DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.033
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
1206 2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)10-1206-03

免疫组化及原位杂交检测人肺组织中的C5a受体

吕凤林[1,2],郑 萍[2],黄云辉[2],胡承香[1],朱锡华[2] (第三军医大学:[1]附属大坪医院野战外科研究所第一研究室,重庆 400042;[2]基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 检测正常人肺组织细胞上C5aR的表达和分布,阐明急性肺损伤、ARDS等病理发生过程中C5aR可能的作用。方法 以小鼠抗人C5aR短肽单克隆抗体作为检测抗体,对人肺组织细胞作免疫组织化学ABC染色;pUC19-C5aR质粒经*BamH*Ⅰ和*Hind*Ⅲ双酶切,得到910 bp的片段,地高辛标记制作原位杂交的探针,对肺血管内皮细胞作原位杂交检测。结果 发现肺血管内皮细胞有C5aR mRNA。肺泡上皮细胞、支气管上皮细胞、肺泡平滑肌细胞、血管内皮细胞以及巨噬细胞上均有C5aR表达。结论 C5a作为前炎症因子,与肺组织细胞上C5aR作用后,可能会介导急性肺损伤、ARDS等疾病的发生,说明这些疾病可能与C5a有关。

关键词:C5aR;补体;肺;CD88
中图法分类号:R322.35;R392.11 文献标识码:A

Detection of C5a receptors (CD88) in normal lung tissue with immunohistochemical technique and *in situ* hybridization

LU Feng-lin, ZHENG Ping, HUANG Yun-hui, HU Cheng-xiang, ZHU Xi-hua (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstracts: Objective To observe the expression and distribution of the C5a receptor on the cells of the normal lung tissues, for clarifying the roles of C5aR in the acute lung injury (ALI) and the acute/adult respiratory distress syndrome (ARDS). Methods The cell and tissue sample were detected by ABC methods using mouse anti-human C5aR McAbs as detecting antibody. The plasmid pUC19-C5aR was digested by *BamH*Ⅰ and *Hind*Ⅲ. A 910 bp segment was obtained and labeled by digoxin as a probe. The pulmonary micovascular endothelial cells (PVEC) was detected by *in situ* hybridication. Results Expression of C5aR was found in bronchial, alveolar epithelial cells, vascular smooth muscle and endothelial cells as well as macrophage. Conclusion As a pro-inflammatory factor, C5a anaphylatoxin reacts with C5aR and C5a and C5aR may play an important role in the acute lung injury (ALI) and the acute/adult respiratory distress syndrome (ARDS).

Key words: C5aR; complement; immunohistochemistry; lung

补体系统活化产物C5a是74个氨基酸残基组成的糖肽,是重要的炎症介质和过敏毒素,与靶细胞上C5a受体(C5aR,CD88)特异性结合。C5a在急性肺损伤、败血症、脑膜炎、风湿性关节炎、肾小球肾炎等病理发生过程中起重要作用[1,2],并可能与这些细胞上存在C5a受体有关。采用免疫组织化学的方法可快速、准确地检测细胞上的C5aR分子。C5aR是350个氨基酸残基组成的糖肽,7次穿越细胞膜,属G蛋白耦联受体超家族成员,研究表明其N端第9~30位氨基酸序列包含其有效的B细胞优势表位[3],以此制作的短肽单克隆抗体对阳性细胞上的C5aR分子有较高的亲和力。检测正常人肺组织C5aR表达及其分布对于探讨肺组织炎症的发生,尤其是探讨急性肺损伤和ARDS的病理过程具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试剂

自制小鼠抗人C5aR单克隆抗体[4],德国Gottingen大学M. Oppermann教授赠予的小鼠抗人C5aR单克隆抗体S5/1作阳性对照;pUC19-C5aR质粒由英国Sheffield大学Barker博士惠赠,该质粒上*Hind*Ⅲ-*EcoR*Ⅰ位点间有1 068 bp的人C5aR cDNA,SP™试剂盒为美国ZYMED公司产品,购自中山公司。

1.2 材料

分别取7月胎龄引产儿和成人肺组织,浸入Zamboin's液中固定5 h,再浸入含30%蔗糖的Zamboin's液中(4 ℃)至组织块沉至瓶底,30 μm厚连续冰冻切片漂于Zamboin's液中备用。按常规方法分离、培养肺毛细血管内皮细胞(PVEC)。

1.3 染色方法

免疫组织化学染色采用ABC法[5],主要步骤:冰冻切片置于含3% H_2O_2的10 mmol/L PBS中处理15 min,以封闭内源性过氧化物酶活性;正常羊血清继续封闭10 min;第一抗体为自制小鼠抗人C5aR短肽单克隆抗体和S5/1,工作浓度分别1∶250和1∶500,4 ℃孵育过夜;第二抗体为生物素标记的山羊抗小鼠IgG,工作浓度1∶200,37 ℃孵育1 h;DAB-H_2O_2显色液显色,非特异性对照组和阴性对照分别用正常小鼠血清和10 mmol/L PBS代替第一抗体,其余步骤同实验组。

