DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.12.017
第24卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 12
2002年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2002

文章编号:1000-5404(2002)12-1413-03

论著

缺氧、氧化损伤对培养人TEC整合素α3表达的影响

刘 宏,吴雄飞,金锡御,余荣杰,赵洪雯 (第三军医大学附属西南医院全军泌尿中心肾科,重庆 400038)

提 要:目的 观察缺氧、氧化损伤后不同染色程序对培养肾小管上皮细胞(TEC)整合素α3染色结果的影响。方法 采用免疫荧光激光共聚焦观察乙醇固定及培养活细胞两种实验条件下TEC整合素α3分布的染色结果。结果 正常组TEC整合素α3主要于细胞基底部极性分布,缺氧、氧化损伤后出现向细胞侧缘及顶侧分布的趋势,活细胞染色仅缺氧组于细胞周缘有阳性荧光染色。结论 缺氧、氧化损伤后不同实验程序对TEC整合素α3染色结果有影响。

关键词:缺氧/氧化损伤;整合素;肾脏
中图法分类号:R322.61;R364.4;R392.11 文献标识码:A

Effects of anoxia and oxidative stress on integrin α3 expression in cultured human tubular epithelial cells

LIU Hong, WU Xiong-fei, JIN Xi-yu, YU Rong-jie, ZHAO Hong-wen (Department of Kidneys, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of anoxia and oxidative stress on the expression of integrin α3 in cultured human tubular epithelial cells (TECs). **Methods** After anoxia/oxidative stress, immunofluorescence staining and confocal microscopy were used to study the distribution of integrin α3 on the membrane of TECs under 2 experimental conditions, i.e., fixed or cultured living cells. **Results** The basal polar location of integrin α3 on normal TECs was weakened after anoxia/oxidative stress and tended to diffuse to lateral and apical surface of TECs in fixed condition, but in living cells the immunofluorescence only appeared at the lateral surface of TECs in anoxic groups. **Conclusion** Exposure of TECs to anoxia/oxidative stress results in the redistribution of integrin α3 from predominantly basal location to the apical and lateral cell surface, and different protocols affect the expression of integrin α3.

Key words: anoxia/oxidative stress; integrins; kidneys

缺氧、氧化损伤后肾小管上皮细胞(Tubular epithelial cell, TEC)的粘附性改变有可能是导致在体肾脏缺血再灌注(Ischemia/reperfusion, I/R)后TEC脱落及小管梗阻的重要因素,粘附分子特别是整合素α3分子的极性分布改变有可能是导致其粘附性改变的原因之一[1]。但对其极性分布变化的程度存在不同的实验结果,Gailit等[2]采用培养猴TEC氧化损伤模型研究表明损伤后存在整合素的顶侧分布,而Zuk等[3]的实验表明仅有侧向分布的趋势。我们的研究结果显示,缺氧、氧化损伤后整合素α3出现侧向分布的趋势,而顶侧分布不明显,不同实验程序和条件下的免疫荧光染色结果不同。

1 材料与方法

1.1 缺氧、氧化损伤模型的建立

人TEC株,以含10%小牛血清的1640培养液培养。于实验前24 h换用无血清1640培养液使细胞同步,实验前吸尽培养液,Hanks液冲洗2次后换用各实验用培养液。实验分组:对照组:无血清1640培养液;缺氧组:无血清无底物1640培养液加入终浓度为0.1 μmol/L的Antimycin A(可逆性阻断细胞氧代谢[4]);氧化损伤组:无血清1640培养液加入终浓度为0.1 mmol/L的H_2O_2。

1.2 TEC整合素α3分析

各实验组TEC加用处理因素120 min后以0.25%胰蛋白酶+0.02%的EDTA消化、离心后Hanks液冲洗3次,于37 ℃恢复10 min后加入1∶100兔抗人整合素α3多克隆抗血清于4 ℃孵育30 min,冷Hanks液冲洗3次,Cy3标记的羊抗兔二抗(1∶100)4 ℃孵育30 min。再次冷Hanks液冲洗3次后置4 ℃冰箱避光保存,于1 h内进行流式细胞仪分析。

