

I型胶原、内皮素对肾小球内皮细胞及系膜细胞产生细胞外基质的影响

段永刚 陈香美

(解放军总医院肾科 北京 100853)

肾小球内皮细胞、系膜细胞在肾脏疾病中起着非常重要的作用,系膜细胞的过度增殖是导致肾小球硬化的重要因素。随着细胞生物学的发展,肾小球系膜细胞和内皮细胞的体外培养成功,人们对系膜细胞、内皮细胞的认识不断加深^[1-3]。晚近的研究发现肾小球细胞能合成和分泌细胞外基质(ECM)、并且ECM在肾小球疾病的发生和发展中亦起到了重要作用,在一些疾病中可以出现细胞外基质含量增多或基质成分变化^[1,2,4]。内皮细胞和系膜细胞在不同的物质刺激下,产生细胞外基质也有所改变。本文通过体外培养肾小球内皮细胞和系膜细胞观察了I型胶原、内皮素对这两种细胞增殖及其产生细胞外基质层粘连蛋白、纤连蛋白(FN)和IV型胶原的影响。

材 料 和 方 法

一、材料

明胶(日本和光纯药工业株式会社)、酸性成纤维细胞生长因子(aFGF,日本Funakoshi公司产品)、硒、转铁蛋白(美国collaborative Biomedical-Products)、V型胶原酶(Promega)、RPMI-1640(GIBCO公司)、胰岛素(上海生物化学制药厂生产)、肝素钠、胎牛血清(天津生物化学制品厂生产)、胰蛋白酶(美国DIFCO公司生产)、Ⅷ因子相关抗原、结蛋白、IV型胶原、I型胶原、内皮素均为美国DAKO公司产品,25cm²塑料培养瓶(日本under Lic.生产)。肾脏为成人肾。

二、实验方法

1. 肾小球和内皮细胞的分离 在无菌条件下,钝性剥离肾被膜,将肾皮质剪成宽约2—3mm的细条,分别经过孔径大小为212μm、100μm、75μm的细胞筛,在75μm的细胞筛上收集肾小球。将收集的肾小球用V型胶原酶消化,70×g离心2分钟收集

肾小球,上清液经250×g离心5分钟收集肾小球内皮细胞,收集的肾小球放入20%FCS 1640中进行系膜细胞培养,3—4天即有系膜细胞向外生长。

2. 细胞的培养及传代:系膜细胞在20%FCS 1640中培养,内皮细胞则需加入肝素、aFGF、胰岛素、硒、转铁蛋白。将原代培养的细胞经过4—7天后传代,分别取内皮细胞和系膜细胞应用间接免疫荧光方法用Von Willebrand factor(Ⅷ因子相关抗原)、结蛋白染色。染色结果为内皮细胞Von Willebrand factor染色阳性,系膜细胞为结蛋白染色阳性,染色方法详见[4]。

3. 将原代细胞用0.2%胰酶消化后,在倒置显微镜下计数,分别接种于25cm²塑料培养瓶每瓶4×10⁵,将两种细胞各分三组,第1组为空白对照组、第2组为内皮素组,内皮素给予刺激浓度为1.33×10⁻⁹mol/L,第3组为I型胶原组,I型胶原浓度为1mg/ml,加入瓶内铺满塑料培养瓶底,4小时后吸出剩余的I型胶原。

4. 细胞培养8天后,用0.2%胰酶消化后进行计数,并收集每瓶细胞的上清,用ELISA方法测上清液中的纤连蛋白、层粘连蛋白、IV型胶原的含量,检测方法详见[5]。

结 果

1. 各种细胞分组培养后观察8天,细胞计数结果如表1所示

表1 各组细胞培养后计数结果(×10⁵)

	内皮细胞(n=6)	系膜细胞(n=5)
空白对照	2.73±0.43	1.73±0.05
内皮素组	2.31±0.25	2.09±0.26
I型胶原组	6.56±0.61*	1.79±0.12

*与空白对照组比较P<0.01

从表1中可以看出I型胶原组细胞数较空白对照组明显增多。与空白对照组比较P<

(下转插页3)

(上接 48 页)

0.01。从倒置显微镜下观察也可以看出 I 型胶原组细胞状态较其他组好,说明 I 型胶原有促进内皮细胞增殖作用。内皮素刺激系膜细胞后细胞数亦有所增多,但与空白对照组比较 $P > 0.05$ 。

2. 各种细胞外基质的检测结果

① 各种细胞上清中层粘连蛋白检测结果如表 2 所示。

表 2 细胞培养上清中层粘连蛋白检测结果(OD 值)

	内皮细胞(n=6)	系膜细胞(n=5)
空白对照	0.230±0.015	0.341±0.045
内皮素组	0.216±0.005	0.260±0.034
I 型胶原组	0.489±0.030*	0.547±0.143

*: 与空白对照组比较 $P < 0.01$ 。

从表 2 结果看出,内皮细胞 I 型胶原组产生的细胞外基质层粘连蛋白明显增多。说明 I 型胶原有促进内皮细胞产生层粘连蛋白的作用。

② 各种细胞上清中 FN 的检测结果如表 3 所示。

表 3 细胞培养上清中纤连蛋白检测结果(OD 值)

	内皮细胞(n=6)	系膜细胞(n=5)
空白对照	0.427±0.044	0.741±0.034
内皮素组	0.442±0.032	0.871±0.023*
I 型胶原组	0.668±0.041**	0.829±0.033

