

人近曲肾小管上皮细胞缺氧/复氧损伤模型的建立

杜逸亭 董文斌 王明勇 航永伦

【摘要】目的 建立一种新的人近曲肾小管上皮细胞 HK-2 缺氧/复氧损伤模型。**方法** 本实验使用人近曲 HK-2。实验分为缺氧 4、12 和 24 h 及缺氧 24 h 后复氧 4、12 和 24 h 组,每个实验组均设立空白对照组。采用经高温灭菌的液体石蜡覆盖法造成缺氧环境;苔盼兰摄取法进行细胞计数及检测细胞存活率,生化法检测培养基中的乳酸脱氢酶(LDH)含量。**结果** 人肾小管上皮细胞经过缺氧/复氧处理后,苔盼兰摄取率显著提高,细胞存活率显著下降,LDH 含量升高。说明缺血-再灌注损伤导致了细胞膜的完整性破坏,甚至细胞发生了不可逆转的损伤。**结论** 采用液体石蜡覆盖法建立人近曲肾小管上皮细胞缺氧/复氧损伤模型,较其他制模方法操作简单、易行、可靠。

【关键词】 缺氧; 复氧; 肾小管上皮细胞; 细胞模型

Replication of a model of injury to human renal proximal tubular cells induced by hypoxia/reoxygenation

DU Yi - ting * , DONG Wen - bin , WANG Ming - yong , HANG Yong - lun . * Department of Neonate , Affiliated Hospital of Luzhou Medical College , Luzhou 646000 , Sichuan , China

【Abstract】Objective To replicate a new model of injury to human renal proximal tubular cells (HK-2) induced by hypoxia/reoxygenation. **Methods** Human renal proximal tubular cell line HK-2 cell was used as the target cell. Tubular cells were divided into six groups: 4 hours of hypoxia, 12 hours of hypoxia, 24 hours of hypoxia, and 24 hours of hypoxia followed by reoxygenation 4, 12 or 24 hours later groups. Each group was accompanied by a control group. Hypoxic culture conditions were produced by covering the culture with liquid paraffin. Trypan blue exclusion was used for cell count and cell viability. The activity of lactate dehydrogenase (LDH) in the culture medium was determined by biochemical method. **Results** After being challenged by hypoxia followed by reoxygenation, trypan blue exclusion rate was greater, cell count and cell viability were lower, and the activity of LDH was increased. It indicated that the destruction of integrity of cellular membrane was induced by ischemia/reperfusion injury, and the tubular cells may be injured irreversibly. **Conclusion:** A simple model of hypoxic injury of renal tubular cells is replicated by covering the culture cells with liquid paraffin.

【Key words】 hypoxia; reoxygenation; renal tubular epithelial cell; cell model

肾缺血-再灌注损伤是围产期窒息、肺炎、休克及肾移植、肾切开取石等临床共同面临的问题。肾损伤最早的部位即肾小管,现认为缺氧后肾小管上皮细胞既是病变损伤的靶细胞,又是造成缺氧损伤进展的主要参与者^[1]。因此,建立小管细胞的缺氧/复氧(H/R)损伤模型,从细胞水平探讨其发生机制,已经成为国内外本领域研究的热点。国内外学者已经建立了采用混合气体培养法、缺氧槽培养法、无糖培养基培养法、氮气饱和培养基法等细胞模型^[2-5],但 these 方法需要的实验成本和条件要求高,难以普遍开展。为此,我们通过液体石蜡覆盖的方法,建立了一种人近曲肾小管上皮细胞 HK-2 的 H/R 损伤模

型,现报告如下。

1 材料和方法

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); Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM, GIBCO 公司);胰酶(Sigma);新生牛血清(兰州民海生物公司);医用液体石蜡(杭州炼油厂出品,南昌扬子江药厂分装);其余试剂均为市售分析纯。

