

维生素 E 和伊那普利对高糖改变肾小球系膜细胞肌动蛋白组装的影响

李 才 侯芳玉* 邓义斌

(白求恩医科大学应用基础医学研究所、*基础医学院 长春 130021)

位于肾小球毛细血管间的平滑肌样系膜细胞(MC),通过细胞突起与毛细血管基底膜连接,其收缩可调节毛细血管口径和肾小球滤过率^[1]。MC的收缩功能主要是由以肌动蛋白(actin)占优势的细胞骨架组装状态调控的。球形的actin(G-actin)与纤维形的actin(F-actin)相互转换,维持MC的结构和收缩等功能。作为糖尿病肾病(DN)的重要启动因素,高浓度葡萄糖(HG)对MC的功能和结构有多方面影响,但HG对MC actin组装方式的影响,尚很少有人研究。

最近的研究证明,维生素E(VE)可防止糖尿病大鼠肾小球高滤过^[2],但作用机制不明。由于actin组装方式与MC收缩功能有密切联系^[3],而MC收缩可调节肾小球滤过率,那么VE能否通过改变MC actin的组装而防止糖尿病时肾小球高滤过,迄今未见报道。伊那普利(enalapril, EN)可改变肾小球入球和出球小动脉阻力,改善DN时肾小球血流动力异常,在DN防治中有较好效果。EN能否通过改变MC actin组装方式而发挥其有益作用,目前尚不清楚。本研究应用共焦激光扫描显微镜和荧光标记技术,观察HG引起的大鼠肾小球MC actin组装的变化及VE和EN对它的影响。

材 料 和 方 法

一、材料

培养基(DMEM)和胎牛血清购自美国Life实验室,罗丹明-鬼笔环肽(rhodamine-phalloidin, R-P)和异硫氰酸荧光素-脱氧核糖核酸酶-1(FITC-DNase-1, F-D)及未交联的上述单一标记物从Molecular

Probes购得。蛋白激酶C(PKC)抑制物H-7购自Colbiochem。VE(D- α -生育酚)、EN及其他试剂购自Sigma公司。

二、实验方法

1. MC培养、分组和处理 按Hurst等^[4]的方法从成年大鼠肾皮质分离肾小球,培养和鉴定MC, DMEM加入10%胎牛血清和抗菌素。本研究用培养了5—10代的MC。MC在放置盖玻片的6孔培养板37℃、5%CO₂培养。MC亚融合时培养板随机分为:正常浓度葡萄糖(5.6 mmol/L, NG)、NG+VE(100 μ mol/L)和NG+EN(25 μ mol/L), HG(30 mmol/L)、HG+VE、HG+EN和HG+H-7(70 μ mol/L)。为排除HG高渗作用的影响,用等分子量甘露醇代替HG作为对照。

2. 荧光标记 MC经3.7%甲醛固定和0.1%曲拉通x-100穿透后,用0.165 μ mol/L R-P和0.3 μ mol/L F-D分别对F-和G-actin进行特异荧光标记^[5]。为确保此标记的特异性,按Zhou等^[5]的方法进行对照实验。

3. 观察和荧光强度测量 用双通道共焦激光扫描显微镜(LSM 410型,德国产)同步显示F-和G-actin图像,用相应微机控制程序测量两种actin荧光强度,计算F/G-actin荧光强度比值。用微机控制程序调节各测量背景参比水平,使之在整个测量中维持恒定。

4. 统计学方法 用方差分析法检验组间均数差异显著性。

结 果

在用甘露醇代替HG的高渗对照实验中,未见actin组装方式有明显改变,故可排除HG因高渗作用对actin组装的影响。荧光标记特异性的研究结果表明,所用R-P和F-D

本所董玉恒主任技师进行统计学分析,特此致谢。

对 F- 和 G-actin 的标记分别是特异的。

培养于 NG 的 MC, F-actin 微丝组装成粗大束状, 即形成应力纤维(stress fibers)。这些束状纤维大致平行, 走向与细胞长轴基本一致, 横跨细胞全长并终止于浆膜。G-actin 呈颗粒状散布于胞浆内, 在核周围相对密集(图版图 1)。NG + VE 和 NG + EN 培养时, actin 组装方式及两种 actin 荧光强度均与 NG 培养者相似。与 NG 培养相比, HG 培养时 MC 大部分 F-actin 失去粗大束状外观, 变成不规则网状, 即出现 F-actin 部分去组装(disassembly, 图版图 2)。而且 F- 和 G-actin 荧光强度分别较 NG 培养者明显降低和升高, F/G-actin 荧光强度比值明显下降(表 1)。

表 1 VE 和 H-7 对系膜细胞 F-和 G-actin 荧光强度的影响(n = 40, $\bar{x} \pm s$)

组 别	F-actin	G-actin	F/G
NG	182 $\pm$ 3	60 $\pm$ 2	3.12 $\pm$ 0.08
NG + VE	181 $\pm$ 3	59 $\pm$ 2	3.10 $\pm$ 0.05
HG	155 $\pm$ 4*	83 $\pm$ 2*	1.91 $\pm$ 0.06*
HG + VE	179 $\pm$ 2 Δ	60 $\pm$ 2 Δ	2.91 $\pm$ 0.04 Δ
HG + H-7	178 $\pm$ 3 Δ	61 $\pm$ 1 Δ	2.92 $\pm$ 0.04 Δ

