

· 实验研究报道 ·

肥大细胞在大鼠慢性肾功能不全 模型肾脏中的分布及意义

王若平¹, 张建江², 易著文²

(1. 湖南省计划生育研究所, 湖南 长沙 410005; 2. 中南大学湘雅二医院小儿肾脏病研究室, 湖南 长沙 410011)

【摘要】 目的 进展中的肾脏疾病是以间质中炎症细胞的浸润及纤维化为主要特征, 而作为炎症细胞中重要成员的肥大细胞目前国内研究较少。该研究旨在探讨肥大细胞在大鼠慢性肾功能不全模型肾脏中的分布及意义。方法 复制阿霉素肾病大鼠的慢性肾功能不全模型, 采用甲苯胺蓝染色和类胰蛋白酶抗体免疫组化的方法, 观察肥大细胞及类胰蛋白酶在肾脏中的分布。结果 ①肥大细胞在皮质、髓质均可见到, 以间质纤维化区域最为多见, 肾小球内基本未见。类胰蛋白酶可在胞浆内发现, 部分被释放在细胞外。②随间质纤维化程度的加重, 肥大细胞数目明显增加, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。结论 肥大细胞在慢性肾功能不全中参与间质纤维化, 对肾小球的病理进展可能影响不大。

[中国当代儿科杂志, 2004, 6(3): 229-231]

【关键词】 肥大细胞; 慢性肾功能不全; 纤维化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1008-8830(2004)03-0229-03

近年来的大量临床和实验表明, 进展中的肾脏疾病是以间质中炎症细胞的浸润及纤维化为主要特征, 而肾脏间质纤维化被认为是导致终末期肾功能衰竭的最终共同途径。而作为炎症细胞中重要成员的肥大细胞(mast cell, MC), 其不仅参与免疫调节、肿瘤发生、血管生长等, 而且在机体器官纤维化中也有重要作用^[1], 但肥大细胞在肾脏疾病中的研究目前国内较少。我们旨在通过复制大鼠慢性肾功能衰竭模型, 观察肥大细胞及其类胰蛋白酶在大鼠肾脏中的分布, 以探讨肥大细胞在慢性肾功能不全进展中的作用, 为研究防治对策提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 80只周龄相同(4周龄)体重相近(130~200 g)的雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠, 由中南大学湘雅二医院医学动物实验中心提供。

1.1.2 抗体 抗 tryptase 抗体由 santa cruz 公司提供。酶标二抗及 SABC 试剂盒, 购自博士德生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 复制大鼠慢性肾功能衰竭模型^[2] 将80只大鼠随机分成两组: ①模型组 40只, 分别于实验第1天、第8天和第15天尾静脉注射阿霉素 3 mg/kg; ②对照组 40只, 分别于实验第1天、第8天和第15天尾静脉注射灭菌注射用水 0.5 ml。

1.2.2 标本留取 在实验的第28天, 采用随机抽样的办法分别处死模型组和对照组的大鼠10只。在实验的第70天, 分别处死模型组和对照组的大鼠30只。处死前, 分别留取24 h尿作蛋白定量及血标本行尿素氮、肌酐检测。处死的大鼠立即取出肾脏, 以甲醛固定后石蜡包埋, 切片 2 μ m 行 HE、PAS 染色后在光镜下观察肾脏病理改变。

1.2.3 免疫组化 石蜡组织切片经干燥箱烤片 2 h 后, 常规脱蜡至水; 3% 的过氧化氢灭活内源性过氧化物酶 10 min。滴加复合消化液 5 min, 蒸馏水洗涤, 滴加正常山羊血清封闭 20 min。滴加 I 抗, 4℃ 过夜。以 PBS 洗涤后滴加生物素化的 II 抗, 37℃ 孵育 20 min, PBS 洗涤 2 min × 3 次后, 滴加试剂 SABC, 37℃ 孵育 20 min, PBS 洗涤 5 min × 4 次后, 滴加 DAB, 室温显色后蒸馏水洗涤, 苏木素轻度复染, 脱水, 封片。每次

