

## 对比剂对维持性血液透析患者氧化应激状态的影响

刘同强<sup>1</sup>, 李娟娟<sup>2\*</sup>, 冯 曦<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学附属常州二院肾内科, <sup>2</sup>肿瘤内科, 江苏 常州 213003)

**[摘要]** 目的: 评估维持性血液透析(maintenance hemodialysis, MHD)患者注射对比剂后氧化应激水平的时序变化, 同时观察患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中核因子 E2-相关因子 2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)和血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)的变化。方法: 选取 30 例未用对比剂进行 CT 检查的 MHD 患者(MHD-对照组)、30 例应用对比剂行增强 CT 检查的 MHD 患者(MHD-CM 组)和 30 例应用对比剂行增强 CT 检查的肾功能正常体检者(nonHD-CM 组), 检测患者氧化应激指标: 晚期蛋白质氧化物(advanced oxidation protein products, AOPP)、8-羟基脱氧鸟嘌呤核苷(8-hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG)和丙二醛(malondialdehyde, MDA), 同时应用 Western blot 检测患者 PBMC 中 Nrf2 核蛋白和 HO-1 总蛋白表达情况。结果: MHD-CM 组 AOPP、8-OHdG 和 MDA 水平增高且持续时间长, AOPP 和 MDA 水平在 CT 检查后 28 d 仍维持在高水平。nonHD-CM 组血清 AOPP、8-OHdG 和 MDA 水平在增强 CT 检查后 1 d 升高, 7 d 内恢复到 CT 检查前的水平。增强 CT 检查后 1 d, MHD-CM 组患者 PBMC 中 Nrf2 核蛋白和 HO-1 总蛋白的表达水平无明显变化( $P > 0.05$ ), 而 nonHD-CM 组显著增加( $P$  均  $< 0.01$ )。结论: MHD 患者应用对比剂可引起较长时间的氧化应激, 估计与 MHD 患者排泄对比剂能力下降和 Nrf2 活化障碍有关。

**[关键词]** 血液透析; 对比剂; 氧化应激; 核因子 E2-相关因子 2; 血红素加氧酶-1

**[中图分类号]** R692.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)09-1252-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20150914

随着医学影像学和介入技术的发展, 对比剂的广泛使用, 对比剂引起的并发症也愈来愈多见, 其中对比剂肾病是最常见的并发症<sup>[1]</sup>。维持性血液透析(maintenance hemodialysis, MHD)患者大多合并其他疾病或并发症, 需要行 CT 和血管造影检查, 接触对比剂的机会较多, 因此保护患者残余肾功能极其重要<sup>[2]</sup>。Janousek 等<sup>[3]</sup>报道, 等渗对比剂碘克沙醇(iodixanol)对 MHD 患者的残余肾功能影响不大, 在这些患者中使用相对安全, 而磁共振成像具有发生肾原性系统性纤维化的潜在风险, 因此 CT 检查更具优势。但是很多 MHD 患者应用对比剂后会出现疲劳、全身不适和食欲不振, 甚至害怕再次应用对比剂, 其原因不清。推测 MHD 患者肾功能基本丧失, 对比剂无法从肾脏排泄, 导致在体内滞留时间较长, 而对比剂可导致氧化应激反应<sup>[4]</sup>, 加上 MHD 患者本身存在着氧化应激状态, 引起机体的氧化应

激水平进一步增高, 出现各种不良反应。核因子-E2 相关因子 2 (nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2) 是一种可以启动多种抗氧化酶和 II 相解毒酶活化的转录因子, 对抗氧化应激所致的疾病损伤, 是迄今为止发现的最重要的内源性抗氧化应激因子, 血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 是其下游信号分子, 具有很强的抗氧化能力<sup>[5]</sup>。但 MHD 患者外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) Nrf2 活性和功能是否正常, 相关报道并不多见。本研究的目的是评估 MHD 患者应用对比剂后血液氧化应激水平的时序变化和 Nrf2 活性变化, 并与未使用对比剂的 MHD 人群和应用对比剂的肾功能正常的人群相比较。

