DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.03.024

庆大霉素肾中毒大鼠肾皮质线粒体、溶酶体损伤机理的研究

何娅妮 廖立生 蒋建新 朱妙珍 (第三军医大学附属大坪医院肾内科) 重庆,630042

提 要 采用庆大霉素(GM)肾中毒大鼠模型,观察肾皮质线粒体、溶酶体膜流动性及其标志酶琥珀酸脱氢酶(SDH)、酸性磷酸酶(ACP)活性的变化以及形态学改变。GM组0.5 h,线粒体、溶酶体膜流动性非常显著下降,并随时间进行性下降;SDH及ACP酶活性亦同时发生相应变化;电镜下,GM组0.5 h,近端肾小管上皮细胞未见明显异常,1 h后线粒体及溶酶体出现明显损伤征象。结果提示,GM肾中毒时,肾皮质线粒体、溶酶体膜流动下降是其肾毒性发病机理的重要环节。

关键词 庆大霉素;肾皮质;亚细胞器
中图法分类号 R692.05

庆大霉素(GM)迄今仍是临床上日常使用的广谱抗生素之一,但其肾毒性问题目前仍未解决。近年来,GM对生物体的膜毒理效应引起了广泛关注。Knauss等[1]证实,近端肾小管上皮细胞线粒体、溶酶体膜都富含能与GM结合的受体物质——磷脂酰肌醇。GM与线粒体膜结合,可引起呼吸链电子传递受阻,使细胞内能量供应不足,溶酶体是GM在细胞内的主要蓄积场所,其膜稳定性下降、溶酶释放与GM肾毒性的发生发展关系十分密切。研究表明,线粒体和溶酶体正常功能的维持与其膜流动性状态关系十分密切[2]。有关GM对生物膜流动性的研究,文献报道尚不多见。本文采用GM肾中毒大鼠模型,观察肾皮质线粒体、溶酶体膜流动性及其标志酶琥珀酸脱氢酶(SDH)、酸性磷酸酶(ACP)活性的变化。旨在为临床上GM肾毒性的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂及药品

GM系四川省长征制药厂产品,批号911206。1,6-二苯基-1,3,5-己三磷(DPH,Sigma)、β-甘油磷酸钠(瑞士Flank公司),其余试剂为分析纯。

1.2 动物分组

Wistar雄性大鼠40只,体重180~230 g。共分2组。对照组($n=8$),生理盐水4 ml×1次,ip.;GM组($n=32$),GM 100 mg/kg bw×1次,ip.。对照组于注射后0.5 h,GM组于给药后0.5、1、12及24 h断颈活杀动物。迅速取双肾进行相应处理,测定指标。

1.3 方法

1.3.1 肾皮质线粒体和溶酶体分离 采用差速离心法[3]。

1.3.2 两种亚细胞器悬液蛋白质含量测定 采用Lowry法。

1.3.3 膜流动性测定 采用荧光偏振法[4]。取2 ml线粒体或溶酶体悬液(150 μg/ml),加入2 ml 0.2 μmol DPH,25℃温育30 min后,在岛津RF-540型荧光分光光度计测定荧光强度。激发波波长382 nm,发射波波长432 nm。计算荧光偏振度(ρ)、微粘度(η)、各向异性(γ)。与基础值相比,ρ、η、γ值越大,膜流动性越小;反之,各值越小,膜流动性越大。

1.3.4 肾皮质线粒体SDH和ACP活性测定分别按Pearson[5]和Gomri[5]法进行。

1.3.5 电镜检查 按常规方法。

1.4 统计学处理

数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各组数据作单因素方差分析;有关数据作相关分析。$P<0.05$为显著性界限。

2 结果

2.1 膜流动性变化

GM组0.5 h,线粒体、溶酶体膜ρ、η、γ值均较对照组升高非常显著($P<0.01$),以后升高更为显著(与0.5 h比较,$P<0.001$)(见表1,2)。

