

时的观察条件,未能对细胞分裂过程作动态观察。曾有作者报道鼠雪旺细胞分裂前后的细胞结构和行为的特点<sup>[11]</sup>。在人雪旺细胞培养过程中,我们注意到:分裂后的两个子细胞有形态和运动时相的不同。细胞的形态和运动(位置和形态的改变)由构成细胞骨架的微丝和微管维持。微丝微管的重聚合已被证明和雪旺细胞的形态和髓鞘基因的表达有直接联系。当用细胞松弛素干扰微丝组分的肌动蛋白的聚合,雪旺细胞成圆形而非梭形,也不表达髓鞘特异性蛋白<sup>[12]</sup>。两个子细胞运动时相和形态的差异反映了各自微丝和微管重聚合的时间差异。这是否和雪旺细胞与轴突形成一对一及长度匹配的关系有关,有待进一步研究。

### 摘 要

为了显示体外培养条件下三维结构上人雪旺细胞的形态和运动方式,将引产人胎儿坐骨神经的雪旺细胞培养在聚酯纤维上,用带培养室的显微镜观察。结果显示:人雪旺细胞呈梭

形,绕聚酯纤维作螺旋式迁移;有的细胞同时抓住两根纤维;在相对静止期,细胞虽无位置的迁移,但有频繁的形态变化;分裂后的子细胞有形态和运动时相的不同。

关键词:人雪旺细胞 聚酯纤维 体外培养

### 参 考 文 献

- [1] 严恒林等,1995,解剖科学进展,1:189-195.
- [2] 杨勤等,1996,解剖学杂志,19:404-407.
- [3] Askanas V et al.,1980,Arch Neural.,37:329-337.
- [4] Billings-Gagliardi S et al.,1974,Am J Anat.,141:375-392.
- [5] 姜文跃等,1993,神经解剖学杂志,9:63-67.
- [6] 冯广友等,1996,解剖科学进展,2:1-10.
- [7] 张自杰等,1991,中华显微外科杂志,14:42-45.
- [8] Fishman RB et al.,1993,J Neurosci.,13:3485-3495.
- [9] 黄克维主编,神经病理学,第二版,北京:人民卫生出版社,1989,220.
- [10] 严恒林等,1996,解剖学杂志,19:110-114.
- [11] Dubois-Dalcq M et al.,1981,Exp Cell Res.,131:283-297.
- [12] Fernandez-Valle et al.,1997,J Neurosci.,1:241-250.

## OBSERVATION ON THE MORPHOLOGY AND MOTILITY OF HUMAN SCHWANN CELL UNDER MICROSCOPE IN VITRO

YANG Qin QIU Yun Fang WANG YANG\* SHEN Xin Ya LIU Cai Dong

(Department of Anatomy, Shanghai Medical University 200032

\* Key Laboratory of Neurobiology, Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Science 200031)

### ABSTRACT

The purpose of present study is to demonstrate the morphology and the motility of human fetal schwann cells cultured on the three-dimensional framework in vitro. Schwann cells were cultured on the polyester fibers and were observed continuously under the microscope with the culturing setting. The results were as follows: Schwann cells were spindle shape and had bipolar processes; They migrated in a spiral fashion; one cell could connected to two fibers; Schwann cells changed their shape in the rest stage. There were different in shape and motility between the both schwann cells after mitosis.

Key words: Human schwann cells Polyester fiber In vitro

## Tolrestat 对高糖所致肾小球系膜细胞肌动蛋白去组装的影响

李才 周晓朋 侯芳玉 蔡璐

(白求恩医科大学应用基础医学研究所 长春 130021)

平滑肌样肾小球系膜细胞(MC)的收缩可调节毛细血管口径和肾小球滤过率,在糖尿病

本文1999年3月24日收到,6月29日接受。

肾病发病中起重要作用。MC 的收缩功能主要由以肌动蛋白(actin)占优势的微丝骨架的空间排布来调控。球形 actin(G-actin)与纤维形 actin(F-actin)相互转换,调节 MC 的收缩状态。最近 Zhou 等报告,高糖(HG)能引起肾小球 MC F-actin 部分去组装(disassembly),可能是由于 HG 激活蛋白激酶 C(PKC)的结果<sup>[1]</sup>。由于 PKC 可调节细胞骨架的排列方式<sup>[2]</sup>,那么活化多元醇通道激活 PKC 有可能改变 actin 的组装形式,影响 MC 的收缩状态。然而这一推测尚未得到证实。本研究应用双荧光标记技术和双通道共焦激光扫描显微镜,定量研究醛糖还原酶抑制剂 Tolrestat 对 HG 引起 MC actin 去组装的影响,以探讨多元醇通道激活在 HG 改变 actin 组装及 MC 收缩中的作用。

