红细胞内 ATP(μmol/gHb)变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of IF and erythrocyte ATP contents (μmol/gHb) ($\bar{x}\pm s$)

	SL	H_1	H_7	H_{14}	H_{21}	H_{30}
IF	0.136±0.032	0.172±0.043△	0.252±0.061**○	0.169±0.043●	0.229±0.054**□	0.234±0.060**
ATP	5.64±1.65	2.71±0.99***	2.13±0.58***	5.37±1.04	5.47±1.99	5.54±1.22

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$ vs SL; ○: $P<0.01$ vs H_1; ●: $P<0.01$ vs H_7; □: $P<0.01$ vs H_{14}

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39170352
** 梁晚益,男,30岁,讲师,博士研究生

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

2.2 红细胞膜 ATPase活性变化

缺氧各组红细胞 Na^+ -K^+ -ATPase、Ca^{2+} -ATPase较平原组均有不同程度明显降低,尤以30 d组最为显著,Mg^{2+} -ATPase仅缺氧30 d组下降明显,见表2

表2 红细胞膜 ATPase活性(μmol Pi/mg pr/h)变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Changes of erythrocyte ATPase activities (μmol Pi/mgpr/g) ($\bar{x}\pm s$)

	SL	H_1	H_7	H_{14}	H_{21}	H_{30}
Na^+ -K^+ -ATPase	0.507± 0.113	0.392± 0.095*	0.379± 0.077**	0.405± 0.053**	0.390± 0.092*	0.261± 0.121***
Ca^{2+} -ATPase	1.10± 0.224	0.889± 0.128**	0.858± 0.160**	0.948± 0.119*	0.804± 0.105***	0.797± 0.076***
Mg^{2+} -ATPase	0.42± 0.106	0.420± 0.119	0.379± 0.096	0.373± 0.108	0.494± 0.100	0.330± 0.102*

*: $P<0.05$,**: $P<0.01$,***: $P<0.001$ *vs* SL group

3 讨论

红细胞变形性是指红细胞在应力作用下改变其形态的能力,本实验用核孔滤膜滤过法测定缺氧大鼠红细胞变形性,结果表明:大鼠缺氧1 d后红细胞变形性明显下降,7 d后更进一步下降;缺氧14 d时虽有所改善,但仍明显低于平原组,缺氧21 d时红细胞变形性再度下降,但缺氧30 d组与21 d组无明显差异,提示红细胞变形性损伤在缺氧3~4周后达到一个较为稳定的水平。红细胞变形性的损伤,可显著地影响全血粘度,导致微循环障碍,在缺氧性肺动脉高压和右心肥大发生中可能起一定作用[1]。

ATP是红细胞的唯一供能方式,本实验结果:缺氧1 d 7 d时大鼠红细胞 ATP水平显著下降,且与同期红细胞 IF呈明显负相关。ATP的下降使得红细胞膜 ATPase能量供给不足,红细胞离子转运失衡,难以维持其正常双凹圆盘状,是引起缺氧早期变形性损害的主要原因[2]。有学者认为红细胞膜上存在一种 Ca^{2+} -ATP依赖的肌球蛋白样物质,它在细胞收缩变形中起重要作用,ATP的下降可使这种肌球蛋白样物质的收缩发生障碍,从而引起红细胞变形困难[5]。红细胞 ATP减少还可致红细胞抵抗自由基损害的能力下降,红细胞膜脂质损伤[6],导致红细胞变形能力降低。缺氧2周以后,红细胞 ATP含量恢复至接近平原对照组水平,作者认为这可能是一种细胞水平的适应,具体机制尚有待于进一步的研究。

整个缺氧过程中 Na^+ -K^+ -ATPase与 Ca^{2+} -ATPase均有显著下降,尤以缺氧后期(缺氧30 d) K/Na比值降低,Mg^{2+} -ATPase活性降低还可使红细胞膜磷脂分布异常,细胞膜及膜骨架的稳定性降低,最终致红细胞变形能力降低[7]。总之,缺氧在促进红细胞生成增多的同时,也导致了红细胞本身的损害。缺氧早期红细胞 ATP含量下降、整个缺氧过程中红细胞膜 ATPase活性降低在其变形性损害中起重要作用。

参考文献

1 Kaniewske V S, Hankim T S, Freedman J C. Cellular deformability of normoxic and hypoxic mammalian red blood cells. Biorheology, 1994; 31(1): 91

2 Miseta A, Peter B, Ervin B. Relationship between cellular ATP, postassium, sodium and magnesium cocentrations in mummalian and vian erythrocyte. BBA, 1993; 1175: 133

3 董 伟.长寿老人红细胞膜 ATP酶及唾液酸的研究.生物化学及生物心理进展, 1986; 3: 49

4 Markwell M A. A modification of the lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Anal Biochem, 1978; 87: 206

5 成同怡.红细胞膜——骨架的研究进展.国外医学:分子生物学分册, 1992; 14(2): 84

6 Zachowski A. Oxygen free radical formation by rat hepatocytes during postanoxia reoxygenation: scavenging effect of ablumin. Am J Physiol, 1994; 266(3ptl): G451

7 Auland M E. Separation and characterization of two Mg^{2+} -ATPase activities from human erythrocyte membrane. Arch Biochem Biophys, 1994; 312(1): 272

(收稿: 1997-01-24;修回: 1997-07-28)

(编辑 张大春)

