DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.07.026
第22卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 7
676 2000年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2000

文章编号:1000-5404(2000)07-0676-03

论著

IL-1对肾小球系膜细胞增殖和周期素依赖激酶2表达的影响

赵景宏[1],王军平[2],曾 毅[1],杨惠标[1] (第三军医大学:[1]附属新桥医院肾内科,重庆 400037;[2]预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨白细胞介素-1(IL-1)对肾小球系膜细胞增殖及周期素依赖激酶2(CDK_2)表达的影响。方法 利用体外培养的大鼠肾小球系膜细胞,分别采用噻唑蓝掺入法、流式细胞仪检测、免疫细胞化学等方法观察IL-1作用前后系膜细胞增殖情况以及CDK_2的表达变化。结果 IL-1可以明显促进系膜细胞增殖,同时伴有CDK_2的表达增高。结论 IL-1对系膜细胞有明显的促增殖作用,其机制可能与影响CDK_2的表达有关。

关键词:白细胞介素-1;系膜细胞;CDK_2
中图法分类号:R392.12 文献标识码:A

Effects of interleukin-1 on proliferation and CDK_2 expression of glumerular mesangial cells of rats

ZHAO Jing-hong, WANG Jun-ping, ZENG Yi, YANG Hui-biao (Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of interleukin-1 (IL-1) on the proliferation of the glomerular mesangial cells of rats in culture and cyclin-dependent kinase-2 (CDK_2) expression in the cells. **Methods** MTT, flow cytometry and immunocytochemistry were employed. **Results** The expression of CDK_2 was increased in the proliferative phase of glomerular mesangial cells induced with IL-2. **Conclusion** CDK_2 can be used as a marker to show the conversion of glomerular mesangial cells from the quiescent phase to proliferative phase.

Key words: interleukin-1; mesangial cell; glomerulus; cyclin-dependent kinase-2; rat

肾小球系膜细胞增生在肾小球肾炎及肾小球硬化过程中起着非常关键的作用[1]。然而,肾小球系膜细胞增生的内部机制尚不清楚。近年来研究表明,细胞的增殖状态与细胞周期调控蛋白的表达变化密切相关。周期素依赖激酶2(Cyclin dependent kinase 2, CDK_2)是细胞周期正调控蛋白的一种,它通过与周期素(cyclin)结合而形成活性复合物,发挥促进细胞增殖的作用[2]。本研究探讨了炎性介质IL-1对肾小球系膜细胞周期素依赖激酶CDK_2表达的影响及其与系膜细胞增生的关系,旨在细胞周期水平阐明IL-1等炎性因子刺激系膜细胞增生的作用机制,从而进一步解释某些疾病的发生、发展过程。

1 材料与方法

1.1 肾小球系膜细胞培养与鉴定

6~8周龄Wistar大鼠,体重在80~120 g,无菌条件下取大鼠肾脏,用无菌D-Hanks液冲洗,剥离肾包膜,分离肾皮质,用剪刀将其剪成碎块,置于100目筛网上研磨,收集过筛悬液,倒在150目筛网上反复冲洗,最后将冲洗下来的悬液倒在200目筛网上,尽量只冲洗不研磨。吸出少许组织倒置显微镜下观察肾小球纯度达98%,即收集网上肾小球,用0.7%的Ⅳ型胶原酶消化,边消化边观察,以肾小球囊从肾小球剥脱为适度,然后1 000 r/min离心5 min,弃上清,以20%小牛血清RPMI 1640悬浮肾小球,置培养瓶中在37 ℃、5% CO_2孵箱中孵育。倒置显微镜下观察培养的细胞形态。分别用抗结蛋白、抗细胞角蛋白、抗Ⅷ因子相关抗原抗体进行免疫组化染色,染色结果显示抗结蛋

作者简介:赵景宏(1973—),女,河北省保定市人,硕士研究生,医师,主要从事增殖性肾病方面的研究。电话:(023)65426995

收稿日期:1999-11-07;修回日期:2000-04-11

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

白为阳性, 抗细胞角蛋白和 Ⅷ因子相关抗原为阴性, 表明培养的细胞为系膜细胞[3]。

1.2　肾小球系膜细胞增殖情况的观察

取 2~4 代生长良好的系膜细胞接种于 96 孔细胞培养板, 约 3×10^3 细胞/孔, 用 20% FCS1640 培养液培养 48 h 后, 换无血清 1640 培养液同步 24 h, 然后分 2 组, 每组 8 个样本进行以下实验。第 1 组为对照组加入无血清 1640 培养液, 第 2 组为无血清 1640 培养液中加入 10 ng/ml 的 IL-1(北京中山公司)。分组培养 8、16、24、32 h 后用噻唑蓝(MTT)法检测细胞增殖, 用酶标仪读取各个样本 D_{490} 值。