### 1 对象和方法

#### 1.1 对象

入选患者为 MHD 患者。入选标准: 行 CT 检查, 透析时间  $> 1$  年, 尿量  $< 50$  mL/d。排除标准: 实验期间急性炎症、感染、严重营养不良及活动性肝病。入选情况: 未用对比剂进行 CT 检查的 MHD 患者(MHD-对照组)30 例, 其中男 16 例, 女 14 例, 平均年龄  $(63.5 \pm 6.2)$  岁; 应用对比剂行增强 CT 检查的

**[基金项目]** 南京医科大学科技发展基金面上项目(08NMUM037); 南京医科大学科技发展基金重大项目(09NJ-MUZ25)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: lijjuan1106@126.com

MHD 患者(MHD-CM 组)30 例,其中男 17 例,女 13 例,平均年龄(62.2 ± 5.9)岁;应用对比剂行增强 CT 检查的肾功能正常体检者(nonHD-CM 组)30 例,其中男 18 例,女 12 例,平均年龄(62.9 ± 3.7)岁。MHD 患者安排透析前 1 d 行 CT 检查,从检查开始到透析开始的平均时间间隔为(19.9 ± 2.1)h。每周 3 次,每次 4 h,均使用德国费森尤斯 F6HPS 聚砜膜透析器。停用静脉注射铁剂 > 2 周,重组人红细胞生成素、ACEI、ARB 和他汀类药物继续维持。未使用其他具有抗氧化作用的药物如维生素 C 和乙酰半胱氨酸等。本研究应用非离子、等渗对比剂碘克沙醇(Visipaque®),剂量 1.3 mL/kg。

本研究所用仪器和试剂:晚期蛋白质氧化物(advanced oxidation protein products,AOPP)ELISA 试剂盒(上海江莱生物技术有限公司),8-羟基脱氧鸟嘌呤核苷(8-hydroxydeoxyguanosine,8-OHdG)ELISA 试剂盒、丙二醛(malondialdehyde,MDA)测定 TBARTS 检测试剂盒(南京建成生物技术公司),核蛋白提取试剂盒(上海碧云天生物技术研究所以)。

### 1.2 方法

MHD-CM 组和 nonHD-CM 组在增强 CT 检查对比剂注射前(0 h)、注射后 4 h、1 d、7 d、14 d、28 d 采集外周静脉血 5 mL。MHD-对照组按上述时间点采血。2 mL 外周静脉血用于提取血清以检测氧化应激指标 AOPP、8-OHdG 和 MDA,所有操作严格按照试剂盒说明进行。

3 mL 外周静脉血用于分离 PBMC。Ficoll 密度梯度离心法分离 PBMC,分为 2 个相等的部分。一部分严格按照核蛋白提取试剂盒提取核蛋白,另一部分在冰冷的 RIPA 裂解缓冲液中匀浆,4℃下 12 000 g 离心 15 min,提取上清液(总蛋白),BCA 法测蛋白浓度。80~120 V 电压下 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,5%脱脂奶粉溶液封闭,兔抗 HO-1 多克隆抗体

(1:1 000)、兔抗 Nrf2 多克隆抗体(1:500)孵育后加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:5 000)室温孵育 2 h;洗膜后加 ECL 试剂发光,LAS-3 000 检测系统检测后,用 Image J 软件对条带进行统计分析。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件分析,数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。每组患者 CT 检查前和 CT 检查后各个时间点氧化应激指标的比较采用 ANOVA 分析,如有差异,采用  $q'$  检验,分析 CT 检查后各个时间点的氧化应激指标与 CT 检查前有无差异。比较每组患者 CT 检查前和 CT 检查后 1 d 蛋白表达水平的差异,采用自身配对  $t$  检验,比较 3 组患者的蛋白表达水平的差异,采用 ANOVA 分析,两两比较采用 SNK- $q$  检验。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血清氧化应激指标的变化

CT 检查后 1 d MHD-对照组氧化应激指标(AOPP、8-OHdG 和 MDA)在整个观察过程中无明显变化。CT 检查后 1 d MHD-CM 组 AOPP、8-OHdG 和 MDA 均明显升高,至 CT 检查后 14 d 维持在较高水平,检查后 28 d 8-OHdG 恢复到 CT 检查前水平,而 AOPP 和 MDA 仍未恢复到 CT 检查前水平。CT 检查后 1 d nonHD-CM 组 AOPP、8-OHdG 和 MDA 水平也明显升高,CT 检查后 7 d 均恢复到 CT 检查前水平(表 1)。

