DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.06.016

急性胆管炎时肝组织ICAM-1与循环PMN表面CD11b、CD18的表达变化

黄显凯* 韩本立** 朱锡光 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所普通外科)重庆,400042

提 要 目的:观察急性胆管炎时大鼠肝组织ICAM-1与循环PMN表面CD11b、CD18的表达变化。方法:应用原位分子杂交和斑点杂交技术观察胆道感染时ICAM-1 mRNA在肝组织的定位及转录表达强度;用流式细胞仪测定PMN表达CD11b及CD18的阳性率。结果:ICAM-1 mRNA原位杂交显示胆道感染3 h后肝窦内皮细胞、枯否细胞和肝小叶中央静脉内皮细胞阳性反应增强,12 h阳性反应最强。斑点杂交显示胆道感染后3 h肝组织ICAM-1 mRNA含量开始增高,12 h达高峰。循环PMN表达CD11b和CD18的阳性率3 h以后明显增高。结论:胆道感染大鼠肝窦内皮细胞等表面ICAM-1与循环PMN表面CD11b、CD18的表达显著增强。

关键词 胆道感染;ICAM-1;CD11b;CD18

中图法分类号 R392.11;R575.7

ICAM-1与配体CD11b/CD18是非常重要的几种粘附分子,在中性粒细胞(Polymorphonuclear, PMN)与微血管内皮细胞粘附,穿越内皮迁移,参与炎症反应过程中发挥重要作用。本实验应用原位分子杂交、斑点杂交、免疫组化和流式细胞仪分析观察胆道感染时这些粘附分子的表达变化,并探讨其在胆道感染肝损害中的意义。

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组

Wistar大鼠,雌雄不拘,体重200～250 g,自由进食进水。动物随机分为3组:①正常对照组;②假手术(SO)组:动物乙醚吸入麻醉,无菌条件下开腹,游离胆总管,然后关腹。③急性胆管炎(AC)组:同样条件下开腹,分离胆总管,结扎远端,近端注入0.3 ml大肠杆菌菌液(E. Coli. O111B4,北京生物制品鉴定所),结扎近端胆总管,关腹。各组分别于3、6、12、24 h取材,每个时相点6只动物。

急性胆管炎大鼠12 h开始发生死亡,存活率仅为70%,24 h存活率仅为45%,SO组各时相点均无死亡。AC组3 h始出现梗阻近端胆管扩张,肝充血肿胀,胆管中充满黄白色脓性胆汁,12 h肝表面可见多发性粟粒样脓肿,24 h融合成较大的脓肿。光镜下见AC组各时相肝小叶间胆管扩张,肝细胞索排列紊乱,肝窦扩张,肝细胞呈现细胞水肿,肝细胞散在小片坏死,24 h肝细胞出现大片状坏死。电镜下见AC组6 h后毛细胆管明显扩张,微绒毛减少,肝细胞线粒体肿胀,嵴断裂、灶性空化或基质浓缩。粗面内织网及滑面内织网扩张。急性胆管炎大鼠肝功能发生明显损害,结果见表1。

表1 急性胆管炎血浆LDH和GPT含量变化(IU/L)

Tab 1 Change of plasma LDH and GPT following acute cholangitis (IU/L)

		Pre-operation	Post-operation			
			3 h	6 h	12 h	24 h
SO	LDH	183.2±15.6	195.3±11.8	192.9±10.0	196.1±12.2	194.8±16.9
	GPT	25.5±4.2	28.5±4.9	29.5±6.7	30.0±8.1	35.3±7.5
AC	LDH	183.3±15.6	227.3±14.8	450.3±144.6*	1 442.6±388.8*	1 615.6±477.2*
	GPT	25.5±4.2	33.2±6.4	52.1±14.3*	132.8±31.2*	185.1±17.2*

*:$P<0.01$ *vs* SO

1.2 取材

大鼠麻醉后,开胸,经左心室-主动脉插管灌注生理盐水约200 ml,然后灌注4%多聚甲醛150～200 ml,30 min后取出肝组织,投入4%多聚甲醛液置冰箱继续固定,24 h后取出肝组织,放入20%蔗糖溶液(4%多聚甲醛配制)过夜,取出标本在-70℃保存备用。