1.3　流式细胞仪检测细胞周期各阶段细胞数的百分比

肾小球系膜细胞 6×10^5 培养于 25 cm^2 培养瓶中, 24 h 后更换无血清培养液使细胞同步 24 h, 然后进行同上的分组培养。根据以上 MTT 检测结果, 选择 IL-1 作用最明显的时相点用流式细胞仪检测细胞周期各阶段细胞数的百分比, 以观察 IL-1 对细胞周期的影响。流式细胞仪为美国 BIO-RAD Model 3550。

1.4　免疫细胞化学染色

参照 S-P 试剂盒操作方法: 细胞培养情况同上, 8、16、24、32 h 后分别进行细胞滴片, 4%的多聚甲醛固定, 0.3% H_2O_2, 0.3% TritonX-100 及 10%山羊血清进行封闭, 加入 1∶100 稀释一抗 37℃孵育 1 h(CDK_2 一抗购自武汉博士德公司), 再与生物素标记二抗及链霉素亲生物蛋白-过氧化物酶复合物反应, DAB 显色。阴性对照用 0.01 mol/L PBS 代替一抗进行免疫细胞化学染色。

1.5　统计学处理

采用 t 检验。

2　结果

2.1　IL-1 对系膜细胞增殖的影响

MTT 法检测证明 IL-1 对系膜细胞有明显的促增殖作用, 在 24 h 系膜细胞增殖达到高峰, 见表 1。

表 1　MTT 法检测 IL-1 对系膜细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of IL-1 on the proliferation of mesangial cells($\bar{x}\pm s$)

Group	8 h	16 h	24 h	32 h
Control	0.194±0.006	0.205±0.011	0.215±0.018	0.211±0.009
IL-1	0.239±0.003*	0.287±0.004*	0.325±0.017*	0.309±0.008*

*: $P<0.01$ *vs* control

2.2　流式细胞仪检测细胞周期各阶段细胞数百分比的结果

根据 MTT 检测结果, 我们分析了系膜细胞增殖达高峰时(IL-1 作用后 24 h)细胞周期各阶段细胞数百分比。结果与正常对照组比较, IL-1 作用 24 h 时培养系膜细胞 S 期的细胞数增加显著($P<0.05$), 见表 2。

表 2　IL-1 对系膜细胞细胞周期各阶段的影响(%)

Tab 2　Effect of IL-1 on the stages of cell cycle of mesangial cells(%)

Group	G_1	S	G_2/M
Control	92.6	7.1	0.3
IL-1	88.9	10.9*	0.2

*: $P<0.05$ *vs* control

2.3　免疫细胞化学染色结果

与正常系膜细胞免疫化学染色相比, IL-1 作用后各时相点 CDK_2 免疫化学染色均明显增强, 其中 24 h 时最为显著, 见图 1、2。



图 1　体外培养正常系膜细胞 CDK_2 低表达　(S-P×200)

Fig 1　Low expression of CDK_2 in normal mesangial cells cultured *in vitro*　(S-P×200)

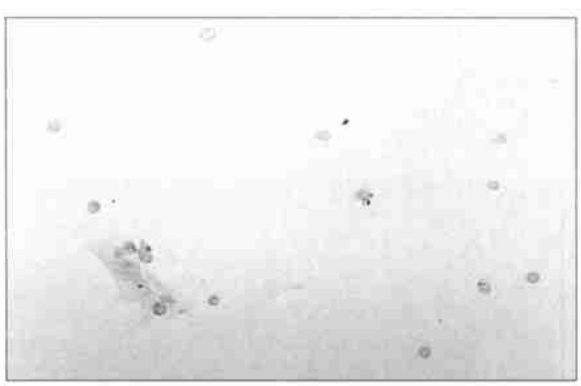


图 2　IL-1 作用 24 h 后 CDK_2 表达明显增高　(S-P×200)

Fig 2　The expression of CDK_2 increased significantly inmesangial cells treated with interleukin-1 for 24 h(S-P×200)

