DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.09.020
第24卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 9
2002年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2002

文章编号:1000-5404(2002)09-1043-03

论著

缺氧及氧化损伤后GEC粘附分子表达与粘附性改变

刘 宏,吴雄飞,金锡御 (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 探讨缺氧、氧化损伤对培养人肾小球内皮细胞(GEC)粘附分子表达及GEC与PMN粘附力的影响。方法 采用化学缺氧、氧化损伤模型,免疫荧光观察GEC粘附分子P、E选择素和ICAM-1的表达,微管吸吮直接测定单个GEC、PMN细胞间粘附力的改变。结果 缺氧、氧化损伤均可导致GEC细胞P、E选择素和ICAM-1的表达增强,以ICAM-1最明显,同时GEC、PMN间粘附力增强,加用ICAM-1抗体可显著抑制这一粘附力的增加。结论 缺氧、氧化损伤后GEC粘附分子表达增强,GEC、PMN细胞间粘附力的改变与GEC粘附分子变化密切相关。

关键词:缺氧/氧化损伤;粘附分子;微管吸吮
中图法分类号:R322.61;R364.4;R392.11 文献标识码:A

Expressions of adhesion molecules on glomerular endothelial cells and changes of adhesion properties after anoxia/oxidative stress *in vitro*

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

Abstract: Objective To explore the effects of anoxia/oxidative stress on the expressions of adhesion molecules on glomerular endothelial cells (GECs) and its adhesion properties. Methods Chemical anoxia/oxidative stress models of GECs were established, and the expressions of P-selectin, E-selectin and ICAM-1 in them were studied with immunofluorescence. Micropipette aspirate techniques were used to measure the adhesive forces between GECs and PMNs. Results Anoxia/oxidative stress increased the expression of P-selectin, E-selectin and ICAM-1, with the last one most obvious. Adhesive forces between GECs and PMNs increased simultaneously. Antibody to ICAM-1 inhibited the adhesive forces between GECs and PMNs markedly. Conclusion The expressions of adhesion molecules on GECs increased after anoxia/oxidative stress, and these changes are related to the changes of adhesive forces between GECs and PMNs.

Key words: anoxia/oxidative stress; endothelium; adhesion

缺血再灌注损伤后内皮细胞的活化和白细胞的浸润在急性缺血性肾衰的发生发展中有重要作用[1]。已有研究显示白细胞的浸润增加是通过其与内皮的粘附增强实现的,而表达于内皮和白细胞表面的选择素、细胞间粘附分子(Intercellular adhesion molecules, ICAMs)、整合素均参与这一过程[2],但仍缺乏对粘附分子改变与细胞间直接粘附力改变间关系的研究。本实验采用微管吸吮技术直接定量测定缺氧、氧化损伤后内皮细胞与中性粒细胞间的粘附力改变,观察相应的粘附分子表达改变,验证粘附分子表达与细胞间粘附力增强的关系并寻找起主要作用的粘附分子。

1 材料与方法

1.1 人肾小球内皮细胞培养

选用3~5月龄人工流产胚胎肾,按陈香美等[3]的方法行肾小球内皮细胞原代培养,兔抗人Ⅷ因子抗体(中山公司)染色鉴定,选择3~5代细胞进行实验。

1.2 人中性粒细胞分离

取正常成人新鲜血离心分离后的白膜层1 ml,以等渗比重为1.085的Percoll 3 ml于2 500 r/min行梯度离心,吸取白细胞层加入1 ml Hanks液重悬后加于3 ml比重1.077的淋巴细胞分离液2 000 r/min梯度离心,沉淀经涂片染色证实为中性粒细胞,以Hanks液冲洗2次后备用。

1.3 缺氧、氧化损伤模型建立

参照Canfield[4,5]的方法建立化学缺氧、氧化损伤模型,实验分为3组:正常组、缺氧组、氧化损伤组,均于实验前24 h换用无血清培养液使细胞同步,Hanks液冲洗2次后加入相应的实验培养液:正常组加入无血清培养液;缺氧组加入含0.1 μmol/L Antimycin A的无血清无底物培养液;氧化损伤组加入含0.1 mmol/L H_2O_2的无血清培养液。分别于37 ℃ 5% CO_2孵箱孵育2 h进行免疫荧光染色或粘附力测定。

