

· 论 著 ·

宫内窘迫后胎鼠肾脏细胞间 粘附分子-1 的表达及意义

吴捷¹, 杨丽², 魏克伦¹

(1. 中国医科大学附属第二医院儿科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 鸡西市妇幼保健院儿科, 黑龙江 鸡西 150014)

[摘 要] 目的 缺血缺氧性肾损伤的发生过程有炎症反应参与,而这种炎症反应的发生与细胞粘附分子有关,其中细胞间粘附分子-1(ICAM-1)可上游调节并介导白细胞与内皮细胞的粘附而致肾损伤。该文旨在探讨宫内急性缺血缺氧及再灌注时 ICAM-1 在胎鼠肾脏炎症反应发生中的作用。方法 通过钳夹孕 21 日龄大鼠供应子宫的血管制备胎鼠宫内不同程度缺血缺氧模型和再灌注不同时间模型;利用免疫组织化学技术动态观察 ICAM-1 的变化,同时应用 HE 染色观察病理学改变。结果 ICAM-1 在假手术组胎鼠肾组织即有少量表达,表达部位主要在近曲小管。比较肾皮质近曲小管 ICAM-1 的表达情况显示:宫内缺血缺氧后,在 35 min 和 45 min 表达增强,差异有显著性 ($P < 0.05$)。与假手术组相比,宫内缺血缺氧 15 min 后再灌注 2 h, ICAM-1 表达即明显增强 ($P < 0.01$), 15 h 达高峰,再灌注 30 h 时表达仍强于假手术组 ($P < 0.05$)。病理学改变:缺血 15 min 再灌注 15 h 病理改变最明显,肾组织普遍充血和渗出,可见中性粒细胞浸润,肾小管普遍空泡变性,伴细胞核模糊,细胞崩解,基底膜阶段性断裂,尤以近曲小管明显。结论 宫内急性缺血和再灌注后胎鼠存在炎症反应;宫内急性缺血缺氧可以导致 ICAM-1 表达增强,其表达变化与病理学改变一致,提示 ICAM-1 可能参与急性缺血缺氧性肾损伤时炎症反应的发生。
[中国当代儿科杂志, 2004, 6(3): 199-202]

[关 键 词] 细胞间粘附分子-1; 缺血缺氧; 胎鼠; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2004)03-0199-04

Expression of intercellular adhesion molecule-1 in the fetal kidneys of rats after intrauterine acute ischemia and hypoxia

Jie WU, Li YANG, Ke-Lun WEI. Department of Pediatrics, Second Clinical Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Email: jiewudoc@hotmail.com)

Abstract: Objective Some research has shown that the inflammatory reaction induced by the intercellular adhesion molecule may be involved in ischemic renal injury. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) plays an important role in renal injury by up-regulating and inducing the adhesion between white blood cells and endothelium. This paper aims to study the effect of ICAM-1 on the inflammatory reaction in the fetal rat kidneys after acute ischemia. **Methods** The models of intrauterine ischemia and reperfusion in various time points were established by clamping one side of the vessels supplying blood to uterus in 21-gestational day-old Wister rats. The dynamic changes of ICAM-1 in the fetal kidneys were detected by immunohistochemical technique. Meanwhile, renal histopathological changes were observed. Another group of rats, the Sham-operation group, were given a normal blood supplement in the other side of the uterus. **Results** There was a small quantity expression of ICAM-1 in the cortical tubuli, especially in the proximal tubuli, in the Sham-operation group. The ICAM-1 expression began to increase 35 and 45 minutes after ischemia ($P < 0.05$). Compared with that of the Sham-operation group, after a 15-minute ischemia and then a 2-hr reperfusion, it began to rise ($P < 0.01$), reached a peak at 15 hrs of reperfusion ($P < 0.01$) and remained a higher level till 30 hrs of reperfusion ($P < 0.05$). Histological changes were most prominent after a 15-minute ischemia and then a 15-hr reperfusion, including vascular congestion, tubular vacuolar degeneration or necrosis and neutrophil accumulation. **Conclusions** There may be an inflammatory reaction in renal injury induced by intrauterine ischemia and reperfusion. Ischemia and reperfusion can induce

