

· 实验研究 ·

新生儿窒息后血清诱导人肾小管细胞 粘附中性粒细胞的作用及机制

付慧¹,董文斌¹,龙汉安²,邓存良³,王明勇³,许开桂¹

(泸州医学院:1.附属医院新生儿科;2.基础医学院病理学教研室;3.附属医院传染与免疫研究室,四川 泸州 646000)

[摘要] 目的 研究新生儿窒息后血清诱导的人肾小管细胞粘附中性粒细胞的作用及机制。方法 以HK-2细胞株为研究对象,用含20%的窒息后血清作为诱导因素。实验分空白对照组、窒息组(窒息后1,3,7 d组)和吡咯烷二硫氨基甲酸(PDTC)干预组。分别检测各组细胞悬液中髓过氧化物酶(MPO)活性;检测HK-2细胞膜ICAM-1和细胞核内NF- κ B的表达。结果 窒息后1 d血清组细胞悬液MPO值显著高于各PDTC干预组、对照组及窒息后3,7 d血清组($P < 0.01$)。窒息后1 d血清组HK-2细胞表面ICAM-1表达和HK-2细胞核NF- κ B表达亦显著高于各PDTC干预组、对照组及窒息后3,7 d血清组($P < 0.01$)。结论 窒息后血清可以诱导肾小管上皮细胞活化进而粘附中性粒细胞,其作用机制可能涉及到窒息后血清活化了NF- κ B,从而使肾小管上皮细胞膜表面ICAM-1表达增加,进而粘附中性粒细胞。 [中国当代儿科杂志,2008,10(5):633-636]

[关键词] 新生儿窒息;血清;肾小管上皮细胞;中性粒细胞;细胞间粘附因子;核因子- κ B

[中图分类号] R722 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)05-0633-04

Role of serum from asphyxiated neonates in the inducement of human renal tubular cell adhesion to neutrophils

FU Hui, DONG Wen-Bin, LONG Han-An, DENG Cun-Liang, WANG Ming-Yong, XU Kai-Gui. Department of Neonatology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China (Dong W-B, Email: dongwenbin2000@163.com)

Abstract: Objective To study the role of serum from asphyxiated neonates in the inducement of human renal proximal tubular epithelial cells (HK-2) adhesion to neutrophils and possible mechanisms. **Methods** HK-2 cells were cultured randomly with 20% serum from neonates (1, 3, and 7 days after asphyxia), pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) or placebo. The activity of myeloperoxidase (MPO), an indicator of adhesion ability of HK-2 cells to neutrophils in suspensions, was detected by the biochemistry assay. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) of HK-2 cells were examined with the immunohistochemical staining. **Results** The expression of MPO in the post-asphyxial 1-day serum treatment group were significantly higher than that in the PDTC treatment and the control groups as well as the post-asphyxial 3 and 7-day serum treatment groups ($P < 0.01$). The expression of ICAM-1 and NF- κ B in the post-asphyxial 1-day serum treatment group was also significantly higher than that in the other groups ($P < 0.01$). **Conclusions** Serum from asphyxiated neonates can induce HK-2 cell adhesion to neutrophils, possibly through activating NF- κ B and increasing the synthesis and expression of ICAM-1 on the surface of renal tubular epithelial cells. [Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10 (5):633-636]

Key words: Neonatal asphyxia; Serum; Renal tubular epithelial cell; Neutrophil; Intercellular adhesion molecule; Nuclear factor- κ B

新生儿窒息导致的多器官功能损伤中,以肾损伤发生率最高^[1],而肾小管是最早、最为敏感的部位。我们前期研究显示^[2,3]:新生儿窒息后血液及尿液中存在各种损伤因子升高,这些损伤因子随再灌注血流进入至肾组织导致肾损伤的发生。根据窒息后

发生肾损伤的再灌注原理^[4],我们前期工作将窒息后血清作为再灌注因素,建立了窒息后血清诱导肾小管损伤的细胞模型,观察到窒息后血清可诱导肾小管细胞损伤、活化^[5,6],但是活化的肾小管是否可以粘附再灌注血流中炎症细胞在肾脏滞留,尚不清

