DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.04.022

经验交流

肾小球系膜细胞的培养及内皮素对其作用的观察

Observation of culture of glomerular mesangial cells and the effects of endothelin

孙慧勤 谯怡然 (第三军医大学基础部病理解剖学教研室) 630038

近年的有关研究认为肾小球系膜细胞(mesangial cell,MC)是一种多功能细胞,在许多肾小球疾病中处于中心地位,而MC的体外培养,则是一起步较晚、难度较大的技术工作。1975年Fish等[1]首先培养分离成功MC;国内谌贻璞等[2]1987年也成功地培养出大鼠MC,从而为MC的研究提供了捷径。内皮素(endothelin,ET)是1988年发现的一种以强烈缩血管为特征的短肽[3],与肾脏有密切关系,但其作用机理不清。本文应用MC的培养方法,观察了ET对大鼠MC的收缩与增殖作用,以探讨ET在肾脏疾病中的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 MC的培养

参照谌贻璞等[2]的方法进行。Wistar大鼠,体重100~150 g,雌雄不拘,5只/次,麻醉后于无菌条件下取出双肾,分离肾皮质,剪碎后研磨,经60目(280 μm)、150目(100 μm)、220目(70 μm)的不锈钢筛网过筛,最后收集220目筛网之上的肾小球,经0.1%胶原酶(Sigma公司产品)于37℃水浴中消化25 min左右后,以15%小牛血清-RPMI 1640完全培养基(含胰岛素0.66 U/ml,pH7~7.3)悬浮肾小球于37℃、5% CO_2的孵箱中培养。一般于第5~7天肾小球贴壁率达70%~时作首次换液,以后每2~4日换液一次,待3~4周MC长满培养瓶(皿)底时,以0.125%胰蛋白酶消化传代,选用传代培养1次后的MC进行本实验研究。

1.2 培养的MC鉴定

将生长于载玻片上的原代、亚培养1代的MC经PBS洗涤后固定,分别用抗actine、抗Ⅷ因子抗体作间接免疫荧光染色,以及常规扫描电镜制样后摄相、观察。

1.3 ET引起MC的收缩试验

参照Fandrey等[4]的方法,于实验开始前以温Hank's液洗培养皿内的MC两次。在37℃条件下,选定一观察区域摄相(记为0时),加入含ET(Sigma产品,临用前配制)5 nmol/L的Hank's液,通过连续摄相(一般间隔2 min),记录ET作用下MC形态的变化。独立重复上述实验3次。

1.4 ET促MC的增殖试验

用0.125%的胰酶将长满的MC从瓶壁上消化下来,离心并以无血清RPMI-1640调节其浓度达10^5个细胞/ml(经台盼兰染色,着色细胞除外),按0.1 ml(10^4个细胞)/孔的量转入96孔微量培养板内生长(37℃,5% CO_2)。24 h后,大部分细胞同步于G_1期,此时分别加入不同浓度的ET,使其终浓度各为0.1、1、5、10、100 nmol/L(ET临用前以无血清培养基稀释),以等量无血清1640培养基作为对照,各浓度均设10个平行孔($n=10$),置孵箱孵育12 h后,再加入^{3}H-TdR(中国科学院原子能研究所产品)0.5 μCi/孔,孵育48 h后,消化,DYQ Ⅰ型多头细胞收集器(浙江绍兴产品)收集MC于49型滤纸上,纸片经烘干后置入含闪烁液(PPO 5 g,POPOP 0.4 g,二甲苯加至1升)5 ml/瓶的闪烁瓶中,用LKB-1217型液闪仪(荷兰产品)检测其放射性强度,结果以测得各孔的cpm值表示。

1.5 统计方法

数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,以本校数学教研室提供的PDA-2统计程序作单因素方差分析,$P<0.05$为差异显著,$P\leqslant 0.01$为差异非常显著。

2 结果

2.1 MC的培养

经150目过筛后的肾小球几乎可完全脱去肾小球囊腔,0.1%胶原酶消化后90%以上的肾小球可除去脏层上皮。原代培养3日左右便有10%肾小球贴壁,MC呈放射状从肾小球中长出并可形成结节性突起(Hillocks),一般3~4周时MC便可长满。