[收稿日期] 2004-02-10; [修回日期] 2004-04-12

[基金项目] 辽宁省教委基金资助(NO:20122168)

[作者简介] 吴捷(1969-),女,博士,讲师。主攻方向:新生儿急性肾损伤。

[通讯作者] 魏克伦,辽宁省沈阳市和平区三好街 36 号中国医科大学附属第二医院儿科,邮编:110004。

the elevation of ICAM-1 expression. This suggests that ICAM-1 may play an important role in the development of inflammatory reaction in renal injury induced by acute ischemia and hypoxia. [Chin J Contemp Pediatr, 2004, 6(3): 199-202]

Key words: Intercellular adhesion molecule-1; Ischemia and hypoxia; Fetal kidney; Rat

新生儿窒息是新生儿死亡和伤残的主要病因之一。Perlman 等^[1]报道,窒息新生儿约 70% 合并不同程度的脏器损伤,其中肾损伤的发生率最高为 50%,可见肾损伤在新生儿窒息的防治中应加以重视。从新生儿窒息发生时间看,主要发生在宫内,约 80%~90% 在产前或产时^[2]。因此,探索宫内窘迫时胎儿是否已发生肾损伤及其机制,无疑对窒息后肾损伤的防治有重要意义。研究显示,缺血缺氧性肾损伤的发生过程有炎症反应参与,而这种炎症反应的发生与细胞粘附分子有关,其中细胞间粘附分子-1(ICAM-1)可上游调节并介导白细胞与内皮细胞的粘附而致肾损伤。有关 ICAM-1 在缺血性肾损伤中的研究尚处于起步阶段,在围生期窒息后肾损伤中未见报道。本研究通过胎鼠急性缺血缺氧及再灌注模型,利用免疫组织化学技术动态观察 ICAM-1 在肾组织的表达变化,同时应用 HE 染色观察病理学改变,旨在探索 ICAM-1 在窒息后肾损伤炎症反应发生中的作用。

1 对象与方法

1.1 动物模型的制备

1.1.1 孕 21 日龄大鼠制备 Wistar 大鼠(由中国医科大学附属二院动物实验室提供),雌鼠体重 270 ± 20 g,雄鼠体重 320 ± 20 g,按雌雄 4:1 放置在同一鼠笼中喂养,自合笼后第 2 日起每日用浸湿生理盐水的棉签在雌鼠阴道内旋转 1~2 周,将棉签上的阴道分泌物均匀涂在滴有生理盐水的载玻片上,光学显微镜下($100\times$)见到精子为妊娠第 1 日,此后单独喂养至 21 日龄备用。

1.1.2 胎鼠宫内缺血缺氧及再灌注模型制备 将 21 日孕龄大鼠,用 2.5% 戊巴比妥钠(0.2 ml/ 100 g 体重)腹腔麻醉后,下腹消毒后正中切口,迅速找到一侧供应子宫和卵巢的动静脉血管,以无创动脉夹钳夹,钳夹时间分别为 15, 25, 35 和 45 min,以制备宫内不同程度缺血缺氧模型;以对侧宫角内未钳夹的胎鼠为对照组(假手术组),钳夹时间内暂时关腹以维持恒定温度。同时,另有孕鼠在钳夹动静脉血管 15 min 后,取出动脉夹关腹,分别再灌注 1, 2, 4, 8, 15, 24 和 30 h,制备宫内缺血 15 min 再灌注不同时间模型。将孕鼠随机分入各组(不同时间点),每组 5 只,在上述不同模型条件满足后立即剖宫取胎

鼠,断头处死,取出完整胎肾,置于液氮中保存。

1.2 免疫组化技术检测肾组织 ICAM-1 蛋白表达

1.2.1 石蜡切片制备 常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡,包埋后,行肾冠状切片,厚 $5\ \mu\text{m}$,多聚赖氨酸作粘附剂处理玻片。