### 2.2 Nrf2 核蛋白和 HO-1 总蛋白表达水平的变化

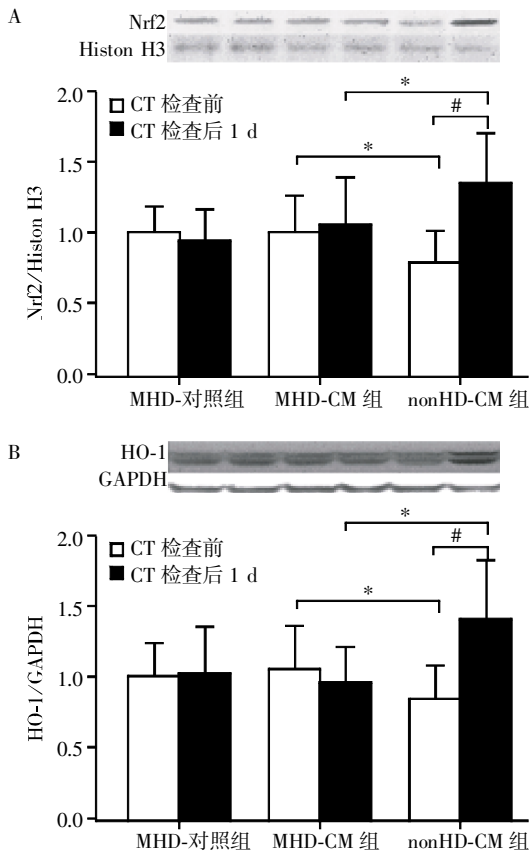
增强 CT 检查前,MHD-CM 组 Nrf2 核蛋白和 HO-1 总蛋白表达水平较 nonHD-CM 组高(Nrf2:  $1.01 \pm 0.26$  vs.  $0.79 \pm 0.23$ ,  $q=5.68$ ,  $P < 0.01$ ; HO-1:  $1.06 \pm 0.30$  vs.  $0.85 \pm 0.21$ ,  $q=6.31$ ,  $P < 0.01$ )。增强 CT 检查后 1 d,MHD-对照组和 MHD-CM 组 Nrf2 核蛋白和 HO-1 总蛋白表达水平与 CT 检查前比较无

表 1 各组患者 CT 检查前后氧化应激指标的检测数据

时间	AOPP(μmol/L)			8-OHdG(μg/L)			MDA(μmol/L)		
	MHD-对照组	MHD-CM 组	nonHD-CM 组	MHD-对照组	MHD-CM 组	nonHD-CM 组	MHD-对照组	MHD-CM 组	nonHD-CM 组
CT前	133 ± 38	130 ± 26	125 ± 29	25.5 ± 5.5	28.1 ± 5.4	20.9 ± 4.7	5.41 ± 1.21	5.34 ± 1.05	4.82 ± 1.28
CT后 4 h	137 ± 36	134 ± 29	127 ± 33	26.1 ± 5.1	29.3 ± 5.9	21.5 ± 4.4	5.49 ± 1.29	5.49 ± 1.20	5.00 ± 1.19
CT后 1 d	131 ± 41	158 ± 26**	148 ± 25**	28.8 ± 5.0	35.5 ± 5.8**	23.8 ± 4.9*	5.55 ± 1.31	6.91 ± 1.21**	5.81 ± 1.25*
CT后 7 d	138 ± 36	165 ± 28**	131 ± 35	24.9 ± 4.8	37.8 ± 5.1**	22.5 ± 6.6	5.36 ± 1.19	7.02 ± 1.38**	4.89 ± 1.13
CT后 14 d	136 ± 35	157 ± 27**	129 ± 26	27.7 ± 5.0	31.0 ± 5.0*	21.1 ± 4.6	5.31 ± 1.25	6.87 ± 1.16**	4.77 ± 1.15
CT后 28 d	134 ± 31	154 ± 28**	124 ± 27	27.9 ± 5.4	29.9 ± 5.8	19.9 ± 4.8	5.51 ± 1.29	6.39 ± 1.03**	4.79 ± 1.03
F 值	1.34	11.75	3.05	1.67	6.21	3.50	1.22	8.79	2.84
P 值	>0.05	<0.01	<0.05	>0.05	<0.01	<0.01	>0.05	<0.01	<0.05