2.2 MC的鉴定

培养的MC呈梭形、星形及三角形,胞核椭圆形,位于中央,胞质向外伸出数个长短不一的突起(图1),密集生长时,可出现重叠生长现象(图2)。原代及亚培养1代的MC经抗actine抗体间接免疫荧光染色显示胞浆阳性,抗Ⅷ因子抗体染色阴性;SEM见细胞表面微绒毛极少,而可见胞浆局部隆起(可能由微丝束形成)。上述结果表明所获得的细胞为MC。

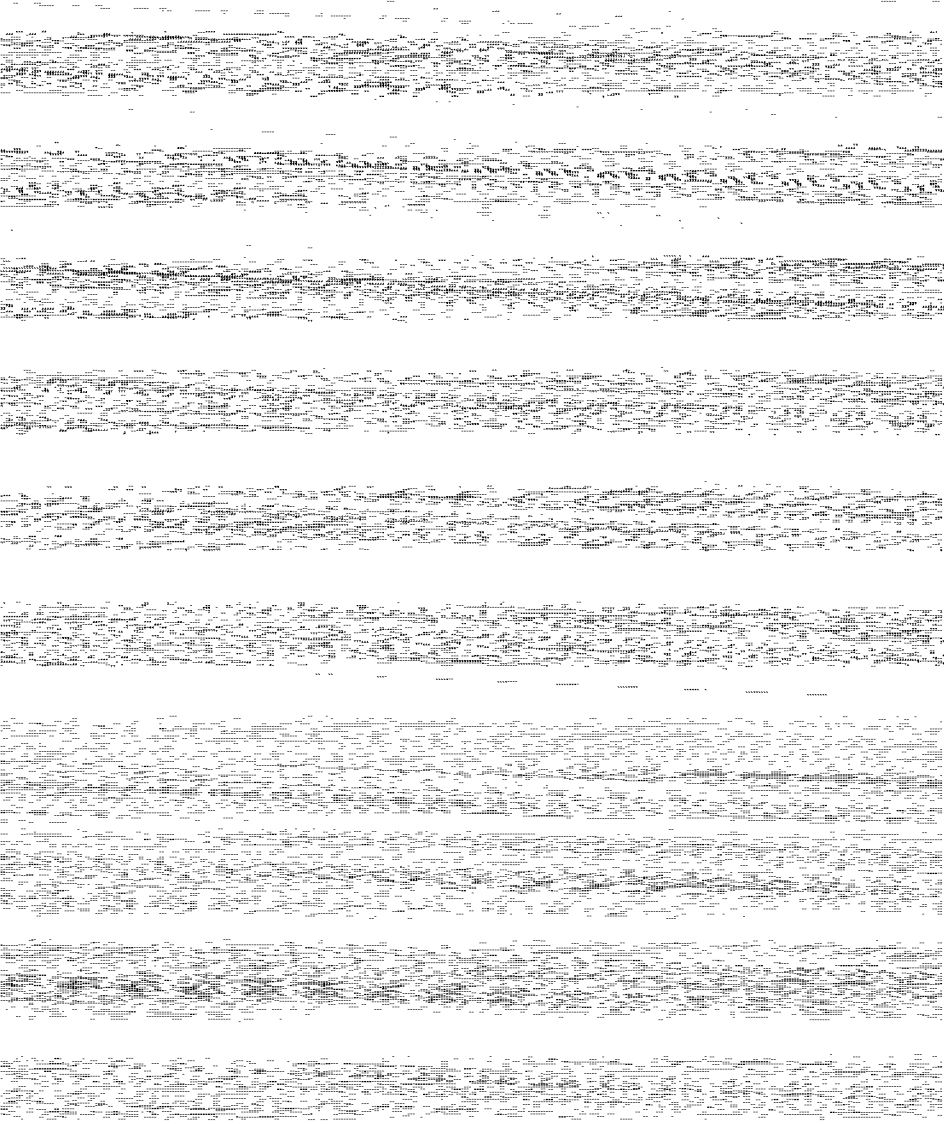
2.3 ET引起MC的收缩试验

加入ET(5 nmol/L)后约2 min时,出现可见的细胞收缩变化,胞突变细变短;以后变化逐渐明显,18 min时,细胞形态变化最为明显:胞突回缩、胞体变圆,细胞长度与直径均明显缩小(图3)。

