

耳变小、多囊肾、生殖能力下降、免疫力下降、消化道上皮异常,结合其他资料更进一步表明,Bcl-2 基因家族在体内作用与中医肾的功能非常接近,为此,本文提出“Bcl-2 家族可能是中医肾本质相关基因”的假说,还就该假说与现代生物学理论的一致性问题进行进一步论述,并用该假说对中医实验研究中的发现和有关中医肾的部分论述进行尝试性解释。最后探讨了提出该假说的意义。

参 考 文 献

- [1] Veis D. J., et al., 1993, *Cell*, **75**: 229-240.
 [2] Nakayama K., et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 3700-3704.
 [3] Kamada S., et al., 1995, *Cancer Res.*, **55**: 354-359.
 [4] 张登海、钟慈声、孙安阳主编, 1997, 一氧化氮的生物医学. P119-131, 上海医科大学出版社.
 [5] Tsujimoto Y., et al., 1984, *Science*, **226**: 1097-1099.
 [6] Bakhshi A., et al., 1985, *Cell*, **41**: 899-906.
 [7] Vaux D. L., et al., 1988, *Nature*, **335**: 440-442.
 [8] Hockenbery D., et al., 1990, *Nature*, **348**: 334-336.
 [9] Kidd V. J., et al., 1998, *Annu. Rev. Physiol.*, **60**: 533-573.
 [10] Brady H. J., et al., 1996, *EMBO J.*, **15**: 6991-7001.
 [11] O'Reilly L. A., et al., 1997, *J. Immunol.*, **159**: 2301-2311.
 [12] Chen D. F., et al., 1997, *Nature*, **385**: 434-439.
 [13] Ratts V. S., et al., 1995, *Endocrinology*, **136**: 3665-3668.
 [14] 山东中医学院、河北医学院, 1991, 黄帝内经素问校释. 人民卫生出版社.
 [15] Kaipia A., et al., 1997, *Endocrinology*, **138**: 5497-5504.
 [16] Amling M., et al., 1997, *J. Cell Biol.*, **136**: 205-213.
 [17] Domen J., et al., 1998, *Blood*, **91**: 2272-2282.
 [18] Greenlund L. J., et al., *Neuron*, **15**: 649-661.
 [19] Zanjani H. S., et al., 1996, *J. Comp. Neurol.*, **374**: 332-341.
 [20] 孟景春、周仲瑛主编, 1987, 中医学概论. P32-P34, 人民卫生出版社.
 [21] Aggarwal S., Gupta S., 1998, *J. Immunol.*, **160**: 1627-1637.
 [22] 李仪奎等主编, 1991, 中药药理实验方法学, P272-P279, 上海科学技术出版社.
 [23] Smets L. A., et al., 1994, *Blood*, **84**: 1613-1619.
 [24] Lam M., et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 6569-6573.
 [25] 黄震宇、赵伟康等, 1995, 上海医院药学, **6**(1): 4-7.
 [26] Deng G., Podack E. R., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 2189-2193.
 [27] Mor F., Cohen I. R., 1996, *J. Immunol.*, **156**: 515-522.
 [28] Miyashita T., et al., 1995, *J. Biol. Chem.*, **270**: 26049-26052.
 [29] Roudi-Reig L., et al., 1997, *Neuroreport*, **8**: 2429-2432.
 [30] Dickson M. C., et al., 1995, *Development*, **121**: 1845-1854.
 [31] Romberger D. J., 1997, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **29**: 939-943.
 [32] Ho Y. S., et al., 1998, *J. Biol. Chem.*, **273**: 7765-7769.
 [33] Fagan A. M., et al., 1997, *J. Neurosci.*, **17**: 7644-7654.
 [34] Kuo M. L., et al., 1997, *Biochem. J.*, **327**(Pt3), 663-667.
 [35] Ghadge G. D., et al., 1997, *J. Neurosci.*, **17**: 8756-8766.