1.4 封片观察拍照

显色后,将切片平展于洁净的载片上,空气中室温干燥过夜。二甲苯中透明,DPX封片,Olympus光学显微镜下观察并拍照。

1.5 地高辛随机引物标记C5aR cDNA探针

本室常规方法提取C5aR cDNA,经鉴定后采用B.M.公司地高辛随机引物标记试剂盒并按公司说明进行操作。

1.6 原位杂交检测PVEC细胞上C5aR mRNA的转录

按本室常规方法进行。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770315,39970330)
作者简介:吕凤林(1964-),男,四川省隆昌县人,博士,副研究员,主要从事C5a-C5aR相互作用和蛋白质分子设计方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68757431
收稿日期:2000-12-28;修回日期:2001-06-20

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

2　结果

人 C5aR cDNA 的酶切图谱, 见图 1。

肺毛细血管内皮细胞 C5aR 的表达和分布见图 2, 光镜下可见肺毛细血管内壁有一扁平的细胞层, 即内皮细胞, 其表面有密集深染的阳性颗粒, 只是深浅不一, 可能是细胞处于不同发育阶段, 其表面 C5aR 的表达存在的差异。肺血管平滑肌细胞表达 C5aR 见图 3, 镜下清晰可见典型的肺血管平滑肌细胞, 在细胞表面上有明显的 C5aR 表达。

支气管上皮细胞和肺泡上皮细胞表达 C5aR 见图 4, 肺支气管上皮细胞和肺泡上皮细胞是肺组织重要的功能细胞, 与上述细胞一样, C5aR 均有不同程度的表达。肺巨噬细胞表达 C5aR 见图 5。肺毛细血管内皮细胞 C5aR mRNA 的原位杂交结果见图 6。

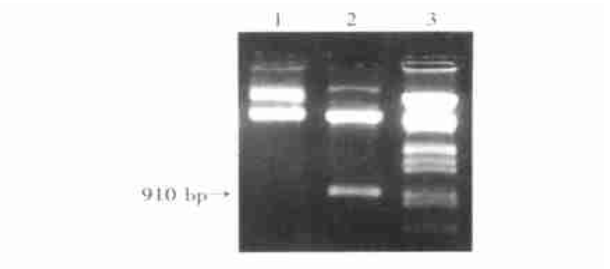


图 **1**　人 **C5aR cDNA** 酶切图谱

Fig 1　Diagram pattern of cDNA of the hC5aR

Line 1: Control plasmid; Line 2: Fragment of the hC5aR cDNA (910 bp); Line 3: Control λDNA by *EcoR* Ⅰ、*Hind* Ⅲ

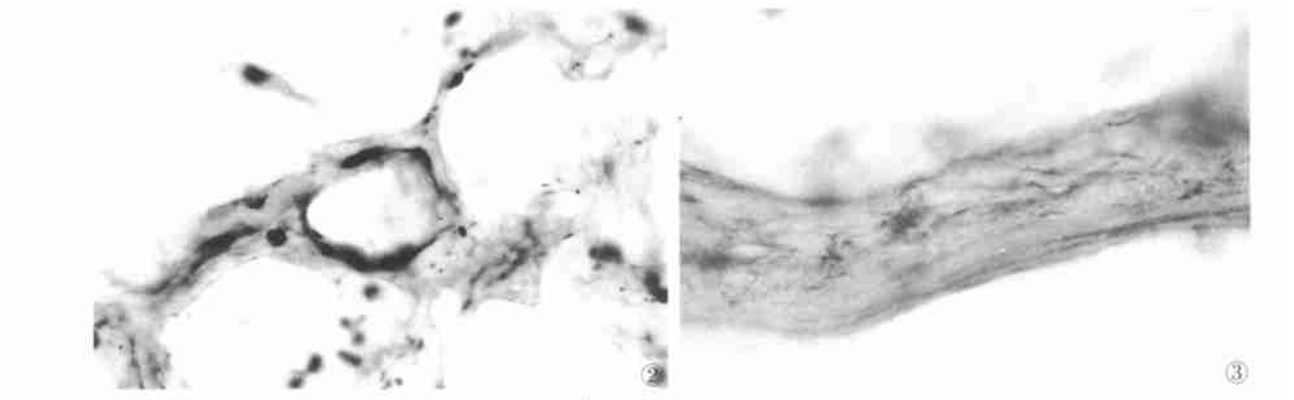


图 **2**　肺毛细血管内皮细胞表达 **C5aR**　(ABC× 100)

