经验交流

文章编号:1000-5404(2005)15-1618-02

大鼠缺血再灌注损伤后肾组织ICAM-1表达及炎细胞浸润

ICAM-1 expression and leukocyte infiltration in renal tissues after renal ischemia/reperfusion injury

刘 宏,吴雄飞,李 敛 (第三军医大学西南医院全军泌尿外科中心肾科,重庆 400038)

局部炎细胞的浸润是导致缺血、再灌注后肾脏损伤及移植肾排斥反应的重要原因[1]。本研究观察在体缺血再灌注损伤后大鼠肾血管ICAM-1表达与肾组织炎细胞浸润的关系,探讨内皮细胞粘附性改变在急性缺血性肾脏损害中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及动物模型

Wistar大鼠35只,本校实验动物中心提供,体质量(150±20)g,雌雄不拘,随机分为假手术组、缺血1 h组、再灌注1、6、12、24、48 h组,每组5只。按我室常规方法建立缺血再灌注损伤模型[2]。

1.2 肾组织ICAM-1、整合素β2免疫组化观察

在体4%多聚甲醛20 ml灌注固定,冰冻切片,以兔抗人和大鼠ICAM-1多克隆抗体,羊抗大鼠整合素β2抗血清,SABC法染色。整合素β2阳性细胞采用高倍镜下随机计数10个视野计算其平均值。

1.3 原位杂交观察肾组织ICAM-1基因表达

采用5 μm厚冰冻切片,ICAM-1原位杂交试剂盒,按说明书进行。

1.4 肾功能测定

自动生化分析仪测定血肌酐水平。

1.5 统计学处理

采用华西医科大学医用统计程序行单因素方差分析及t检验。

2 结果

2.1 缺血再灌注后肾组织ICAM-1表达的改变

正常大鼠肾内ICAM-1表达稀少,缺血再灌注损伤后肾内ICAM-1表达显著增强,尤以髓质直小血管明显,见图1。

2.2 再灌注后肾组织整合素β2阳性细胞观察

再灌注后肾组织中浸润白细胞数量显著增加($P<0.01$),再灌注24 h达到高峰,见表1,图2。

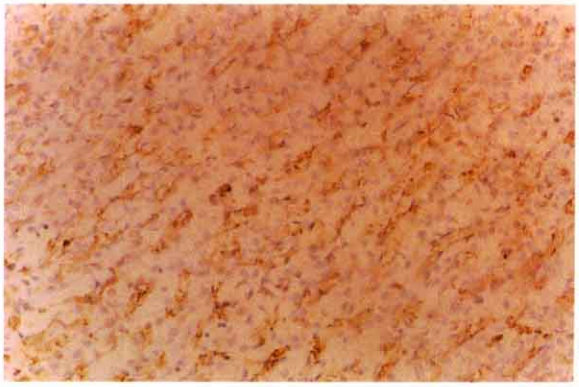


图1 再灌注24 h肾脏外髓ICAM-1染色 (SABC×200)

表1 缺血再灌注损伤后肾组织白细胞浸润($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

	假手术组	缺血组	再灌注组				
			1 h	6 h	12 h	24 h	48 h
β2(+) cells	2.9±0.72	5.6±0.67*	7.3±1.05*	11.7±1.15*	20.9±1.94*	35.1±2.13*	19.9±1.97*

*:$P<0.01$ 与假手术组比较

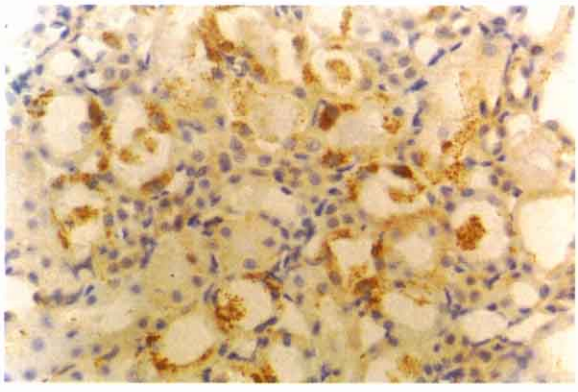


图2 再灌注24 h肾组织整合素β2阳性白细胞浸润 (SABC×400)

2.3 缺血再灌注后肾功能变化

再灌注后各时相点动物血浆肌酐(Scr)水平进行性增高($P<0.05$),见表2。

表2 缺血再灌注后血清肌酐改变(C_B/μmol·L^{-1}, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

	正常值	假手术组	再灌注组		
			6 h	24 h	48 h
Scr	67.8±9.76	74.4±8.07	116±14.88*	139±16.00**	223±21.30**

*:$P<0.05$, **:$P<0.01$ 与假手术组比较

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870348)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39870348)
作者简介:刘 宏(1968-),男,湖北省襄樊市人,博士,主治医师,讲师,主要从事急性肾衰及肾移植方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68754188
通讯作者:吴雄飞,电话:(023)68754188
收稿日期:2003-07-10;修回日期:2004-10-12

3 讨论

缺血再灌注损伤后肾组织炎细胞的浸润不仅是造成肾组织直接损伤的重要原因，而且可引起肾血管内皮细胞的损伤和免疫原性增强，导致进一步的免疫性损伤，从而在急性缺血性肾衰、移植肾功能延迟恢复、急性排斥的发生中发挥重要作用[1]。