1.3 固定的培养TEC整合素α3免疫荧光染色

细胞培养于以多聚赖氨酸处理的盖玻片上,各组加用处理因素120 min后以-20℃纯乙醇固定30 min。采用兔抗人整合素α3多克隆抗血清(1∶100),Cy3标记的羊抗兔二抗(1∶100),以正常PBS作为阴性对照,一抗、二抗均于37 ℃作用60 min。于激光共聚焦显微镜下观察,逐格上移共焦显微镜的聚焦层面,测量细胞由基底侧至顶侧Cy3染色荧光强度的变化。

1.4 活细胞整合素α3免疫荧光染色

各实验组均按前述方法加入处理因素,同时行免疫荧光染色,于加入处理因素后120 min于激光共聚焦显微镜下直接观察。

2 结果

2.1 流式细胞仪分析

正常组、缺氧组、氧化损伤组整合素α3表达量无明显改变,见图1。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(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
收稿日期:2002-03-20;修回日期:2002-06-10

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

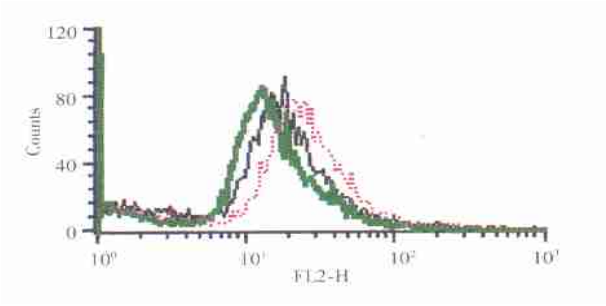
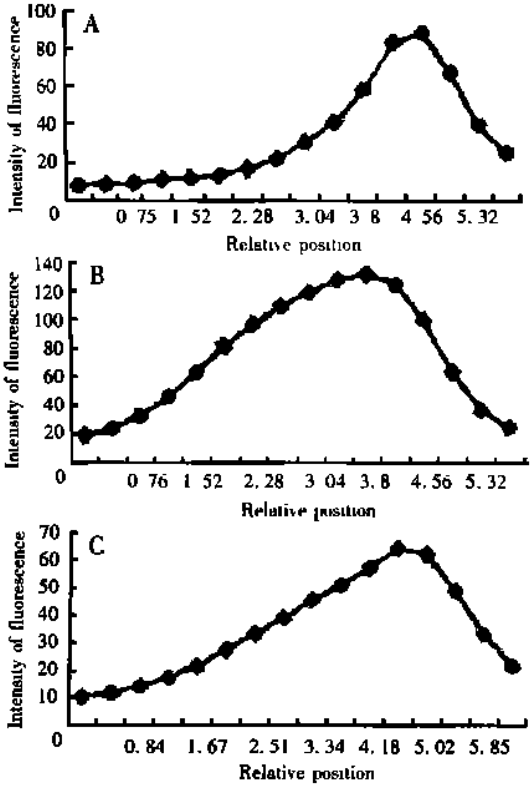


图 1 TEC 整合素 α3 流式细胞仪分析

Fig 1 FACS analysis of integrin α3 on TECs

2.2 固定的培养标本 TEC 整合素 α3 免疫荧光染色结果

以细胞顶端平面为基准，以检测平面与细胞顶端的相对距离为横坐标，相应检测平面的荧光强度为纵坐标绘制整合素 α3 在 TEC 表面不同层面的分布曲线显示，正常 TEC 整合素 α3 主要分布于细胞基底部，缺氧、氧化损伤后出现向细胞侧面及顶侧分布的趋势，以缺氧组改变明显，见图 2。



A: Normal; B: Anoxia; C: Oxidative stress

图 2 固定标本 TECs 整合素 α3 分布结果

Fig 2 Distribution of integrin α3 on fixed TECs

2.3 TEC 活细胞整合素 α3 免疫荧光染色结果

TEC 整合素 α3 于正常组及氧化损伤组未见明显阳性荧光染色，缺氧组可见阳性荧光染色于细胞周缘呈环状分布，见图 3。



图 3 缺氧组 TECs 整合素 α3 免疫荧光染色(活细胞)