1.4 GEC粘附分子的免疫荧光染色

细胞以-20℃纯酒精固定30 min,按常规免疫组化方法染色,一抗:羊抗人多克隆抗体(Santa Cruz公司),小鼠抗人E选择素单克隆抗体(Ancell公司产品),小鼠抗人ICAM-1多克隆抗体(Boster公司),均按1∶100稀释。二抗为FITC标记的兔抗山羊IgG抗体;FITC标记的羊抗小鼠IgG,均按1∶100稀释。一抗于4℃过夜,二抗于37 ℃ 30 min。各组均以PBS替代一抗作为阴性对照,于激光共聚焦荧光显微镜下观察,随机选取20个细胞,计算其平均荧光强度。

1.5 GEC-PMN间粘附力测定

培养GEC细胞于特制的圆形小室中长成单层后按前述方法建立细胞缺氧、氧化损伤模型,Hanks液冲洗后加入浓度为1×10⁷/ml的PMN 200 μl,于37 ℃静置30 min后吸除未贴壁细胞,200倍镜下随机选取10个视野统计粘附PMN数量,以微管吸吮系统测定粘附PMN与平铺于培养小室底面的GEC间分离

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,博士研究生,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7篇。电话:(023)68754188
收稿日期:2002-03-15;修回日期:2002-05-07

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

的临界负压值△P，按下述公式计算得出细胞间粘附力(F)和相对粘附应力(S)，计算公式：$F=\times\pi(Rp)^2\times\cos\theta$；$S=\triangle P\times(Rp/Rc)^2\times\cos\theta$，其中 Rp 为微管半径，Rc 为白细胞半径。各组实验均于 1 小时内完成。

1.6 氧化损伤＋ICAM-1 抗体对 PMN-GEC 粘附力的影响

按前述方法制备氧化损伤模型，与 PMN 同时加入 100 μl 1∶100 稀释的小鼠抗人 ICAM-1 多克隆抗体，同法统计粘附细胞数和 PMN-GEC 细胞间粘附力。

1.7 统计学处理

采用第四军医大学 Nosa 软件进行单因素方差分析及 t 检验，实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果

2.1 肾小球内皮细胞培养

成功进行人胎肾小球内皮微血管内皮细胞的培养，Ⅷ因子抗体染色证实细胞为内皮源性，细胞可正常传 6～8 代。

2.2 GEC 粘附分子免疫荧光染色

不同损伤因素对内皮细胞粘附分子表达的影响不同，氧化损伤可显著增强 P 选择素的表达，而单纯缺氧的影响不明显；缺氧及氧化损伤后 ICAM-1、E 选择素的表达均有增强，而以 ICAM-1 的改变较为显著。见表 1、图 1。

表 1 缺氧及氧化损伤后培养 GEC 粘附分子荧光强度变化($n=20$)

Tab 1 Immunofluorescence intensities of adhesion molecules on GECs after anoxia/ oxidative stress($n=20$)

	Control	Anoxia	Oxidative stress
P-selectin	84.03±4.10	81.93±3.98	117.01±4.10 *
E-selectin	54.29±1.35	80.13±1.99 *	97.16±1.48 *
ICAM-1	64.92±1.30	146.49±4.05 *	111.75±3.34 *