## 材料和方法

1. 材料:培养基(DMEM)和胎牛血清(FBS)购自 Life 实验室。罗丹阳-鬼笔环肽(rhodamine-phalloidin, R-P)、异硫氰基荧光素-脱氧核糖核酸酶-1(FITC-DNase-1, F-D)和未交联的上述单一标记物从 Molecular Probes 购得。醛糖还原酶抑制剂 Tolrestat 和 ARI509 由 Wyeth-Ayerst 实验室提供。其他试剂购自 Sigma 公司。

2. MC 培养和处理:按 Hurst 等的方法<sup>[2]</sup>分离成年大鼠肾小球,培养和鉴定 MC。DMEM 补充 10%FBS 和抗菌素。MC 在放置盖玻片的 6 孔培养板中 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养,本研究使用 5—10 代细胞。MC 融合时 FBS 降至 0.5%使细胞同步生长,培养基改为正常浓度葡萄糖(NG, 5.6mmol/L)、中浓度葡萄糖(MG, 15mmol/L)和 HG(30mmol/L)加入或不加入 Tolrestat (0.3mmol/L)继续培养 2 天后,进行荧光标记。为排除 HG 和 MG 高渗作用的影响,用等分子量甘露醇代替相应糖作为对照。

3. 荧光标记:3.7%甲醛固定和 0.1% Triton X-100 穿透后,用 0.165 $\mu$ mol/L R-P 和 0.3 $\mu$ mol/L F-D 在室温暗处分别对 F-和 G-actin 进行荧光标记和对照染色<sup>[1]</sup>。每步操作后用 PBS 洗涤 3 次。

4. 荧光强度和 MC 面积测定:F-和 G-actin 用双通道共焦激光扫描显微镜(LSM410 型, Zeiss, 德国)转换到监视器上,用相应操作程序同时测量两种 actin 荧

光强度和 MC 平面面积,并计算 F-与 G-actin 荧光强度比值。为使测量标准化,用微机控制系统调节各测量背景参数水平,使它们在整个测量过程保持恒定。

5. 统计学方法:组间均数差异显著性用方差分析检验。

## 结 果

在用等分子量甘露醇代替 HG 和 MG 的高渗对照研究中,未见 actin 组装方式有明显改变,故可排除 HG 和 MG 的高渗作用对 actin 组装的影响。荧光标记物特异性对照实验结果均为阴性,说明本研究所用的两种荧光标记物是特异的。

在共焦扫描显微镜下 F-和 G-actin 同时显现,并可分别测量各自的荧光强度。在 NG 培养的 MC 中 F-actin 微丝组装成粗大束状结构,即形成应力纤维(stress fiber)。这些纤维束大致平行,走向与细胞长轴其本一致,横跨细胞全长并终止于浆膜下。G-actin 散布于胞浆中,在核周围区较密集(图版图 1)。培养于 NG+Tolrestat 的 MC, F-和 G-actin 组装方式与 NG 培养者无明显差异。与 NG 培养相比, HG 培养 MC, 大多数 F-actin 微丝失去束状外观,变成无定形网状,即 F-actin 发生部分去组装(图版图 2)。同时, F-actin 荧光强度明显降低, G-actin 荧光强度明显增加, F/G-actin 荧光强度比值下降, MC 平面面积明显小于 NG 培养者(表 1)。

在 HG+Tolrestat 培养时,大部分 MC 的 F-actin 又呈现粗大束状,网状结构相对少见(图版图 3), F-actin 荧光强度显著上升, G-actin 荧光强度明显下降, F/G-actin 荧光强度比值和细胞面积与 NG 培养者无明显差异(表 1)。当用另一种醛糖还原酶抑制剂 ARI509 (0.1mmol/L)进行对比研究时,所得结果与 Tolrestat 一致(资料未列出)。在 MG 培养 MC 中, F-actin 的去组装状态、F-actin 和 G-actin 荧光强度及 F/G-actin 荧光强度比值均与 HG 培养时有相同的改变趋势,但变化的程度明显