Fig 3 Immunofluorescence staining of integrin α3 on living anoxic TECs

3 讨论

整合素是由 α 和 β 亚单位组成的异二聚体跨膜糖蛋白，包括较大的细胞外域、跨膜区、较小的细胞内域。其细胞外域与其特定的配体结合，细胞内域则通过 Talin、Vaculin 等中间蛋白与细胞内骨架蛋白相连。整合素参与细胞与基质及细胞间的粘附、信号传导、个体发育、分化、凋亡等生理病理过程[5]。因其 α 和 β 亚单位的不同可将整合素分为不同的亚型，α3、β1 是表达于 TEC 表面的主要粘附分子[3]。

多项实验已证实 I/R 损伤后 TEC 粘附性改变参与急性缺血性肾衰的发生，是导致细胞脱落、小管阻塞、原尿回漏的重要原因[6,7]。而粘附分子的改变是粘附性改变的基础。Gailit 等[2] 发现，体外培养的非洲绿猴 TEC 接受亚致死剂量的氧化损伤后活细胞免疫荧光染色发现，缺氧、氧化损伤均不引起整合素 α3 分子表达量的改变，但存在整合素在细胞表面分布的改变：损伤后整合素 α3β1 失去正常基底侧的极性分布而出现于细胞侧壁和细胞顶侧；但 Zuk 等[3] 通过在体 I/R 损伤模型却未发现明显的整合素 α3 顶侧分布，而仅有少量侧缘分布。这种差异是源于实验条件的差异还是损伤程度的不同目前尚无定论。

为进一步明确损伤后整合素 α3 分布的改变及导致其变化的损伤因素，我们采用人 TEC 株，化学缺氧、氧化损伤模型，首先采用活细胞 FACS 分析显示损伤后各组间细胞整合素 α3 表达量无明显改变；但活细胞免疫荧光染色激光共聚焦观察仅于缺氧组出现少量的阳性荧光染色，且均于细胞侧缘呈环状分布，与文献报道不符。通过与文献实验条件的对比分析显示其差异主要表面在：①培养介质不同：本实验采用多聚赖氨酸而文献采用基底膜成分；②标记抗体不同：本实验一抗为抗整合素 α3 多克隆抗血清，二抗标记 Cy3 产生荧光，Gailit 等[2] 的实验直接在一抗标记荧光。分析这一实验条件的不同可能通过对抗体通透性的影响产生实

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

验结果的差异，正常 TEC 整合素 α3 仅于细胞基底侧表达，因而无法在活细胞产生足够的抗原抗体反应导致显色反应，而缺氧损伤后于细胞侧缘表达的整合素 α3 则可直接与培养液中的抗体反应产生荧光。为证实这一推测，我们进一步采用纯乙醇固定细胞后加用 Triton-100 以增加抗体对细胞的通透性，染色后出现与 Gailit 相同的实验结果。实验结果显示，缺氧、氧化损伤后整合素 α3 的表达只存在分布的改变而无明显强度变化，活细胞仅缺氧组染色的原因源于活细胞对抗体分子不通透而在空间上阻碍了细胞基底侧表达的整合素 α3 与其相应抗体间的正常抗原抗体反应所致。活细胞仅缺氧组于细胞周边染色更加证实在本实验条件下缺氧后存在细胞整合素 α3 在侧缘的重新分布，表明损伤后确实存在着整合素分子分布的改变。通过我们在体肾缺血再灌注损伤后整合素 α3 的免疫金银染色结果也显示出明显的细胞侧缘及顶侧的分布改变。