3　讨论

肾小球系膜细胞增生是导致肾小球硬化乃至肾功

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

能衰竭的主要原因之一。而细胞增殖实质上是促进与抑制增生的失衡。近年来研究表明，细胞增殖的调节最终发生在细胞周期水平上，整个细胞周期的完成有赖于正性和负性周期调节蛋白之间的平衡[4]。周期蛋白依赖激酶(CDK)是一类正性细胞周期调节蛋白，它们通过与周期素结合而形成活性复合物，这些复合物中有些是G_0/G_1时相转换与G_1早期所需[5,6]，有些是G_1/S期DNA合成与M期有丝分裂所需。在非肾系细胞的研究中发现，细胞增殖时CDK_2表达明显增高，细胞静止时CDK_2水平则较低。所以我们推测CDK_2有可能在肾小球系膜细胞的增生中占有重要的地位，各种细胞因子刺激系膜细胞增殖或许与CDK_2表达变化密切相关。

已知IL-1是引起肾小球病变的主要炎症介质之一，但到目前为止IL-1对肾小球系膜细胞的影响尤其是其影响机制尚未清楚。本实验的MTT和流式细胞仪结果表明IL-1可以显著刺激系膜细胞增生，使由G_0/G_1期进入S期的细胞增加，也就是DNA合成增加。我们进一步采用免疫细胞化学染色证实IL-1诱导培养系膜细胞增殖的同时CDK_2表达增高。CDK_2的表达增高将引起cyclin-CDK活性增强，表明IL-1对系膜细胞的促增殖作用与CDK_2的表达上调有关，从而揭示了IL-1影响系膜细胞增生的内部机制。并由此提示我们在治疗以肾小球系膜细胞增生为特征的肾脏疾病时，可以将CDK_2作为作用目标。

随着细胞周期成为近年来的研究热点，在肾脏领域的研究也将日益受到关注，细胞因子与细胞周期正、负调控蛋白的关系已倍受重视，通过这方面的研究可以从根本上揭示各种细胞因子的作用机制，并从一个全新的角度揭示肾脏疾病的发生机制，为肾脏疾病提供新的治疗途径。

参考文献：

[1] Floege J, Johnson R J, Gorder K, *et al*. Increased synthesis of extracellular matrix in mesangial proliferative nephritis[J]. Kidney Int, 1991, 40(3): 477—488.

[2] Lees E M, Harlow E. Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase[J]. Mol Cell Biol, 1993, 13(2): 1 194—1 201.

[3] 于力方，陈香美，黎磊石. 正常人肾小球系膜细胞培养的研究[J]. 中华肾脏病杂志，1990，6(2)：70—72.

[4] Morgan D O. Principles of CDK regulation[J]. Nature, 1995, 374(6 518): 131—134.

[5] Ohtsubo M, Theodoras A M, Schumacher J, *et al*. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G_1 to S phase transition[J]. Mol Cell Biol, 1995, 15(5): 2 612—2 624.

[6] Girard F, Strausfeld U, Fernandez A, *et al*. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts[J]. Cell, 1991, 67(6): 1 169—1 179.

(编辑 陈聪连)

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2000)07-0678-01

微波局部治疗晚期直肠癌11例报告

Report of locally treating 11 cases of late rectal carcinoma by microwave

周 建 (重庆市第一人民医院外科，重庆 400010)

11例患者中，男性3例，女性8例，年龄47～71岁，平均61.6岁，肿块距肛门3.5～7 cm，占据肠腔2/3至一周，所有病人均有不全性肠梗阻或排便困难或便血。并发广泛肝转移2例，肺转移1例，癌肿肠外侵润呈“冰冻盆腔”3例，伴严重心肺疾病，极度虚弱(体重仅32 kg)1例，因种种原因拒绝手术4例。

采用福建威利医疗器械公司生产的MTC-Ⅱ型微波手术器。病人经禁食、输液，1∶2∶3液灌肠或抠出干硬粪团等措施解除梗阻后再进行治疗。患者取截石位或左侧卧位，肛镜插入直肠，用棉球吸尽肠腔内液体，将单针电极平行于肠管插入突出于肠腔的肿块内，用100 W的功率辐射20～30 s，见肿癌表面产生固化带后再相隔1.5 cm距离重复操作，直至突出于肠腔的肿

(下转681页)

作者简介：周 建(1956—)，男，重庆市人，主治医师，主要从事肛肠外科方面的研究。电话：(023)63708731

收稿日期：2000-01-15；修回日期：2000-03-30

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