

SIN-1 (3-morpholinosydnonimine)对内皮细胞的作用以及 SOD、CAT 对内皮细胞的保护作用。结果提示:高浓度 SIN-1 可严重损伤内皮细胞;SOD、CAT 能协同减轻 NO 对内皮细胞的损伤,说明 ONOO⁻的产生可能是 NO 损伤内皮细胞的重要机制。

关键词: SIN-1 内皮细胞 一氧化氮

参 考 文 献

[1] Garthwaite J, et al., 1988, *Nature*, 336:385

-388.

[2] 杨自力等,1997,第三军医大学学报,19(3):202-203.

[3] 安静,1990,第三军医大学学报,12(3):222-224.

[4] Palmer RMJ, et al., 1987, *Nature*, 327:524-529.

[5] Forstermann U, et al., 1994, *Hypertension*, 23(pt2):1121-1131.

[6] Royall JA, et al., 1995, *New Horiz*, 3(1):113-122.

[7] Kooy NW, et al., 1995, *AmJ Respir Crit Care Med*, 151(4):1250-1254.

THE STUDY OF DAMAGES OF NO DONOR (SIN-1) ON ENDOTHELIAL CELL

YANG Zi Li WANG Zhen Guo* ZHU Pei Fang* BAI TAO WU Heng Yi

(Critical Care Institute Liuhuaqiao Hospital, Guangzhou 510010,

*The third army medical college)

ABSTRACT

The different effect of SIN-1 with different concentration and the protect effect of SOD and CAT on endothelial cells were studied in this paper. It was found that high-dose, rather than low dose of SIN-1 could induce severe endothelial cells injury, which might be related to the formation of ONOO⁻.

Key words: SIN-1 Endothelial Cell Nitric Oxide

*The Project was Supported by National Natural Science Foundation of China and Natural Science Foundation of Guangdong Province.

肾小球系膜细胞间隙连接的通讯功能及其影响因素

于力方 陈香美 程庆砾 傅 博

(全军肾脏病研究重点实验室 解放军总医院肾内科 北京 100853)

细胞间隙连接是毗邻细胞间跨膜离子及低分子的通道,其在维持细胞间信息的传递、调节细胞增殖、分化及组织内环境的稳态等过程中起着十分重要的作用^[1]。已有的研究证实血管紧张素Ⅰ可以诱导肾小球系膜的增殖、肥大,进而引起肾小球系膜区的病变,最终可导致肾小球的硬化^[2-3],那么外来或系膜细胞局部分泌产

生的血管紧张素Ⅰ对系膜细胞的刺激信号是如何在细胞间进行传导的呢?肾小球系膜细胞间隙连接的信号传递功能在这一过程中的作用如何?间隙连接的通讯功能是否可以被药物抑制或阻断?为此,我们利用激光扫描共聚焦显微镜及荧光漂白回复技术对体外培养的肾小球系膜细胞的间隙连接通讯功能进行了研究。

材料与方 法

一、材料

血管紧张素 I 为 Sigma 公司产品,甲基强的松龙为 UPJOHN 公司产品,6-羟基双乙酸甲酯荧光素(CFDA/AM)、V 型胶原酶及胰蛋白酶均系 Sigma 公司产品,RPMI 1640 培养液及新生小牛血清均系 GIBCO BRL 公司产品。

二、方法

1. 成人肾小球系膜细胞的培养 成人肾脏来源于配型不合的移植供肾,系膜细胞的体外培养方法按文献^[3]进行。简言之,取无菌的健康供肾皮质剪成细条并在钢筛上研磨冲洗分别过 80、150 目钢筛后收集分离的肾小球,以 0.5mg/ml V 型胶原酶消化 30 分钟后置于 20% 小牛血清 RPMI 1640 培养液中于 37℃ 5% CO₂ 培养,用含有 10mmol/L EDTA 的 0.2% 胰蛋白酶消化对数生长期的系膜细胞,终止消化后传代培养,取第 4-6 代的系膜细胞进行如下实验。

2. 血管紧张素 I 对肾小球系膜细胞的作用 取系膜细胞按 3×10^3 /孔的密度接种于 96 孔细胞培养板中,细胞贴壁后以 0.5% 小牛血清 RPMI 1640 培养液同步培养 24 小时,再更换为 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养液,按 5×10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} mol/L 浓度加用血管紧张素 I,每一浓度设置 3 个孔,并以相同体积的 PBS 加于另外 3 孔作为对照,分别置 37℃ 5%CO₂ 培养箱中培养后进行细胞间隙连接检测。