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

表 2 EN 对系膜细胞 F- 和 G-actin 荧光强度的影响(n = 40, $\bar{x} \pm s$)

组 别	F-actin	G-actin	F/G
NG	182 $\pm$ 3	60 $\pm$ 2	3.12 $\pm$ 0.08
NG + EN	181 $\pm$ 3	59 $\pm$ 1	3.10 $\pm$ 0.05
HG	155 $\pm$ 4*	83 $\pm$ 2*	1.91 $\pm$ 0.06*
HG + EN	178 $\pm$ 3 Δ	62 $\pm$ 2 Δ	2.90 $\pm$ 0.05 Δ

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

HG + VE 培养时, 大部分 F-actin 仍维持粗大束状, 网状外观相对少见(图版图 3)。F- 和 G-actin 荧光强度及两者荧光强度比值均与 NG 培养时无显著差异(表 1)。PKC 抑制剂 H-7 加入 NG 培养后对 F-actin 组装和荧光强度无明显影响。在 HG + H-7 培养中, HG 引

起的 F-actin 部分去组装状态、F- 和 G-actin 荧光强度及二者荧光强度比值均与 NG 培养者无明显差异(表 1)。HG + EN 培养 MC, F-actin 部分去组装表现不明显, F- 和 G-actin 荧光强度及 F/G-actin 荧光强度比值已恢复到 NG 培养的水平(图版图 4, 表 2)。

讨 论

HG 可引起 MC 对缩血管多肽的收缩反应性降低, 形成 MC 功能不全^[4]。这种 MC 功能不全在 DN 发病机制中起重要作用。MC 功能不全与细胞骨架的改变有关。HG 导致 actin 组装方式的变化与 MC 功能不全有密切联系^[3,5]。本研究结果表明, HG 引起 F-actin 去组装, 是 HG 损害 MC 的表现之一。

Koya 等^[2]报告, VE 可防止糖尿病大鼠肾小球高滤过, 但作用机制不明。在本研究中 VE 加入到 HG 培养 MC 后, F-actin 仍维持束状结构, F-actin 和 G-actin 的荧光强度及两者比值均与 NG 培养时无明显差异, 表明 VE 可防止 HG 引起的 F-actin 部分去组装。因 actin 组装方式与 MC 收缩有关^[3], 而 MC 收缩能调节肾小球滤过率^[1], 推测 VE 防止 F-actin 去组装可能改变 MC 收缩性, 从而减轻肾小球高滤过状态。

HG 可引起分离大鼠肾小球脂质过氧化物含量增高, 也可致 MC 氧化反应增强。将培养的心肌细胞暴露于脂质过氧化产物后可引起细的骨架改变^[6]。VE 是抗氧化剂, 它可能通过其抗氧化作用而影响 HG 引起细胞骨架的变化。在糖尿病时体内二酯酰甘油(DAG)含量明显升高, 它激活 PKC^[7], PKC 通过骨架蛋白磷酸化调节细胞骨架组装^[4]。VE 可防止糖尿病大鼠肾小球 DAG 含量升高和 PKC 激活^[2]使已升高的 DAG 水平和 PKC 活性恢复正常。本研究中也观察到, PKC 抑制剂 H-7 加入 HG 培养后, actin 组装方式明显改善, F- 和 G-actin 的荧光强度也显著恢复。证明 VE 预防 HG 引起的 F-actin 去组装可能主要与它防止

DAG-PKC 活性途径有关。

本研究结果还显示, EN 加入到 HG 培养 MC 后, 可防止 HG 所致的 F-actin 去组装, EN 是血管紧张素转换酶抑制剂, 可减少血管紧张素 II 的生成, 也可增加缓激肽水平^[8], 故可间接影响 actin 的组装方式。

内皮素可明显影响 actin 组装方式^[9], EN 可减少糖尿病大鼠肾小球中内皮素-1 基因表达^[9], 在人 MC 培养中也发现, EN 能减少内皮素-1 的产生^[10]。我们认为 EN 可能通过抑制内皮素-1 基因的表达和水平进而影响 HG 所致 actin 组装方式的变化。当然, EN 对 actin 组装的影响还可能通过其他机制, 如抑制脂质过氧化物的生成, 影响一氧化氮和前列腺素的产生等。

总之, 本研究结果表明, HG 引起了 MC actin 部分去组装, VE 和 EN 均能防止 HG 对 actin 组装方式的影响, 提示 VE 和 EN 防治 DN 的作用机制可能部分与它们调节肾小球系膜细胞 actin 组装状态有关。

摘 要

研究了维生素 E(VE)和伊那普利(EN)对高浓度葡萄糖(HG)所致肾小球系膜细胞(MC)肌动蛋白组装的影响。结果证明, MC 在 HG 培养时, F-actin 失去粗大束状外观呈不规则网状, 显示 F-actin 部分去组装。与正常浓度