本研究结果表明，缺氧、氧化损伤后 TEC 整合素 α3 均可出现明显的极性分布变化，这种变化有可能是导致细胞间粘附力增强而细胞与基底面粘附力减弱的的基础。

参考文献：

[1] Noiri E, Gailit J, Sheth D, *et al*. Cyclic RGD peptides ameliorate ischemic acute renal failure in rats[J]. Kidney Int, 1994, 46(4): 1 050—1 058.
[2] Gailit J, Colflesh D, Rabiner I, *et al*. Redistribution and dysfunction of integrins in cultured renal epithelial cells exposed to oxidative stress[J]. Am J Physiol, 1993, 264(1 Pt 2): F149—F157.
[3] Zuk A, Bonventre J V, Brown D, *et al*. Polarity, integrin, and extracellular matrix dynamics in the postischemic rat kidney[J]. Am J Physiol, 1998, 275(3 Pt 1): C711—C731.
[4] Canfield P E, Geerdes A M, Molitoris B A. Effect of reversible ATP depletion on tight-junction integrity in LLC-PK1 cells[J]. Am J Physiol, 1991, 261(6 Pt 2): F1 038—F1 045.
[5] Gumbiner B M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis[J]. Cell, 1996, 84(3): 345—357.
[6] Lieberthal W, McKenney J B, Kiefer C R, *et al*. Betax1 integrin-mediated adhesion between renal tubular cells after anoxic injury[J]. J Am Soc Nephrol, 1997, 8(2): 175—183.
[7] Romanov V, Noiri E, Czerwinski G, *et al*. Two novel probes reveal tubular and vascular Arg-Gly-Asp (RGD) binding sites in the ischemic rat kidney [J]. Kidney-Int, 1997, 52(1): 93—102.

（编辑　冷怀明）

文章编号：1000-5404(2002)12-1415-02

个案与短篇

口服聚乙二醇改性聚乳酸靶向分布实验

Studies on distribution of PELA after oral administration

曾韦锟，任建敏，邹全明　（第三军医大学医学检验系临床微生物学及免疫学教研室，重庆 400038）

聚乙二醇改性聚乳酸(PELA)是能在生物体内被水解或酶解后吸收并排出体外的高分子聚合物。它具有无毒、靶向、缓释性等优良性能，因此在载药方面显示出良好的应用前景。通过控制制造工艺，可以将其制成不同直径大小的微球，从而产生不同的定位效果[1]。本研究试采用与人在解剖结构上有较好可比性的小型猪为实验对象，采用造影剂示踪法，从大体上研究微球在动物胃肠道的靶向分布情况。

1　材料和方法

1.1　材料

聚乙二醇改性聚乳酸 PELA[P(L-PEG2000)(95∶5)]：M_v 20000-23000，(本室合成)。泛影葡胺(浓度为 60%)。聚乙烯醇(PVA-1788)：中国石化总公司四川维尼纶厂生产。LeitzDiaplan-光学显微镜 Wild MPS46、PHOTOAUTOMAT 、Wild Leitz、Wild MPS52 照相设备，德国生产。AMRAY 型扫描电子显微镜。WL-2 激光粒度分析仪，TV 显微系统（重庆大学光电学院研制），可见/紫外分光光度计 DU640（美国 BECKMAN），低温高速离心机（美国 BECKMAN），高速乳化制作器 T25B（美国），真空干燥器（国产），低温冷冻真空干燥器（国产）。CT 机（德国西门子公司）。雄性小型猪，体重为 20 kg(第三军医大学实验动物中心)。

1.2　方法

1.2.1　微球包裹泛影葡胺的制备方法　参照文献[2、3]制备，低温真空干燥，贮存备用。

1.2.2　微球的表征　微球表面形态用 AMRAY 型扫描电子显微镜照相观察；粒径分布用 WL-2 激光粒度分析仪测定；微球的粒径 M.D 用 LeitzDiaplan-光学显微镜目测，计算得数均粒径 $\bar{X}$，即 $\bar{X}=\Sigma X_i/n$，其中 X_i 为单个微球粒径；$\bar{X}$ 为数均粒径；n 为粒子数目(不少于 150)。结果平均粒径为 6.4 μm。

1.2.3　动物实验　动物实验前，禁食 1 d。经口灌服 20 ml 液体石蜡油。全麻插胃管，对照组灌服空微球(20 g)悬液，实验组灌服 PELA 包裹物悬液(20 g 微球内含包裹的泛影葡胺约为 10 ml)。于实验第 7 天禁食。经口灌服 20 ml 液体石蜡油。第 8 天 CT 下观察活体及胃肠组织(离体)。

2　结果

与口服空微球的对照组比较，口服 PELA 包裹泛影葡胺的实验组小型猪，活体检查可见局部肠壁密度增强，胃肠组织离体下，胃壁及小肠粘膜出现致密影。提示微球包裹物沿胃、肠壁沉积在小肠粘膜。

（下转 1419 页）

作者简介：曾韦锟(1974—)，男，贵州省贵阳市人，硕士，医师，主要从事病原微生物的检测及预防等方面的研究。电话：68753590
收稿日期：2001-06-06；修回日期：2001-12-12

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