[收稿日期] 2004-03-25; [修回日期] 2004-04-09

[作者简介] 王若平(1963-), 男, 硕士研究生在读, 儿科副主任医师。主攻方向: 儿科肾脏病。

[通讯作者] 王若平, 湖南省长沙市芙蓉中路 388 号湖南省计划生育研究所, 邮编: 410005

检测均以 PBS 液替代一抗为阴性对照。甲苯胺蓝染色按文献进行^[3]。染色的切片标本置高倍镜下,观察肥大细胞及类胰蛋白酶的分布。

1.2.4 结果判断和记录 大鼠肾脏 HE、PAS 染色后在光镜下观察肾病理改变,其中肾间质纤维化的程度分为轻、中、重度;间质基本正常(-);肾间质纤维化范围小于 20% 为轻度损害(+);20%~40% 为中度损害(++);40% 以上为重度损害(+++)。每一切片用 10×40 光镜观察肾间质 5 处病变最明显的区域,记录其免疫组化的阳性细胞数,取平均数作为此标本的阳性细胞数。甲苯胺蓝染色的阳性细胞数亦如此计数。

1.3 统计学处理

采用 SPSS-10.0 统计软件包进行统计学处理,所有资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,模型组与对照组比较用配对 t 检验,模型组中不同程度间质纤维化间的肥大细胞计数比较用成组 t 检验,以 $\alpha = 0.05$ (two tailed) 作为检验水准, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 肾功能与 24 h 尿蛋白定量的变化

第 28 天处死的模型组大鼠的尿素氮、肌酐、24 h 尿蛋白定量分别为 17.24 ± 5.35 mmol/L、 118.18 ± 42.71 μ mol/L、 145.04 ± 56.07 mg/d,与同期对照组的 6.35 ± 1.86 mmol/L、 45.11 ± 13.52 μ mol/L、 2.10 ± 1.04 mg/d 相比,差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。第 70 天处死的模型组大鼠的尿素氮、肌酐、24 h 尿蛋白定量分别为 22.54 ± 4.07 mmol/L、 197.22 ± 36.80 μ mol/L、 450.79 ± 66.49 mg/d,与同期对照组的 6.03 ± 0.81 mmol/L、 45.74 ± 6.34 μ mol/L、 1.99 ± 0.73 mg/d 相比,差异有显著性意义, $P < 0.05$ 。

2.2 肥大细胞的分布

在第 28 天处死的模型组大鼠的肾组织中,肾小球出现轻度系膜细胞增殖和基质增生,基本未见到小管间质纤维化,偶尔可见到肥大细胞。在第 70 天处死的模型组大鼠的肾组织中,肾小球出现明显基质增生,偶可见到局灶、节段性硬化,小管间质有不同程度的纤维化。肥大细胞在皮质、髓质均可见到,以间质纤维化区域最为多见,肾小球内基本未见。对照组未见肥大细胞。甲苯胺蓝染色的阳性细胞数与类胰蛋白酶抗体免疫组化的阳性细胞数基本一致,类胰蛋白酶可在胞浆内发现,部分被释放在细胞外。(图 1、2,见封底)。

2.3 第 70 天处死的模型组大鼠的肾组织中肥大细胞的计数与间质纤维化

由表 1 可见,随间质纤维化程度的加重、肥大细胞计数明显增加,差异有显著性, $P < 0.05$ 。

表 1 不同间质纤维化程度中肥大细胞的计数

间质纤维化程度	例数	肥大细胞的计数
轻度	22	7.27 ± 2.96
中度	8	11.13 ± 3.60^a

注: a 与轻度比较 $P < 0.05$

3 讨论

MC, 又称组织嗜碱细胞, 由造血祖细胞衍化而来, 其前体细胞来源于骨髓, 血循环中仅有少量。光镜下呈圆形或卵圆形, 核小而圆, 胞质内充满异染色颗粒。用甲苯胺蓝染色则胞浆颗粒呈紫红色, 胞核为淡蓝色。电镜下颗粒大小不一, 内部结构呈多样性, 可有螺旋状或网格样结晶。MC 的胞浆颗粒中富含蛋白多糖和蛋白酶, 其中包括糜蛋白酶和类胰蛋白酶。此外, MC 尚可分泌其它的活性介质如组胺、肝素及多种细胞因子, 包括肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和转化生长因子- β (TGF- β) 及成纤维细胞生长因子等。