研究工作

补体攻膜复合体致肾小球脏层上皮细胞粘附性改变研究*

郭啸华 廖立生

(第三军医大学新桥医院肾内科 重庆 400037)

补体激活在肾炎的发生发展过程中起重要作用,其损伤机理包括化学趋化因子生成所致

*国家自然科学基金资助项目(39500071)。

的炎性细胞浸润、C_{5b}-9 攻膜复合体 (membrane attack complex MAC) 诱生所致的溶破及亚溶破效应。膜性肾病以 IgG 和补体在上皮下弥漫性沉积为特征, 由于组织内缺乏细胞炎症反应, 目前公认, MAC 对肾小球脏层上皮细胞 (glomerular visceral epithelial cell, GVEC) 的亚溶破损伤是其蛋白尿产生的原因^[1]。然而 MAC 如何改变肾小球的通透性, 如何诱导蛋白尿的产生, 其机制迄今不明。

GVEC 和肾小球基底膜间的相互作用, 在维护肾小球滤过屏障的正常结构形态和功能中起重要作用。细胞和基质之间的这种特异作用, 称之为局部粘附。局部粘附从形态和生化水平分为四个区域, 依次为细胞外基质、穿膜区、胞质斑、微丝束^[2]。GVEC 的形态改变, 如足突退缩、融合是蛋白尿产生的结构基础。形态改变是粘附性改变的结果。为此, 本研究拟以亚溶破剂量 MAC 诱导体外 GVEC 损伤, 通过对局部粘附的研究, 探讨 MAC 诱导膜性肾病蛋白尿发生的机制。

材料和方法

一、GVEC 培养

取人肿瘤肾正常皮质, 分离出肾小球, 以 K₁-3T3 培养基加 10% 小牛血清悬浮, 种植于覆盖胶原的培养瓶中, 孵箱内 37℃ 培养。细胞长出后第四天以 0.025% 胰酶/0.5mmol/L EDTA 消化, 经 300 目尼龙筛网过滤去除肾小球残体后, 细胞种植于涂胶的培养瓶中, 长至汇合后继续传代。取 3-4 亚代细胞用于实验。

GVEC 鉴定标准: 细胞外形呈典型的多边形, 细胞和细胞间紧密排列, 免疫组化染色波形蛋白阳性, 结蛋白阴性, VⅢ因子阴性, 肌球蛋白阴性, 碱性磷酸酶阴性, 细胞角蛋白阴性, 嘌呤霉素毒性试验呈敏感反应。

二、MAC 亚溶破模型

以 4mg/ml 酵母多糖 (Zymosa, Zy) (Sigma 产品) 等量加入新鲜正常人血清 (NHS), 经旁路途径激活补体, 诱导 MAC 形成。以最低 LDH 释放法确定 MAC 的亚溶破剂量。NHS 经 56℃ 30 分钟处理作为后续实验的补体灭活组对照。

三、MAC 致伤 GVEC 后脱落细胞计数及细胞存活率

细胞培养在 24 孔培养板上, 长至汇合后以 D-Hanks 液清洗, 换 DMEM/F₁₂ 培养液。Zy 和 NHS 等量混合后 4 分钟, 以 0.22μm 滤膜过滤, 每孔加入 0.2ml (亚溶破剂量)。37℃ 温育 24 小时后, 收集温育液, 离心, 加少量培养液重悬, 以计数板计算脱落细胞数。同时以台盼蓝拒染法, 计算细胞存活率。

四、MAC 致伤 GVEC 对 SO₄²⁻ 基团的影响

细胞培养于 24 孔培养板上, 长至大半汇合时进行试验。Na³⁵SO₄ (上海原子能所) 和 ³H-TdR (北京原子能所) 每孔加入量分别为 3.5μCi/10μl, 0.5μCi/25μl。

1. 每孔加 Na₂³⁵SO₄, 37℃ 温育 12h 后, 加 ³H-TdR, 继续温育 12h, 去除原培养液, 换 DMEM/F₁₂, 再加 Zy 和 NHS 共 0.2ml, 继续温育 12h 后, 清洗细胞, 1% 胶原酶消化, 在细胞收集器上收集细胞, 作 ³⁵S 和 ³H 放射活性双道测定, 分别计算其放射活度 (dmp) S 和 H。