1.2.2 免疫组化染色 石蜡切片常规脱蜡至水,每张片子加 $50\ \mu\text{l}$ 的 3% H_2O_2 10 min,以阻断内源性过氧化物酶活性;蒸馏水冲洗 3 次后,在沸水中煮沸 10 min 进行抗原修复;将抗原修复后的切片以 0.01 M PBS 冲洗后加 $50\ \mu\text{l}$ 正常血清室温封闭 10 min,以减少非特异性染色,甩掉多余的液体后滴加兔抗 ICAM-1 蛋白抗体(工作浓度 1:100), 4°C 过夜;0.01 M PBS 冲洗 3 次后加 $50\ \mu\text{l}$ 生物素化山羊抗兔 IgG, 37°C 下孵育 30 min,0.01 M PBS 冲洗后加试剂 SABC, 37°C 20 min;0.01 M PBS 冲洗 4 次,每次 5 min 后加新鲜配制的 DAB 显色剂,蒸馏水洗涤;苏木素轻度复染,脱水,透明,封片。用假手术组肾组织做正常对照,不加第一抗体做阴性对照,以细胞浆有棕黄色颗粒沉着为阳性细胞。

1.2.3 免疫强度判定 每个时间点各选取表达清晰的切片 3 张,每张切片于光镜下($360\times$)随机选取 3 个视野,每个视野随机选取 1~2 个近曲小管,利用美国 Universal Imaging Porporation 的图像分析系统,应用 Meta Morph 软件测定其光强度(intensity),其值越小,表示 ICAM-1 表达越强。

1.3 肾组织病理学观察

将于 10% 福尔马林中充分固定的肾组织,常规脱水,石蜡包埋,连续冠状切片 $5\ \mu\text{m}$ 厚,进行常规 HE 染色。组织学改变主要观察血管充血和扩张、中性粒细胞积聚和肾小管细胞破坏等变化。

1.4 统计方法

所有数据均以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验, $P < 0.05$ 提示有显著性意义。

2 结果

2.1 宫内缺血缺氧后肾组织 ICAM-1 表达的动态变化

对石蜡包埋的肾组织切片进行免疫组化技术检测显示,ICAM-1 在假手术组胎鼠肾组织即有少量

表达,表达部位主要在肾小管上皮细胞胞浆中,近曲小管表达略强于远曲小管,肾小球区则未见表达,(图1,见封II)。在宫内缺血缺氧后,胎鼠肾小管上皮细胞 ICAM-1 表达不同程度增强,以近曲小管最为明显,其次为远曲小管,髓质中部分集合管也有表达。

比较宫内缺血缺氧后肾皮质近曲小管 ICAM-1 的表达情况,结果显示:21日孕龄胎鼠肾组织在假手术组可见 ICAM-1 的少量表达。宫内缺血缺氧 15 min 和 25 min 时 ICAM-1 表达增强不明显 ($P > 0.05$),35 min 表达有所增强 ($P < 0.05$),在 45 min 时更明显 ($P < 0.01$)。与假手术组相比,宫内缺血缺氧 15 min 后再灌注 2 h, ICAM-1 表达即明显增强 ($P < 0.01$);此后 ICAM-1 表达逐渐增强,在再灌注 15 h 达高峰,(图2,见封II);再灌注 30 h 表达仍强于假手术组 ($P < 0.05$)。再灌注各时间点与缺血 15 min 相比,再灌注 1~2 h 时 ICAM-1 表达增强并不明显 ($P > 0.05$),4 h 开始高于缺血时水平 ($P < 0.05$),8 h 和 15 h 增强更明显 ($P < 0.01$),30 h 降至缺血时水平 ($P > 0.05$)。见表1和表2。

2.2 肾组织病理学改变

宫内缺血缺氧 15 min,肾组织光镜下变化不明显;25 min 时肾小管上皮细胞开始出现轻度空泡变性;35~45 min 时肾组织血管扩张,明显充血,肾小管上皮细胞空泡变性有所加重,以近端肾小管最明显。缺血 15 min 再灌注过程中,1h 出现肾浊肿表现,近曲小管上皮细胞肿胀,管腔变小;8 h 肾小管在普遍浊肿基础上出现轻度空泡变性和轻度充血;15 h 时病理改变最明显,表现为明显的充血,可见中性粒细胞浸润,肾小管普遍空泡变性,伴细胞核模糊,细胞崩解,基底膜阶段性断裂,尤以近端小管明显,肾小球区广泛血管扩张充血,局部可见渗出;至 24 h 肾组织充血减轻,近端肾小管尚有较明显的空泡变性;30 h 仍可见肾小管轻微的空泡变性。