1.2 HK-2 细胞的复苏、培养、传代实验分组及处理:从液氮罐中取出冻存的 HK-2 细胞投入 37℃ 的温水中,充分摇动使其尽快解冻^[6]。吸出细胞悬液并滴加 10 倍体积、体积分数为 15% 新生牛血清的 DMEM,混匀,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液后再重复洗涤 1 次。用含 15% 新生牛血清的 DMEM 将细胞悬液稀释混匀,接种于 100 ml 培养瓶中,37℃ 下置入体积分数为 5% 的 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。用质量分数为 0.25% 的胰蛋白酶消化

基金项目:四川省杰出青年学科带头人培养基金资助项目(04ZQ026-33);四川省中医管理局重点科研基金资助(200239)

作者单位:646000 四川 泸州,泸州医学院附属医院新生儿科(杜逸亭,董文斌),传染与免疫研究室(王明勇),检验科(航永伦)

通讯作者:董文斌(Email: dongwenbin2000@2.163.com)

作者简介:杜逸亭(1978-),女(汉族),江苏省淮安市人,硕士研究生。

后,传代比例为 1:2,培养条件不变。实验分为 6 个大组:①缺氧(H)4 h 组;②H 12 h 组;③H 24 h 组;④H/R 4 h 组;⑤H/R 12 h 组;⑥H/R 24 h 组。每个实验组均设立空白对照组。

1.3 H/R 模型的建立:参考文献[7]方法进行改良,将已融合长满约 80%的细胞从细胞培养瓶中消化成单个细胞,调整细胞密度后向 24 孔培养板的每孔中置入 40 000 个细胞。培养板中的细胞在 37℃、5% CO₂ 的条件下共培养 12 h 后,向实验组中每孔培养基表面滴加数滴高温消毒灭菌的液体石蜡至培养基表面完全被其覆盖。H 组石蜡覆盖时间按预先设计分别为 4、12 和 24 h。H/R 实验组在石蜡覆盖 24 h 后,去除表面的液体石蜡,再分别培养 4、12 和 24 h,培养条件不变。

1.4 HK-2 细胞的苔盼兰活细胞计数及乳酸脱氢酶(LDH)检测:用 0.25%胰蛋白酶将细胞从培养板孔中消化下来,加入质量分数为 0.4%的苔盼兰溶液后进行活细胞计数。实验组细胞存活率计算公式:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{未染细胞总数}}{\text{已染细胞总数} + \text{未染细胞总数}} \times 100\%$$

培养上清液 LDH 含量检测用自动生化分析仪。

1.5 统计学分析:所有的数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较采用单因素方差分析,组内比较用 *q* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 HK-2 细胞形态学观察:H/R 过程中 HK-2 细胞形态学变化见彩色插页图 1A~G。

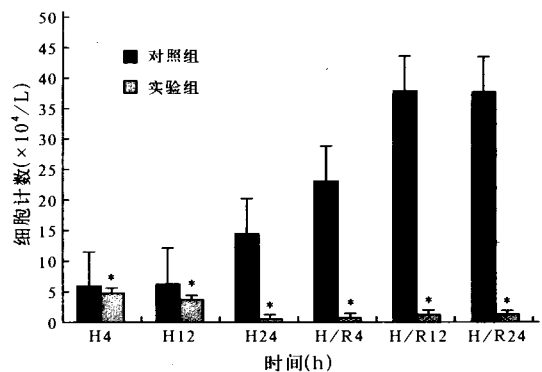
2.2 各组 HK-2 活细胞计数及细胞存活率的比较(表 1,图 2,图 3):倒置相差显微镜下观察上皮细胞,可以看到 H/R 实验组的细胞生长减慢,细胞数量和相应对照组比较明显减少,细胞形态改变,细胞之间连接松散,折光性增强,似乎吞噬了小颗粒。在 H 24 h 时,此情况达到了高峰,镜下荒凉。复氧后细胞数量有所增加,其折光性减弱,但形态改变不明显。对照组细胞透明,生长旺盛,呈扁平的多角形,随着培养时间的延长,细胞之间紧密相靠,互相衔接,逐渐连成片。同时可见:HK-2 细胞给予缺氧刺激后其细胞生长较对照组明显减慢,至 H 24 h 达最低值,细胞复氧后活细胞计数虽稍有增加,但细胞计数增加不显著;而对照组细胞的生长遵循了一代细胞的生长过程,经历了滞留期、指数生长期和平台期。实验组细胞给予缺氧刺激后其存活率开始下降,在 H 24 h 时至第一个低谷,复氧后细胞存活率稍有波动,到 H/R12 h 时降至最低值,24 h 又稍有增加。