2. 加 Na₂³⁵SO₄ 和 ³H-TdR 的同时, 加 Zy 和 NHS (剂量同上), 37℃ 温育 24h 后, 收集细胞。分别计算其放射活度。

以 S/H 为系数, 评价 GVEC 上 ³⁵SO₄²⁻ 基团相对含量。

五、MAC 致伤 GVEC 对层粘蛋白 (LN) 分泌的影响

取大半汇合的 24 孔板内细胞, 加 Zy 和 NHS 共 0.2ml, 37℃ 温育 72h, 取上清液作 LN 放免测定 (上海海军医学研究所试剂盒)

六、MAC 致伤 GVEC 对细胞骨架蛋白的影响

细胞培养于 6 孔培养板中载玻片上, Zy 和 NHS 共 0.3ml (亚溶破剂量) 加入孔内。37℃ 温育 2 小时后, 清洗载玻片, 4% 多聚甲醛 0℃ 下固定 10 分钟。置入 0.5% Triton X-100 低张溶液中, 置 0℃ 下 5 分钟, 然后以 SP 间接免疫酶染色法作肌动蛋白和结蛋白染色 (迈新公司产品)。

七、MAC 致伤 GVEC 对整合素 VLA-3 的影响

细胞培养于 6 孔培养板中载玻片上, 加入 Zy 和 NHS 共 0.3ml, 37℃ 下温育 2h, 载玻片清洗并以 4% 多聚甲醛室温固定 5 分钟后, 作 SP 间接免疫酶染色。抗 VLA-3 单抗由美国 Old L. J. 博士惠赠。

八、统计学处理

所有数据采用单因素方差分析, N-K 检验处理。

结 果

一、MAC 致伤 GVEC 脱落细胞计数及活率

亚溶破剂量 MAC 致伤 GVEC 后,细胞脱落计数明显增多(与正常对照组比较 $P < 0.05$);对脱落细胞作台盼蓝拒染试验,可见损伤组大多为存活细胞,而正常对照组则绝大部分为死亡细胞(见表 1)。由此可见,这种细胞脱落是细胞粘附力消失的结果。为此,本研究对损伤状态下细胞局部粘附中几个相关蛋白作了进一步观察。

0.05);对脱落细胞作台盼蓝拒染试验,可见损伤组大多为存活细胞,而正常对照组则绝大部分为死亡细胞(见表 1)。由此可见,这种细胞脱落是细胞粘附力消失的结果。为此,本研究对损伤状态下细胞局部粘附中几个相关蛋白作了进一步观察。

表 1 MAC 损伤诱导的 GVEC 脱落计数及活性分析(n=6)

分 组	脱落细胞计数(X±SD)	台盼兰染色率(%) (X±SD)
补体灭活组	1187.5±239.4	82.5±23.6
正常 GVEC 组	1312.5±239.4	82.5±13.6
亚溶破损伤组	2437.5±427.0*	36.9±15.2*

*:表示与正常 GVEC 组比较, $P < 0.05$ 。

二、MAC 致伤 GVEC 对 SO_4^{2-} 基团的影响

GVEC, 尤其细胞膜上含有丰富的硫酸化物质。亚溶破损伤状态下, GVEC 上已标记的 $^{35}SO_4^{2-}$ 基团明显减少(12h 后,与正常对照组比较 $P < 0.05$, 见表 2); $^{35}SO_4^{2-}$ 基团掺入量明显减少(24h 后,与正常对照组比较 $P < 0.05$, 见表 3)。这说明, MAC 致伤 GVEC 能在多个水平上减少细胞上的硫酸化物质含量。

从表 4 中可看到,亚溶破损伤后 72h GVEC 分泌 LN 明显增多(与正常对照组比较 $P < 0.05$)。

表 2 MAC 损伤对 GVEC 上已标记的 $^{35}SO_4^{2-}$ 影响(n=6)

分 组	GVEC 上 $^{35}SO_4^{2-}/H-TdR$ (dmp/dpm) (X±SD)
补体灭活组	0.542±0.032
正常 GVEC 组	0.534±0.031
亚溶破损伤组	0.379±0.0222*

*:表示与正常 GVEC 组比较, $P < 0.05$ 。

表 3 MAC 损伤对 GVEC $^{35}SO_4^{2-}$ 掺入的影响(n=6)

分 组	GVEC 上 $^{35}SO_4^{2-}/H-TdR$ (dmp/dpm) (X±SD)
补体灭活组	1.719±0.046
正常 GVEC 组	1.674±0.117
亚溶破损伤组	1.391±0.011*

