DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.17.032
第25卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 17
2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2003

文章编号:1000-5404(2003)17-1573-03

论著

氧化低密度脂蛋白对人肾小球系膜细胞增殖周期的影响

李开龙,张建国,王惠民,闫振成, 涵露 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所肾内科,重庆 400042)

提 要:目的 研究氧化低密度脂蛋白(Oxidized low density liporotein, Ox-LDL)对培养的人肾小球系膜细胞(Human mesangial cell, HMC)增殖周期的影响。方法 将与不同浓度Ox-LDL共培养后的HMC制成单细胞悬液,经流式细胞仪检测后,计算出细胞周期中的G_0/G_1期、S期、G_2+M期各时期的百分比及S期抑制百分比、细胞增殖指数。结果 低浓度(<100 μg/ml)的Ox-LDL明显刺激HMC增殖,表现为G_0/G_1期细胞百分比减少及S期细胞增加;细胞的S期抑制百分比明显下降,而细胞的增殖指数则显著增高($P<0.01$);高浓度(>150 μg/ml)的Ox-LDL明显抑制HMC增殖,表现为G_0/G_1期细胞百分比增加及S期细胞减少,细胞的S期抑制百分比明显增加,而细胞的增殖指数则显著降低($P<0.01$)。结论 不同浓度的Ox-LDL可能通过对MC增殖周期的不同影响,参与肾小球硬化过程中从MC过多状态到MC过少状态的一系列病理过程。

关键词:氧化低密度脂蛋白;人肾小球系膜细胞;增殖周期
中图法分类号:Q513+.5;R322.6+1;R329.2+8 文献标识码:A

Effects of oxidized low density lipoprotein on proliferation phases of cultured human mesangial cells

LI Kai-long, ZHANG Jian-guo, WANG Hui-min, YAN Zhen-cheng, DING Han-lu (Department of Nephrology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of oxidized low density lipoprotein (Ox-LDL) on proliferation phases of cultured human mesangial cells(HMCs). **Methods** HMCs incubated with Ox-LDL at different concentrations were made into mono cell suspension. After the mono cell suspension was detected by flow cytometry, the percentages of G_0/G_1 phase, S phase or G_2+M phase in cell proliferation phases were calculated, respectively. Reduced percentages in S phase and proliferation index of HMC were also calculated. **Results** Ox-LDL of lower concentrations (<100 μg/ml) enhanced ($P<0.01$) HMC proliferation. The percentage of G_0/G_1 phase decreased distinctly but the percentage of S phase increased. However, the reduced percentage in S phase decreased but the proliferation index of HMC increased. On the other hand, Ox-LDL of high concentrations (>150 μg/ml) could significantly inhibit HMC proliferation($P<0.01$). The percent of G_0/G_1 phase increased markedly but the percentage of S phase decreased. However, the reduced percentage in S phase increased but the proliferation index of HMC decreased. **Conclusion** By diversely affecting the proliferation phases of HMCs with different concentrations, Ox-LDL may have the potential to cause an initial hypercellular (at lower concentrations) and subsequent hypocellular(at higher concentrations) mesangium in the course of the development of glomerulosclerosis.

Key words: oxidized low density lipoprotein; human mesangial cell; cell proliferation phase

肾小球硬化是一个肾小球细胞数先过度增殖、继而进行性下降和细胞外基质进行性增加的过程,后者研究较多,前者报道相对较少。研究表明,肾小球系膜细胞(Mesangial cell, MC)和巨噬细胞可通过"清道夫"受体大量摄入氧化低密度脂蛋白(Oxidized low density lipoprotein, Ox-LDL)、导致前列腺素E_2(Prostaglandin E_2, PGE_2)合成增多,使肾小球内血流动力学和血管通透性改变进一步加剧,并产生大量细胞因子刺激MC合成基质;同时MC和巨噬细胞摄入大量Ox-LDL后变成泡沫细胞,最终死亡[1,2]。Sharma[3]报道,低密度脂蛋白(Low density lipoprotein, LDL)在低浓度(<100 μg/ml)时可促进MC增殖,高浓度时可促进MC凋亡;而Ox-LDL在浓度为50到200 g/L时均可促进MC凋亡,参与了肾小球硬化过程中从细胞过多状态到细胞过少状态的

作者简介:李开龙(1966-),男,湖北省广水市人,硕士,副主任医师,副教授,主要从事泌尿内科疾病的临床方面的研究,发表论文28篇。电话:(023)68757446

收稿日期:2002-07-18;修回日期:2002-09-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

细胞丧失过程。但 Ox-LDL 是否直接参与对 MC 增殖周期的影响以及如何影响，目前未见文献报道。我们研究了不同浓度 Ox-LDL 对培养的人肾小球系膜细胞(Human mesangial cell，HMC)增殖周期的影响，以期更广泛地探讨肾小球硬化的发生机制。

