文章编号:1000-5404(2006)16-1701-03

论著

缺血预适应对缺血再灌注大鼠肾脏黏附分子表达的影响

范连慧,吴雄飞,余荣杰,赵洪雯,刘 宏,李 敛 (第三军医大学西南医院肾科,重庆 400038)

提 要:目的 研究缺血预适应对缺血再灌注大鼠肾脏黏附分子表达的影响。**方法** 采用缺血6 min,再通血4 min,循环4次的缺血预适应方案,对Wistar大鼠肾脏进行缺血预处理,再缺血60 min后进行再灌注,与缺血再灌注大鼠肾脏进行比较,观察大鼠肾功能及肾内黏附分子ICAM-1、P-Selectin、E-Selectin的表达变化。**结果** 缺血预适应大鼠肾脏内的黏附分子ICAM-1、P-Selectin、E-Selectin表达明显低于缺血再灌注组,在第48 h其血清肌酐也明显低于缺血再灌注组大鼠。**结论** 缺血预适应对肾功能有保护作用,其机制与减少缺血再灌注肾脏内黏附分子的表达有关。

关键词: 缺血预适应;ICAM-1;P-Selectin;E-Selectin;肾功能

中图法分类号: R322.61;R363;R364.12 **文献标识码:** A

Effect of ischemic preconditioning on ICAM-1, P-Selectin and E-Selectin in rat kidney

FAN Lian-hui, WU Xiong-fei, YU Rong-jie, ZHAO Hong-wen, LIU Hong, LI Lian (Department of Kidney, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effect of ischemic preconditioning on ICAM-1, P-Selectin and E-Selectin expression in rat kidney. **Methods** Totally 150 Wistar rats were randomly divided into sham operation group, ischemia/reperfusion (I/P) group and ischemic preconditioning (IP) group ($n=50$ in each group). IP was performed by 4 cycles of 6-minute ischemia followed by 4-minute reperfusion before 60-minute cold ischemia. The changes of renal function, expression of ICAM-1, P-Selectin and E-Selectin were detected in renal tissues at 1, 2, 12, 24, 48 h after operation. **Results** The expressions of ICAM-1, P-Selectin and E-Selectin in rat kidneys after IP were decreased, and the renal function was better than that in renal tissues of I/P rats. **Conclusion** IP can reduce the expression of ICAM-1, P-Selectin and E-Selectin, and has preventive effect on I/P kidneys.

Key words: ischemic preconditioning; ICAM-1; P-Selectin; E-Selectin; renal function

预适应是指给予某种刺激后机体器官对再次有害刺激产生的耐受性或适应性。器官在短暂缺血/再灌注后产生能耐受更长时间缺血的现象称为缺血预适应(ischemic preconditioning, IP)。研究表明,很多器官存在这种现象,如骨骼肌[1]、心脏[2]等。对于肾脏的缺血预适应现象,目前大多局限在对肾功能保护作用的宏观研究[3],对其保护作用机制研究较少。本实验利用大鼠的缺血再灌注模型,研究黏附分子在其保护机制中的作用和意义。

1 材料与方法

1.1 材料

2~3月龄Wistar大鼠150只,雌雄不限,体质量200~250 g,由第三军医大学实验动物中心提供。

山羊抗大鼠ICAM-1(中山公司,北京),山羊抗大鼠P-Selectin抗体(中山公司,北京),山羊抗大鼠E-Selectin抗体(Ancell,美国),SABC免疫组化试剂盒(博士德,武汉),生物素化兔抗山羊IgG(博士德,武汉)。

1.2 实验方法

将大鼠分成3组:假手术组(sham operation)、缺血再灌注组(I/R)、缺血预适应组(IP),每组50只。每组又分成1、2、12、24、48 h组,每组大鼠10只。采用1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(30~40 mg/kg),无菌下打开腹腔,切除右肾,游离左肾肾

作者简介:范连慧(1968-),男,河北省唐山市人,博士,主治医师,主要从事泌尿外科和肾移植方面的研究,发表论文10余篇,现在沈阳军区总医院泌尿外科。电话:(024)23051201

通讯作者:吴雄飞,电话:(023)68754188

收稿日期:2005-09-08;修回日期:2005-12-15

蒂,假手术组60 min后直接关闭切口;缺血再灌注组用微动脉夹夹闭左肾动静脉,60 min后放开,关闭切口;大鼠预适应组用微动脉夹夹闭肾动静脉6 min,再通血4 min,循环4次后,继以缺血60 min,放开微动脉夹,关闭切口。

各组大鼠均分别于关闭切口后1、2、12、24、48 h后活杀,取左肾标本于升汞4.5 ml+甲醛0.5 ml中固定15 min后,于5 ml苦味酸于4 ℃保存,以备病理检查。同时在活杀时经腔静脉取静脉血检查血肌酐水平。

1.3 免疫组化染色观察肾脏ICAM-1、P-Selectin、E-Selectin表达的变化

免疫组化染色按产品说明书进行。每个肾脏标本用ICAM-1、P-Selectin、E-Selectin抗体各染色10张切片,每张3张切片,随机计数5个高倍视野下的阳性细胞数,取其平均值作为每个检测指标的阳性细胞数。