*: 与空白组比较 $P < 0.05$ **与空白组比较 $P < 0.01$ 。

从表 3 中可看出, I 型胶原可以促进内皮细胞分泌 FN 增多,内皮素可以促进系膜细胞产生 FN 增多。

表 4 细胞培养上清中 IV 型胶原检测结果(OD 值)

	内皮细胞(n=6)	系膜细胞(n=5)
空白对照	0.232±0.003	0.271±0.007
内皮素组	0.230±0.005	0.293±0.008
I 型胶原组	0.244±0.005	0.325±0.012*

* 与空白对照组比较 $P < 0.01$ 。

③ 各种细胞上清中 IV 型胶原的检测如表

4 所示。

从表 4 中可以看出,系膜细胞 I 型胶原组产生 IV 型胶原明显增多,说明 I 型胶原有促进系膜细胞产生 IV 型胶原的作用。

讨 论

IV 型胶原、层粘连蛋白和纤连蛋白均为细胞外基质,它们是组成肾小球基膜的成分,在肾小球内不同部位的基膜它们各自的含量有所不同,各种细胞外基质成分在基膜中所起的作用也不相同。最近的研究证明不同物质可以改变细胞对细胞外基质的产生,如高糖可以促进系膜细胞产生 FN 增多^[6]。从本文观察的结果证实,在体外培养的肾小球细胞中, I 型胶原组内皮细胞的生长状态比对照组明显好,细胞的数量明显增加,表明 I 型胶原有促进内皮细胞生长的作用。但 I 型胶原对系膜细胞的生长无明显作用。内皮素可促使系膜细胞的生长,细胞数增多。此观察与其他报道相一致^[6]。从细胞外基质的产生来看, I 型胶原有促进内皮细胞产生层粘连蛋白和纤连蛋白作用,可促使系膜细胞产生 IV 型胶原,内皮素可促使系膜细胞产生 FN 增多。

I 型胶原本身为细胞外基质,可由系膜细胞产生,它又可促进系膜细胞产生 FN、IV 型胶原,说明了细胞外基质以自分泌的形式控制系膜细胞分泌 ECM。内皮细胞产生 FN 和 I 型胶原,但尚未见到 I 型胶原促进内皮细胞生长的报道。目前人们认为 IV 型胶原、层粘连蛋白、纤连蛋白是由细胞产生,同时对细胞维持正常结构起一定的作用,此外还有更重要的生物学意义,细胞与细胞外基质通过相互作用使细胞维持正常代谢、增殖、分化、迁移和信息传递,使细胞及细胞外基质构成的组织器官发挥特定的功能^[7-8]。在某些病理情况下,细胞外基质明显增多或系膜基质的成分改变,细胞外基质的增多可能与肾小球硬化有密切关系,因此研究细胞外基质的成分及影响因素对揭示肾脏疾病的发生发展有一定的重要意义。

(转下页)

摘 要

本文观察了 I 型胶原、内皮素对肾小球内皮细胞、系膜细胞增殖的影响,同时探讨了 I 型胶原和内皮素对培养的内皮细胞及系膜细胞产生层粘连蛋白、纤连蛋白和 IV 型胶原的影响。结果提示: I 型胶原可以明显促进内皮细胞的增殖($P < 0.01$),内皮素对系膜细胞的增殖有一定作用; I 型胶原可以促进内皮细胞产生层粘连蛋白和纤连蛋白,并可以促进系膜细胞产生 IV 型胶原;内皮素可以促进系膜细胞产生 FN 增多($P < 0.05$)。

关键词: 内皮细胞 系膜细胞 I 型胶原
内皮素 细胞外基质

参 考 文 献

- [1] 陈香美等, 1994, 第四届全国肾脏病学术会议论文摘要汇编, 387。
- [2] Myers, J. C., 1993, *kidney International*, 43: 45—52.
- [3] Ballerman, B. J., 1989, *Am. J. Physiol.*, 256: C 182—C 189.
- [4] Green, DF, et al., 1992, *Kidney International*, 41: 1506—1516.
- [5] Nahman, N S. et al., 1992, *Kidney International*, 41: 396—402.
- [6] Badr, K F. et al., 1989, *J. clin. Invest.*, 83: 336.
- [7] Abrahamson, D R. St., et al., 1993, *Kidney International*, 43: 66.
- [8] Kefelides, N A. et al., 1993, *Kidney International.*, 43: 94.

EFFECTS OF COLLAGEN I AND ENDOTHELIN ON PROLIFERATION AND PRODUCTION OF EXTRACELLULAR MATRIXES IN VITRO OF GLOMERULAR ENDOTHELIAL AND MESANGIAL CELLS

Duan yong-gang Chen xiang-mei
(General Hospital of PLA Beijing, 100853)

ABSTRACT

Huma glomerular mesangial cell (MC) and endothelial cell (EC) were cultured, and stimulated by collagen I (col I) or endothelin (ET) respectively, It was found that the number of EC counted and the level of laminin and FN in the supernatant of EC were increased in the group of adding Col I than that of control, The number of MC counted in the group of ET were slightly increased. It was also found that the level of collagen IV and FN in the supernatant of MC were increased in the group of adding Col I than that of control. The FN released by MC could be induced by ET.

Key words: Endothelial cell Mesangial cell Collagen I Endothelin
Extracellular matrix