*:表示与正常 GVEC 组比较, $P < 0.05$ 。

三、MAC 致伤 GVEC 对 LN 分泌的影响

表 4 MAC 损伤对 GVEC 分泌 LN 的影响(72 小时)(n=6)

分 组	GVEC 上 $^{35}SO_4^{2-}/H-TdR$ (dmp/dpm) (X±SD)
补体灭活组	155.2±10.18
正常 GVEC 组	139.2±15.56
亚溶破损伤组	189.7±22.26*

*:表示与正常 GVEC 组比较, $P < 0.05$ 。

四、MAC 致伤 GVEC 对细胞骨架部分蛋白的影响

免疫酶组化染色可见,正常状态下的 GVEC 肌动蛋白染色呈纤维状多边形分布,染色均匀;而损伤状态下,纤维状结构消失,其染色围绕细胞核呈圆形分布,部分细胞有印戒样结构染色。正常 GVEC 不显色的结蛋白,亚溶破损伤时出现较强染色。

五、MAC 致伤 GVEC 对 VLA-3 的影响

由免疫酶组化可见,正常 GVEC 的 VLA-3 染色均匀致密,损伤时明显减弱,呈稀疏分布。

讨 论

GVEC 局部脱附可以改变肾小球的通透

性。在氨基核甙肾病模型中发现,蛋白尿的产生和 GVEC 脱附有关。本研究对 GVEC 在 MAC 亚溶破损伤状态下的粘附性观察显示,MAC 降低 GVEC 的粘附性,其机理涉及多个粘附相关蛋白。

细胞外基质(ECM)是局部粘附结构中的胞外区,也是局部粘附的触发因素,它与细胞膜表面的粘附分子结合。本研究中的 LN 分泌增多,与膜性肾炎中肾小球基层膜(GBM)上 LN 异常积聚的结果相吻合。这种改变如何参与粘附性降低的过程,目前还无法解释。在我们的细胞培养操作中也发现,培养瓶中涂胶浓度过高对细胞贴壁会产生不利影响。

本研究也发现,MAC 能减少 GVEC 表面的硫酸化物质。已知 GVEC 中的硫酸化物质主要是胞膜上的蛋白聚糖,由硫酸肝素和硫酸软骨素/皮肤素组成。它们具有疏水活性,作为配体,一端与 ECM 分子相应部分结合,另一端与胞质中的细胞骨架连接,参与局部粘附的形成。它们易受蛋白酶的作用,从膜上解离下来。有人使用细胞表面硫酸肝素半衰期缩短和硫酸化物质减少的突变细胞研究发现,这两种细胞都不能形成局部粘附^[3]。由此推测,本研究中 GVEC 细胞膜硫酸化基团的减少,参与了 MAC 介导的 GVEC 粘附性改变。其减少原因,可能与某些蛋白酶作用有关。已证明,MAC 能刺激培养的 GVEC 产生蛋白酶,而且也证实,这类蛋白酶能增加体外分离肾小球对白蛋白的通透性^[4,5]。

整合素是细胞膜上细胞和基质相互作用的另一类重要粘附分子。VLA-3 是正常体内 GVEC 唯一表达的 β_1 整合素,它均匀而又强烈地表达于 GVEC 的足突与 GBM 相接触面^[6]。本研究中的 VLA-3 表达减少,表明它参与了 MAC 所致的粘附性改变。对膜性肾炎中上皮免疫沉积物形成处研究发现,VLA-3 表达缺失^[3]。

细胞骨架是局部粘附中的关键成分。GVEC 含有丰富的中间丝、微管和微丝系统。

在体内,微丝主要位于足突而中间丝和微管则位于胞体和主突。本研究中的微丝肌动蛋白和中间丝结蛋白的结构变化,表明细胞骨架在细胞内发生了结构重排(rearrangement)。Lachapelle 等研究发现,随着肌动蛋白丝在肾病大鼠体内 GVEC 足突中消失及在胞体中的重排,足突结构消失^[6]。因此,MAC 不仅与 GVEC 粘附性改变有关,而且与体内 GVEC 足突退缩融合结构改变有关。