[收稿日期]2007-12-01;[修回日期]2008-03-15

[基金项目]四川省杰出青年学科带头人培养基金(NO.04ZQ026-033);四川省中医管理局重点科研基金资助(NO.200239)。

[作者简介]付慧,女,硕士,医师。主攻方向:新生儿疾病。

[通讯作者]董文斌,教授,泸州医学院附属医院新生儿科,邮编:646000。

楚,本研究对此进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

人近曲肾小管上皮细胞(HK-2),引自 ATCC (American Type Culture Collection); DMEM/F12 培养基(美国 GIBCO 公司);标准胎牛血清(天津灏洋生物);胰酶和吡咯烷二硫氨基甲酸(pyrrolidine dithiocarbamates, PDTC)(美国 Sigma 公司);鼠抗人 ICAM-1、NF- κ Bp65 单克隆抗体(深圳晶美生物工程公司);髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)和 ABC 试剂盒(武汉博士德生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 新生儿窒息后血清的制备 选择2005年10月至2006年1月我科住院的足月重度窒息新生儿(出生后1分钟 Apgar 评分 ≤ 3 分为重度窒息),均未使用免疫抑制制剂、无明显感染性疾病。在窒息后1, 3, 7 d 分别抽取外周血5 mL(肝素抗凝), 2 500 r/min 离心10 min, 分离血清, 56 $^{\circ}$ C 水浴30 min 灭活补体, 微孔滤器过滤除菌, 采用 DMEM 培养液成20%(体积比, v/v)的攻击浓度待用^[5,6]。

1.2.2 HK-2 细胞株的复苏、培养、传代 从液氮罐取出冻存的 HK-2 细胞投入37 $^{\circ}$ C 的温水中, 摇动使其尽快解冻。吸出细胞悬液并滴加10倍体积的质量分数为10%的胎牛血清的 DMEM/F12 培养基, 混匀, 1 000 r/min 离心5 min, 弃上清液后再重复洗涤1次。用含10%的胎牛血清的 DMEM/F12 培养液将细胞悬液稀释混匀, 接种于100 mL 培养瓶中, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 细胞培养箱中静置12 h, 换液除去未贴壁细胞后至细胞长满成片80%以上。用0.25%的胰蛋白酶消化后, 传代。

1.2.3 窒息新生儿外周血中性粒细胞的分离

取足月窒息后24 h 时新生儿外周静脉血5 mL(肝素抗凝)于18~22 $^{\circ}$ C, 2 000 r/min 离心30 min, 取出离心管可见中间白细胞层。用吸管轻轻吸出白细胞, 加入 PBS 缓冲液洗涤3次, 离心3次(18~22 $^{\circ}$ C, 800 r/min, 离心10 min), 然后悬浮于 DMEM/F12 完全培养基中, 光学显微镜下计数中性粒细胞数目, 调整中性粒细胞密度至 1×10^9 /L 备用。

1.2.4 实验分组及实验过程 实验分为:空白对照组、窒息组(窒息后1, 3, 7 d 组)和 PDTC 干预组(窒息后1 d PDTC, 3 d PDTC, 7 d PDTC 干预组)。根据分组, 将已生长至约占培养瓶底80%的细胞, 在细胞培养瓶中用含0.25%胰蛋白+0.02% EDTA

消化液消化成单个细胞, 按每40 000个细胞接种到24孔培养板中。均于接种后12 h 换液使细胞生长繁殖同步后, 进行如下处理:①各窒息组:各窒息组培养液换成含20% 窒息血清的 DMEM/F12 培养液;②各 PDTC 干预组:每组培养液换成含20% 窒息血清的 DMEM/F12 培养液的同时每孔加入终浓度为40 μ mol/L 的 PDTC;③空白对照组:每组培养液换成含10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 上述培养体系其余培养条件完全一致, 在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的条件下培养24 h。窒息后血清诱导细胞损伤模型的建立参考本实验室前期工作^[5,6]。

1.2.5 指标的检测 ①细胞悬液中 MPO 活性的测定 24 孔板各孔板细胞培养24 h 后, 加入密度为 1×10^9 /L 的中性粒细胞悬液0.1 mL, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的条件下培养1 h。各孔去培养基并用 PBS 洗涤3次, 各孔加入同样体积的质量分数为0.25%的胰蛋白酶消化成细胞悬液, 按照 MPO 检测试剂盒操作步骤进行, 利用酶标仪测定各孔 OD 值, 根据公式 MPO 活力(U/L) = [测定管 OD 值 - 对照管 OD 值] / (11.3 \times 取样量(mL) \times 匀浆浓度), 计算 MPO 的活力单位。根据中性粒细胞内含一定量的 MPO, 因此测定细胞悬液中 MPO 活性来推断被粘附中性粒细胞的数目^[7]。②免疫组化法检测 NF- κ B、ICAM-1 的表达 24 孔板各孔内提前放入盖玻片进行细胞爬片。各组细胞爬片用非免疫血清封闭15 min。一抗(工作浓度为1:100)为鼠抗人 NF- κ B、ICAM-1 的单克隆抗体, 室温下孵育过夜。ABC 试剂盒按说明书进行操作, 显色后光镜下观察。采用 HSCORE 值间接表示 NF- κ B、ICAM-1 表达的强弱^[7]: HSCORE = $\sum P_i(i+1)$, i 表示免疫组化颗粒 ICAM-1 的光密度值1, 2 或3(分别表示抗原表达的弱, 中和强), P_i 表示每种光密度值的细胞占有细胞的百分值。