本研究结果显示, 在实验的第 28 天模型组大鼠就已出现大量蛋白尿及肾功能损害, 在第 70 天蛋白尿及肾功能损害更为明显, 并且肾间质损害的程度渐加重。肥大细胞在模型组大鼠的肾小球内基本未见, 而以间质纤维化区域最为多见, 并且随间质纤维化程度的加重, 肥大细胞数目明显增加, 统计学有显著意义。已有资料表明, 通常 MC 自发地将 α -类胰蛋白酶分泌至血中, 而将 β -类胰蛋白酶保存在细胞分泌颗粒中, 仅在 MC 激活时通过脱颗粒的方式将其分泌至细胞外。我们的结果亦证明类胰蛋白酶可在胞浆内发现, 部分被释放在细胞外。MC 分泌的类胰蛋白酶能激活胶原酶, 刺激原胶原向纤维胶原转化^[4]。采用胸苷摄取实验表明, 类胰蛋白酶与肝素共同培养肾脏成纤维细胞, 随着类胰蛋白酶浓度的增加 (0.5 到 5 nM), 成纤维细胞合成 DNA 的量显著增加, 而加入类胰蛋白酶的抑制物亮氨酸和盐酸苯甲脒, 上述效应被抑制。他们并且证明了类胰蛋白酶是以剂量依赖方式来使纤维结合素和胶原 I 增加^[5]。由于成纤维细胞数量的增加, 可促使 I 型胶原基因转录加速, 已知 I 型胶原基因 mRNA 是成纤维细胞的主要转录产物, 故总胶原合成速率明显

增加,从而参与纤维化的作用也增强。当然,肥大细胞尚可通过分泌其它的活性介质如组胺、肝素及多种细胞因子,参与肾脏间质纤维化的形成^[6]。

我们认为,肥大细胞在慢性肾功能不全中对肾小球的病理进展可能影响不大,对间质纤维化却起着不可忽视的作用。因此,深入研究肥大细胞及其类胰蛋白酶参与纤维化的详细机理,有可能为慢性肾功能不全的预防和治疗提供新的思路。

【参 考 文 献】

[1] Schaffer FL, Weg VB. Mast cells eosinophils and fibrosis [J].

Clin Exp Allergy, 1997, 27 (Suppl 1): 64-70.

[2] 施新猷. 现代医学实验动物学 [M]. 北京:人民军医出版社, 2000, 476-477.

[3] 赵香汝,王家鑫,崔平. 肥大细胞用甲苯胺蓝染色之体会 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2000, 9(3): 353.

[4] Eddy AA. Mast cells find their way to the kidney [J]. Kidney Int, 2001, 60(1): 375-377.

[5] Kondo S, Kagami S, Kido H, Strutz F, Muller GA, Kuroda Y. Role of mast cell tryptase in renal interstitial fibrosis [J]. J Am Soc Nephrol, 2001, 12(8): 1668-1676.

[6] 张建江. 肥大细胞与肾脏纤维化的关系 [J]. 国外医学儿科学分册, 2003, 30(7): 186-188.

(本文编辑:吉耕中)

· 病例报告 ·

烟雾病并双相性贫血 1 例

颜美玲

(湘潭市中心医院儿科, 湖南 湘潭 411100)

【中图分类号】 R743 【文献标识码】 E

患儿,男,4岁6个月,因乏力4d就诊,发现血红蛋白为36 g/L而住院。住院第2天突然出现左侧肢体不自主抖动,神志清楚,无口吐白沫,无口唇发绀,无双眼凝视,持续约10 min缓解。缓解后左侧肢体乏力,语言障碍,吐词不清,口角向右歪斜,流涎,肌张力弛缓,肌力Ⅲ级,不能行走。既往出生时有“先天性弓形虫感染”,2岁时有“鼠药中毒”史,当时无抽搐症状。体查:神志清楚,吐词不清,口角向右歪斜,流涎,伸舌稍右偏,面色苍黄,心肺无异常,腹软,肝脾未及,腹壁反射存,左侧肢体肌张力弛缓,肌力Ⅲ级,余神经系统检查未见异常。实验室检查:血红蛋白40 g/L,大小便常规、肝肾功能、心肌酶学、血电解质、胸片、腹部B超均正常;脑脊液压力、常规、生化、免疫学检查均正常,未见弓形虫;骨髓细胞形态学检查符合双相性贫血即缺铁性贫血和巨幼细胞性贫血(以缺铁为主);头部CT示右额颞叶稍低密度影性质待查;行头部MRI、脑磁共振血管造影(MRA),其改变符合烟雾病(moya-moya disease)。最后诊断为“烟雾病并双相性贫血”。经予以甘露醇改善脑水肿,川芎嗪、罂粟碱扩血管,及补铁,补叶酸,输红细胞支持对症处理。住院2周后复查血红蛋白100 g/L,左侧下肢乏力改善,能下地自由行走,左上肢能上抬,但精细动作较差,吐词较清楚,口角稍歪斜,无流涎。继续治疗,随访6个月,恢复正常。