表1 各组系膜细胞 actin 荧光强度和平面面积测量结果( $\bar{X} \pm S_x$ )

组别	细胞数	平均荧光强度/细胞			细胞面积( $\mu\text{m}^2$ )
		F-actin	G-actin	F-/G-actin	
NG	50	183 $\pm$ 4	61 $\pm$ 3	3.18 $\pm$ 0.10	3394 $\pm$ 208(27)
NG+Tol	40	180 $\pm$ 3	58 $\pm$ 1	3.17 $\pm$ 0.06	3215 $\pm$ 144(24)
HG	50	155 $\pm$ 4*	85 $\pm$ 3*	1.93 $\pm$ 0.07*	2439 $\pm$ 118*(30)
HG+Tol	50	175 $\pm$ 3 $\Delta$	62 $\pm$ 2 $\Delta$	2.84 $\pm$ 0.07 $\Delta$	3169 $\pm$ 159 $\Delta$ (28)

注:Tol=Tolrestat;括号内为测量系膜细胞面积的细胞数。

\*,与NG组比较, $P < 0.01$ ; $\Delta$ ,与HG组比较, $P < 0.01$ 。

轻于HG培养者(图1,2)。在MG+Tolrestat培养时,所测得的参数有的已接近或达到NG培养时的水平。

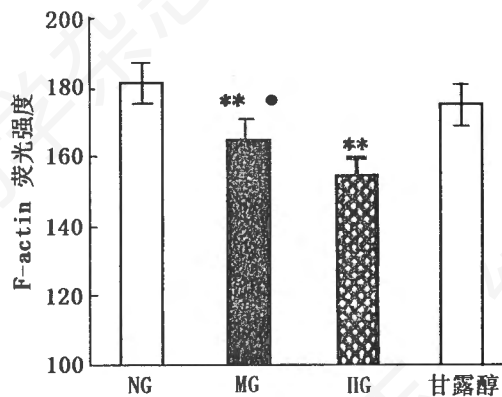


图1 各组MC F-actin 荧光强度  
\*\*  $P < 0.01$  VS NG。  
 $\Delta$   $P < 0.05$  VS HG。

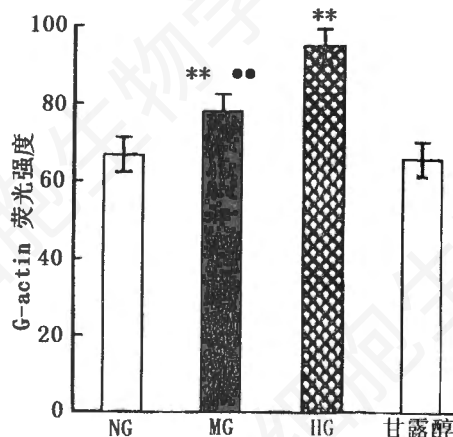


图2 各组MC G-actin 荧光强度  
\*\*  $P < 0.01$  VS NG。  
\*  $P < 0.01$  VS HG。

## 讨 论

MC含有以actin为主的微丝骨架,其中以actin对调控MC的形态、功能最为重要。actin与肌球蛋白轻链建立横桥联系,actin的组装方式调节MC的收缩状态。后者可调节毛细血管口径及肾小球滤过率。

本研究结果显示,与NG培养的MC相比,在HG培养MC中,粗大束状的F-actin明显减少,呈现网状外观,荧光强度也显著减少,而G-actin密度和荧光强度明显升高,F/G-actin荧光强度比值下降,同时MC面积也明显缩小(表1),这可能是F-actin部分去组装的结果。因为F-actin的空间结构和含量对维持MC的形态是必要的<sup>[1]</sup>。本研究结果还显示,MG对actin组装的影响与HG的趋势一致,但程度上较HG培养时明显减轻(图1,2),提示葡萄糖对actin组装的影响是取决于糖浓度的。本研究还证明,Tolrestat加入到HG培养MC后,F-actin又呈粗大束状,且增加了荧光强度,F-actin的改变和MC面积已接近NG培养者(表1)。在用ARI509的研究中也得到与Tolrestat相似的结果。这些结果表明,醛糖还原酶抑制剂阻抑多元醇通路激活,能有效防止HG引起的F-actin去组装。

然而,多元醇通路激活通过何种机制影响actin的组装状态,目前尚不完全清楚,很可能是通过激活蛋白激酶C(PKC)这一环节。糖尿病情况下当生理糖酵解途径被高浓度葡萄糖所饱和时,MC中的醛糖还原酶被活化,激活多元