1.4 统计学处理

结果以$\bar{x}\pm s$表示,应用SPSS统计软件进行方差分析和t检验。

2 结果

2.1 肾脏IP后黏附分子ICAM-1的变化

假手术组可见少数阳性细胞。在进行缺血再灌注后,免疫组化显示肾内ICAM-1表达增强,ICAM-1阳性细胞数在第2小时就有增加,并于12 h达到高峰,24 h时有下降趋势,48 h时仍较高($P<0.01$);主要表达在肾小球内皮细胞、肾小管周围毛细血管、及肾脏近曲小管上皮细胞。在进行IP后,ICAM-1阳性细胞相应减少,各时相点显著少于缺血再灌注组($P<0.05$)。见表1。

表1 缺血预适应对大鼠肾脏ICAM-1表达的影响(阳性细胞数/高倍视野)

组别	1 h	2 h	12 h	24 h	48 h
假手术组	0.6±0.70	1.0±0.67	1.2±0.92	1.1±0.74	1.2±0.63
缺血再灌注组	2.1±0.99	7.6±1.43[a]	12.9±2.33[a]	10.6±2.59[a]	7.1±1.37[a]
缺血预适应组	1.1±0.74	5.0±1.63[ab]	10.4±1.43[ab]	8.3±1.49[ab]	5.2±1.31[ab]

a: $P<0.01$,与假手术组比较;b: $P<0.05$,与缺血再灌注组比较

2.2 肾脏IP后P-Selectin的变化

假手术组阳性细胞数量极少。缺血再灌注后1 h P-Selection即在肾内广泛表达,包括肾小球系膜区、毛细血管襻、肾小管、肾间质等部位表达,以肾小管上皮细胞最显著,12 h达到高峰,以后下降。在进行IP后,P-Selection的表达明显降低($P<0.05$),见表2。

2.3 肾脏IP后E-Selectin的变化

假手术组表达极少。缺血再灌注2 h后,表达E-Selection的细胞增加,主要位于管周毛细血管,于第24 h表达最强;以后逐渐下降。IP组阳性细胞数量明显减少,见表3。

表2 缺血预适应对大鼠肾脏P-Selectin表达的影响(阳性细胞数/高倍视野)

组别	1 h	2 h	12 h	24 h	48 h
假手术组	1.5±0.85	1.5±0.85	1.3±0.67	1.2±0.63	1.5±0.85
缺血再灌注组	6.0±1.15[a]	9.9±1.52[a]	13.0±2.53[a]	4.7±1.16[a]	3.89±0.94
缺血预适应组	5.4±1.26[a]	6.4±1.65[a b]	10.8±1.81[ab]	4.4±1.65[a]	3.78±1.33

a: $P<0.01$,与假手术组比较; b: $P<0.01$,与缺血再灌注组比较

表3 缺血预适应对大鼠肾脏E-Selectin表达的影响(阳性细胞数/高倍视野)

组别	1 h	2 h	12 h	24 h	48 h
假手术组	0.6±0.70	1.0±0.82	1.0±0.67	1.0±0.57	1.11±0.63
缺血再灌注组	2.4±1.07	3.8±0.79[a]	6.2±1.14[a]	13.56±1.75[a]	3.1±1.1[a]
缺血预适应组	1.7±0.67	3.2±1.32[a]	4.4±0.97[ab]	8.44±1.49[ac]	2.8±1.23[a]

a: $P<0.01$,与假手术组比较; b: $P<0.05$, c: $P<0.01$,与缺血再灌注组比较

2.4 肾脏缺血再灌注及缺血预适应后肾功能的变化

大鼠肾脏缺血再灌注后,血清肌酐水平进行性升高,在第24 h血肌酐已显著高于1、2、6、12 h水平,并在第48 h肌酐达到140 μmol/L左右,发生ARF。而在IP组,肌酐虽然也升高,但趋势缓慢,在第1、2、12、24 h与IP组相应时相点比较无明显差异;第48 h与缺血再灌注组比较相差显著,见表4。

表4 缺血预适应对大鼠血清肌酐水平的影响(μmol/L)

组别	1 h	2 h	12 h	24 h	48 h
假手术组	57.0±3.16	54.0±4.18	62.4±2.65	60.6±4.22	61.8±5.67
缺雪再灌注组	49.4±2.79	55.4±5.59	58.6±5.98	79.8±7.6	139.0±11.55[a]
缺血预适应组	52.2±5.07	54.6±6.10	59.2±7.85	75.2±7.99	108.0±8.86[ab]