表 1 各组 HK-2 细胞计数及存活率比较($\bar{x} \pm s, n=7$)

Table 1 Cellular count and cellular viability of HK-2 after being stimulated with hypoxia followed by reoxygenation($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	时间(h)	细胞计数($\times 10^4/L$)	细胞存活率 Δ (%)
对照组	H 4	5.83 ± 0.32	
	H 12	6.23 ± 0.25	
	H 24	14.33 ± 1.53	
	H/R 4	22.77 ± 6.31	
	H/R 12	37.40 ± 13.08	
	H/R 24	37.20 ± 2.43	
实验组	H 4	4.87 ± 0.31*	83.29 ± 1.80
	H 12	3.68 ± 0.61*	59.50 ± 3.43
	H 24	0.50 ± 0.39*	3.51 ± 1.06
	H/R 4	0.72 ± 0.47*	6.25 ± 2.87
	H/R 12	1.14 ± 0.11*	2.53 ± 0.86
	H/R 24	1.14 ± 0.04*	3.80 ± 0.59

注:与对照组比较:**P* < 0.05;组内比较: ΔP < 0.05



注:与对照组比较:**P* < 0.05

图 2 HK-2 细胞实验组细胞计数和对照组比较

Figure 2 Cellular count of HK-2 after being stimulated with hypoxia followed by reoxygenation corresponding control group

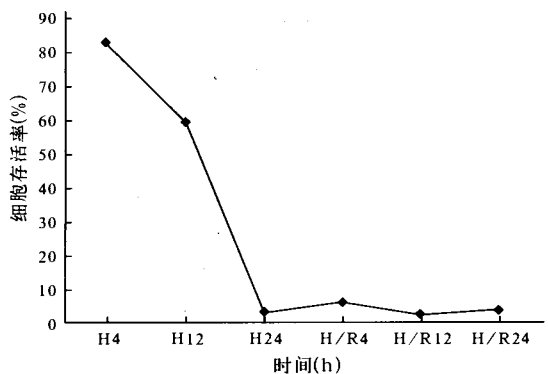


图 3 HK-2 细胞 H/R 各实验组细胞存活率变化

Figure 3 Cellular viability of HK-2 after being stimulated with hypoxia followed by reoxygenation

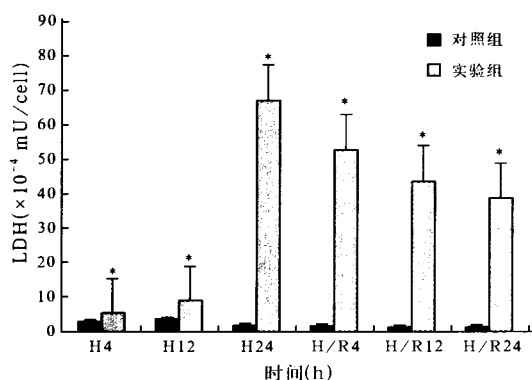
2.3 HK-2 细胞培养基中 LDH 含量(表 2,图 4):缺氧各实验组培养基中 LDH 含量随缺氧时间的延长明显高于相应对照组,且 LDH 含量在 H 24 h 达到最高峰(66.82 ± 20.28) × 10⁻⁴ mU/cell;复氧后 LDH 含量逐渐下降,至 H/R 24 h 时含量降至

