·维普资讯 http://www.cqvip.com

肾近曲小管 细胞系 温度控制 血管高血压 血管紧张肽原

参 考 文 献

1. Bannister R, J of Auto. Nerv.Sys, 1990;30:s19
2. Bannister R. 2nd edn.0xford University Press. 1988
3. Robertson D,er al. Int Angiol,1993;12(2):93
4. Singamells NJ,et al. Lancet,1995;345:1024
5. Gentric A, et al. J Am Geriatr Soc,1993:41(5):550
6. Freewman R,et al. Arch,Neural.1991;48(2):185
7. Malik M,et al.Clin Cardiol 1990;13:570
8. Hayano J,et al.Am J Cardiol 1991:67:199
9. Krdbs HB,et al,Am J Obstet Gynecol,1982;10:1060
10. Murakawa Y,et al.Br Heart J,1993;126:108
12. Ewing JE,et al.Am Heart J,1984;52:396
13. 谢正祥,等.科学技术文献出版社,北京,1992
14. Gill JS, et al.Electrophysiol. 1992;15(11):2206
15. Luria MH,et al.Am Heart J,1993;125(3):676
16. Hukiuri AV,et al.circulation 1993;87(4):1220
17. Pomeranz B,et al.Am J Physiol.1985;248:H151
18. Bigger JT,et al.AM J cardiol. 1992;69:891
19. Goldberger AL.et al.Sci.Am.1990;262(2):42
20. Deering W et al.IEEE ENG Med Biol.1992;11(2):40
21. Goldberger AL.IEEE Eng Med Biol. 1992;11(2):47
22. Xu XH,et al.Chinese J BME.1995;13(3):128
23. 徐晓红,等.中华物理医学杂志 1995;17(4)212
24. 徐晓红,等.生物医学工程杂志 1996;13(1):25

(收稿日期 1996－09－28)

276-277

(37)

介绍一种温度控制的鼠近曲小管细胞系

基础医学院生物教研室 尹泰昌* 徐 述

R544.1

中图分类号 R318.16

温度控制为条件的鼠肾近曲小管细胞系由美国犹他大学霍华德—休斯医学院Jean—MarcLa, Lalouel M.D,人类遗传学实验室所建立[1],已培养30余代未见丧失肾近曲小管细胞的特性,目前正在用于血管紧张肽酶—血管紧张肽原系统与原发性高血压的生理学及基因突变分子了生物学研究,因此该细胞系在基础与临床研究是非常有价值的。

1 温度控制为条件的鼠肾近曲小管细胞系(tsmpt)的建立

用r—干扰素(r—interferon,r－INF)诱导,经精基因(tsA58)后携带有温度敏感的sv40大T抗原(Temperatuer sensitive large T antige of SV40)的雄鼠(trangenic mouse)[2]与雌鼠129/3vEv杂交,从子代鼠的肾皮质近曲小管细胞(Murine proximal tubulets)培养获得温度条件控制的小鼠肾近曲小管上皮细胞系(tsMPT),用k1培养基以常规数量细胞接种于培养瓶,37°C24小时培养细胞即附着,换培养基,加INF10μ/ml,转移含5%CO_2,33°C下培养。传代后的细胞保持在含10%小牛血清,青一链霉素及谷胺酰胺、INF 10u/ml的DMEM培养基中。2～3天后用胰酶0.05%EDTA消化、传代、若要诱导细胞分化,则在实验前48～86小时将培养基更换成不含INF,温度条件是39°C即可。

2 tsMPT细胞系的生长特点

在33°C温度条件下细胞生长分裂,该细胞经INF诱导有胞核内大T抗原的表达特点。当在39°C条件不大T抗原表达下降,在48小时即不能被检测出。一般用正常近曲小管上皮细胞培养少数几代后,细胞即停止分裂,不能繁殖,而tsMPT由于病毒DNA的表达[3],使细胞不能分化,持续分裂,但它又具有近曲小管细胞的特点,故形成可长期培养的有温度条件控制的细胞系。

当tsMPT细胞生长时见细胞集合成团(domes)现象,是细胞间的紧密连接所致。这是上皮细胞特征之一,该细胞碱性磷酸酶、碳酸酐酶Ⅳ均为阳性。在33°C时,细胞扁平有极性,有单层,有时也有多层。转移至39°C时细胞进入分化状态,电镜下可见线粒体增加,细胞顶端微绒毛清晰可见,这是肾近曲小管细胞的特征。在细胞生理方面该细胞具有Na^+－Na^+－D－葡萄糖及Na^+－脯氨酸等的同向运输交换。近曲小管细胞与体内大量Na^+、碳酸氢盐及水价等重吸收有关,它是体内Na^+及体液平衡的重要部位。该细胞具有甲状旁腺素,血管紧张肽Ⅱ(angiotesinⅡ),多巴胺(dopamine)等重要激素受体。通过甲状旁腺素刺激(而不是精氨酸后叶加后素)可使胞内产生第二信使cAMP。因此,tsMPT细胞是来源于肾近曲小管上皮细胞而