葡萄糖(NG)培养的 MC 相比, HG 引起 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。VE 和 EN 加入培养后, HG 引起的 F-actin 部分去组装及 F-和 G-actin 荧光强度的变化均恢复正常, 提示, VE 和 EN 可防止 HG 引起的 MC actin 去组装。

关键词: 维生素 E 伊那普利 系膜细胞 肌动蛋白 组装

参 考 文 献

- [1] Mene P et al., 1989, *Physiol Rev.*, 69: 1347—1423.
- [2] Koya D et al., 1995, *J Am Soc Nephrol.*, 6: 1042(Ab).
- [3] Whiteside CI et al., 1995, *Kidney Int.*, 48: S28—S33.
- [4] Hurst RD et al., 1995, *Diabetes*, 44: 759—766.
- [5] Zhou XP et al., 1995, *Lab Invest.*, 73: 372—383.
- [6] Van Winkle WB et al., 1994, *Cell Motil Cytoskeleton*, 28: 119—134.
- [7] Derubertis FR and Craven PA. 1994, *Diabetes*, 43: 1—8.
- [8] Ruiz-Ortega M et al., 1995, *Kidney Int.*, 48: 1778—1791.
- [9] Fukui M et al., 1994, *J Lab Clin Med.*, 123: 763—768.
- [10] Bakris GL et al., 1994, *Am J Hypertension*, 7: 583—590.

EFFECTS OF VITAMIN E AND ENALAPRIL ON HIGH GLUCOSE ALTERED ACTIN ASSEMBLY IN GLOMERULAR MESANGIAL CELLS

LI Cai HOU Fang Yu DENG Yi Bin

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

ABSTRACT

The effects of vitamin E(VE) and enalapril(EN) on high glucose(HG)-induced the alteration of actin assembly were studied in rat glomerular mesangial cells (MC). Rat MC were cultured in high (30 mmol/L) or normal (5.6 mmol/L, NG) glucose with or without VE or EN. The

MC were labeled with fluorescent probes and fluorescence intensities were measured using confocal laser scanning microscopy. MC incubated in HG, F-actin bundles appeared less prominent and changed to irregular network, displaying partial disassembly of F-actin. As compared with NG, HG caused a decrease in F-actin fluorescence intensity and an increase in G-actin intensity, consequently reducing the F/G-actin fluorescence intensity ratio. In HG, the addition of VE or EN normalized HG-induced F-actin disassembly and F- and G-actin fluorescence intensities. These findings suggest that both VE and EN prevent HG-induced the alteration of actin assembly pattern.

Key words: Vitamin E Enalapril Mesangial cell Actin Assembly

实验技术

不同中间丝类型细胞系间交叉污染的 抗中间丝蛋白免疫荧光检测*

张荣兴 朱德厚 葛锡锐

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

细胞系间的交叉污染, 严重地威胁着细胞系的质量控制, 特别是 HeLa 细胞的污染是世界性的棘手问题^[1,2]。目前采用的检测细胞系间交叉污染的方法主要是染色体分析和同功酶分析。但是, 由于体外培养细胞染色体的复杂性和同种不同细胞系的同功酶的同源性, 这些方法都存在一定的局限性, 需要建立一些新的检测手段来弥补上述方法的不足。

中间丝是一种细胞骨架结构, 其结构蛋白是组织和细胞类型特异性的: 上皮细胞中的角蛋白(keratin)、间质源细胞中的波形蛋白(vimentin)、肌肉源细胞中的结蛋白(desmin)、星形胶质细胞中的胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和神经细胞中的神经丝蛋白(neurofilament proteins)^[3]。另外, 恶性细胞仍保持其来源细胞类型特异中间丝的表达这一事实, 已被广泛用于肿瘤诊断^[4,5], 如癌以表达角蛋白为特征, 肌肉肉瘤以表达结蛋白为特征等。本文根据中间丝蛋白的细胞类型特异性, 建立了抗中间丝蛋

白的间接免疫荧光法, 藉以检测不同类型细胞系间的交叉污染。

材料与方 法

1. 细胞

人宫颈癌细胞(HeLa)、非洲绿猴肾细胞(Vero)、幼地鼠肾细胞(BHK)和中国仓鼠卵巢细胞(CHO), 均来自本细胞库, 星形胶质瘤细胞(U 251)来自重庆医科大学范维珂教授实验室。

2. 抗体

兔抗人胼胝角蛋白抗体见张荣兴等^[6]。兔抗结蛋白抗体购自 Sigma 公司。抗胶质纤维酸性蛋白单抗购自重庆医科大学范维珂教授实验室。异硫氰酸荧光黄标记的第二抗体(FITC-羊抗兔 IgG 和 FITC-兔抗鼠 IgG)均由本细胞库制备。

3. 细胞系间实验交叉污染

取两个不同类型细胞系培养物分别计数, 然后按照一定比例混合后种入带盖片的培养瓶, 两种细胞总

* 中国科学院“八五”重点项目基金资助