醇通路,使大量葡萄糖经此通路代谢。其后果是引起胞浆 NADH/NAD<sup>+</sup> 比值明显升高<sup>[3]</sup>。后者能增加二酯酰甘油(DAG)再合成,DAG 作为 PKC 活性的重要调节物质,其含量增加可激活 PKC<sup>[4,5]</sup>。已有研究证明,MC 对缩血管多肽的收缩反应取决于肌球蛋白轻链激酶磷酸化和 F-actin 去组装<sup>[1,6]</sup>;大量细胞骨架蛋白磷酸化涉及 PKC 介导的 F-actin 去组装<sup>[7]</sup>。可见 PKC 激活与 actin 组装之间存在密切联系。我们不久前的研究证明,在 HG 时 DAG 敏感的 PKC $\delta$  荧光强度和活性明显增加,Tolrestat 可防止 PKC  $\delta$  荧光强度和活性增加,表明 HG 引起 F-actin 去组装可能通过激活 PKC 同功酶 PKC $\delta$  活性的途径<sup>[8]</sup>。

醛糖还原酶抑制剂在防治糖尿病肾病中有一定效果,除了知道它们抑制醛糖还原酶之外,对更深入的作用机制了解较少。本研究结果扩展了醛糖还原酶抑制剂防治糖尿病肾病机理的认识。醛糖还原酶抑制剂可能通过抑制多元醇通路激活,改变 MC 以及可能包括入球小动脉微丝骨架的组装方式,使这些细胞对缩血管多肽的反应性恢复正常,由此改善肾小球血流动力学异常。

## 摘 要

研究了醛糖还原酶抑制剂 Tolrestat 对高

浓度葡萄糖(HG)所致肾小球系膜细胞(MC)肌动蛋白(actin)组装的影响。结果证明,与正常浓度葡萄糖(NG)相比,在 HG 培养的 MC, F-actin 失去束状外观呈不规则网状,显示 F-actin 部分去组装;F-actin 荧光强度降低,G-actin 荧光强度升高和 F-/G-actin 荧光强度比值下降。Tolrestat 加入培养后,明显防止 HG 引起的 F-actin 去组装及 F-和 G-actin 荧光强度的变化。提示多元醇通路激活在 HG 引起的 MC actin 去组装改变中起一定作用。

关键词:多元醇通路 肾小球系膜细胞 肌动蛋白组装

## 参 考 文 献

- [1] Zhou,XP et al.,1995,*Lab Invest.*,**73**:372—383.
- [2] Hurst RD et al.,1995,*Diabetes*,**44**:759—766.
- [3] Titon RG et al.,1992,*Kidney Int.*,**41**:778—788.
- [4] Ruderman NB et al.,1992,*FASEB J.*,**6**:2905—2911.
- [5] Ayo SH et al.,1991,*Am J Physiol.*,**261**:F571—F577.
- [6] Miralem T et al.,1996,*Am J Physiol.*,**339**:F960—F970.
- [7] Aderen A.,1992,*TIBS.*,**17**:438—443.
- [8] Zhou XP et al.,1997,*Kidney Int.*,**51**:1797—1808.

## EFFECT OF TOLRESTAT ON HIGH GLUCOSE-INDUCED ACTIN DISASSEMBLY IN GLOMERULAR MESANGIAL CELLS

LI Cai ZHOU Xiao Peng HOU Fang Yu CAI Lu

(Institute of Preclinical Sciences, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun, 130021)

### ABSTRACT

The effect of Tolrestat, an aldose reductase inhibitor, on high glucose-induced actin disassembly in rat glomerular mesangial cells (MC) was quantitatively studied using dual fluorescence labeling technique and confocal laser scanning microscopy. The results showed that MC incubated in high glucose (HG), F-actin bundles appeared less prominent and changed to irregular network, displaying partial disassembly of F-actin, with decreased F-actin fluorescence intensity and increased G-actin fluorescence intensity, and consequently reduced F-/G-actin fluorescence intensity ratio as compared with those in normal glucose. In MC incubated in Tolrestat added to HG, the changes in F- and G-actin fluorescence intensities and the F-actin disassembly were significantly prevented by addition of Tolrestat. These findings indicate that the activation of the polyol pathway may play a role in HG altered actin assembly.

Key words: Polyol pathway Glomerular mesangial cell Actin assembly