3. 肾小球系膜细胞间隙连接功能的检测 上述细胞分别培养 12、24、42 及 60 小时,在培养结束时每孔加入 CFDA/AM 1×10^{-6} mol/L 染色 15 分钟后在激光扫描共聚焦显微镜 (ACAS Ultima, 美国 MERIDIAN 公司产品)下选择相邻的细胞进行荧光漂白,荧光漂白的激光为氩离子激光,波长为 488nm,输出功率 200mW,细胞扫描步进为 1.00 μ m,扫描强度为激光功率的 10%,荧光漂白强度为激光功率的 50%,漂白用激光束直径 0.1 μ m,漂白区的照射密度为 1 点/ μ m²,每点照射时间为 200 毫秒。漂白区为整个细胞,记录被漂白细胞的荧光回复率。每孔共扫描 3 组细胞,其中设置单个细胞荧光漂白对照组及相邻细胞无荧光漂白对照组作为计算机图像处理的内参照。

4. 甲基强的松龙对肾小球系膜细胞间隙连接功能的影响 系膜细胞培养、铺板同前所述,在 96 孔

细胞培养板中分别加入不同浓度甲基强的松龙 50、100、200、300、400 μ g/ml,并设立等体积的 PBS 对照组,每一浓度设置 3 个孔,细胞在分别培养 12、24 小时在激光扫描共聚焦显微镜下进行相邻细胞荧光漂白及荧光回复的测定,荧光漂白的各项参数指标均同前所述。

结 果

一、肾小球系膜细胞荧光漂白后荧光回复的检测结果

相邻的肾小球系膜细胞之一在荧光漂白后 2 分钟内即开始出现荧光回复现象,于 9 分钟时,荧光回复率达到高峰,而与其细胞无连接的单个系膜细胞在荧光漂白后无回复现象(图 1 及图 2),提示体外培养的相邻两系膜细胞在融合生长状下有间隙连接的形成。

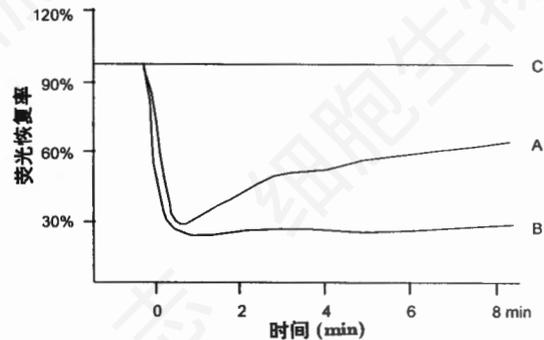


图 1 细胞漂白后荧光恢复的时间动力学曲线

- A. 经荧光漂白后的与其他细胞连接而具有通讯功能的系膜细胞
- B. 经荧光漂白后的与其他细胞无连接的单个系膜细胞
- C. 未经荧光漂白的正常对照系膜细胞

二、血管紧张素 I 对系膜细胞间隙连接功能的影响

如表 1 所示,用不同浓度的血管紧张素 I 刺激培养后,相邻肾小球系膜细胞荧光漂白后的荧光回复率明显高于对照组,并随血管紧张素 I 的浓度增高而增强,提示血管紧张素 I 可增强肾小球系膜细胞间间隙连接的通讯功能。

表 1 血管紧张素Ⅱ刺激后肾小球系膜细胞荧光漂白后荧光回复率(%)

血管紧张素Ⅱ (M/L)	12hr	24hr	42hr	60hr
10 ⁻⁵	1.83±0.56*	1.53±0.62*	1.87±0.61*	0.50±0.47*
10 ⁻⁶	1.22±0.15*	1.07±0.34*	1.03±0.13*	1.24±0.32*
10 ⁻⁷	1.21±0.19*	0.87±0.22	1.00±0.15	0.65±0.12
10 ⁻⁸	1.21±0.35*	0.71±0.19	0.69±0.09	0.77±0.13
10 ⁻⁹	1.01±0.11*	0.63±0.19	0.63±0.06	0.59±0.15
PBS 对照组	0.65±0.11	0.53±0.22	0.66±0.21	0.59±0.16