讨论:烟雾病是一组原因不明的颅底动脉进行性狭窄,以致闭塞、导致颅底出现异常血管网为特点的脑血管疾病。临床以小儿多见,15岁以下儿童占60%~80%。儿童以脑缺血梗塞为特征。因其脑基底部的异常血管网很像吸烟时吐出的烟雾而得名。本病病因尚不完全清楚,有认为系先天性血管发育异常,还有认为系后天性多病因性疾病如结核性

脑膜炎、脑外伤、非特异性动脉炎、梅毒、螺旋体病、EB病毒感染、镰状细胞性贫血、放射线等均可导致类似的病理改变。亦有认为本症系由包括先天和后天因素在内的各种病因引起的,或在原有血管异常的基础上由后天因素作用促发而成的脑血管病。本例患儿有先天性弓形虫感染,2岁时的鼠药中毒与4岁6个月的双相性贫血,考虑系在先天因素的基础上由后天因素促发而成的疾病。双相性贫血与烟雾病的发生是否存在一定的关联,尚须进一步研究。

本病无特征性的临床症状与体征。儿童以脑缺血为首发症状,可出现轻偏瘫,语言障碍,不自主运动,精神异常,感觉障碍,进行性智力低下,癫痫发作,四肢痉挛等,临床上以发作性肢体无力或轻偏瘫、运动性失语或头痛为主要表现的患儿,应考虑本病的可能性。脑血管造影对本病的诊断有重要价值。脑磁共振血管造影(MRA)作为一种新的血管成像技术,因其无创性、快捷等特点,有可能成为儿科脑血管疾病诊断中重要而常用的技术方法^[1]。

由于本病病因不明,治疗上主要针对脑血管缺血梗塞对症处理,降低颅内压,改善脑水肿;应用扩血管药物;对病因明确者要及时病因治疗;恢复期可行理疗、按摩,促进功能恢复;亦可用手术方法治疗。本病预后取决于疾病的自然发展,即与发病年龄,原发病因,病情轻重,脑组织损伤程度等因素有关。早期诊断,及时治疗,可改善预后。

【参 考 文 献】

[1] 富建华,姚秀云. 磁共振血流成像对儿童烟雾病的诊断价值 [J]. 中国当代儿科杂志, 2001, 3(1): 57-58.

(本文编辑:吉耕中)

内毒素血症对新生鼠脑一氧化氮合酶表达的影响

(正文见第203页)

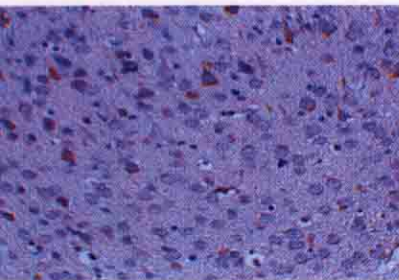


图1 对照组新生大鼠脑皮质锥体细胞nNOS 散在表达 (SP 染色, $\times 400$)
Figure 1 Scattered expression of nNOS in pyramidal cells of the cerebral cortex in the brain from normal neonatal rats (SP $\times 400$)

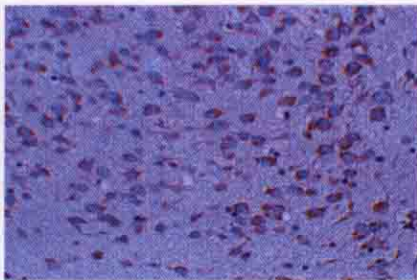


图2 LPS 24 h 组新生大鼠脑室旁核nNOS 表达 (SP 染色, $\times 400$)
Figure 2 Expression of nNOS in paraventricular nuclei of the cerebral cortex in neonatal rats 24 hrs after LPS administration (SP $\times 400$)