表1 不同程度宫内缺血缺氧后肾皮质近曲小管 ICAM-1 表达的变化

Table 1 ICAM-1 expression in the fetal rat kidneys after intrauterine ischemia in various time points ($\bar{x} \pm s$)

分组	ICAM-1
假手术组	129.00 ± 6.00
缺血 15 min	122.20 ± 8.92
缺血 25 min	121.40 ± 11.08
缺血 35 min	121.00 ± 10.22 ^a
缺血 45 min	118.20 ± 8.63 ^b

注:与假手术组相比,a $P < 0.05$; b $P < 0.01$

表2 宫内缺血缺氧15 min后再灌注 30 h 内 ICAM-1 表达的变化

Table 2 ICAM-1 expression in the fetal rat kidneys within 30 hrs of reperfusion ($\bar{x} \pm s$)

分组	ICAM-1
假手术组	129.00 ± 6.00
缺血 15 min	122.20 ± 8.92
再灌注 1 h	124.60 ± 11.74
再灌注 2 h	117.30 ± 9.76 ^a
再灌注 4 h	108.80 ± 8.52 ^{a,b}
再灌注 8 h	94.70 ± 10.58 ^{a,c}
再灌注 15 h	87.50 ± 10.44 ^{a,c}
再灌注 24 h	107.50 ± 8.89 ^{a,b}
再灌注 30 h	120.40 ± 11.08 ^a

注:a 示与假手术组相比 $P < 0.01$; b 与缺血 15 min 组相比 $P < 0.05$; c 与缺血 15 min 组相比 $P < 0.01$

3 讨论

缺血缺氧性肾损伤是一个复杂的病理生理过程,它不单纯是由于血流阻断或代谢产物蓄积导致损伤,而且还因为缺血缺氧可引发一系列病理生理变化,导致再灌注时白细胞进入缺血区,与内皮细胞相互作用,诱发炎症反应,致使在恢复血供和氧供后肾组织损伤反而加重。研究证实,肾缺血后白细胞主要是中性粒细胞(PMN)浸润所致的炎症反应与细胞粘附分子有关^[3],并在肾损伤的发生和发展中起重要作用^[4]。

血管内皮细胞表面至少可以表达 5 种粘附分子,其中比较重要而且与 PMN 与内皮细胞相互粘附过程关系密切的粘附分子为 ICAM-1 和白细胞粘附分子(ELAM-1),它们的表达规律基本反映了血管内皮细胞的粘附特性。不同的是 ELAM-1 属完全诱导合成性,即正常时不表达;而 ICAM-1 正常时有一定背景表达,刺激因素可诱导其表达增强。ICAM-1 属于细胞粘附分子四大家族中免疫球蛋白超家族中的一个成员,为单链跨膜糖蛋白,由 5 个 Ig 样结构的细胞外区和较短的胞质区组成。虽然 ICAM-1 的主要配体 CD_{11a}/CD₁₈ 仅在粒细胞上表达,但 ICAM-1 可以在内皮细胞、上皮细胞、成纤维细胞和粒细胞上均有表达。ICAM-1 与其配体结合可介导白细胞与血管内皮细胞粘附,而当 PMN 聚集于肾组织内,一方面机械堵塞,使脏器微循环发生障碍;另一方面,又释放大量的氧自由基及其它损伤性介质而加重了肾损伤。目前有关 ICAM-1 在缺血性