1.3 统计学处理

各组实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 各实验组间进行单因素方差分析, 组内比较进行 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有显著的统计学意义。

2 结果

2.1 新生儿窒息后血清诱导 HK-2 细胞粘附中性粒细胞的情况

在 MPO 值的测定结果中, 与窒息后1, 3, 7 d PDTC 干预组(0.60 \pm 0.11, 0.57 \pm 0.07, 0.57 \pm 0.13)、窒息后3 d 组、7 d 组(0.59 \pm 0.09, 0.57 \pm 0.06)和空白对照组(0.56 \pm 0.04)相比, 窒息后1 d

组 MPO 值(0.87 ± 0.19)升高,差异具有显著性意义($P < 0.01$);而与空白对照组相比,窒息后 3 d、7 d 组 MPO 值差别无统计学意义;与空白对照组比较,各 PDTC 干预组 MPO 值差异无统计学意义。

2.2 新生儿窒息后血清诱导 HK-2 细胞 ICAM-1 的表达情况

在 ICAM-1 的表达结果中,与窒息后 1、3、7 d PDTC 干预组(2.53 ± 0.02 、 2.52 ± 0.02 、 $2.47 \pm$

0.03)、窒息后 3 d 组、7 d 组(2.55 ± 0.02 、 2.52 ± 0.03)和空白对照组(2.53 ± 0.04)相比,窒息后 1 d 组 ICAM-1 的表达(HSCORE 值)(3.06 ± 0.02)升高,差异具有显著性意义($P < 0.01$);而与空白对照组相比,窒息后 3 d、7 d 组 ICAM-1 的表达(HSCORE 值)差别无统计学意义;与空白对照组比较,各 PDTC 干预组 MPO 值差异无统计学意义(图 1)。

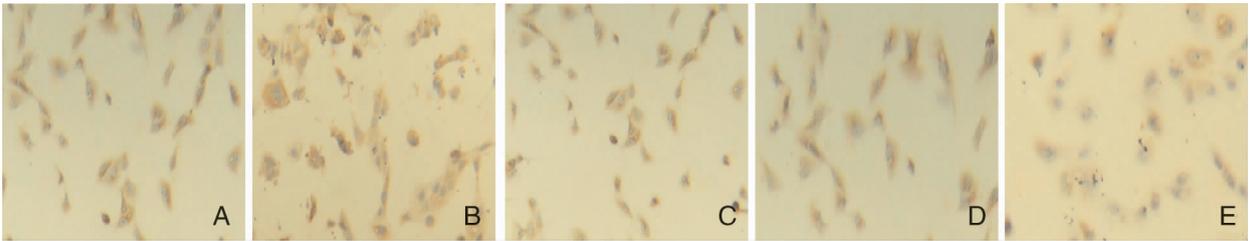


图 1 窒息后血清诱导 HK-2 细胞的 ICAM-1 表达(倒置显微镜 $\times 100$)。A:空白对照组;B:窒息后 1 d 组;C:窒息后 3 d 组;D:窒息后 7 d 组;E: PDTC 组。空白对照组细胞贴壁良好,透明度大,折光性强,呈扁平的多角形,细胞膜 ICAM-1 弱阳性表达;窒息后组细胞形态发生改变,连接松散,细胞间可见较多细胞碎片,细胞膜 ICAM-1 阳性表达,以窒息后 1 d 最为明显。

2.3 新生儿窒息后血清诱导 HK-2 细胞 NF- κ B 的表达情况

在 NF- κ B 的表达结果中,与窒息后 3 d 组、7 d 组(2.48 ± 0.04 、 2.45 ± 0.02)和空白对照组(2.49

± 0.02)相比,窒息后 1 d 组 NF- κ B 表达(HSCORE 值)(2.96 ± 0.02)升高,差异具有显著性意义($P < 0.01$);而与空白对照组相比,窒息后 3 d、7 d 组 NF- κ B 表达(HSCORE 值),差别无统计学意义(图 2)。