Fig 2　Expression of C5aR in pulmonary endothelial cell　(ABC× 100)

图 **3**　肺血管平滑肌细胞表达 **C5aR**　(ABC× 100)

Fig 3　Expression of the C5aR in smooth muscle cell　(ABC× 100)

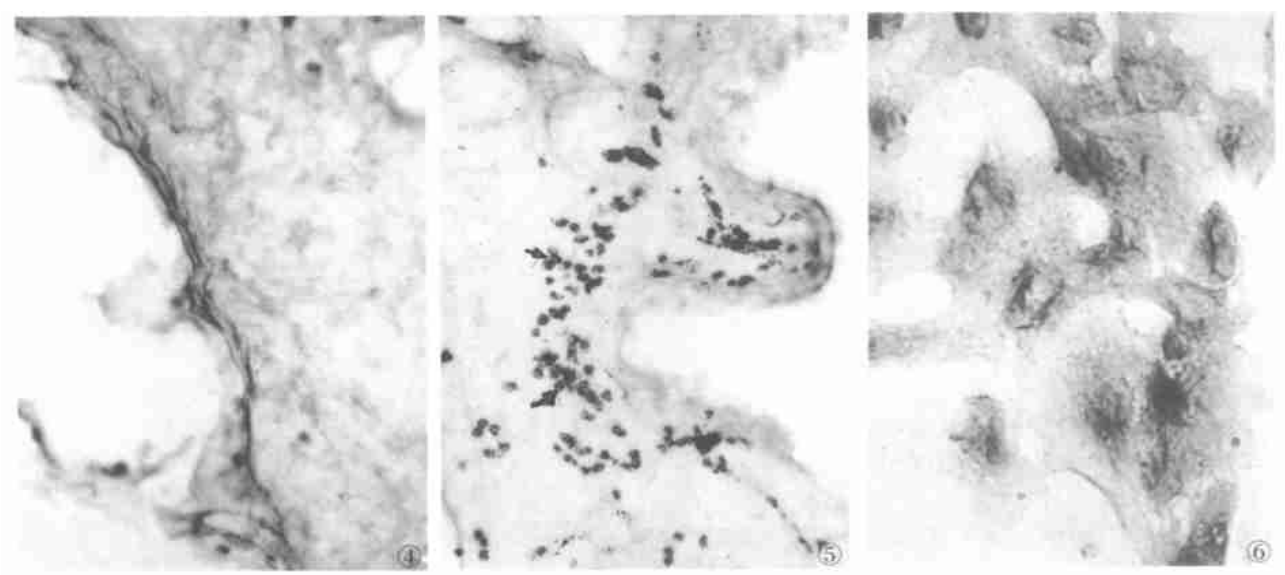


图 **4**　支气管上皮细胞和肺泡上皮细胞表达 **C5aR**　(ABC× 100)

Fig 4　Expression of the C5aR in bronchial and alveolar epithelial cells　(ABC× 100)

图 **5**　肺巨噬细胞高表达 **C5aR**　(ABC× 100)

Fig 5　Expression of the C5aR in pulmonary macrophage　(ABC× 100)

图 **6**　肺毛细血管内皮细胞 **C5aR** 的 **mRNA**　(ISH× 100)

Fig 6　mRNA of the C5aR in pulmonary endothelial cell　(ISH× 100)

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

3 讨论

烧伤、创伤、出血性休克、感染等因素是引起急性肺损伤(ALI)的重要原因,急性缺氧性呼吸衰竭的最终阶段是出现急性呼吸窘迫综合症(ARDS)。长期以来,人们认为 C5a 对血管平滑肌的致收缩作用依赖于组胺,本实验结果发现肺血管平滑肌细胞、支气管上皮细胞和肺泡上皮细胞上分布 C5aR,提示 C5a 可不依赖于组胺而直接实现对以上细胞的调节,内皮细胞膜上的 C5aR 受血清中 C5a 直接作用后,表现多种生理、病理功能。肺巨噬细胞和 PMN 甚至 T 细胞上也有 C5aR 表达[6,7],血清 C5a 作用肺血管内皮细胞(PVEC)和 PMN 上的 C5aR 后,诱导细胞表达 P-selectin CD11b/CD18、ICAM-1 等粘附分子[8],促进 PVEC 对 PMN 等白细胞的粘附,使白细胞移行穿越迁移至炎症部位,凝集、浸润肺组织,同时 PMN 还释放多种溶酶体酶,造成 PVEC 和其它肺组织细胞的损伤。C5a 与组织细胞上 C5aR 结合后,还刺激白细胞释放多种血管活性物质,使血管通透性增加,导致支气管、血管平滑肌收缩,引起出血、水肿等临床症状。但也有不尽一致的报道,Fayyazi 等[9]认为需要做更多的研究来予以证实。