a: $P<0.01$,与假手术组比较; b: $P<0.05$,与缺血再灌注组比较

3　讨论

1986 年 Murry 等[2]首次观察到心脏的 IP 现象。以后研究表明机体的很多器官存在预适应现象，如骨骼肌、大脑[4]等器官。

对于肾脏缺血预适应现象，目前仅限于 IP 对缺血再灌注肾脏保护作用的宏观研究，而对 IP 保护肾脏的机制研究很少。Beauchamp 用培养的大鼠冠状动脉内皮进行缺氧预适应，采用缺氧 1 h 再复氧 1 h 的预适应方案，发现缺氧复氧后 ICAM-1 的表达增加，其基因表达的峰值是在缺氧复氧后 6 h，蛋白表达的峰值发生在缺氧复氧后 9 h。Zhou 等[5]用血管内皮细胞进行氧化应激预适应研究，发现预适应后 ICAM-1 和 E-selectin 表达均下降。在体研究表明，器官 IP 通过影响黏附分子及细胞因子的表达发挥对缺血再灌注器官的保护作用。Peralta 等[6]进行肝脏 IP 发现，IP 保护了肝脏的 I/R 损伤；同时还发现肝脏的预适应通过减少系统性 TNF 从枯否细胞释放，TNF 抑制 P-Selection 上调，从而阻断了全身肝脏以外器官的炎症损伤。我们研究发现，采用缺血 6 min、灌注 4 min，循环 4 次的 IP 方案，再缺血 1 h 并灌注 48 h，IP 显著降低了再灌注肾脏黏附分子 ICAM-1、P-Selectin、E-Selectin 的表达。大鼠血清肌酐明显低于缺血再灌注组，证实 IP 对肾脏功能有明确的保护作用，其机制与 IP 降低黏附分子表达密切相关。

我们认为，减少黏附分子的表达是 IP 预防再灌注肾脏损伤的主要机制之一。多项研究证实肾脏再灌注后黏附分子表达增加。通过对培养 HUVEC 的研究显示，低氧刺激使储存于 Weibel-Palade 小体中的 P-Selection 基因表达及释放增强。洪欣用培养的肺动脉内皮细胞研究发现，缺氧可使肺动脉内皮细胞内 vwF 小体大量释放，而导致 P-Selection 表达增加；缺氧复氧后内皮细胞 E-Selection 表达也增加[7]；阻断 P-Selectin 和 E-Selectin 表达均能保护肾脏的缺血再灌注损伤[8,9]。Klein 等发现，缺氧过程中 ICAM-1 的表达并无明显变化；而缺氧复氧后 ICAM-1 的表达增强；用 ICAM-1 基因敲除的大鼠和 ICAM-1 单克隆抗体研究，证实 ICAM-1 是缺血性急性肾功能衰竭的关键介质[10]。上述资料提示黏附分子在肾脏的缺血再灌注损伤中起重要作用。我们用缺血预适应的方法可明显降低黏附分子表达，结果证实对再灌注肾脏有保护作用，与其他方法阻断黏附分子表达作用结果类似，再次证实黏附分子表达增加在肾脏缺血再灌注损伤中起重要作用。

采用缺血预适应的方法，降低黏附分子表达，可以较其他方法单独阻断某一类型黏附分子更为简单，并从整体上降低各种黏附分子，应较单独阻断某一种或几种黏附分子效果更为确切可靠。可实现缺血再灌注肾脏整体器官意义上的保护作用，甚至通过控制炎症因子对其他器官实现保护作用，减少多器官障碍综合征的发生，更符合临床实际使用的需要。

参考文献：

[1] HOPPER R A, FORREST C R, XU H, *et al*. Role and mechanism of PKC in ischemic preconditioning of pig skeletal muscle against infarction[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000, 279(2): R666 - R676.

[2] MURRY C E, JENNINGS R B, REIMER K A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium[J]. Circulation, 1986, 74(5): 1124 - 1136.

[3] OGAWA T, NUSSLER A K, TUZUNER E, *et al*. Contribution of nitric oxide to the protective effects of ischemic preconditioning in ischemia-reperfused rat kidneys[J]. J Lab Clin Med, 2001, 138(1): 50 - 58.

[4] PASUPATHY S, HOMER-VANNIASINKAM S. Ischaemic preconditioning protects against ischaemia/reperfusion injury: emerging concepts[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2005, 29(2): 106 - 115.

[5] ZHOU S G, LEI X Y, LIAO D F. Effects of hypoxic preconditioning on the adhesion of neutrophils to vascalar endothelial cells induced by hypoxia/reo xygenation[J]. Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue, 2003, 15(3): 159 - 162.

[6] PERALTA C, FERNANDEZ L, PANES J, *et al*. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin upregulation in the rat[J]. Hepatology, 2001, 33(1): 100 - 113.

[7] KOO D D, WELSH K I, WEST N E, *et al*. Endothelial cell protection against ischemia/reperfusion injury by lecithinized superoxide dismutase[J]. Kidney Int, 2001, 60(2): 786 - 796.

[8] SINGBARTL K, LEY K. Protection from ischemia-reperfusion induced severe acute renal failure by blocking E-selectin[J]. Crit Care Med, 2000, 28(7): 2507 - 2514.

[9] ZHOU T, LI X, WU P, *et al*. Effect of anti-P-selectin monoclonal antibody on renal ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Chin Med J (Engl), 2000, 113(9): 790 - 793.

[10] 刘　宏，吴雄飞，李　敛. 大鼠缺血再灌注损伤后肾组织 ICMA-1 表达及炎细胞浸润[J]. 第三军医大学学报，2005，27(15)：1618 - 1619.

（编辑　栾　嘉）