2.4 ET促MC的增殖试验

加入ET后,MC的48 h ^{3}H-TdR掺入显著增加,与对照

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



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

并逐步加强，提示ET有降低GFR的可能性。活体情况下，MC的收缩可引起与之相连的毛细血管管腔直径的缩小，从而调控肾小球血流并减少肾小球有效滤过面积，导致单个肾小球滤过率(SNGFR，SNGFR＝kf·$\overline{PuF}$，其中kf为超滤系数，是有效滤过面积与有效水通透性的乘积)的降低。这在急性肾功能衰竭(ARF)的发生中尤为重要。MC对ET刺激的慢性反应是发生增殖，本文ET作用下48 h MC的^{3}H-TdR掺入量的明显增加说明了这种反应的强度。MC的增生，不但增多的细胞会对外围的毛血血管造成挤压甚至使之闭塞而影响肾小球的滤过率，而且增多的MC产生过多的基质，也会引起肾小球硬化的发生。

我们在通过大鼠静脉注射ET后所致肾功能障碍模型中的肾脏病理观察中已经发现：给ET后半小时，肾小球毛细血管丛缩小，管腔不易分辨，肾功能降低；而至48 h后，则见MC增生，系膜区扩大，而肾功能仍未恢复(待发表)。本文结果也说明了活体实验中所见的MC病理变化与ET的直接作用有关。ET对MC的作用，提示了ET在肾脏疾病中的重要性，已证实：肾脏是ET作用最敏感、来源最广泛的器官之一，血管包括肾小球毛细血管内皮、上皮、MC本身等均具有产生与释放ET的能力[8]。缺血、缺氧、凝血酶、血管内皮的损伤可促ET释放，并且组织缺血时可表现出增加的ET缩血管活性与其它毒性作用，任何以低灌注为特征的紊乱都将激活和/或增强ET的病理作用[2,8]。

因此，可以推断：多种致伤因子可以通过刺激ET的释放而影响MC的功能，MC的收缩与增殖等病理变化将导致肾脏功能等的改变，从而引起一系列的肾脏疾病，其中尤以ARF等最为重要。预防ET的释放以及采用拮抗ET效应的治疗方法，对临床ARF等多种肾脏疾病的防治将具有重要作用。

(本文细胞培养工作得到本室辛榕技师的热心指导，谨致谢意。)

关键词 细胞，培养的；胃小球系膜；内皮素*

中图法分类号 R322.61

参考文献

1 Fish AJ, Michael AF, Vernier RL, et al. Human glomerular cells in tissue culture. Lab Invest, 1975, 33(3): 330～341

2 谌贻璞，高 进，邢宝才，等. 肾小球系膜细胞培养. 北京医科大学学报，1989，21(4)：335～336

3 Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature, 1988, 40: 1～12

4 Fandrey J, Jelkman W. Prostaglandin E_2 and Atriopeptin Ⅱ oppose the contractile effect of Angiotensin Ⅱ in rat mesangial cell cultures. Prostaglandins, 1988, 36(2): 249～257

5 Kreisberg JI, Karnovsky MJ. Glomerular cells in cultured. Kidney Int, 1983, 23: 439～447

6 Simonson MS, Wann S, Mene P, et al. Endothelin stimulates phospholipase C, Na^+/H^+ exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. J Clin Invest, 1989, 83: 708～712

7 Badr KF, Murry JJ, Breyer MD, et al. Mesangial cell, glomerular and renal vascular response to endothelin in the rat kidney. J Clin Invest, 1989, 83: 336～342

8 Kon V, Badr KF. Biological actions and pathophysiologic significance of endothelin in the kidney. Kidney Int, 1991, 40: 1～12

(收稿：1993-10-02；修回：1994-03-18)

^{99m}TC标记的EIgM测定正常大鼠枯否氏细胞补体受体清除功能

Evaluation of the clearance function of KcCR with ^{99m}TC-labelled EIgM in normal rats

陈 平 韩本立 (第三军医大学西南医院肝胆外科中心) 630038

枯否氏细胞(Kupffer cell，Kc)是机体十分重要的防御屏障，Callery实验证明，当用氯化钆($GdCl_2$)封闭Kc吞噬功能后，即使全身免疫状况改善，但仍有极高的动物感染死亡率。大量研究表明，Kc通过其膜上补体受体(CR)介导的吞噬功能，清除血循环中的细菌，对正常机体防御起重要作用[1]，因此测定Kc补体受体功能(KcCR)具有重要意义，本实验介绍用^{99m}TC标记EIgM测定大鼠KcCR清除功能。

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