1.3 原位分子杂交

将ICAM-1 cDNA质粒转化到大肠杆菌(JM109)中并扩增,用酚、氯仿抽提质粒并纯化,电泳鉴定。加入内切酶*EcoRI*、

* 黄显凯,男,43岁,副主任医师,副教授,博士

** 附属西南医院肝胆外科中心 重庆,400038

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

KpnI 将 ICAM-1 酶切，制备线性 DNA 模板。用地高辛标记 CAM-1 cDNA 探针。冰冻切片机将肝组织切 30 μ 冰冻切片，参照文献[1]方法进行原位分子杂交。原位杂交对照采用以下两种方法：①杂交前将切片用 20 μg/ml RNA 酶预处理 30 min；②杂交液中不加核酸探针或加地高标记的顺义探针。

1.4　RNA 提取及斑点杂交

用异硫氰酸胍提取肝组织 RNA，进行斑点杂交[1,2]，显影结果用计算机扫描仪扫入，测定各杂交点的光密度值，并作相对定量。

1.5　PMN 表面 CD11b 及 CD18 的阳性率测定

参照严鸣等[3]的方法分离大鼠 PMN 并调至 5×10^6/ml，取 0.2 ml 加入到 5 ml 试管（内含 1×10^6 细胞），加入鼠抗大鼠 CD18 或 CD11b 单抗 10 μl（意大利 Rossi 教授惠赠），室温孵育 30 min，再加入兔抗鼠荧光抗体（华美公司）10 μl 室温置 30 min，加入 1 ml 1%多聚甲醛溶液。用 PACSCAN 流式细胞仪测定。

2　结果

2.1　肝组织 ICAM-1 原位杂交

正常肝组织可见少许散在分布的阳性反应细胞，呈紫蓝色颗粒，主要见于肝窦内皮细胞，枯否细胞和肝小叶中央静脉内皮细胞也呈阳性反应。胆道感染后阳性反应增强，表现阳性细胞数量增多，细胞内阳性颗粒逐渐增多，蓝色变浓，胆道感染后 12 h 阳性反应最强，24 h 阳性反应开始减弱，但仍较正常肝组织阳性反应强。

2.2　肝组织 ICAM-1 斑点杂交

胆道感染后 3 h 肝脏 ICAM-1 mRNA 含量开始增高（$P<0.01$），且逐渐增高，感染后 12 h 达高峰，24 h 呈下降趋势，见表 2。

表 2　急性胆管炎肝组织 ICAM-1 mRNA 含量变化（μg/g）

Tab 2　Change of ICAM-1 mRNA content of hepatic tissue following acute cholangitis (μg/g)

Group	Pre-operation	Post operation			
		3 h	6 h	12 h	24 h
SO	14.8±2.6	21.8±7.5	26.5±6.4	23.6±8.3	24.3±6.5
AC	14.8±2.6	64.8±12.5*	83.4±23.3*	158.7±32.6*	63.7±16.7*

*：$P<0.01$ *vs* SO

2.3　循环 PMN 表面 CD11b、CD18 表达变化

正常大鼠循环 PMN 表达 CD18 的阳性率仅 6.2%，而胆道感染大鼠循环 PMN 3 h CD18 阳性细胞增多（$P<0.01$），并逐渐增高。正常大鼠循环 PMN 表达 CD11b 的阳性率仅 6.5%，而胆道感染大鼠各时相点循环 PMN CD11b 阳性细胞增多（$P<0.01$），见表 3。

表 3　急性胆管炎循环血 PMN 表达 CD11b、CD18 阳性率变化（%）

Tab 3　Change of postive rate of PMN express CD11b、CD18 following acute cholangitis (%)

		Pre-operation	Post operation			
			3 h	6 h	12 h	24 h
SO	CD18	6.2±1.5	12.3±3.6	13.2±4.1	13.3±4.2	12.6±6.2
	CD11b	6.5±1.9	11.3±2.8	13.6±3.6	10.2±4.7	11.3±3.3
AC	CD18	6.2±1.5	16.0±2.3*	25.7±3.5*	35.0±6.1*	46.2±5.3*
	CD11b	6.5±1.9	16.5±2.8*	22.3±5.7*	33.8±3.9*	46.3±5.9*

*：$P<0.01$ *vs* SO

3　讨论

PMN 在组织和脏器的大量聚集和过度活化可对宿主产生破坏作用，造成组织损伤。在严重感染、组织缺血、缺氧等情况下，PMN 与微血管内皮细胞粘附性增强，通过黄嘌呤脱氢酶-氧化酶系统，髓过氧化物酶系统，NAKPH 氧化酶系统等产生大量氧自由基，造成血管内皮细胞损伤，并使微血管通透性增高。PMN 在趋化因子作用下穿越血管内皮细胞迁移到周围组织，释放活性氧，水解蛋白酶及脂类代谢产物，造成脏器的细胞损害。近年来研究发现 PMN 对组织细胞的损害作用呈粘附依赖性，即依赖 PMN 与微血管内皮细胞的粘附，而这种粘附的分子基础是 PMN 和血管内皮细胞表面细胞粘附分子的表达变化[4]。