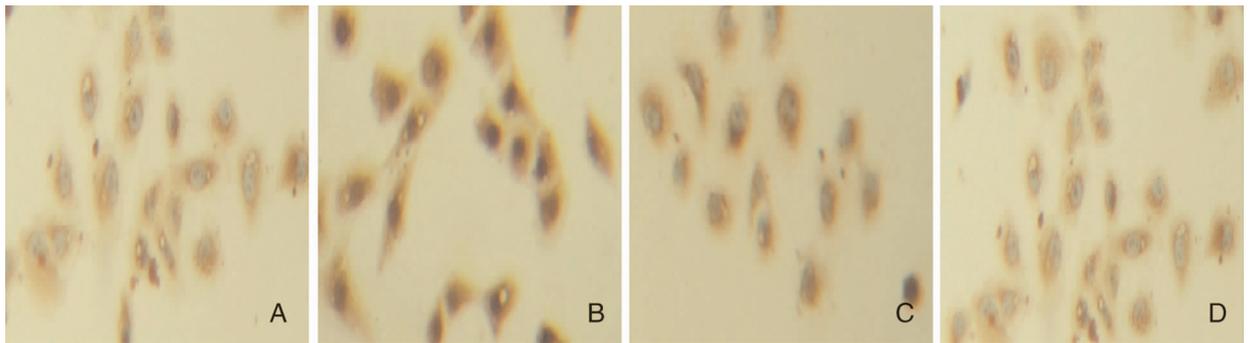


图 2 窒息后血清诱导 HK-2 细胞的 NF- κ B 表达(倒置显微镜 $\times 100$)。A:空白对照组;B:窒息后 1 d 组;C:窒息后 3 d 组;D:窒息后 7 d 组。棕黄色颗粒为 HK-2 细胞表达的 NF- κ B,可见空白对照组细胞核 NF- κ B 弱阳性表达;窒息后细胞核 NF- κ B 阳性表达,以窒息后 1 d 最为明显。

3 讨论

缺血再灌注损伤后可激发机体出现一系列的炎症反应。首先是大量活性介质的产生,包括氧自由基和细胞因子等,而氧自由基是造成内皮细胞损伤的主要因素,这是造成器官组织损伤的重要原因^[2-9]。因此,有学者把肾脏缺血再灌注损伤等同

于“炎症性疾病”^[4]。我们前期研究发现,炎症反应同样存在新生儿窒息后肾损伤的发病过程,新生儿窒息同样是一种“炎症性疾病”。窒息时机体受到缺氧和再灌注损伤等因素影响时,产生过多炎症介质,如 TNF- α 、IL-8 等,激发机体出现全身炎症反应综合征,这些活性物质在血液中水平升高,在窒息后复氧的过程中,随再灌注血流进入肾脏,很可能直接导致肾损伤的发生^[2,5,6,9]。本研究显示:窒息后血

清具有诱导 HK-2 细胞粘附窒息新生儿外周血中性粒细胞的作用,这种作用以窒息后 1 d 的血清最为明显,而窒息后 3、7 d 血清并不明显,这与窒息后炎症反应具有时间性,肾损伤发生的高峰在 24 h 的观点相一致^[8]。

很多研究表明,核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)是调节缺血再灌注时炎症反应的关键因子和触发器^[10]。当细胞受到炎症介质、病原体感染、氧化应激等刺激后,I κ B 磷酸化而被降解,NF- κ B 游离后即进入细胞核内,结合到相应的靶基团的启动子与增强子的 κ B 结合域,进而促进多种炎症因子转录和表达^[11],导致炎症反应的发生。抗氧化剂 PDTC 就是一种公认的 NF- κ B 抑制剂,可以阻断 I κ B 的磷酸化进而抑制了 NF- κ B 的活化^[10]。很多学者研究发现^[12],细胞受到缺氧刺激后 ICAM-1 的表达增加,而加入 PDTC 可以降低 ICAM-1 表达。我们前期工作也发现^[7]:HK-2 细胞经缺氧/复氧处理后,细胞膜表面 ICAM-1 的表达明显增加,而在缺氧/复氧处理前加入 PDTC 后细胞表面 ICAM-1 的表达受到抑制。这些研究说明缺血(缺氧)的刺激可能诱导 NF- κ B 的活化,进而诱导 ICAM-1 等炎症基因的表达,参与缺血再灌注时组织器官的损伤过程。本研究进一步显示:窒息后血清诱导 HK-2 细胞损伤时,细胞表面 ICAM-1 和细胞核 NF- κ B 的表达明显增加,而加入 NF- κ B 抑制剂(PDTC),阻断 NF- κ B 活性后 ICAM-1 的表达显著减少,而且粘附中性粒细胞数量减少,这种作用以窒息后 1 d 的血清最为明显,而窒息后 3、7 d 血清并不明显。