与 CT 检查前比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

明显变化( $P > 0.05$ ),而 nonHD-CM 组两种蛋白的表达水平均明显增高(Nrf2:  $1.35 \pm 0.35$  vs.  $0.79 \pm 0.23$ ,  $t=5.31$ ,  $P < 0.01$ ; HO-1:  $1.40 \pm 0.41$  vs.  $0.85 \pm 0.21$ ,  $t=4.84$ ,  $P < 0.01$ ),且高于 MHD-CM 组表达水平(Nrf2:  $1.35 \pm 0.35$  vs.  $1.06 \pm 0.33$ ,  $q=4.40$ ,  $P < 0.01$ ; HO-1:  $1.40 \pm 0.41$  vs.  $0.96 \pm 0.27$ ,  $q=4.68$ ,  $P < 0.01$ , 图 1)。



与 CT 检查前比较, \* $P < 0.01$ ; 与 MHD-CM 组比较, \* $P < 0.01$ 。

图 1 各组患者 PBMC 中 Nrf2 核蛋白(A)和 HO-1 总蛋白(B)的表达水平

### 3 讨论

MHD 患者是发生心脑血管疾病的高危人群,也是肿瘤的高发人群<sup>[6]</sup>,通常需要对对比剂进行相关检查。对比剂毒性包括离子强度、黏滞度和渗透性等,均通过增强氧化应激反应发挥毒性作用<sup>[7]</sup>。氧化应激可引起人体多种疾病,如神经退行性疾病、恶性肿瘤、心血管疾病、纤维肌痛、慢性疲劳、甚至老化<sup>[8]</sup>。本研究显示 MHD 患者应用对比剂后氧化应激反应增强且持续时间较长,所以应该重视对比剂等药物导致的氧化应激水平增高的问题。

肾功能正常的患者注射碘克沙醇后,大约 97% 在 24 h 内以原型从尿液中排出,只有不到 2% 在 5 d

内从粪便排出<sup>[9]</sup>。在本研究中,选取的 MHD 患者尿量少于 50 mL/d,因此,通过尿液排泄碘克沙醇的量很小。碘克沙醇已被证明是可透析的,研究中显示:透析 4 h,应用纤维素膜大约有 36% 的碘克沙醇、应用聚砜膜大约 49% 的碘克沙醇可被排出<sup>[10]</sup>。本研究中,患者使用的透析器是聚砜膜,透析时间为 4 h,所以应用对比剂的患者经过一次透析后仍有 50% 左右的碘克沙醇未被排出的,需要较多次数的透析才能将对比剂全部排除,残留的对比剂可引起持续的氧化应激反应。研究结果显示:与 MHD-对照组相比,MHD-CM 患者氧化应激水平升高,说明对比剂引起了机体的氧化应激反应;与 nonHD-CM 比较,MHD-CM 组在应用对比剂后氧化应激指标明显升高,CT 检查后 28 d AOPP 和 MDA 水平仍高,8-OHdG 水平在 CT 检查后 14 d 持续增高,28 d 恢复到 CT 检查前水平,说明 MHD 患者应用 CT 检查后引起的氧化应激反应较肾功能正常的患者更为严重和持久。