本实验通过原位杂交和免疫组化的方法确定 C5aR 存在于肺血管内皮细胞,平滑肌细胞、支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞,这与 Haviland 等[6]的研究结果一致,他们采用免疫组化和 Northern 杂交的方法发现,C5aR 不仅分布在肺组织多种细胞上,而且在肺泡巨噬细胞上也有 C5aR 表达。

参考文献:

[1] Gasque P, Singhrao S K, Neal J W, *et al*. Expression of the receptor for complement C5a(CD88) is up-regulated on reactive astrocytes, microgila, and endothelial cells in the inflamed human central nervous system[J]. Am J Pathol, 1997, 150(1): 31—41.
[2] Morelli A, Larregina E, Chulayan E, *et al*. Expression and modulation of C5a receptor(CD88) on skin dendritic cells[J]. Immunology, 1996, 89(1): 126—134.
[3] 吕凤林,朱锡华. 人 C5aR(CD88)序列结构分析及其 B 细胞表位预测[J]. 免疫学杂志, 1998, 14(3): 153—157.
[4] 吕凤林,郑 萍,朱锡华. 小鼠抗人 C5aR(9-30)短肽单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 免疫学杂志, 2000, 16(4): 294—296.
[5] 蔡文琴,王伯[illegible]云 主编. 实用免疫细胞化学及核酸杂交技术[M]. 第 2 版. 成都:四川科学技术出版社, 1996. 300—360.
[6] Haviland D L, Mccoy R L, Whitehead W T, *et al*. Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor(C5aR): Demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung[J]. J Immunol, 1995, 154(3): 1 861—1 869.
[7] Nataf S, Davoust N, Ames R S, *et al*. Human T cells express the C5a receptor and are chemoattracted to C5a[J]. J Immunol, 1999, 162(7): 4 018—4 023.
[8] Foreman K E, Vaporciyan A A, Bonish B K, *et al*. C5a anaphylatoxin induced expression of P-selectin in endothelial cells[J]. J Clin Invest, 1994, 94(4): 1 147—1 155.
[9] Fayyzai A, Scheel O, Werfel T, *et al*. The C5a receptor is expressed in normal renal proximal tubular but not in normal pulmonary or hepatic epithelial cells[J]. Immunology, 2000, 99(1): 38—45.

(编辑 陈聪连)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2001)10-1208-01

肾上腺尿酸盐假性囊肿 1 例报告

A case report of adrenal false cyst containing urate

吴 刚,靳风烁,李黔生 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042)

患者,64 岁,男性。体检发现右肾上腺占位于 1999 年 7 月 5 日入院。体检无阳性发现。B 超:右肾上腺区探及 4.3 cm× 3.8 cm 低回声、边界清、形态尚规则的椭圆形包块,包膜尚完整。CT:右肾上腺区见 4.5 cm× 4.0 cm 大小实质性包块。密度比正常肾上腺组织略低,边界清晰,有完整包膜,增强后不被强化。实验室检查:血浆皮质醇浓度正常,但失去昼夜节律性;血浆醛固酮 165 pmol/L(卧位),略高于正常;24 h 尿 VMA 正常。术前未测定血及尿尿酸浓度。拟诊为右肾上腺占位性病变,行扩容 2 周后于全麻下行右肾上腺切除术。术中所见:于右肾上方扪及 7 cm× 5 cm× 5 cm 大小囊性包块,边缘光滑,包块下方与肾上腺组织相连,与周围组织无粘连,逐步分离并完整切除右肾上腺及包块。

病理检查:灰黄色卵圆形包块,下方附着少许淡黄色似肾上腺组织。包块大小为 7 cm× 5 cm× 3 cm,表面光滑,包膜完整厚约 2 mm,呈囊性感。切开后内充满淡黄色豆腐渣样物质。切片检查:包块囊壁为纤维结缔组织,无内皮及表皮细胞,内为大量红染、无定形的坏死物,其中含大量球形、呈折光性的尿酸盐结晶。周围附着正常肾上腺组织。病理诊断:肾上腺尿酸盐假性囊肿。术后 3、15、120 d 患者血及尿尿酸均正常。

讨论

肾上腺囊肿较为少见。因患者多无临床症状,一些较大囊肿只在体检中被发现。其分类为寄生虫性、表皮性、内皮性及假性囊肿。其中假性囊肿约占 39%。假性囊肿多由于肾上腺出

(下转 1211 页)

作者简介:吴 刚(1973—),男,重庆市人,硕士,医师,主要从事高强度聚焦超声治疗肿瘤及膀胱组织工程学方面的研究。电话:(023)68757344

收稿日期:2000-04-20;修回日期:2000-08-10

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