表 2 各组 HK-2 细胞 LDH 含量比较($\bar{x} \pm s, n=7$)Table 2 Change of LDH activity in the culture medium of HK-2 after being stimulated with hypoxia followed by reoxygenation corresponding control group($\bar{x} \pm s, n=7$) $\times 10^{-4}$ mU/cell

组别	H 4 h	H 12 h	H 24 h	H/R 4 h	H/R 12 h	H/R 24 h
对照组	2.45±1.38	3.21±0.47	1.46±0.45	1.26±0.12	0.92±0.12	1.00±0.29
实验组	5.28±1.84*	8.61±2.23*	66.82±20.28*	52.63±11.60*	44.09±8.83*	39.12±9.13*

注:与对照组比较: * $P < 0.05$

(39.12±9.13) $\times 10^{-4}$ mU/cell。对照组 LDH 含量随着细胞的生长而逐渐升高,在实验组相应时间点 H 12 h 达到高峰(3.21±0.47) $\times 10^{-4}$ mU/cell,随后逐渐下降。



注:与对照组比较: * $P < 0.05$

图 4 HK-2 细胞实验组与对照组 LDH 含量比较

Figure 4 Change of LDH activity in the culture medium of HK-2 after being stimulated with hypoxia followed by reoxygenation corresponding control group

3 讨论

H/R 对肾脏的损伤是一个临床问题,其病因复杂,涉及多种因素。为研究其对肾脏的损伤,国内外的研究者在体外实验中采用混合气体培养法、缺氧槽培养法、无糖培养基培养法、氮气饱和培养基法等多种方法。混合气体培养法需要混合气体培养箱,这种培养箱价格昂贵,一般实验室无法开展;利用缺氧槽进行细胞培养也存在同样的问题;无糖培养基培养法虽然简单,但是该法模拟的环境与机体受到 H/R 损伤的真实环境有差异;氮气饱和培养基法需要检测培养基中的氮气浓度,操作较繁琐。

本实验使用活细胞计数计算细胞存活率和检测细胞培养基中的 LDH 含量作为检测指标^[8]。检测细胞培养基中的 LDH 是因为 LDH 能催化乳酸生成丙酮酸,LDH 常作为一个衡量细胞膜是否完整的重要指标,甚至被看作是 H/R 至细胞发生不可逆损伤的指示剂。缺氧期间由于细胞糖酵解增强,乳酸的产生增多,故 LDH 的合成加快、活力增强。同时,H/R 损伤签署可引起细胞的能量代谢障碍,代谢物堆积,使溶酶体膜的稳定性降低,溶酶体释放引起生物膜

的变形和损伤。在 H/R 时,细胞清除自由基的酶类活性降低,导致脂质过氧化物的降解产物丙二醛(MDA)在胞内含量增高,通过连锁反应导致细胞膜结构和功能的进一步损伤,使本以高于正常的 LDH 漏出细胞。

给予缺氧刺激后,细胞受损明显,细胞形态改变,细胞之间连接松散,折光性增强,似乎吞噬了小颗粒。各组中对照组活细胞数均高于实验组,其细胞存活率急剧下降,在缺氧 24 h 降至最低值。缺氧各实验组培养基中的 LDH 含量明显高于相应对照组,并随着缺氧时间的延长而较对照组明显增高。在缺氧 24 h 给予复氧后,细胞损伤情况没有缓解而是继续加重,细胞的折光性虽然减弱,但形态无明显变化,细胞存活率没有明显改变,在 H/R12 h 时达到了最低值。缺氧各实验组培养基中的 LDH 含量明显高于相应对照组,LDH 含量随着缺氧时间的增加继续较对照组明显增高,表明缺氧后复氧也是对细胞的一个损伤因素。对照组 LDH 含量表现为随着相应缺氧实验组的时间点改变而先增高,在对应的 H 12 h 达到了高峰,之后逐渐降低。结合对照各组细胞计数,HK-2 细胞在实验相对应的 H 4 h 和 12 h 这一时间段时,仍处于一代细胞生长的滞留期,此时间段内是细胞被胰蛋白酶溶解掉部分细胞膜(细胞间相连接处)到重新贴壁生长增殖的阶段。未修复的细胞膜必然会释放出 LDH,在之后的时间直到 H/R12 h 细胞释放到培养基中的 LDH 含量很低,这一时间段内细胞生长旺盛处于指数生长期,细胞功能好,释放的 LDH 少,随后细胞进入生长平台期,细胞代谢减慢,活力降低,LDH 释放又逐渐增多。实验组 LDH 含量随着缺氧时间的延长显著升高,在 H24 h 达到高峰。复氧后 LDH 含量逐渐减少,这短时间细胞数量无明显改变,在一定的时间内释放到培养基中的 LDH 也相应的减少。

