

[文章编号] 1000-4718(2006)12-2411-03

## 肾缺血-再灌注损伤引起的脑生化改变\*

李东亮, 李炳, 张利彬, 李晓娟

(新乡医学院生理学与神经生物学教研室, 河南 新乡 453003)

**[摘要]** 目的: 观察血清及脑脊液生化成分变化, 初步探讨肾缺血-再灌注损伤对脑的影响。方法: 20只健康新西兰兔随机分为对照组和肾缺血再灌注组(IR组), 检测和比较血清和脑脊液中肌酐(Cr)、尿素氮(UN)、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、一氧化氮(NO)代谢产物含量及脑组织总一氧化氮合酶(NOS)活力。结果: 在肾缺血再灌注后24h, IR组血清和脑脊液中的UN、Cr和NO均显著高于对照组( $P < 0.05$ ),  $\text{Na}^+$ 明显低于对照组; IR组血清 $\text{Ca}^{2+}$ 显著低于( $P < 0.05$ )、而脑脊液中 $\text{Ca}^{2+}$ 显著高于对照组( $P < 0.05$ )。IR组脑组织中 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量和NOS活力均明显高于对照组( $P < 0.05$ )。结论: 肾缺血再灌注损伤不仅影响血清成分, 而且还可引起脑生化的改变; NO可能参与了肾缺血-再灌注损伤对脑功能的影响。

**[关键词]** 兔; 肾; 再灌注损伤; 脑脊液; 一氧化氮; 一氧化氮合酶

**[中图分类号]** R338.2

**[文献标识码]** A

### Change of neurobiochemistry induced by renal ischemia-reperfusion injury

LI Dong-liang, LI Bing, ZHANG Li-bin, LI Xiao-juan

(Department of Physiology and Neurobiology, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, China)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To explore the effects of renal ischemia-reperfusion injury on the changes of biochemistry in blood serum and cerebrospinal fluid. **METHODS:** Twenty healthy New Zealand rabbits were randomly divided into control group and renal ischemia-reperfusion injury group (IR group). The contents of creatinine (Cr), urea nitrogen (UN),  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , metabolite of nitric oxide (NO) in blood serum and cerebrospinal fluid were detected and analyzed. The total activity of nitric oxide synthase (NOS) in brain tissues was also measured. **RESULTS:** Compared with control group, the contents of UN, Cr and NO were obviously higher ( $P < 0.05$ ), and the content of  $\text{Na}^+$  was obviously lower both in blood serum and cerebrospinal fluid in IR group than those in control at 24 h after renal ischemia-reperfusion injury. The content of  $\text{Ca}^{2+}$  was lower in blood serum but higher in cerebrospinal fluid in IR group compared with control group ( $P < 0.05$ ). Both the contents of  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  and the total activity of NOS in brain tissues were higher in IR group than those in control group ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION:** Not only elements of blood serum but also the biochemistry of cerebrospinal fluid were changed by renal ischemia-reperfusion injury. NO may involve in the influence of the renal ischemia-reperfusion injury on the cerebral function.

**[KEY WORDS]** Rabbits; Kidney; Reperfusion injury; Cerebrospinal fluid; Nitric oxide; Nitric-oxide synthase

肾缺血再灌注损伤是引起肾功能衰竭的重要发病原因, 可导致肾单位功能的急剧减退, 影响代谢废物的排出, 造成体液酸碱平衡和电解质的紊乱从而破坏机体内环境稳态。脑脊液是体液的重要部分, 脑脊液的物理性状、化学成分能反映脑和脊髓的新陈代谢和功能活动状况<sup>[1]</sup>。在肾功能衰竭的病人, 由于代谢废物甚至有害致毒物质的堆积滞留, 可造成神经系统的中毒损害, 引发一系列的精神异常、意识障碍、抽搐和自主运动等症状<sup>[2]</sup>。肾脏的缺血再灌注损伤对中枢神经系统的影响目前鲜有报道, 作者曾经观察了肾缺血再灌注损伤引起的血清及脑脊液电解质成分的改变<sup>[3]</sup>。本研究主要观察肾缺血再灌注损伤后脑脊液和脑组织中NO代谢产物含量

和NOS活力变化, 以探讨肾缺血再灌注损伤对中枢神经系统影响的机制。

### 材料和方 法

#### 1 动物分组

成年新西兰兔20只, 雌雄不拘, 体重2.5-3.0 kg, 由新乡医学院动物中心提供。随机分为假手术对照组( $n=10$ )和肾缺血再灌注(IR)组( $n=10$ )。