* 与 PBS 对照组比较 P<0.01。

三、甲基强的松龙对系膜细胞间隙连接功能的作用

不同浓度的甲基强的松龙可明显抑制肾小球系膜细胞间隙连接的通讯功能,使细胞荧光漂白后的荧光回复率明显降低,这种抑制作用随甲基强的松龙的浓度递增而明显加强(表 2 所示)。

表 2 甲基强的松龙对系膜细胞
荧光漂白后荧光回复率(%)

甲基强的松龙 (mg/ml)	12hr	24hr
50	1.75±0.44*	0.78±0.01*
100	0.75±0.14*	0.52±0.17*
200	0.69±0.21*	0.42±0.12*
300	0.39±0.11*	0.32±0.12*
400	0.11±0.07*	0.19±0.10*
PBS 对照组	2.34±0.79	2.53±0.92

* 与 PBS 对照组比较 P<0.01。

讨 论

细胞间隙连接是在哺乳动物细胞接触间普遍存在的一种质膜结构,这种结构构成的细胞间通道可允许相邻两细胞胞浆中分子量小于 1 000 道尔顿的物质,包括各种离子、核苷酸、环核苷酸及多种营养元素等在细胞间自由弥散^[4],是相邻两细胞间信息传递的重要结构。CFDA/AM 是不带电荷的酯溶性分子,所以能透过细胞膜。CFDA/AM 本身不发荧光,进入细胞后被细胞内胞浆酯酶水解,释放出分子量为 532 的荧光素分子,并可被波长为 488nm 的激光激发出黄绿色荧光。荧光漂白回复技术即

是对选定的细胞进行激光照射,使细胞内的荧光分子淬灭,在有间隙连接存在时,相邻细胞的荧光素分子即可通过间隙连接进入荧光淬灭的细胞而使其出现荧光回复现象,通过记录荧光回复率可以测定细胞间隙连接的功能^[5]。

细胞间隙连接在细胞增殖、分化的信号传递中起着十分重要的作用,Inoguchi 等报告高糖可抑制体外培养的牛胸主动脉内皮细胞间隙连接的通讯功能^[6],进一步的研究证实这种抑制作用可能是通过激活蛋白激酶 C 所致。研究表明高糖刺激可以抑制血管内皮细胞的增殖,因此可以推测内皮细胞间隙连接的通讯功能可能与内皮细胞的增殖有密切的关系。

系膜细胞是肾小球病变的重要靶细胞,但目前尚未见有关肾小球系膜细胞间隙连接通讯功能的研究。本研究观察了体外培养的肾小球系膜细胞间隙连接的功能及血管紧张素Ⅱ及甲基强的松龙对系膜细胞间隙连接通讯的功能的影响,结果表明不同浓度的血管紧张素Ⅱ可明显增强肾小球系膜细胞间隙连接的通讯功能,而甲基强的松龙作用则正好相反,我们的前期研究表明血管紧张素Ⅱ可以明显刺激肾小球系膜细胞增殖^[3],而甲基强的松龙则可以明显抑制肾小球系膜细胞的增殖^[7],因而,我们推测肾小球系膜细胞间隙连接可能是影响肾小球细胞增殖的信号分子传导的重要途径之一。肾小球系膜细胞的增殖、分化在肾小球疾病的发生、发展等演变过程中起着主导作用,因此进一步研究小球系膜细胞间隙连接通讯功能的影响因素及其与系膜细胞行为的相关关系,对于研究增殖

性肾小球病变的发病机制,筛选增殖性肾炎的治疗药物均具有十分重要的意义。

参 考 文 献

摘 要

本文利用激光扫描共聚焦显微镜及荧光漂白后荧光回复技术对人肾小球系膜细胞间隙连接的通讯功能及其影响因素进行了观察。结果发现,体外培养的肾小球系膜细胞在融合生长状况下,相邻两细胞有间隙连接结构形成。不同浓度的血管紧张素 I 对肾小球系膜细胞间隙连接的通讯功能具有促进作用,而甲基强的松龙则具有抑制作用。

关键词: 间隙连接 肾脏 系膜细胞

- [1] Loewenstin WR, 1979, *Biochem Biophys Acta*, 560:1.
- [2] Anderson PW, Do YS, Hsueh WA, 1993, *Hypertension*, 21:29.
- [3] 于力方等,1990,中华肾脏病杂志,2:70.
- [4] Schwarzmann G, Wiegandt H, Rose B, et al., 1987, *Science*, 213:551.
- [5] 于力方等,1997,军医进修学院学报,18(3):164.
- [6] Inoguchi T, Ueda F, Umeda F, et al., 1995, *Biochem Biophys Res Com*, 208(2):492.
- [7] 陈香美等,1992,第三届全军肾脏病学学术会议论文集, P77.