1 材料和方法

1.1 材料

80、120 和 200 目不锈钢筛网(浙江上虞县矿用仪器厂)；倒置相差显微镜(XSJ-D 型，日本 Olympus)；FACScan 流式细胞仪(美国)。FCS 和 RPMI1640 培养基粉(美国 Hyclon 公司产品)；0.25%胰蛋白酶和Ⅳ型胶原酶(美国 Sigma 公司产品)；兔抗人Ⅷ因子相关抗原多克隆抗体工作液和小鼠抗人波形蛋白(Vimentin)单克隆抗体工作液(武汉博士德公司产品)；LDL(北京协和医科大学生化教研室提供)；丙二醛(MDA)为北京邦定公司产品；标准荧光小球(美国 Coulter 公司产品)。

1.2 方法

1.2.1 人肾小球系膜细胞培养与鉴定 参照文献[4]，取利凡诺引产的 5～6 月龄胎儿肾脏，剥除肾纤维膜，剪下肾皮质、弃髓质。将皮质剪成碎糜状，依次过 80、120 和 200 目钢筛，于 200 目钢筛筛面上收集肾小球。以无血清 RPMI1640 培养液洗涤肾小球 1 次，1 000 r/min 离心 5 min、弃上清，加 0.1% Ⅳ型胶原酶 2 ml，37 ℃水浴箱内震荡消化 20 min。无血清 RPMI1640 培养液洗涤肾小球后进行收集。用 20%FCS-RPMI 1640 培养液悬浮肾小球块，接种至 2 只 50 ml 培养瓶中，置恒温 CO_2 培养箱(37 ℃、5% CO_2)中培养。5 d 后换液，以后每 2～3 天换液 1 次。2 周左右，细胞贴满瓶底，可行传代培养。培养的细胞经倒置相差显微镜观察、HE 染色、电镜观察、Ⅷ因子以及 Vimentin 单克隆抗体免疫细胞化学鉴定，均证实为 HMC。实验用细胞为 3～6 代 HMC。

1.2.2 LDL 的氧化与鉴定 参照文献[5]进行。

1.2.3 Ox-LDL 对 HMC 增殖周期的影响 取 3～6 代 HMC，以 20% FCS-RPMI1640 培养液制成细胞悬液，按 1×10^4/孔接种至 96 孔培养板，待细胞贴壁后，以无血清 RPMI1640 培养液培养 24 h，使 HMC 同步化。取出已同步化的培养板，吸净各孔内的原培养液，按对照组、实验 1 组、实验 2 组和实验 3 组分别加入 Ox-LDL 终浓度为 0、100、150 和 200 μg/ml 的 20%小牛血清 RPMI 1640 培养液培养 48 h，每孔 200 μl，每组复孔数为 7。

1.2.4 HMC 增殖周期的流式细胞仪检测

1.2.4.1 HMC 单细胞悬液制备及染色 各组实验结束后，以 0.05%胰蛋白酶及 0.02% EDTA 液消化，收集细胞，PBS 洗 2 遍，1 500 r/min 离心 5 min、弃上清，75%乙醇滴注固定细胞。离心后弃上清液，PBS 洗 1 次后加入 0.1% Triton X-100 于室温静置 5 min。再离心弃上清，加入 0.1%RNA 酶 1ml 混匀后置 37 ℃水浴箱内震荡 10 min，离心后弃上清，然后加入 0.05%碘化丙锭(Propidium，PI)1 ml 染色并调整细胞悬液浓度至 1×10^6/ml。4 ℃下避光静置 30 min，经 60 U 尼龙筛网过滤后上机检测。

1.2.4.2 流式细胞仪检测 ①流式细胞仪(Flow cytometer，FCM)主要工作原理[6]：将经过 PI 染色的细胞悬液样本置于 FACScan 流式细胞仪检测样本盒中，FCM 液压系统将细胞悬液从样本室内压出并以单个细胞通过激光照射区，与氩离子激光器产生的激光相交，在激光激发下，被染色成分发出荧光，经光电倍增管接受并转化为电信号，输入计算机处理。显示器上通过单参数或多参数图象显示结果，再经 EASY-88 型专用电脑 PARAI 软件程序转换资料进行分析，从而计算出细胞周期中 G_0/G_1 期、S 期、G_2+M 期各时期的百分比及各群细胞的道数。②样本检测前机器校准：采用标准荧光小球校准机器，使其 CV 值在 3%以下，检测样本前测定人淋巴细胞为外定准。③FCM 结果计算：DNA 指数(DNA Index，DI)：细胞 DNA 含量用 DI 来表示，DI 是根据样本 G_0/G_1 期细胞群道数与正常细胞(这里采用的是正常人淋巴细胞) G_0/G_1 期细胞群道数的比值来确定的，它主要反应的是细胞增殖周期中静止期的细胞状况。