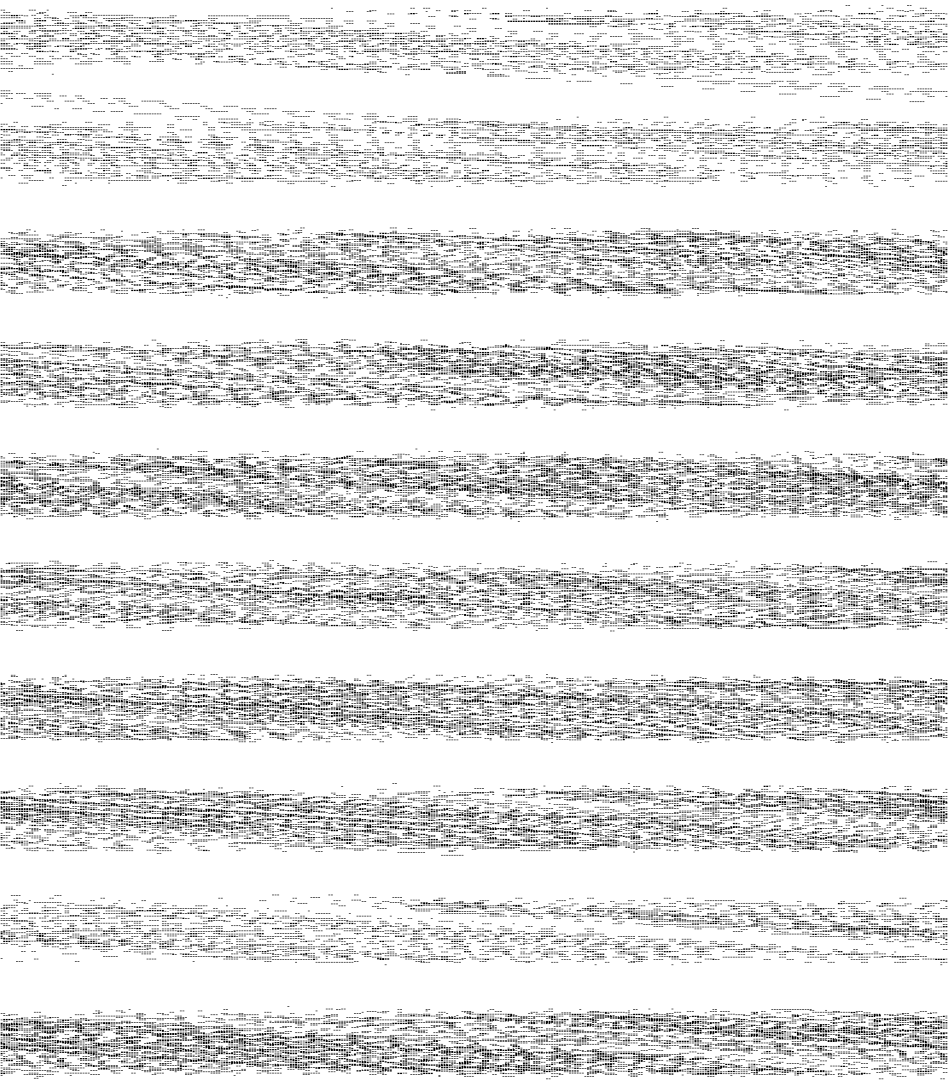
表1 肾皮质线粒体膜流动性的变化

Tab 1 Changes of membrane fluidity of mitochondria in the renal cortex

	Control	Time after GM administration (h)			
		0.5	1	12	24
ρ	0.231±0.007	0.275±0.008#	0.306±0.009*	0.317±0.005**	0.335±0.012**
η	2.071±0.118	2.976±0.045#	3.984±0.135*	4.432±0.116**	5.327±0.613**
γ	0.167±0.005	0.202±0.006#	0.227±0.007*	0.239±0.002**	0.250±0.024**