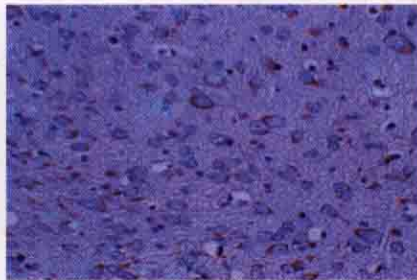


图3 DXM 6 h 组新生大鼠脑皮质锥体细胞nNOS 表达 (SP 染色, $\times 400$)
Figure 3 Expression of nNOS in pyramidal cells of the cerebral cortex in neonatal rats with endotoxemia 6 hrs after DXM administration (SP $\times 400$)

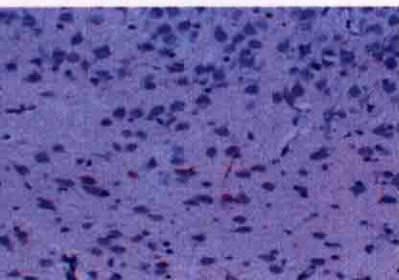


图4 对照组新生大鼠脑室旁核eNOS 微弱表达 (SP 染色, $\times 400$)
Figure 4 Faint expression of eNOS detected in paraventricular nuclei in the brain from normal neonatal rats (SP $\times 400$)



图5 LPS 24 h 组新生大鼠脑室旁核eNOS 表达 (SP 染色, $\times 400$)
Figure 5 Expression of eNOS detected in paraventricular nuclei in neonatal rats 24 hrs after LPS administration (SP $\times 400$)

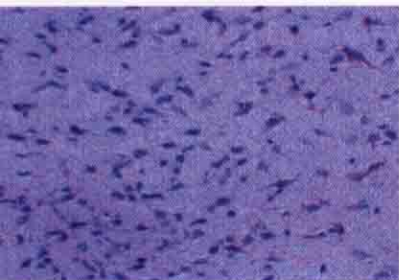


图6 LPS 6 h 组新生大鼠脑皮质iNOS 表达 (SP 染色, $\times 400$)
Figure 6 Expression of iNOS in the cerebral cortex in neonatal rats 6 hrs after LPS administration (SP $\times 400$)

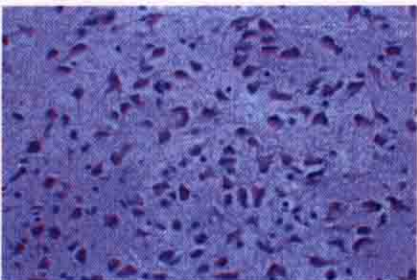


图7 LPS 24 h 组新生大鼠脑室旁核iNOS 表达 (SP 染色, $\times 400$)
Figure 7 Expression of iNOS detected in paraventricular nuclei in neonatal rats 24 hrs after LPS administration (SP $\times 400$)

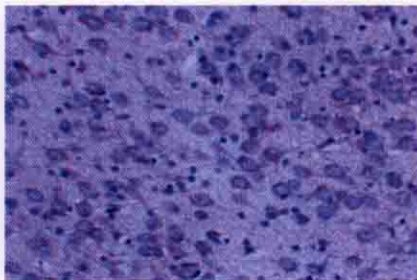
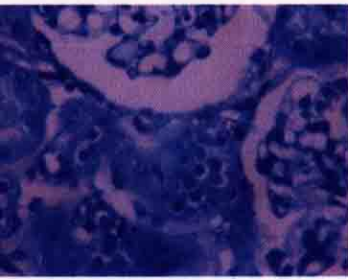


图8 DXM 24 h 组新生大鼠脑皮质iNOS 表达减少 (SP 染色, $\times 400$)
Figure 8 Decreased expression of eNOS detected in the cerebral cortex in neonatal rats with endotoxemia 24 hrs after DXM administration (SP $\times 400$)

肥大细胞在大鼠慢性肾功能不全模型肾脏中的分布及意义

(正文见第229页)



1



2

图1 甲苯胺蓝染色肥大细胞
胞浆颗粒呈紫红色的细胞为肥大细胞 (光镜 $\times 400$)
图2 类胰蛋白酶抗体免疫组化阳性细胞
免疫组化后呈棕红色的细胞为类胰蛋白酶抗体阳性细胞即肥大细胞 (光镜 $\times 360$)