肾损伤中的研究尚处于起步阶段,且在围产期窒息后肾损伤中未见报道。

我们应用免疫组化技术发现,正常21日孕龄胎鼠肾组织 ICAM-1 蛋白表达主要在皮质区肾小管中,以近曲小管为主,这与同样应用免疫组化技术在成人肾组织的发现相似^[5],不过成人肾组织的远曲小管未见 ICAM-1 蛋白表达。胎鼠肾组织在缺血和再灌注后 ICAM-1 蛋白表达增强的主要部位仍是近曲小管,其次为远曲小管,部分髓质中集合管也有染色,而肾小球区基本未见着色。这与 Chen W 等^[6]在成年大鼠的发现类似,不同的是后者在肾小球区也有表达,另外 Seth P 等^[7]在成年大鼠的缺血再灌注肾损伤模型中发现,ICAM-1 蛋白表达增强的主要部位在肾小球区,这是否因为胎鼠肾小球相对于肾小管更易耐受缺血刺激或是发育不成熟而不同于成年大鼠的表达,尚需进一步探讨。由于 ICAM-1 蛋白表达增强的部位及时间与组织形态学研究极为一致,即与胎肾在 PMN 浸润和肾小管损伤的变化规律相一致,提示在宫内缺血后胎肾 ICAM-1 的上游调节是时间依赖性的,表明了 ICAM-1 可能参与了肾损伤时炎症反应的发生。

本研究证实,胎鼠在缺血缺氧后肾脏有炎症反应发生,肾组织 ICAM-1 的高表达可能是促进白细胞浸润,加重肾损伤的一个重要原因。此发现无疑有助于我们寻求新的手段来预防和治疗围产期窒息后肾损伤。当然,由于现有研究关于肾缺血时封闭

或调节粘附分子及其配体表达的可能防治价值还了解不多,有待我们进一步探索。

【参 考 文 献】

- [1] Perlman JM, Tack ED, Martin T, Shackelford G, Amon E. Acute systemic organ injury in term infants after asphyxia [J]. AJDC, 1989, 143(5): 617-620.
- [2] 宋琳琳. 缺氧缺血性脑病 [A]. 见: 金汉珍, 黄德珉, 官希吉. 实用新生儿学 [M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1997, 624-631.
- [3] Rabb H. Cell adhesion molecules and the kidney [J]. Am J Kidney Dis, 1994, 23(2): 155-166.
- [4] de la Qssa JC, Malago M, Gewertz BL. Neutrophil-endothelial cell binding in neutrophil-mediated tissue injury [J]. J Surg Res, 1992, 53(1): 103-107.
- [5] Paraf F, Chauveau D, Chretien Y, Richard S, Grunfeld JP, Droz D. Renal lesions in von Hippel-Lindau disease: immunohistochemical expression of nephron differentiation molecules, adhesion molecules and apoptosis proteins [J]. Histopathology, 2000, 36(5): 457-465.
- [6] Chen W, Bennett CF, Wang ME, Dragun D, Tian L, Stecher K, et al. Perfusion of kidneys with unformulated "naked" intercellular adhesion molecule-1 antisense oligodeoxynucleotides prevents ischemic/reperfusion injury [J]. Transplantation, 1999, 68(6): 880-887.
- [7] Seth P, Kumari R, Madhavan S, Singh AK, Mani H, Banaudha KK, et al. Prevention of renal ischemia-reperfusion-induced injury in rats by picroliv [J]. Biochem Pharmacol, 2000, 59(10): 1315-1322.

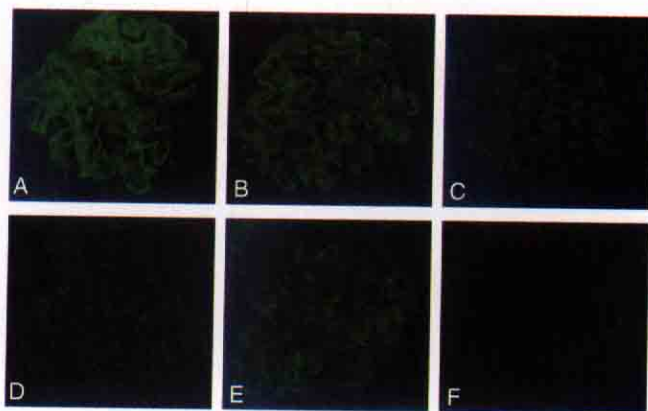
(本文编辑:段元冬)

· 消息 ·

国家级继续医学教育项目 《小儿血液学新进展》学习班招生通知

受卫生部委托,上海第二医科大学附属新华医院、上海儿童医学中心将于2004年9月在上海儿童医学中心举办《小儿血液学新进展》学习班,项目编号为:2004-06-01-024,授课30个学时,授于I类学分10分。欲参加者请即与上海儿童医学中心血液/肿瘤科邹佳音联系,邮编:200127;电话:021-58732020 转6365分机。