采用液体石蜡覆盖法造成体外培养细胞缺氧环境的方法是肯定的。研究使用的液体石蜡简单、价廉,是可以直接获得的普通试剂。采用此法操作简便易行,易于推广,可以使一般实验室研究缺氧对肾小管细胞甚至其他种类的细胞成为可能。

参考文献:

- 1 Combe C, Burton C J, Dufourco B P, et al. Hypoxia induces intercellular adhesion molecule - 1 on cultured human tubular cells[J]. *Kidney Int*, 1997, 51: 1703 - 1709.
- 2 周四桂, 雷小勇, 廖端芳. 缺氧预适应对缺氧复氧诱导内皮细胞-中性粒细胞黏附的影响[J]. *中国危重病急救医学*, 2003, 15: 159 - 162.
- 3 张岚, 宋欣, 李向红, 等. 缺氧-再给氧刺激的脑微血管内皮细胞表达细胞间黏附分子-1[J]. *中国应用生理学杂志*, 1998, 14: 14 - 16.
- 4 宋扬, 沈洪, 丁爱石, 等. 纳洛酮对体外培养的缺氧大鼠皮质神经元细胞凋亡的影响[J]. *中国危重病急救医学*, 2003, 15: 553 - 556.
- 5 宋振举, 杨光田, 陆德琴, 等. 缺氧与复氧对脑动脉内皮细胞一氧化氮合酶 mRNA 表达的影响[J]. *中国危重病急救医学*, 2003, 15: 535 - 537.
- 6 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996. 73 - 82.
- 7 徐建文, 张更, 王玮, 等. 围生期缺氧缺血后脑组织型纤溶酶原激活物的活性变化[J]. *实用儿科临床杂志*, 2002, 17: 444 - 446.
- 8 Doctor R B, Mandel L J. Minimal role of xanthine oxidase and oxygen free radicals in rat renal tubular reoxygenation injury [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1991, 1: 959 - 969.

(收稿日期: 2005 - 03 - 13 修回日期: 2005 - 10 - 01)

(本文编辑: 李银平)

• 病例报告 •

肝破裂致下腔静脉破裂 1 例救治成功体会

郭卫 董方林

【关键词】 肝破裂; 肝血流阻断; 不规则切除

车祸致肝左叶全部、肝右叶部分碎裂时, 出现肝右静脉断裂、肝后下腔静脉破裂损伤, 易引起致命性大出血, 是最危险的腹部损伤之一。我院 2005 年 1 月成功救治 1 例肝损伤分级 V 级的患者。现结合文献讨论成功救治的经验与体会。