新生儿窒息后血清导致 NF- κ B 活化的原因可能与血清中存在的过多炎症介质如 IL-1、IL-8、IL-6、TNF- α 等有关,这些因子随再灌注血流进入肾脏组织,进而导致 HK-2 细胞内 NF- κ B 的活化、转位,进而结合于相应基因的启动子或增强子的 κ B 结合区,进一步使相关因子 ICAM-1 的表达上调。同时这些因子可持续刺激并激活中性粒细胞,使中性粒细胞内的 LFA-1 (CD11a/CD18, ICAM-1 的相应配体)磷酸化、变构^[13],进而与 HK-2 识别、粘附,进一

步造成肾脏持续炎性损伤。这可能是新生儿窒息后肾损伤时发生炎症反应的细胞内重要信号机制。这为临床认识窒息后肾损伤的发病机制和采取抗炎症治疗提供了一定的实验性理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] Aggarwal A, Kumar P, Chowdhary G, Majumdar S, Narang A. Evaluation of renal functions in asphyxiated newborns[J]. J Trop Pediatr, 2005, 51(5):295-299.
- [2] 董文斌,冉隆瑞,冯志强,赵春玲,龙汉安,张春来. 白细胞参与新生鼠窒息后肾损伤的作用及机制研究[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(4):208-210.
- [3] 董文斌,唐章华,陈红英,陈书琴,王胜会,王兴勇,等. 窒息新生儿尿液中炎症细胞因子的改变与肾小管损伤的关系[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15(2):94-96.
- [4] Bonventre JV and Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? [J]. Kidney Int, 2004, 66(2): 480-485.
- [5] 董文斌,曹敏,邓存良,王明勇,陈枫,许开桂. 新生儿窒息后血清诱导人肾小管细胞凋亡的作用[J]. 实用儿科临床杂志, 2005, 2(12):1207-1209.
- [6] 曹敏,董文斌,王明勇,邓存良,陈枫,许开桂. 新生儿窒息后血清在诱导人肾小管细胞损伤中的作用[J]. 实用儿科临床杂志, 2006, 21(17):1135-1136.
- [7] 杜逸亭,董文斌,余鸿,邓存良,王明勇,杭永伦,等. 缺氧-复氧诱导 HK-2 细胞黏附窒息新生儿中性粒细胞的作用机制[J]. 细胞与分子免疫学, 2006, 22(6):752-754.
- [8] 董文斌,唐章华,翟雪松,邹艳,陈书琴,陈红英,等. 炎症细胞因子参与新生鼠窒息后肾损伤的作用时间[J]. 中华急诊医学杂志, 2002, 11(1): 25-26.
- [9] 董文斌,陈跃,王胜会,刘春艳,陈桃. 血清 TNF- α 与窒息新生儿多器官功能不全的关系[J]. 中国当代儿科杂志, 2003, 5(5):455-456.
- [10] 杜逸亭,董文斌. 核因子- κ B 与缺血缺氧所致疾病的关系[J]. 国外医学妇幼保健分册, 2004, 15(4):209-211.
- [11] Cao CC, Ding XQ, Ou ZL, Liu CF, Li P, Wang L, et al. In vivo transfection of NF- κ B decoy oligodeoxynucleotides attenuate renal ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Kidney Int, 2004, 65(3):834-845.
- [12] Combe C, Burton CJ, Dufourco P, Weston S, Horsburgh T, Walls J, et al. Hypoxia induces intercellular adhesion molecule-1 on cultured human tubular cell [J]. Kidney Int, 1997, 51(6): 1703-1709.
- [13] 陈凤琴,蔡宝萍,陈永胜,王瑞杰,张英丛,刘青,等. 新生儿缺氧缺血性脑病中性粒细胞 CD11b、CD18 变化及临床意义[J]. 新生儿科杂志, 2003, 18(6):247-249.

(本文编辑:吉耕中)