Podocin expression in rats with puromycin aminonucleoside nephropathy



(These figures refer to the paper on page 161)

Figure 2 Immunofluorescence staining (magnification, $\times 200$)

Figure 2A Linear-like pattern of the continuous fine granules in normal glomeruli

Figure 2B Partly discontinuous pattern on day 1

Figure 2C Diffusely granular pattern on day 3

Figure 2D Coarse granular pattern on day 10

Figure 2E Partly retrieved expression on day 20

Figure 2F No staining on glomerular (negative control)

Dynamic expression and effect of TGF- β 1 on extracellular matrix in premature rats with CLD

(These figures refer to the paper on page 166)

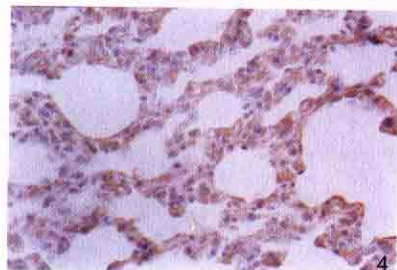
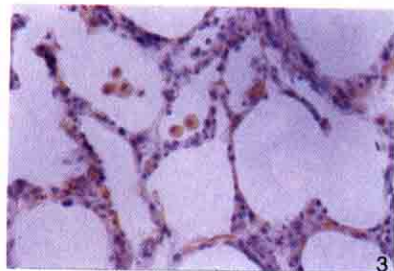
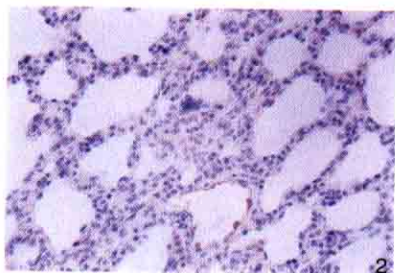


Figure 1 Expression of TGF- β 1 of the normal lung (SABC, $\times 200$)

Figure 2 Expression of TGF- β 1 of the model lung on day 7 (SABC, $\times 200$)

Figure 3 Expression of TGF- β 1 of the model lung on day 14 (SABC, $\times 400$)

Figure 4 Expression of TGF- β 1 of the model lung on day 21 (SABC, $\times 400$)

宫内窘迫后胎鼠肾脏细胞间粘附分子-1 的表达及意义

(正文见第 199 页)

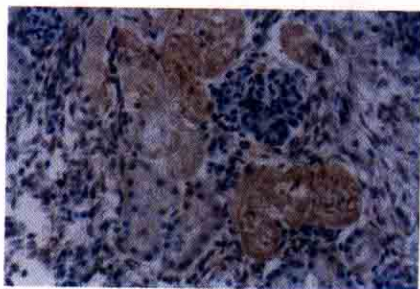
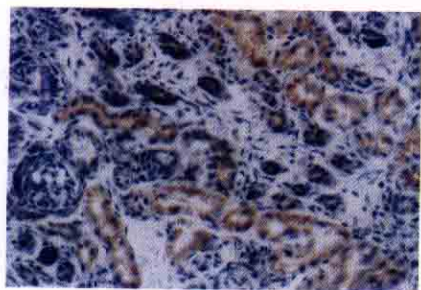


图 1 ICAM-1 在假手术组胎鼠肾组织即有少量表达, 表达部位主要在肾小管上皮细胞胞浆中, 近曲小管表达略强于远曲小管, 肾小球区则未见表达。(免疫组化染色 $\times 360$)

Figure 1 Small quantity expression of ICAM-1 in the cortical tubuli in the Sham-Operation group (HE $\times 360$)

图 2 缺血 15 min 再灌注 15 h 时, ICAM-1 在近曲小管的表达达到高峰, 在坏死和空泡变性明显的小管中其表达最强。(免疫组化染色 $\times 360$)

Figure 2 ICAM-1 expression in the proximal tubuli reached a peak after a 15-minute ischemia and then a 15-hr reperfusion (HE $\times 360$)