#: $P<0.01$ *vs* control; *: $P<0.01$ *vs* 0.5 h, **: $P<0.001$ *vs* 0.5 h

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



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

性值都非常显著地高于对照组（$P<0.01$），且随时间递增，说明GM肾中毒时，肾皮质线粒体膜流动性显著下降；与此同时，线粒体标志酶SDH酶活性亦呈进行性降低；电镜下，GM组0.5 h，肾近端小管上皮细胞线粒体无明显结构改变，1 h后出现明显的肿胀、嵴断裂、消失等损伤表现。提示GM肾中毒时，膜流动性下降可能是线粒体损伤的重要环节。

本研究还发现，GM组0.5 h肾皮质溶酶体膜流动性亦明显下降，同时伴有ACP酶活性增强，释放增多，虽然此时溶酶体超微结构尚无明显改变，但1 h后，便有髓样小体形成，以后其数量进行性增多。提示溶酶体膜流动性下降与内容物释放、髓样小体形成可能有密切关系。其机理可能为：膜流动性下降，可导致溶酶体膜脂质分子排列的有序性增加，膜刚性增强，从而使膜稳定性下降，导致溶酶以及溶酶体内蓄积的GM释放；膜流动性下降同时也标志着膜脂质的活动度下降，这可引起溶酶体与吞饮小泡的膜融合能力下降，使进入细胞浆内的GM继续向溶酶体内转运的过程受阻。此外，膜流动性的变化，可引起膜上磷脂酶的分子空间构象发生变化，酶活性下降，使溶酶体膜磷脂代谢紊乱，磷脂沉积[8]。

综上所述，肾皮质线粒体、溶酶体膜流动性下降可能是GM肾中毒的重要发病机理。

参考文献

1 Knauss TC, Weinberg JM, Humes HD. Alteration in renal cortical phospholipid content induced by gentamicin: time course, specificity, and subcellular localization. Am J Physiol, 1983; 244: F535

2 林克椿，聂松青. 细胞膜流动性. 生理科学进展，1985；16：83

3 何娅妮，廖立生. 庆大霉素肾毒性大鼠细胞器膜流动性与MDA变化的关系. 肾脏病与透析肾移植杂志，1994；3(3)：172

4 芮菊生 主编. 组织切片技术. 北京：高等教育出版社，1987：277～315

5 Brasseur R, Laurent G, Ruyschaert JM *et al*. Interactions of aminoglycoside antibiotics with negatively charged lipid layers. Bichem Pharmacol, 1984; 33: 629

6 Levi M, Cronin RE. Early selective effects of gentamicin on renal brush border membrane Na-Pi cotransport and Na-H exchange. Am J Physiol, 1990; 258: F1379

7 蒋建新，汪江淮，陈惠孙等. 脓毒败血症对大鼠肾脏线粒体损伤及其机理的研究. 中国危重病急救医学，1992；4：195

8 Kaloyanides GJ. Drug-phospholipid interaction: role in aminoglycoside nephrotoxicity. Renal Failure, 1992; 14: 351

（收稿：1995-10-15；修回：1996-04-25）

（编辑　沈锡庚、王　红）

Study of gentamicin-induced mitochondrial and lysosomal damages in renal cortex in rats

He Yani, Liao Lisheng, Jiang Jianxin, Zhu Miaozhen (Department of Nephrology Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630042)

Abstract The changes of membrane fluidity of the mitochondria and lysosomes in the renal cortex, the activities of their marker enzymes, succinate dehydrogenase (SDH) and acid phosphatase (ACP), and the morphological changes were studied in rats with gentamicin (GM)-induced nephrotoxicity. It was found that the membrane fluidity of mitochondria and lysosomes in the renal cortex was very significantly decreased 0.5 hour after the administration of GM and it kept on decreasing along with the elapse of time. Corresponding changes of the activities of SDH and ACP were observed simultaneusly. Under electron microscopy, no obvious changes of the epithelial cells of the proximal tubules were observed 0.5 hour after GM administration but severe mitochondrial and lysosomal damages were found in the 1st hour. These findings suggest that the changes of the membrane fluidity of the mitochondria and lysosomes in the renal cortex may be the important cause of the damages of the organelles in GM-induced nephrotoxicity.

Key words gentamicin; renal cortex; organelle; rat

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