THE INTERCELLULAR COMMUNICATION VIA GAP JUNCTION IN CULTURED GLOMERULAR MESANGIAL CELLS AND ITS INFLUENTIAL FACTORS

YU Li Fang CHEN Xiang Mei CHENG Qing Li FU Bo

(Military Key Lab of Nephrology, Dept of Nephrology, General Hospital of PLA, Beijing 100853)

The intercellular communication via gap junction in cultured human glomerular mesangial cells and the effects of angiotensin I and methylprednisolone on the gap junction were observed using fluorescence bleaching technique under laser scanning confocal microscopy in this study. The results showed that there were fluorescence recovery within 2 minutes after-fluorescence bleaching. It suggested that there are gap junctions on the cell membrane between the adjacent cultured mesangial cells in vitro. Angiotensin I can enhance the fluorescence recovery rate of the mesangial cells after laser bleaching but methylprednisolone can inhibit the intercellular communication via gap junction.

Key words: Gap junction Kidney Mesangial cell

细胞生物学杂志 1998 年第 20 卷第 3 期

国内统一刊号:CN 31-1478/Q

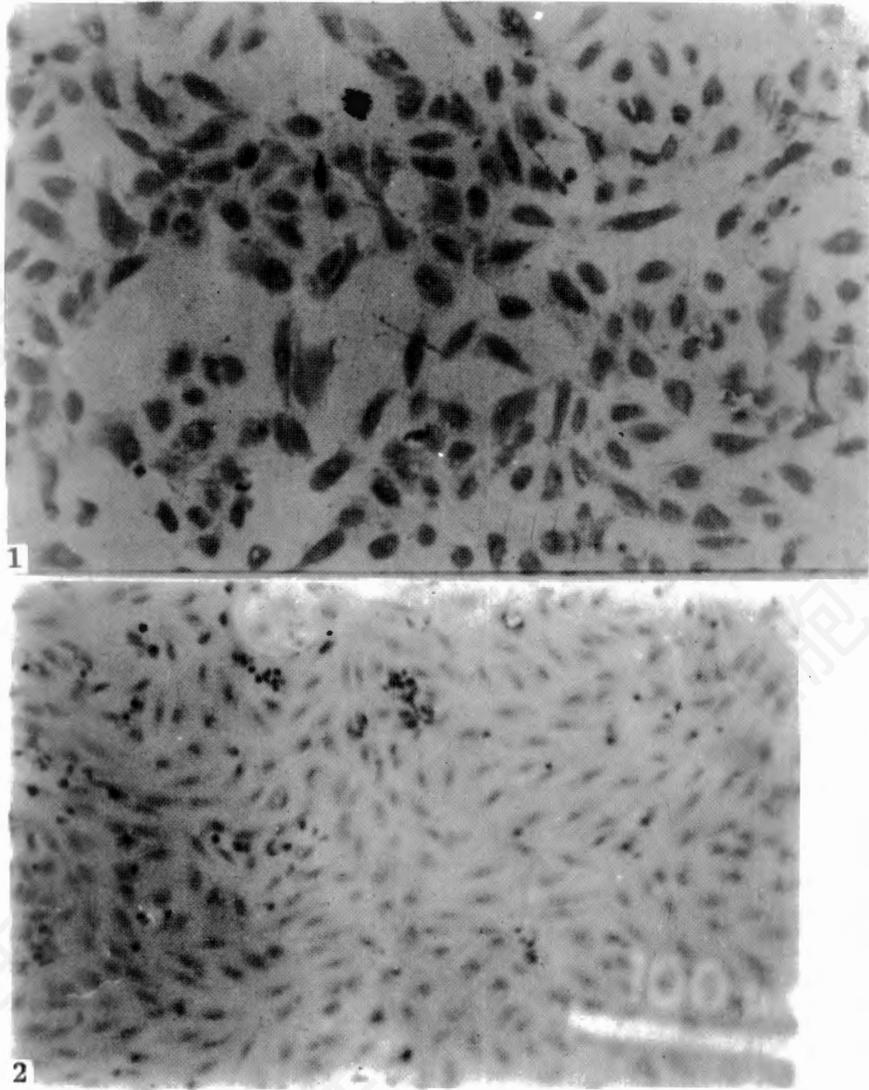