* 男,1935－07出生,教授

维普资讯 http://www.cqvip.com

不是肾集合管细胞。该细胞系用于生理学基础研究是非常有价值的。

3 SV40大T抗原的检测

将33℃,INF诱导的细胞溶解，按100μl细胞溶解液加5 ml抗大T单隆抗体及蛋白酶A Sepherose(20μl),x SDS—PAGE电泳，将分离的蛋白带进行Western印迹分析。SV40大T抗原分子量为84KD。

用免疫细胞化学方法也对SV40大T抗原进行检测，鼠单抗和免抗鼠多抗实验，萤光显微镜下可见在33℃培养的细胞大T抗原于细胞核内，而转移至39℃培养的细胞大T抗原的荧光标记减弱甚至不能检测，提示抗原降解。

4 钠依赖的物质运输

近曲小客的细胞一个重要特征Na^+依赖的物质运输，如Na^+piD—葡萄糖，氨基酸等。当有α—甲基—D—吡喃葡萄糖苷、磷酸(pi)及l—脯氨酸三种物质进行试验，当三种物质运输在低水平时提示细胞Na^+缺乏，而三种物质运输在高水平时细胞生率降低。用磷酸单蚁酸(Phosphonoformic acid)处理将导致49.9％磷酸摄取抑制，由5mM砷酸(arsenate)将导致75％磷酸摄取抑制。

5 胞内环磷酸腺苷(cAMP)的检测

由甲状腺素(parathyroid hormone pTH)的作用引起肾近曲小管细胞内第二信使cAMP的产生。对照肾曲小和及肾集合管细胞内cAMP的产生主要靠精氨酸后叶加素(arginine vasopersin, AVP)刺激。用5×10^{-7}M PTH作用于tsMPT细胞可见胞内cAMP显著增加，但同样浓度的AVP验，cAMP却无变化。

6 碳酸酐酶Ⅳ的证实

碳酸酐酶Ⅳ(Carbonic anhydrase isozymeⅣ、cAⅣ)位于肺部及肾近曲小管刷状缘膜处，通过该标志酶来确认tsMPT。用Western Ep迹分析tsMPT细胞粗制液液表明膜上有CA—Ⅳ存在，且分子量为34KD。用免疫细胞化学测示CA－Ⅳ在33℃及39℃培养的细胞都有分布。

7 tsMPT细胞血管紧张肽原RNA的测试

在肝及其它组织证实可合成血管紧张肽原(Angiotersinogen,Agt)在肾脏主要分布在肾近曲小管[4]。在39℃培养的分化细胞，可经转录形成AgtmRNA。经逆转录PCR(RT—PCR)可预期获得Agt mRNA。

8 小结

美国J.M.L实验正在致力于血管紧张肽原(Agt)基因变异与高血压盐敏感研究，Agt是血管紧张肽酶(renin)的底物，者被催化成血管紧张肽Ⅱ(angtotesinⅡ)，该物促进近曲小管对Na^+的重吸收。而Na^+重吸收的异常相关于Agt的产生。这被认为是原发性高血压的可能原因之一，为此该实验室建立了tsMPT细胞系进行基础与临床及分子生物学研究。Havertg[5]报道了类似的细胞系，但没有温度条件限制，细胞也不能分化。

总之，tsMPT细胞系有如下特点①细胞生长有极性，细胞顶端有微绒毛，细胞生长分裂可形成domes提示细胞间有紧密连接的形成，这是上皮细胞的特征。②具有位于刷状缘质膜的碳酸酐酶Ⅳ，这是近曲小管细胞的标志酶。③具有Na^+依赖的Pi,D—葡萄糖,L—脯氨酸的运输这是肾近曲小管细胞基本生理功能，④对PTH着作用而不是AVP的作用于膜受体在胞内产生二信使cAMP证明该细胞系是近曲小管而不是远曲小管或集合管细胞。⑤最有说服力的是胞内可测出血管紧张肽原的存在。直接与肾近曲小管上皮对Na^+重吸收有关。以上从形态生理生化及mRNA水平证明tsMPT细胞系是非常典型近曲小管上皮细胞系。

(致谢:J—M Laloue博士及要Mahmoud等人给予有关资料)。

参 考 文 献

1. Loghman—Adham M. et al
2. Yanai N,etal Jpn. J. Cancer Res 82:1344—1348., 1991
3. Chou, J. Y, Mol Endocrinol 3:1511—1514 1989
4. Moe, O. W, et al sem Naphrol,13:552—55711993
5. Haverty, T.P. etalj cell Biol 107 1359－1368 1988

(收稿日期1996—10—18)