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

PMN表面粘附分子CD11b、CD18和内皮细胞表面粘附分子ICAM-1是PMN与微血管内皮细胞粘附过程中非常重要的几种粘附分子。CD11b和CD18储存于PMN第二和第三级颗粒的储存池内，当PMN活化时PMN的CD11b和CD18由细胞内颗粒向细胞表面转位，以及颗粒膜与胞质膜融合，导致PMN表面CD11b及CD18显著增高。CD11b和CD18的配体ICAM-1是一种诱导性抗原，应答IL-1、TNF、IFNγ或LPS等细胞因子及炎症介质在内皮细胞等细胞上表达。ICAM-1广泛分布于内皮细胞等细胞上，合成的蛋白储存于细胞颗粒内，当受到细胞因子等刺激时转位到细胞膜上，使细胞表面表达增加。研究表明CD11b/CD18及配体ICAM-1在PMN后期与血管内皮细胞牢固粘附和穿越内皮迁移中发挥关键性作用[5~7]。PMN活化后CD11b和CD18质和量发生改变，而PMN的粘附和穿越内皮迁移与CD11b和CD18表达量上调及构型改变有关[8]。PMN与内皮细胞粘附后造成内皮细胞损伤，血管内皮通透性增高，也为PMN穿内皮迁移提供了有利条件。

全身感染时，TNF、IL-1、IFNγ及LPS等刺激下，PMN及各脏器微血管内皮细胞表面的相关粘附分子表达增强，从而介导一系列炎症反应。关于胆道感染时肝组织粘附分子的表达变化及其在肝脏损害机制中的作用还不清楚。本实验结果显示胆道感染大鼠肝窦内皮细胞等细胞表面ICAM-1与循环PMN表面CD11b、CD18的表达显著增强，且其水平变化与肝损害的组织学改变及肝功能损害相一致，表明胆道感染初期这些粘附分子表达明显上调，为PMN与肝窦内皮细胞粘附和迁移提供了分子基础，可能在胆道感染肝脏损害等发生机制中具有重要意义。

参考文献

1 蔡文琴，王伯沅 主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术. 成都：四川科学技术出版社，1994. 406～434

2 Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, *et al*. Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion induced liver injury in rats. J Surg Res, 1991, 51(2): 140

3 严 鸣，龚肖崎，张亚霏. 大鼠中性粒细胞的分离及糖皮质激素受体阻断率的测定. 第二军医大学学报，1994，15(1)：85

4 金伯泉. 主编. 细胞和分子免疫学. 北京：世界图书出版公司，1994. 35～47

5 Rosen S D, Bertozzi C R. The selectins and their ligand. Curr Opin Cell Biol, 1994, 6(5): 663

6 Ley K E, Bullard D, Arbones M L, *et al*. Sequential contribution of L-and P-selectin to leukocyte rolling *in vivo*. J Exp Med, 1995, 181(8): 669

7 Schleiffenbaum B, Fehr J. Regulation and selectivity of leukocyte emigration. J Lab Clin Med, 1996, 127(2): 151

8 Chatila T A, Geha R S. Arnaout M A, *et al*. Constitutive and stimulus-induced phosphorylation of CD11/CD18 leukocyte adhesion, J Cell Biol, 1989, 169(6Pt2): 3435

（收稿：1998-09-15；修回：1999-01-22）

（编辑 汪勤俭）

Changes of ICAM-1 expression in the liver and CD11b and CD18 expression in PMNs in severe cholangitis in rats

Huang Xiankai, Han Benli, Zhu Xiguang (Department of General Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract Objective: To study of ICAM-1 expression in the liver and CD11b and CD18 expression in PMNs during severe cholangitis in rats. Methods: Expression of ICAM-1 mRNA in the liver was determined with *in situ* hybridization and dot hybridization and expression of CD11b and CD18 in PMNs with flow cytometry. Results: ICAM-1 mRNA expressed mainly in the sinusoidal endothelial cells, kupffer cells and the endothelial cells of the central vein of a hepatic lobule. The expression and the relative quantity of ICAM-1 mRNA began to increase in the 3rd h after infection and reached the peak in the 12th hour. The expression of CD11b and CD18 in PMNs also began to be positive in the 3rd hour after infection and reached the peak in the 12th hour. Conclusion: Expression of ICAM-1 in the liver and CD11b and CD18 in PMNs are markedly increase in severe cholangitis.

Key words cholangitis/acute; ICAM-1; CD11b; CD18; rat

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