综上所述,MAC 通过改变 ECM 成分组成,减少胞膜硫酸化蛋白聚糖及整合素的含量,对细胞骨架进行重排,从而引起 GVEC 粘附性改变。这种改变引起体内 GVEC 脱附,足突退缩融合,从而参与膜性肾炎的蛋白尿产生。

摘 要

为探讨膜性肾炎中补体攻膜复合体(MAC)介导蛋白尿机制,本研究制作了 MAC 致肾小球脏层上皮细胞(GVEC)亚溶破模型。通过对细胞局部粘附及相关蛋白的观察发现,MAC 亚溶破致伤 GVEC 后,其粘附性发生改变。其机理与 ECM 分泌失调、膜硫酸化物质及整合素减少、细胞骨架重排有关。这些改变导致体内 GVEC 脱附,足突退缩融合,从而参与膜性肾炎的蛋白尿产生。

关键词:补体攻膜复合体 局部粘附
肾小球脏层上皮细胞

参 考 文 献

- [1] Kerjaschki D. 1990, *Virchows Archiv. B Cell Pathol.*, **58**:253-271.
- [2] Couchman, J. R. and Woods A. 1995, *Kidney Int.*, **47**(Suppl 49):8-11.
- [3] Couchman, J. R. Et al., 1988, *J Cell Physiol*, **136**:226-236.
- [4] Watanabe, K. et al., 1990, *Nephron*, **56**:405-409.
- [5] Savin, V. J. et al., 1991, *Clin. Res.*, **39**:308A.
- [6] Baraldi, A. Et al., 1994, *Nephron*, **66**:295-301.

[7] Baraldi, A. Et al., 1992, *Nephron*, 62: 382-388.

[8] Lachappelle, M. Et al., 1991, *Virchows Archiv. B Cell Pathol.*, 60: 105-111.

EFFECT OF MAC SUBLYTIC INJURY ON FOCAL ADHESION OF CULTURED HUMAN GLOMERULAR VISCERAL EPITHELIAL CELL

GUO Xiao Hua LIAO Li Sheng

(Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Chongqing, 400037)

ABSTRACT

It is now well established that proteinuria can be mediated by membrane attack complex of complement (MAC). This mechanism, however, is not understood. This in vitro study was performed to define the change of focal adhesion and adhesion-associated proteins upon cultured human glomerular visceral epithelial cells (GVEC) to MAC sublytic injury. The results show that this injury brings on imbalance of extracellular matrix protein production, cytoskeleton rearrangement, decrease of integrin and cell surface sulfate proteoglycan, with change of GVEC adhesion, which associate with simplification of the foot process, even detachment of GVEC from the GMB, consequent the onset of proteinuria in vivo.

Key words: Membrane attack complex of complement Focal adhesion Glomerular visceral epithelial cell

热损伤诱导单核细胞株 Raw264.7 凋亡及其分子机制的初步研究

张璐 张琳 赵克森

(第一军医大学全军休克微循环重点实验室 广州 510515)

业已知道,重症烧伤后机体易出现细胞、免疫功能紊乱^[1]。导致烧伤的致热源对机体的热辐射作用,可以引起一系列的病理生理变化。已查明烧伤和创伤以后出现了白细胞功能不全(dysfunction),表现为它的趋化性、吞噬力、产生超氧阴离子和过氧化氢能力及杀灭细菌能力均减弱,导致机体免疫力下降和容易发生感染^[2,3]。凋亡概念的提出为研究烧伤开拓了一个新的领域。我们曾用在体动物模型研究表明,烧伤后外周血单个核细胞凋亡率明显增加,并随时间的推延呈增高趋势,它可能是烧伤后白细胞功能不全发生的机制之一^[4]。为了进一步研究烧伤后单核细胞凋亡发生的机制,需要对离

体单核细胞用分子生物学方法进行基因转染和传代研究,此时用一般活体动物分离的细胞难以完成,为此我们拟建立一个单核细胞株的热损伤模型,探讨热损伤是否诱导其凋亡及相关基因表达情况,为进一步深入研究打下基础。

材料和方 法

1. 细胞培养

单核细胞株 Raw264.7 由美国 Scripps 研究所惠赠。将 1×10^6 个细胞接种在含 5% 小牛血清的 DMEM 培养液中培养(37℃, 5% CO₂)。

2. 热损伤反应