Nrf2 是细胞抗氧化应激的中枢调节者<sup>[11]</sup>。生理状态下 Nrf2 与胞浆蛋白伴侣分子 Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) 结合使活性处于相对抑制状态<sup>[11]</sup>。当受到 ROS 信号攻击后,Nrf2 与 Keap1 解偶联后转移到细胞核内,与 ARE 结合后激活靶基因的表达、调节抗氧化酶/蛋白的转录,如谷胱甘肽-S 转移酶、NAD(P)H 苯醌氧化还原酶-1、HO-1 等<sup>[5]</sup>。由此可见,Nrf2 是机体氧化应激的感受器,在参与细胞抗氧化应激的主要防御机制中发挥重要作用,因此 Nrf2 表达水平的变化更能反映细胞对氧化应激抵抗能力的变化。其中 HO-1 广泛参与机体各组织细胞的抗氧化应激损伤,是机体最重要的内源性保护体系之一<sup>[12]</sup>。在本研究中,MHD-CM 组 Nrf2 核蛋白和 HO-1 总蛋白表达均明显高于 nonHD-CM 组,但 MHD 患者氧化应激水平较高,说明 MHD 患者 Nrf2 核蛋白长期处于激活状态,维持在较高水平以对抗氧化应激反应。增强 CT 检查后 MHD-CM 组 Nrf2 核蛋白和 HO-1 总蛋白表达水平较 CT 检查前无明显变化,而增强 CT 检查后 nonHD-CM 组 Nrf2 核蛋白和 HO-1 总蛋白表达水平较 CT 检查前明显增加,提示 MHD-CM 组患者对对比剂所致的氧化应激刺激没有发生适应性变化,未能活化 Nrf2,从而导致 HO-1 的表达无明显变化,未能提高机体的抗氧化能力,因此发生了严重的氧化应激反应。

综上所述,MHD 患者应用对比剂后,对比剂在体内存留时间较长,同时存在 Nrf2 活化障碍,以致 HO-1 生成减少,引起了严重、持续的氧化应激反应。

因此,推测抗氧化治疗或加强透析可能对 MHD 患者对比剂引起的不良反应有治疗作用,有必要在今后的研究进一步证实。

[参考文献]

- [1] 吴河,张丰富,叶飞. STEMI 行急诊 PCI 术患者 V/eGFR 对对比剂肾病和近期预后的影响[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2014,34(10):1395-1399
- [2] Zhang J, Li Y, Tao GZ, et al. Short-term rosuvastatin treatment for the prevention of contrast-induced acute kidney injury in patients receiving moderate or high volumes of contrast media: a sub-analysis of the TRACK-D study[J]. Chin Med J(Engl), 2015, 128(6): 784-789
- [3] Janousek R, Krajina A, Peregrin JH, et al. Effect of intravascular iodinated contrast media on natural course of end-stage renal disease progression in hemodialysis patients: a prospective study[J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2010, 33(1): 61-66
- [4] Nazıroğlu M, Yoldaş N, Uzgür EN, et al. Role of contrast media on oxidative stress, Ca<sup>2+</sup> signaling and apoptosis in kidney[J]. J Membr Biol, 2013, 246(2): 91-100
- [5] 李雪丽,唐云,许雪珠,等. 核转录因子 Nrf2 最新研究进展[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(24): 4530-4534
- [6] Drew DA, Weiner DE, Tighiouart H, et al. Cognitive function and all-cause mortality in maintenance hemodialysis patients[J]. Am J Kidney Dis, 2015, 65(2): 303-311
- [7] Seeliger E, Lenhard DC, Persson PB. Contrast media viscosity versus osmolality in kidney injury: lessons from animal studies[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 358136
- [8] Essick EE, Sam F. Oxidative stress and autophagy in cardiac disease, neurological disorders, aging and cancer[J]. Oxid Med Cell Longev, 2010, 3(3): 168-77
- [9] Hirao Y, Kashiyama E, Umehara K, et al. Hemodialysis clearance of iosimenol, a novel iso-osmolar radiographic contrast medium[J]. Acta Radiol, 2014, 55(8): 938-944
- [10] Bailie GR, Eisele G, Sala J, et al. Determination of iodixanol hemodialysis clearance using a novel in vitro system[J]. Clin Res Regul Aff, 1996, 13(4): 111-124
- [11] 齐亚军,刘健,郑力,等. 基于 Keap1-Nrf2-ARE 探讨强直性脊柱炎患者心功能降低的机制[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(5): 654-661
- [12] Zhang H, Liu YY, Jiang Q, et al. Salvianolic acid A protects RPE cells against oxidative stress through activation of Nrf2/HO-1 signaling[J]. Free Radic Biol Med, 2014, 69: 219-228

[收稿日期] 2015-03-22