#### 2 模型复制

术前禁食水6 h, 3%戊巴比妥钠耳缘静脉注射40 mg/kg, 麻醉动物左侧颈外静脉抽取静脉血。所有动物开腹去右肾, 以避免健康肾脏的代偿作用。分离左肾动脉, IR组用无创动脉夹夹闭左肾动脉

[收稿日期] 2005-09-21

[修回日期] 2006-02-26

\* [基金项目] 河南省科技攻关项目(No. 991170318); 河南省医学科技创新人才工程项目(No. 200024)

60 min,去夹后再灌注 24 h。对照组仅开腹去右肾,不夹闭左肾动脉,余操作同 IR 组。

### 3 样品采集与测定

脑脊液收集参照 Huang 等<sup>[4]</sup>方法自小脑延髓池获取,每次 0.3 mL。具体方法:备皮消毒枕骨粗隆部皮肤,在环枕间隙刺入小脑延髓池约 0.5 cm,以密闭的注射器抽取脑脊液 0.3 mL。缺血前及缺血再灌注 24 h 于颈外静脉采集静脉血约 2 mL,待凝血后经离心抽提血清。再灌注 24 h 后处死动物,快速取脑,取皮质约 500 mg 以冷磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.4, 20 mmol/L EDTA - Na<sub>2</sub>) 冲洗后制成 10% (W/V) 脑匀浆液,再于 4 °C 4 000 r/min 离心 15 min 后取上清液。

以硝酸还原酶法测定 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 水平含量(试剂盒由南京建成生物工程研究所提供),反映 NO 水平。总 NOS 活力用化学比色法测定(试剂盒由南京建成生物工程研究所提供)。组织蛋白测定用考马斯亮蓝法。脑脊液和血清均由美国 Dimension Rxl 全自动生化分析仪测定 UN、Cr、Na<sup>+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup> 含量。

### 4 统计学处理

使用 SPSS 11.0 软件进行统计学处理,所有实验数据用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,均数间差异的显著性用单因素方差分析和成组设计两样本的 *t* 检验。

用 Bivariate 进行相关分析。

## 结 果

### 1 血清和脑脊液中 UN、Cr、Na<sup>+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup> 含量

肾缺血再灌注前对照组和 IR 组的血清和脑脊液中 UN、Cr、Na<sup>+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup> 含量均无显著差异。对照组右肾切除 24 h 后,血清和脑脊液中的 UN 和 Cr 明显高于术前 ( $P < 0.05$ ); Na<sup>+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup> 含量则无明显变化 ( $P > 0.05$ )。IR 组(右肾切除 + 左肾动脉夹闭 60 min) 24 h 后,血清和脑脊液中的 UN 和 Cr 明显高于术前 ( $P < 0.01$ ); 血清 Ca<sup>2+</sup> 含量明显低于术前 ( $P < 0.05$ ), 脑脊液 Ca<sup>2+</sup> 含量明显高于术前 ( $P < 0.05$ ); Na<sup>+</sup> 含量则无明显变化 ( $P > 0.05$ )。肾缺血再灌注后 24 h 血清和脑脊液中 UN 和 Cr 含量均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 钠含量显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 缺血再灌注后 24 h, IR 组血清钙浓度显著低于对照组, 脑脊液中钙浓度显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

### 2 血清、脑脊液和脑组织匀浆液中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 含量

在肾缺血再灌注 24 h 后, IR 组血清、脑脊液和脑组织匀浆液中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 含量均显著高于对照组, 见表 2。

表 1 兔血清和脑脊液中尿素氮、肌酐、Na<sup>+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup> 含量

Tab 1 Contents of UN, Cr, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> in blood serum and cerebrospinal fluid in rabbits (mmol/L.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 10$ )

		Control group		IR group	
		Preoperation	24 h postoperation	Preoperation	24 h postoperation
Blood serum	UN	6.82 ± 1.26	11.79 ± 2.73 <sup>#</sup>	6.68 ± 1.12	21.36 ± 6.89 <sup>Δ*</sup>
	Cr	88.33 ± 13.78	104.40 ± 11.90 <sup>#</sup>	77.34 ± 8.48	420.76 ± 72.45 <sup>Δ*</sup>
	Na <sup>+</sup>	138.89 ± 1.97	141.56 ± 1.81	139.00 ± 1.41	138.44 ± 2.56 <sup>*</sup>
	Ca <sup>2+</sup>	2.89 ± 0.07	2.73 ± 0.10	2.87 ± 0.12	2.56 ± 0.14 <sup>#*</sup>
Cerebrospinal fluid	UN	4.13 ± 0.70	8.93 ± 2.38 <sup>#</sup>	4.12 ± 0.77	14.88 ± 4.59 <sup>Δ*</sup>
	Cr	45.49 ± 2.48	59.43 ± 6.11 <sup>#</sup>	46.66 ± 4.52	81.37 ± 20.15 <sup>Δ*</sup>
	Na <sup>+</sup>	148.33 ± 2.60	152.56 ± 1.94	147.57 ± 2.83	148.56 ± 2.30 <sup>*</sup>
	Ca <sup>2+</sup>	1.52 ± 0.03	1.53 ± 0.02	1.52 ± 0.03	1.60 ± 0.03 <sup>**</sup>