1 病历简介

患者男性, 19 岁, 骑摩托车摔伤致腹痛 2 h 入院, 门诊腹腔穿刺抽出不凝血 5 ml, B 超示肝破裂、腹腔积液, 立即输液后入院。查体: 脉搏 94 次/min, 血压 80/50 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa), 意识清, 重度贫血貌, 心、肺无异常, 腹部隆起, 右上腹压痛, 反跳痛阳性, 肝浊音界扩大, 叩诊浊音, 移动性浊音阳性, 肠鸣音弱。入院诊断: 腹部闭合性损伤, 肝破裂伤, 失血性休克。入院后立即输血、抗休克治疗, 右锁骨下静脉穿刺置管, 全麻后气管插管, 剖腹探查, 右肋缘下斜切口入腹。见腹腔大量积血 3 000 ml, 探查见肝右叶左侧, 肝左叶全部呈广泛组织碎裂, 直达第二肝门, 肝左静脉, 肝中静脉断裂, 下腔静脉裂伤约 2 cm, 大出血, 血压 52/30 mm Hg。用干纱布块压迫创面, 导尿管阻断肝门(每 10 min 松导尿管 1 次, 给肝供血 1~2 min), 沿长切口, 切除胸骨剑突, 断离肝圆韧带, 肝镰状切

带, 左三角韧带, 冠状韧带。显露第二肝门, 下腔静脉。切除全部肝左叶、尾状叶, 不规则切除部分肝右叶及胆囊(共切除肝脏约 2/3)。用手阻断下腔静脉, 修补其裂伤, 结扎肝左静脉, 肝中静脉, 肝右叶创面止血, 探查右肝管已分离, 有胆汁流出, 考虑手术时间长(术中患者继续出血 2 000 ml, 血压下降至 0, 瞳孔散大, 直径 6 mm, 对光反射差, 生命垂危, 中止手术), 停止作胆管吻合。右肝管放置引流管, 文氏孔、肝创面各放一引流管, 大网膜覆盖肝创面, 然后关腹。术中共输入红细胞悬液 4 000 ml、血浆 800 ml、血小板计数 $10 \times 10^9/L$ 、纤维蛋白原 1 g、输液共计 8 500 ml。术后 30 min 患者瞳孔恢复正常, 自主呼吸恢复正常, 脉搏 100 次/min, 血压 100/60 mm Hg, 护送患者到重症监护治疗病房(ICU)监护。

术后予继续抗休克、输血、保肝、保肾、营养支持, 手术前后共输红细胞悬液 5 200 ml、血浆 2 000 ml、全血 400 ml、血小板 $10 \times 10^9/L$ 、纤维蛋白原 1 g。使患者平稳渡过休克、感染期。术后有黄疸及漏胆发生, 于第 12 d 送上级医院行二次手术。第 20 d 行空肠-右肝管吻合, 于手术后 1 个月黄疸消退, 痊愈出院, 至今存活。

2 讨论

肝破裂合并肝后下腔静脉破裂, 是肝脏最严重的损伤, 易引起致命性的大出血, 病死率达 60%~80%^[1]。主要原

因是位置隐蔽、显露困难、很难处理, 此时应快速用手或纱布压迫肝创面, 阻断肝血流, 切除碎裂的肝组织, 显露下腔静脉, 修补裂口, 迅速止血。切口的选择以右肋缘下切口, 或上腹正中切口, 必要时胸腹联合切口, 切口大, 视野宽, 有利于操作。肝血流的阻断: 一般肝损伤小, 可阻断肝门血供, 修补肝裂伤, 如阻断肝门后仍有大量出血, 要考虑有肝后下腔静脉裂伤, 肝静脉裂伤^[2], 此时需行全肝血流阻断^[3]。如肝裂伤创面呈广泛不规则裂伤, 行肝组织不规则切除, 创面止血, 手术要快, 必要时行第二次手术^[4]。术前建立快速输液通路, 积极抗休克; 术后 ICU 监护, 抗休克, 充分引流, 抗感染等, 是防止并发症, 降低病死率的重要治疗措施。

参考文献:

- 1 Misra B, Agner T, Boneval H. Injuries of hepatic vein and retrohepatic vena injury [J]. *Am J Surg*, 1983, 49: 54.
- 2 李宜雄, 吕新生. 肝外伤的诊断和治疗 [J]. *肝胆外科杂志*, 1999, 7: 88.
- 3 徐少明. 全肝血流阻断下的肝后段下腔静脉修补术 [J]. *中国实用外科杂志*, 1999, 19: 7.
- 4 李鸿伟, 顾凤元. 8 例严重肝破裂伴近肝静脉损伤的处理 [J]. *中国危重病急救医学*, 1996, 8: 626 - 627.