我们以前的体外研究结果表明[3]：缺氧、氧化损伤均可导致内皮细胞粘附分子表达的改变；ICAM-1是介导PMN与内皮细胞牢固粘附的主要分子，加用ICAM-1抗体可明显抑制氧化损伤后粘附力的增加，反映出细胞间粘附力的增加与粘附分子表达增强的相互依从关系。本研究结果表明，体缺血再灌注损伤同样可导致ICAM-1表达的显著增强；并且ICAM-1的表达增强与炎细胞的浸润密切相关，是介导再灌注后炎细胞浸润的重要原因。

除通过粘附力的增加介导PMN等炎细胞的浸润外，粘附分子的表达还在促进浸润白细胞的激活并抑制PMN的凋亡中发挥作用；另一方面，浸润、活化的PMN可通过释出的花生四烯酸代谢产物、超氧离子及细胞因子导致进一步的内皮及组织损伤[4]，形成恶性循环。粘附分子拮抗在器官保存中的作用已引起重视，采用ICAM-1反义ODN可抑制冷保存肺、肾组织ICAM-1的表达并减少原发性的移植肺失功并延长移植物的存活期[5]。在器官保存中粘附分子拮抗的作用有两方面：①减少再灌注后局部PMN的浸润及继发的组织学损害，防止急性肾衰、移植物功能延迟恢复的发生；②减少移植免疫发生的强度。减少粘附分子的表达可减轻致敏T细胞的活化，从而有利于减轻排斥反应、增加免疫耐受发生的可能。

关键词：缺血再灌注；肾脏；ICAM-1
中图法分类号：R692.02 **文献标识码**：B

参考文献：

[1] Lauriat S, Linas S L. The role of neutrophils in acute renal failure[J]. Semin Nephrol, 1998, 18(5): 498-504.
[2] 刘 宏，金锡御，吴雄飞. 肾脏缺血再灌注后内皮素-1、一氧化氮改变[J]. 重庆医学，2002，31(4)：296-298.
[3] 刘 宏，吴雄飞，金锡御. 缺氧及氧化损伤后GEC粘附分子表达与粘附性改变[J]. 第三军医大学学报，2002，24(9)：1043-1045.
[4] Banda M A, Lefer D J, Granger D N. Postischemic endothelium-dependent vascular reactivity is preserved in adhesion molecule-deficient mice[J]. Am J Physiol, 1997, 273(6 Pt 2): H2721-H2725.
[5] Horimoto H, Nakai Y, Nakahara K, *et al*. HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin prolonged rat cardiac allograft survival by blocking intercellular signals[J]. J Heart Lung Transplant, 2002, 21(4): 440-445.

（编辑 栾 嘉）

文章编号：1000-5404(2005)15-1619-02

经验交流

人胆囊上皮细胞优化培养及其炎症模型建立

Optimized culture and inflammatory model establishment of human gallbladder epithelial cells

潘光栋[1]，程南生[1]，熊先泽[1]，刘江文[1]，李胜富[2]，张国福[3]，严律南[1]（四川大学华西医院：[1]普通外1科，[2]移植免疫实验室，[3]核医学科，成都 610041）

本研究结合国内外文献报道，进行胆囊上皮细胞(human gallbladder epithelial cells, HGBEC)的优化培养并建立其炎症模型

1 材料与方法

1.1 材料

正常胆囊2枚，DMEM培养基(Gibco)，Ⅳ型胶原酶(Sigma)，包被液(Ⅳ型胶原酶配成200 g/L)，200 ml/L小牛血清(成都哈里生物公司)，人内皮细胞生长因子(hEGF)(Sigma)，CK_{19}抗体(DAKO)，人白介素1β(hIL-1β)(Roche公司)，TNF-α、IL-6放免测定药盒(北京放射免疫研究所)。

1.2 方法

先用小牛血清包被培养基37 ℃烘干，再用200 g/L Ⅳ型胶原酶包被，37 ℃烘干后备用。无菌条件下剪开胆囊底部，以缓冲液及生理盐水反复冲洗胆囊粘膜，无菌纱布蘸干，刮擦胆囊粘膜层，收集细胞悬液，经100目筛网过滤后1 200 r/min离心10 min，再用DMEM培养液离心洗涤细胞沉淀2次。用DMEM生长培养基培养悬液洗涤后的细胞，按(5~10)×10^5/ml的细胞浓度接种于塑料培养皿内，37 ℃培养2 h以去除其中的非上皮细胞；同时以加有10 mg/L hEGF的DMEM培养基接种相同皿数的细胞，作为对照，共48孔。用台盼蓝染色活细胞数大于95%，置37 ℃、50 ml/L CO_2、饱和湿度二氧化碳培养箱内培养，24 h后全量换液，以后每2.5天换液1次；每24小时行细胞计数，用2.5 g/L胰蛋白酶和0.1 g/L EDTA消化3孔细胞计数，取均值绘制细胞生长曲线。培养第3天取出细胞固定于载玻片上，按常规方法以上皮细胞标记角蛋白CK_{19}的兔抗人IgG为一抗，HRP标记的羊抗兔IgG为二抗进行免疫组化染色，DAB显色，苏木精复染，进行细胞鉴定，同时观察细胞着色及细胞的纯度。另取一胆囊，以上述方法进行胆囊上皮细胞的分离、培养，接种于含10 mg/L hEGF的DMEM培养基，细胞数

基金项目：留学回国人员科研启动基金资助项目[2001(345)]
Supported by the Starting Funds for Personnel Returning From Overseas [2001(345)]
作者简介：潘光栋(1966-)，男，广西省北海市人，博士研究生，主治医师，主要从事肝胆外科临床、基础方面的研究。电话：(028)88054973，E-mail：pgdhs@126.com
通讯作者：程南生，电话：(028)85422467
收稿日期：2004-02-12；修回日期：2004-12-24