*：$P<0.01$ *vs* Control

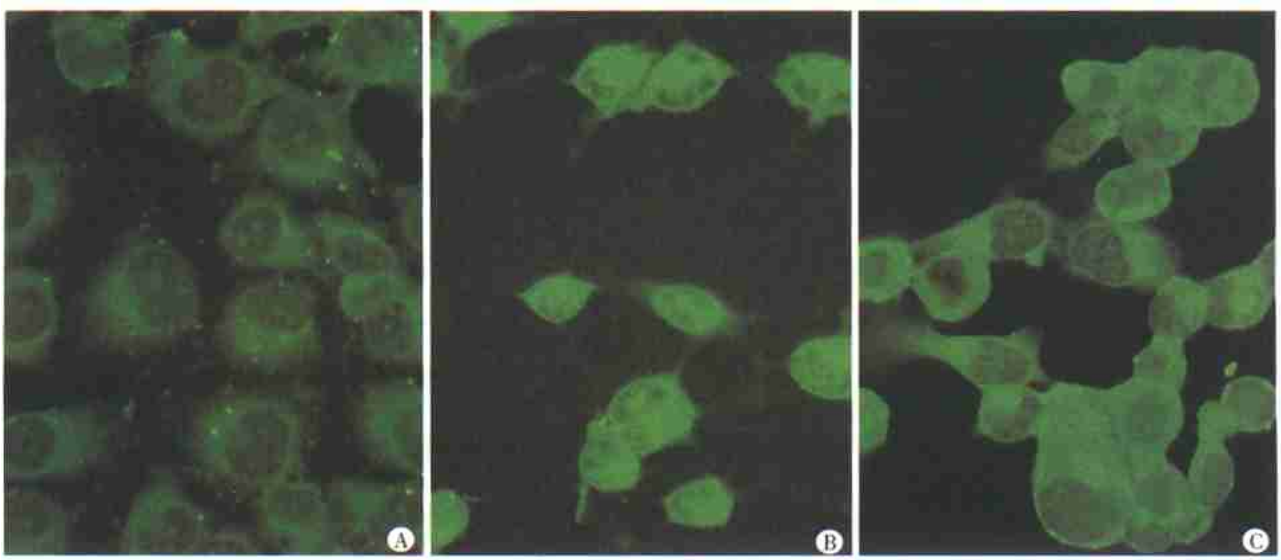


图 1 缺氧、氧化损伤后 GEC ICAM-1 表达改变

A：正常组 (免疫荧光×1000)；B：缺氧组 (免疫荧光×1000)；C：氧化损伤组 (免疫荧光×1000)

Fig 1 Expression of ICAM-1 on GECs after anoxia/ oxidative stress

A：Normal control (IF×1000)；B：Anoxia (IF×1000)；C：Oxidative stress (IF×1000)

2.3 GEC-PMN 细胞间粘附力测定

缺氧及氧化损伤均可导致内皮细胞与白细胞的粘附性增强，采用 ICAM-1 抗体可拮抗氧化损伤后 PMN-GEC 间的粘附性增强。通过镜下计数损伤后粘附细胞数量的实验结果与直接对粘附力的检测结果相一致。见表 2。

表 2 缺氧、氧化损伤后 GEC-PMN 粘附特性改变

Tab 2 Adhesive properties of GEC— PMN after anoxia/ oxidative stress

	Control	Anoxia	Oxidative stress	Anti-ICAM-1
Adhesive forces(N/m^2)	47.10±3.46	92.47±6.95 **	136.05±10.03 **	60.49±3.86 #
Number of Adhesive PMN	17.5±1.74	25.7±2.80 *	34.1±3.40 **	22.6±2.26 #

*：$P<0.05$ **：$P<0.01$ *vs* Normal；#：$P<0.01$ *vs* Oxidative stress

3 讨论

缺血再灌注损伤后肾组织炎细胞的浸润在急性缺血性肾衰的发生发展中有重要作用[6]。Kelly 等[7]于缺血再灌注前 16 小时采用白细胞抗血清清除体内中性粒细胞的实验表明，再灌注 24 小时血肌酐水平与血白细胞计数直接相关。采用抗体拮抗、基因敲除等在体研究表明[8～10]，表达于内皮和中性粒细胞的多种粘附分子均有可能在缺血再灌注后白细胞的浸润和肾脏组织损害中发挥作用。

不同的粘附分子在介导内皮细胞与白细胞粘附的作用不同，选择素主要与白细胞在内皮细胞表面的减速与滚动有关，而 ICAM-1 则主要介导内皮细胞与白细

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

胞的紧密粘附及跨膜趋化运动[9]。本实验采用体外培养的人肾小球内皮细胞缺氧、氧化损伤模型显示, 缺氧、氧化损伤均可导致内皮细胞粘附分子表达的改变, P 选择素仅对氧化损伤敏感, 而单纯缺氧对 P 选择素的表达增强作用不明显; 缺氧、氧化损伤后 ICAM-1 表达的改变最明显。这种不同粘附分子表达对缺氧、氧化损伤的不同反应及时相性变化有可能是在体损伤性刺激后介导白细胞在局部滞留及组织浸润这一复杂及连贯过程的生理基础。

既往的研究多采用直接或间接测算粘附于内皮的 PMN 总体数量的方法评价内皮-PMN 粘附性的改变[11, 12], 缺乏对单细胞间粘附力数值的定量测定, 无法令人信服的证实粘附分子变化与粘附力改变的依从关系。本实验采用微管吸吮技术直接测定单个内皮细胞与 PMN 间的粘附力, 显示缺氧、氧化损伤后二者间的粘附力显著增加, 尤以氧化损伤后明显。加用 I-CAM-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。我们的研究进一步证实了粘附分子改变与单细胞间粘附力改变的关系。通过同时计数粘附 PMN 数量表明粘附 PMN 数量与 GEC-PMN 细胞间粘附力存在明显相关性, 但微管吸吮法具有精确、直接、直观、灵敏的特点, 更适合对粘附力改变的定量观察。

ICAM-1 是介导 PMN 与内皮细胞牢固粘附的主要分子。我们的研究发现, 缺氧、氧化损伤均可导致内皮细胞 ICAM-1 表达的显著增强, 并伴有细胞间粘附力的增加, 加用 ICAM-1 抗体可显著抑制氧化损伤后的粘附力增强, 表明 ICAM-1 是介导内皮与 PMN 粘附力增加的主要粘附分子, 有效的拮抗或阻断在体缺血再灌注损伤后肾脏 ICAM-1 的表达是减轻和治疗肾脏缺血再灌注损伤的有效手段。

参考文献:

[1] Rabb H, O' Meara YM, Maderna P, *et al*. Leukocytes, cell adhesion molecules and ischemic acute renal failure[J]. Kidney Int, 1997, 51(5): 1 463—1 468.