DI=(样本 G_0/G_1 期细胞群峰道数)/(正常细胞 G_0/G_1 期细胞群峰道数)

增殖指数(Proliferative Index，PI)为细胞周期中 S 期和 G_2+M 期与整个细胞周期的比例，反应了细胞的增殖水平。

PI=(S+ G_2+M)/(G_0+G_1+S+G_2+M)

1.3 统计学处理

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 不同浓度 Ox-LDL 对培养 HMC 增殖周期的影响

低浓度(< 100 μg/ml)的 Ox-LDL 可使 HMC G_0/G_1 期细胞百分比减少及 S 期细胞增加($P<0.01$)；高浓度(> 150 μg/ml)的 Ox-LDL 可使 HMC G_0/G_1 期细胞百分比增加及 S 期细胞减少($P<0.01$)，见表 1。

表 1 不同浓度 Ox-LDL 对培养 HMC 增殖周期的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of Ox-LDL at different concentrations on proliferation phases of cultured HMCs($\bar{x}\pm s$)

	n	G_0/G_1	G_2+M	S	S+G_2+M
Control	7	42.50±7.56	13.32±7.86	36.37±2.04	49.69±9.90
1	7	28.22±5.27 *	15.37±3.21	52.84±4.21 *	68.21±7.42 *
2	7	68.54±4.20 **##	14.17±4.70	16.43±3.28 **##	30.60±7.98 **##
3	7	70.16±8.35 **##	14.73±5.64	15.96±4.77 **##	30.69±10.41 **##

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control；##：$P<0.01$ *vs* 1

2.2 不同浓度 Ox-LDL 对培养 HMC S 期抑制百分比和 HMC 增殖指数的影响

对照组 HMC S 期细胞道数分别减去实验组 HMC 的 S 期细胞道数、再除以对照组 HMC S 期细胞道数，绝对值即为 HMC S 期抑制百分比，反应了 S 期细胞增殖的被抑制程度。低浓度(< 100 μg/ml)的 Ox-LDL 可使 HMC S 期抑制百分比明显下降，细胞的增殖指数显著增高($P<0.01$)；高浓度(> 150 μg/ml)的 Ox-LDL 可使 HMC S 期抑制百分比明显增加，而细胞的增殖指数则显著降低($P<0.01$)，见表 2。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　不同浓度 Ox-LDL 对培养 HMC S 期抑制百分比和 HMC 增殖指数的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effects of Ox-LDL at different concentrations on reduced percentage in S phase and proliferation index of cultured HMCs($\bar{x}\pm s$)

	n	Reduced percent in S phase(%)	PI
Control	7	0	0.62±0.14
1	7	45.28±1.26	0.77±0.16 *
2	7	54.83±6.49 #	0.36±0.08 #
3	7	56.12±4.28 #	0.34±0.09 #

*: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.01$ *vs* control and 1

3　讨论

肾小球硬化是肾小球疾病进展到肾功能不全的共同病理过程,它包括早期肾小球有核细胞过度增殖、继而肾小球细胞数进行性下降和细胞外基质进行性增加等一系列动态过程。在人和动物模型的病变肾组织中,均发现有 LDL 及 Ox-LDL 沉积[7],其中 Ox-LDL 可能是由肾小球内固有细胞或浸润细胞的氧化修饰而来[8]。研究表明,LDL、Ox-LDL 均可通过各种途径刺激 MC 增殖和细胞外基质合成增加[9,10],Wanner[11] 的研究还发现,脂蛋白 a 也具有促进 MC 增殖和细胞外基质合成的作用;Chen 等[12,13] 则发现,载脂蛋白 E 和高密度脂蛋白对 LDL、Ox-LDL 和脂蛋白 a 的这种刺激 MC 增殖和细胞外基质合成效应具有一定的缓解作用。Ox-LDL 的促 MC 增殖和细胞外基质合成作用可能是通过刺激细胞因子生成和/炎性介质的浸润来实现的[14,15],此外,LDL、Ox-LDL 可能还通过对 MC 信号传导途径的影响来促进 MC 增殖[8]。LDL、尤其是 Ox-LDL 还可通过加速 MC 凋亡促成肾小球细胞数的进行性减少[1,2,16]。本研究从 Ox-LDL 对 HMC 增殖周期影响的角度出发,通过体外实验发现,不同浓度的 Ox-LDL 对 HMC 增殖周期的影响绝然不同,低浓度(< 100 μg/ml)的 Ox-LDL 明显刺激 HMC 增殖,表现为 G_0/G_1 期细胞百分比减少及 S 期细胞增加;细胞的 S 期抑制百分比明显下降,而细胞的增殖指数则显著增高(与对照组相比 $P<0.05$ 或 0.01);高浓度(> 150 μg/ml)的 Ox-LDL 明显抑制 HMC 增殖,表现为 G_0/G_1 期细胞百分比增加及 S 期细胞减少,细胞的 S 期抑制百分比明显增加,而细胞的增殖指数则显著降低(与对照组和低浓度组相比 $P<0.01$)。表明,低浓度的 Ox-LDL 可通过对 MC 增殖周期的作用刺激 MC 增殖,即通过促成 G_0/G_1 期细胞百分比减少及 S 期细胞的增加、S 期抑制百分比的下降和细胞增殖指数的增高($P<0.01$)而达到 MC 增殖增强的结果;高浓度的 Ox-LDL 则通过直接对 MC 增殖周期的影响抑制 MC 的增殖,即直接刺激 G_0/G_1 期细胞百分比的增加及 S 期细胞的减少,增加 HMC 的 S 期抑制百分比、降低 HMC 的增殖指数。这可能是 Ox-LDL 参与肾小球硬化发生发展的机制之一。