<sup>#</sup> $P < 0.05$  vs preoperative; <sup>Δ</sup> $P < 0.01$  vs preoperative; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs control group.

表 2 肾缺血再灌注 24 h 后血清、脑脊液和脑组织匀浆液中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的含量

Tab 2 Content of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in blood serum, cerebrospinal fluid and brain tissue 24 h after renal ischemia reperfusion injury ( $\bar{x} \pm s$ .  $n = 10$ )

	Control group	IR group
Blood serum (μmol/g protein)	268.70 ± 14.51	329.46 ± 12.92 <sup>*</sup>
Cerebrospinal fluid (μmol/L)	81.92 ± 7.99	138.15 ± 48.05 <sup>*</sup>
Brain tissue homogenate (mmol/g protein)	1.44 ± 0.05	2.92 ± 0.33 <sup>*</sup>

<sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs control group.

### 3 脑组织中总 NOS 活力

在肾缺血再灌注 24 h 后, IR 组脑组织中的总 NOS 活力显著高于对照组, 结果详见表 3。

表 3 肾缺血再灌注 24 h 后脑组织中总 NOS 活力

Tab 3 Total activity of nitric oxide synthase (NOS) in brain tissue at 24 h after renal ischemia reperfusion injury ( $\bar{x} \pm s$ .  $n = 10$ )

Group	Total vital force of NOS in brain tissue (U/g protein)
Control	0.64 ± 0.05
IR	0.88 ± 0.06 <sup>*</sup>

<sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs control group.

### 4 脑组织中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 浓度与 UN 和 Cr 含量的关系

肾缺血再灌注 24 h 后, 脑组织匀浆液中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/

NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量与血清 UN 含量呈正相关( $r=0.69$ ,  $P<0.01$ ), 脑脊液中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量与脑脊液中 UN 含量呈正相关( $r=0.65$ ,  $P<0.01$ )。但 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量与血清和脑脊液中 Cr 含量在统计学上无明显的相关性。

## 讨 论

在肾动脉急性缺血时, 肾组织细胞氧化磷酸化过程停止, 将出现肾功能障碍。目前认为主要与钙超载、氧自由基和细胞因子作用、内分泌-免疫调节紊乱等因素有关<sup>[5]</sup>。由于肾脏自身对缺血敏感, 所以缺血引起的肾细胞损伤, 可使肾小球滤过功能下降, 从而引起肾小管内压降低, UN 等代谢废物排泄障碍以及尿 Na<sup>+</sup> 排出减少和水重吸收增多等一系列改变。本研究发现对照组右肾切除 24 h 后, 血清和脑脊液中的 UN 和 Cr 明显高于术前( $P<0.05$ ), 表明一侧肾脏急性切除后, 可能已经影响了 UN 和 Cr 的清除率, 体液中这些物质含量增高。IR 组(右肾切除+左肾动脉夹闭 60 min)24 h 后, 血清和脑脊液中的 UN 和 Cr 更明显高于术前( $P<0.01$ ), 进一步印证了上述观点。血清 Ca<sup>2+</sup> 含量明显低于术前( $P<0.05$ ), 脑脊液 Ca<sup>2+</sup> 含量明显高于术前( $P<0.05$ )的原因将在后文探讨。本研究还发现肾缺血再灌注后 24 h 血清和脑脊液中 UN 和 Cr 含量均显著高于对照组( $P<0.05$ ), 与原有的理论知识相符合。肾缺血再灌注后 24 h 血清和脑脊液中钠浓度显著低于对照组( $P<0.05$ ), 可能是由于水的滞留引起血钠稀释而降低。肾缺血再灌注损伤时, 由于磷的滞留和 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 合成减少则可使血钙降低<sup>[6]</sup>, 结果也证实了这一观点。然而脑脊液中钙明显高于对照组, 与血清的结果形成明显反差, 除了排泄障碍造成的 UN 和 Cr 升高, 可能通过影响血脑屏障和毒害神经元, 动员胞内钙释放引起脑脊液钙浓度升高外, 还可能与脑内 NO 的调节有关, 其机制有待阐明。