Deformative changes of erythrocytes and its mechanism during hypobaric hypoxia in rats

Liang Wanyi, Luo Decheng, Zhang Guobin, Gao Yuqi (Department of Pathophysiology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To observe deformative changes of erythrocytes and explore its mechanism during

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

hypobaric hypoxia in rats. Methods: Adult Wistar rats were randomized into 6 groups: 1) sea level group (SL); 2) 1-day-hypoxic group (H1); 3) 7-day-hypoxic group (H2); 4) 14-day-hypoxic group (H14); 5) 21-day-hypoxic group (H21); 6) 30-day-hypoxic group (H30). Erythrocyte filtration index (IF), the ATPase activities and ATP content were determined. Results: 1) IF was significantly lower in SL than in each hypoxic group ($P < 0.05$ or 0.01). It reached its peak in H7 and then gradually decreased. There was no evident difference between H21 and H30. 2) Erythrocyte ATP content was significantly lower in H1 and H7 than in SL and negatively correlated to their IF ($r = -0.6358$, $P < 0.01$; $r = -0.7044$, $P < 0.01$). 3) Na-K-ATPase and Ca-ATPase activities were significantly lower in hypoxic groups than in SL but Mg-ATPase activity reduced only in H30. Conclusion: Hypoxia can destroy erythrocyte deformability, but it was not progressive. Erythrocyte deformability might be improved in the second hypoxic week and then decreased to reach hemostasis in the third or fourth week. 2) The decrement of erythrocyte ATP contents in the early hypoxic period and ATPase activity in the whole hypoxic course play an important role in erythrocyte deformability damages during hypobaric hypoxia.

Key words erythrocyte devormability; ATPase activity; ATP; hypoxia; rat

烟雾吸入性肺损伤大鼠 SPA表达异常机制研究

A study on the mechanisms of SPA down- regulation in a rat model of smoke inhalation injury

傅祖红* 杨宗城 黎 鳌 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所) 重庆, 400038

我所既往研究发现吸入伤后 SPA mRNA表达下降,然而其机理尚不清楚,本研究旨在探讨吸入伤后 SPA mRNA表达下降机理。

反式作用因子与基因顺式元件相互作用,对基因转录具有关键性作用,活性氧作为基因调控信号传导分子,通过对反式作用因子活性调节,调控多种基因转录过程。故本研究从 SPA反式作用因子(TTF$_1$)与 SPA顺式元件环节,探讨吸入伤后活性氧对 SPA基因调控机制。拟从以下三方面进行研究:① 动物体内实验:研究吸入伤后肺脏氧化应激与 SPA mRNA表达及其关系;② 体外实验:a.从 SPA顺式元件与 TTF$_1$分子结合水平,研究活性氧及氧化还原状态对其结合活性的影响;b.从 SPA体外转录水平,研究活性氧及氧化还原状态对 TTF$_1$启动 SPA体外转录的影响;③ 以 NAC清除吸入伤肺脏氧化应激,研究氧化应激解除后,SPA mRNA表达情况。

本研究还采用动物实验研究了 NAC对吸入伤 SPA相关功能及对吸入性肺损伤保护作用,为 NAC用于吸入伤临床治疗提供依据,也是本研究另一目的。

结果与结论:(1)体内实验发现:① 吸入伤后肺脏 MDA含量显著增加;总抗氧化能力(TAO)显著降低;还原性谷胱甘肽显著消耗。② 吸入伤后 SPA mRNA表达明显降低。提示:吸入伤后肺脏活性氧大量产生、肺脏氧化还原电势(GSSG/GSH)增高,可能是吸入伤后 SPA mRNA表达下降的原因。

(2)体外实验发现:① 活性氧(H_2O_2)及 GSH氧化产物 GSSG,可抑制 TTF$_1$与 SPA顺式件结合,GSH可解除上述抑制作用;② 活性氧介质(H_2O_2)及 GSSG可抑制 TTF$_1$与 SPA体外转录,GSH可解除上述抑制作用。表明:吸入伤后 TTF$_1$"置身"于高活性氧及高氧化还原电势环境,TTF$_1$与 SPA顺式元件结合受抑制可能是吸入伤后 SPA mRNA表达下降的分子病理基础。

(3)以 NAC清除吸入伤肺脏氧化应激、提高 GSH含量,发现吸入伤后 SPA mRNA表达增强。证实了上述推论及结论。

(4) NAC对吸入伤治疗保护实验发现:① NAC治疗可改善 SPA相关功能:a. NAC治疗后可使反映静态肺顺应性的参数 C2.94 C0.49 EI;及反映肺表面活性物质特性的参数 STmin Ha RI SI恢复至正常水平;b. NAC治疗后肺Ⅱ型细胞板层体恢复至正常形态。② NAC治疗可保护肺损伤:a. NAC治疗后反映肺损伤的 BALF中 AKP LDH酶活性;及反映肺微血管损伤的 BALF中白蛋白含量恢复至正常水平。b. NAC治疗后 BALF中白细胞总数及中性粒细胞百分数皆恢复至正常水平;c. NAC治疗后肺脏病理形态异常明显减轻。表明: NAC对吸入性肺损伤具有治疗、保护作用。

关键词 肺损伤; SPA; TTF;顺式元件;反式因子;氧化还原

中图法分类号 R644

(收稿: 1997-12-05;修回: 1998-01-06)

(编辑 王 红)

* 傅祖红,男,32岁,主治医师,博士研究生

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