ISSN 0253-9977



编辑 细胞生物学杂志编辑委员会
上海岳阳路 320 号(200031)
主编 左嘉客
出版 上海科学技术出版社
发行 上海市报刊发行局
订阅 全国各地邮局
印刷 中国科学院上海分院印刷所

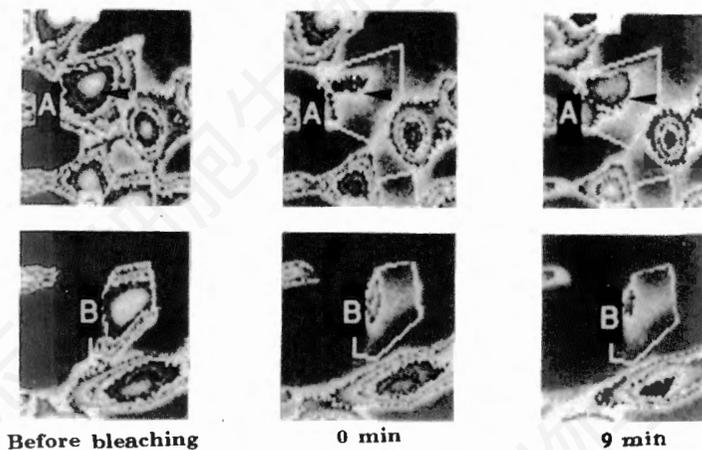
刊号 4-296 1998 年 9 月 定价:4.50 元

杨自力等图版



图版说明

1. ABC 法标记的培养 VIII:Ag HUVEC。×100
2. 正常生长的内皮细胞。×40



图版说明

系膜细胞经荧光漂白后的荧光回复现象

- A. 相邻两细胞之一经荧光漂白后 9 分钟可见荧光回复现象
B. 与其他细胞无连接的单个系膜细胞经荧光漂白后无荧光回复现象

经验交流

细胞培养物中的逆转录病毒检测

张荣兴 吕沅冈 杨正洪 喻峰 朱德厚 葛锡锐
(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

细胞培养物的各种内源性和外源性病毒污染特别是人病毒如 EBV、狂犬病毒、疱疹病毒、腺病毒和人 RNA 肿瘤病毒等, 严重地威胁细胞系(株)的质量控制。同时, 如防护不当, 将危及操作人员的身体健康。为此美国典型培养物保藏中心(ATCC)的细胞库目录中, 对一些具有内源病毒的细胞系(株)均明确指出具体的防护要求。例如释放高滴度 EBV 的 B 95-8 细胞^[1]和产生 T-细胞白血病病毒的 MJ 细胞等^[2], 均要求作为潜在的生物危险材料而至少在二级生物安全规范(Biosafety Level 2 Containment)下操作。因此, 作为收集和保藏细胞系(株)的中国科学院细胞库, 不断建立各种内源和外源病毒的检测方法是当务之急。

与淋巴瘤密切相关的逆转病毒的特征是在

病毒颗粒中存在逆转录酶(Reverse Transcriptase, RT), 此酶在病毒的增殖过程中是必须的^[3]。因此, 通过 RT 的检测, 可间接证明逆转录病毒的存在。本文用非放射性法对 Hut-102 等 6 个细胞系进行了逆转录病毒检测。

材料和方法

1. 细胞

人慢性髓性白血病细胞 K 562, 小鼠骨髓瘤细胞 SP 2/0, 人正常肝细胞 L-02, 人肺腺癌细胞 SPC-A-1, 人肝癌细胞 SMMC-7721 和人皮肤 T 细胞淋巴瘤细胞 HUT-102 均来自本细胞库。

2. 细胞培养物准备

中国科学院“八五”重点项目基金资助。