[2] Dragun D, Haller H. Diapedesis of leukocytes: antisense oligonucleotides for rescue[J]. Exp Nephrol, 1999, 7(2): 185—192.

[3] 陈香美, 于力方, 陈中华, 等. 肾小球内皮细胞培养及产生细胞外基质的研究[J]. 中华医学杂志, 1995, 75(1): 25—28.

[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] 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.

[6] Iauriat S, Linas S L. The role of neutrophils in acute renal failure[J]. Semin Nephrol, 1998, 18(5): 498—504.

[7] Kelly K J, Williams-WW J, Colvin R B, *et al*. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury[J]. J Clin Invest, 1996, 97(4): 1 056—1 063.

[8] Kelly K J, Williams-WW J, Colvin R B, *et al*. Antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(2): 812—816.

[9] Singbartl K, Green S A, Ley K. Blocking P-selectin protects from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure(full text at doctor)[J]. FASEB J, 2000, 14(1): 48—54.

[10] Singbartl K, Ley K. Protection from ischemia-reperfusion induced severe acute renal failure by blocking E-selectin[J]. Crit Care Med, 2000, 28(7): 2 507—2 514.

[11] Kokura S, Wolf R E, Yoshikawa T, *et al*. T-lymphocyte-derived tumor necrosis factor exacerbates anoxia-reoxygenation-induced neutrophil-endothelial cell adhesion[J]. Circ Res, 2000, 86(2): 205—213.

[12] Kokura S, Rhoads C A, Wolf R E, *et al*. NF kappa b signaling in posthypoxic endothelial cells: relevance to E-selectin expression and neutrophil adhesion[J]. J Vasc Res, 2001, 38(1): 47—58.

(编辑　薛国文)

(上接 1042 页)

例 VATS 手术治疗观察, 认为 VATS 镜下视野广, 操作灵活, 探查病灶方便, 能彻底切除病灶, 降低复发率。

关于 VATS 治疗肺大泡手术, 我们的体会是: ①术中探查十分重要, 应按照一定的顺序寻找病灶, 以免遗漏病变。特别是肺萎陷状态时, 肺大泡亦可随之萎陷, 因此, 对术中未能发现肺大泡的病例, 抑或是对明显肺大泡已处理的病例都必须注水试验, 以明确是否存留病灶。②采用 Endo-GIA 切除肺大泡基底部要彻底, 应适当切除少量临界正常肺组织为宜, 否则易残留部分肺大泡, 导致术后漏气或复发。若肺大泡基部宽于 Endo-GIA 切除范围, 对残留部分应用钛夹、丝线套扎、缝扎。③对于巨大肺大泡或弥漫性肺大泡, VATS 手术操作难以完成的情况下, 可辅以小切口处理, 以保证手术效果。

对于肺大泡切除后是否常规作胸膜固定。我们的体会是: 如果肺大泡为孤立性, 且病人无肺部慢性疾病, 尤其是青少年患者, 术中切除彻底, 可不必作胸膜粘连固定术。而肺大泡呈弥漫性或肺大泡无法切除干净以及术中未发现有明确的肺大泡, 应行胸膜固定术, 以防气胸复发。常用干沙布或 Marlex 网于 1～5 肋部的壁层胸膜摩擦, 或喷洒无菌干燥滑石粉以及注射四环素等化学性药物行胸膜粘连, 以保证手术效果。

关键词: 电视胸腔镜; 自发性气胸; 治疗
中图法分类号: R561.405　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 梁　正, 李小伟, 刘丹丹, 等. 电视胸腔镜手术治疗自发性气胸[J]. 中华胸心血管外科杂志, 1998, 14(4): 201—202.

[2] 陈鸿义, 王　俊 主编. 现代胸腔镜外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 94—95.

[3] 赵凤端. 美国胸外科学会第 80 届年会的简介[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2000, 16(3): 191—192.

(编辑　王　红)

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