(收稿日期: 2005 - 01 - 16)

修回日期: 2005 - 10 - 03)

(本文编辑: 李银平)

作者单位: 518112 广东省深圳市布吉人民医院普外科

作者简介: 郭卫(1957-), 男(汉族), 陕西省西安市人, 副主任医师。

蛋白酶抑制剂对内毒素致大鼠肾功能损害的保护作用

(正文见603页)

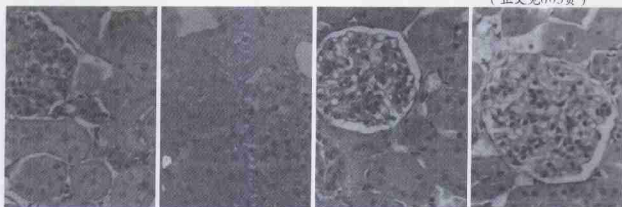


图1 正常对照组大鼠肾组织病理学变化(HE, x100)
Figure 1 Pathological changes of renal tissue in normal control group(HE, x100)

图2 LPS组大鼠肾组织病理学变化(HE, x100)
Figure 2 Pathological changes of renal tissue in LPS group(HE, x100)

图3 大剂量UT干预组大鼠肾组织病理学变化(HE, x100)
Figure 3 Pathological changes of renal tissue in large dosage of UT intervention group(HE, x100)

图4 小剂量UT干预组大鼠肾组织病理学变化(HE, x100)
Figure 4 Pathological changes of renal tissue in small dosage of UT intervention group(HE, x100)

PPAR γ 和 α -SMA在单侧输尿管梗阻大鼠肾组织中的表达及其意义

(正文见611页)

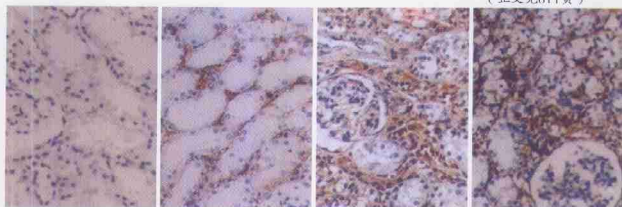


图1 假手术组PPAR γ 的表达(免疫组化, x200)
Figure 1 Expression of PPAR γ protein in sham-operated group (immunohistochemistry, x200)

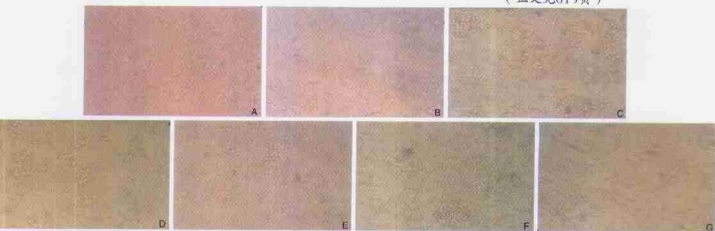
图2 模型组术后3 d PPAR γ 的表达(免疫组化, x200)
Figure 2 Expression of PPAR γ protein in UUO 3 days group (immunohistochemistry, x200)

图3 模型组术后14 d PPAR γ 的表达(免疫组化, x200)
Figure 3 Expression of PPAR γ protein in UUO 14 days group (immunohistochemistry, x200)

图4 模型组术后28 d PPAR γ 的表达(免疫组化, x200)
Figure 4 Expression of PPAR γ protein in UUO 28 days group (immunohistochemistry, x200)

人近曲肾小管上皮细胞缺氧/复氧损伤模型的建立

(正文见619页)



注: A为正常对照, B为H4h, C为H12h, D为H24h, E为H/R4h, F为H/R12h, G为H/R24h

图1 各组HK-2细胞H/R过程中形态学变化(x100)

Figure 1 Changes of morphology of HK-2 cells during H/R in each group (x100)