参考文献:

[1] Schlondorff D. Cellular mechanisms of lipid injury in the glomerulus[J]. Am J Kidney Dis, 1993, 22(1): 72—82.

[2] Zingg J M, Ricciarelli R, Azzi A. Scavenger receptors and modified lipoproteins: fatal attractions[J]? IUBMB Life, 2000, 49(5): 397—403.

[3] Sharma P, Reddy K, Franki N, *et al*. Native and oxidized low densitylipoproteins modulate mesangial cell apotosis[J]. Kidney Int, 1996, 50(5): 1604—1611.

[4] 辛　榕, 卞修武, 焦怡然. 肾小球系膜细胞体外培养方法的改进[J]. 第三军医大学学报, 1994, 16(5): 357—359.

[5] 王惠民, 朱妙珍, 张建国, 等. 抗氧化剂 PDTC 抑制氧化的低密度脂蛋白诱导的人肾小球系膜细胞 NF-kB 活化[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, 18(1): 36—38.

[6] Melamed M R. Flow cytometry and sorting[M]. New York: John wiley and Sons, 1999. 1—5.

[7] Kirschenhaum M A, Pai R, Roh D D, *et al*. Role of atherogenic lipoproteins incytokin-mediated movascular injury[J]. Miner Electrolyte Metab, 1996, 22(1—3): 47—50.

[8] Kamanna V S. Low density lipoproteins and mitogenic signal transduction-processes: role in the pathogenesis of renal disease[J]. Histol Histopathol, 2002, 17(2): 497—505.

[9] Nishida Y, Oda H, Yorioka N. Effect of lipoproteins on mesangial cellproliferation[J]. Kidney Int Suppl, 1999, 71: S51—53.

[10] Roh D D, Kamanna V S, Kirschenhaum M A. Oxidative modification of low-densitylipoprotein enhances mesangial cell protein synthesis and gene expression of extracellular matrix proteins[J]. Am J Nephrol, 1998, 18(4): 344—350.

[11] Wanner C, Greiber S, Kramer Guth A, *et al*. Lipids and progression of renal disease: role of modified low density lipoprotein and lipoprotein(a)[J]. Kidney Int Suppl, 1997, 63: S102—106.

[12] Chen G, Paka L, Kako Y, *et al*. A protective role for kidney apolipoprotein E. Regulation of mesangial cell proliferation and matrix expansion[J]. J Biol Chem, 2001, 276(52): 49142—49147.

[13] Kramer Guth A, Greiber S, Pavenstadt H, *et al*. Interaction of native and oxidized lipoprotein(a) with human mesangial cells and matrix[J]. KidneyInt, 1996, 49(5): 1250—1261.

[14] Nishida Y, Yorioka N, Oda H, *et al*. Effect of lipoproteins on cultured humanmesangial cells[J]. Am J Kidney Dis, 1997, 29(6): 919—930.

[15] Kamanna V S, Pai R, Roh D D, *et al*. Oxidative modification of low-density lipoprotein enhances the murine mesangial cell cytokines associated with monocyte migration, differentiation, and proliferation[J]. Lab Invest, 1996, 74(6): 1067—1079.

[16] Kamanna V S, Bassa B V, Vaziri N D, *et al*. Atherogenic lipoproteins and tyrosinekinase mitogenic signaling in mesangial cells[J]. Kidney Int, 1999, 71: S70—75.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net