肾脏和肺是血管内皮依赖性舒张因子(EDRF)代谢最为活跃的部位, 而 EDRF 的化学本质就是 NO。在肾缺血再灌注后可引起 NOS 表达上调<sup>[7]</sup>, 从而导致 NO 生成增多。由于 NO 具有舒张血管的作用, 这是机体的一种生理性防御反应<sup>[8]</sup>。本实验中发 现肾缺血再灌注后不仅在血清而且在脑脊液和脑组织内都出现 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量明显高于对照组, 提示肾脏的缺血再灌注损伤引起的生化变化波及到脑部。脑脊液是脑组织的细胞外液, 由脉络丛、脑细胞、脑毛细血管内皮细胞及神经胶质细胞共同分泌的一种低蛋白溶液。其成分变化可反映脑组织的代谢和功能活动状况。肾缺血再灌注损伤引起血液成分的改变, 也随着循环影响到脑, 改变脑脊液的成分。钙在维持正常的神经肌肉应激性、传导神经冲

动、维持细胞膜通透性等方面起重要作用<sup>[9]</sup>。肾缺血再灌注损伤后, 代谢废物的毒性作用引起神经细胞释放过多的兴奋性氨基酸(EAA), 过度激活 N 甲基-D 门冬氨酸受体(NMDAR), 使受体依赖性 Ca<sup>2+</sup> 通道开放, Ca<sup>2+</sup> 持续内流, 引起 Ca<sup>2+</sup> 超载, 神经元过度兴奋, 从而产生神经毒作用<sup>[10]</sup>。结果神经元能量耗竭, 代谢性酸中毒, 部分神经细胞破坏释放出钙, 又引起脑脊液中钙升高。本研究的实验发现肾缺血再灌注后 24 h 后脑脊液中钙明显高于对照组, 用事实证明了上述观点。

经相关分析发现肾缺血再灌注 24 h 后, 脑组织匀浆液中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量与血清 UN 含量呈正相关( $r=0.69$ ,  $P<0.01$ ), 脑脊液中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含量与脑脊液中 UN 含量呈正相关( $r=0.65$ ,  $P<0.01$ )。这些结果或许能说明肾脏功能降低、体液中尿素氮的升高, 通过某种机制引起脑组织匀浆液和脑脊液中 NO 代谢产物含量的增加。然而这一观点尚需更多的实验来证实。很显然, 肾缺血损伤与脑功能、多器官功能障碍的关系是十分复杂的。本实验提示 NO 在肾缺血-在灌注损伤与脑功能紊乱之间可能充当着一种媒介, 进一步阐明其过程的每一细节, 必将给人们干预肾损伤引起的脑紊乱多增添一份信心。

## [参 考 文 献]

- [1] 王海燕 主编. 肾衰竭[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003. 334.
- [2] 朱长庚 主编. 神经解剖学[M]. 版次. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 994.
- [3] 李 炳, 刘 琼, 侯软玲, 等. 肾脏的缺血再灌注损伤后血清和脑脊液中电解质含量变化的研究[J]. 实用临床医学, 2005, 6(7): 4-6.
- [4] Huang YL, Suneson A, Hansson HA, et al. Comparison among different approaches for sampling cerebrospinal fluid in rats[J]. Brain Res Bull, 1996, 41: 5273-5279.
- [5] Seth P, Kumari R, Madhavan S, et al. Prevention of renal ischemia reperfusion-induced injury in rats by picroliv [J]. Biochem Pharmacol, 2000, 59(10): 1315-1322.
- [6] 雷 伟, 王玲珑, 周江桥. 肾缺血再灌注损伤分子水平发生机制研究进展[J]. 国外医学: 泌尿系统分册, 2004, 24(4): 473-476.
- [7] 王新良, 黄善生. 肾脏缺血再灌注损伤中肾小球的改变与 NO 的作用[J]. 国外医学: 生理、病理科学与临床分册, 2001, 21(2): 154-156.
- [8] Weight SC, Furness PN, Nicholson ML. Biphasic role for nitric oxide in experimental renal warm ischaemia-reperfusion injury[J]. Br J Surg, 1999, 86(8): 1039-1046.
- [9] 刘中华. 钙通道与疼痛[J]. 中国临床康复, 2002, 6(12): 1712-1713.
- [10] 肖忠新, 戴 红, 王建中, 等. 脊髓损伤患者脑脊液中常、微量元素测定[J]. 中国康复理论与实践, 2003, 9(12): 717-718.