

论 著

高糖对原代培养人系膜细胞表达 TGF- β 1 的影响

尹燕志, 张李梅, 牟授菡, 吕丛奎, 鞠建伟, 王鸿梅

作者单位: 264003 烟台, 山东滨州医学院中西医结合学院

作者简介: 尹燕志(1977-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 临床肾脏病中西医结合诊治。E-mail: yinyanzhi08@sina.com

通讯作者: 鞠建伟(1961-), 男, 硕士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 临床肾脏病中西医结合诊治。E-mail: jujianwei1234@sina.com

【摘要】 目的 了解高糖对原代培养的人肾小球系膜细胞表达 TGF- β 1 的影响, 并进一步探讨糖尿病肾病的发病机制。方法 取自愿水囊引产的胎儿肾并解剖取肾皮质剪碎, 应用肾皮质组织块法合优生选择法培养人肾小球系膜细胞。以 ELISA 方法检测 TGF- β 1 的表达。结果 与正常组相比较, 高糖组 TGF- β 1 在 24、48、72 h 均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 高糖能够升高系膜细胞 TGF- β 1 分泌, 这可能与肾小球系膜细胞细胞外基质积聚和糖尿病肾病发病密切相关。

【关键词】 人系膜细胞; 原代培养; 转化生长因子 β 1; 高糖**【中图分类号】** R 587.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-3806(2010)01-0021-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2010.01.07

Effects of high glucose on the expression of TGF- β 1 in primary cultured human mesangial cells YIN Yan-zhi, ZHANG Li-mei, MU Shou-han, et al. College of integrated Chinese and Western Medicine, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China

【Abstract】 **Objective** To observe the effect of high glucose on the expression of TGF- β 1 in primary cultured human mesangial cells, and to elucidate their possible role in diabetic nephropathy. **Methods** Fetal kidneys from voluntary induction of labor with water bag were cut into pieces; Human mesangial cells were cultivated with the method of renal cortical tissue combined eugenic selection; ELISA was used to measure the expression of TGF- β 1. **Results** Compared to the normal group, the expression of TGF- β 1 in high glucose group were significantly high at 24 h, 48 h, 72 h ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** High glucose can increase the expression of TGF- β 1 in mesangial cells, which may contribute to the inhibition of ECM degradation in glomerulus and the possibility of diabetic nephropathy.

【Key words】 Human mesangial cells; Primary culture; TGF- β 1; High glucose

转化生长因子- β 1 (transforming growth factor β 1, TGF- β 1) 作为肾小球系膜基质的主要成分之一, 在 ECM 的动态变化中起着重要作用。本实验主要研究高糖环境下体外培养人胚肾小球系膜细胞 (glomerular mesangial cells, GMCs) TGF- β 1 的分泌及其动态变化, 模拟糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 体内病理环境, 了解高糖环境下 GMCs 分泌 TGF- β 1 的变化情况, 以期进一步探讨其在糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 中的病理、生理机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 DMEM 低糖培养基 (美国 ScienCell), 胎牛血清 (Gibco 公司), MsCM (含 2% FBS 和 MsCGS) (美国 ScienCell), 胶原酶 IV (Gibco 公司),

0.25% 胰蛋白酶 (含 0.02% EDTA) (Gibco 公司), 牛血清白蛋白 (美国 Amresco), 小鼠抗 α -肌动蛋白、小鼠抗人抗肌球蛋白单克隆抗体、小鼠抗人抗波形蛋白、小鼠抗人抗结蛋白、细胞角蛋白 (武汉博士德), VIII 因子一抗 (SantaCruz 公司), 羊抗鼠 IgG-FITC (异硫氰酸荧光) 荧光二抗 (武汉博士德), 人 TGF- β 1 ELISA 试剂盒 (武汉博士德)。

1.1.2 肾组织来源 取自愿水囊引产的妊娠 16-32 周的胎儿肾。

1.2 方法

1.2.1 GMCs 体外培养 应用肾皮质组织块法合优生选择法^[1]培养 GMCs, 解剖取肾皮质, 细剪成极碎至肉泥状, 置 200 目不锈钢筛网上过滤, 收集筛网上组织, 加入含 0.15% IV 型胶原酶的 DMEM 低糖

培养基,在 37 ℃ 恒温电磁搅拌器上电磁搅拌热消化 30 min 离心两次后,转入一次性培养皿,放入 37 ℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。从第三代起更换为 MsCM 培养基。实验选用 3~7 代细胞。

1.2.2 GMCs 形态学观察 选取 3 代的 GMCs 在相差显微镜下观察其形态。

1.2.3 免疫荧光化学鉴定 依次经 4% 多聚甲醛固定细胞、0.5% Triton X-100 穿透、10% 小牛血清白蛋白封闭后,滴加 PBS 稀释的一抗,4 ℃ 冰箱过夜,滴加 IgG-FITC 荧光二抗,37 ℃ 避光反应 60 min, 50% 缓冲甘油封片,荧光显微镜下观察并摄影。

1.2.4 ELISA 方法检测 TGF-β1 取培养皿中对数生长期的系膜细胞调成 5×10^5 /ml 接种于 96 孔板上。贴壁生长 24 h 以后,更改为含 0.5% 胎牛血清的培养基培养 24 h,再根据实验分组的不同加入相应的培养液。正常组(简称 NG):葡萄糖 5 mmol/L;高糖组(简称 HG):葡萄糖 30 mmol/L。每组设 6 个平行复孔分别在培养后 24、48、72 h 后收集细胞上清, -20 ℃ 下保存待测,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.3 统计学方法 计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS16.0 统计软件进行配对样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学显著意义。

2 结果

2.1 GMCs 形态学观察表现 培养 7~10 d 后,相差显微镜下可见大量细胞呈梭形,随着培养时间的延长,部分细胞呈不规则星形和细长形,单核,密集生长时可重叠,其中偶有鹅卵石样上皮细胞和扁平的多边形内皮细胞长出(见图 1)。

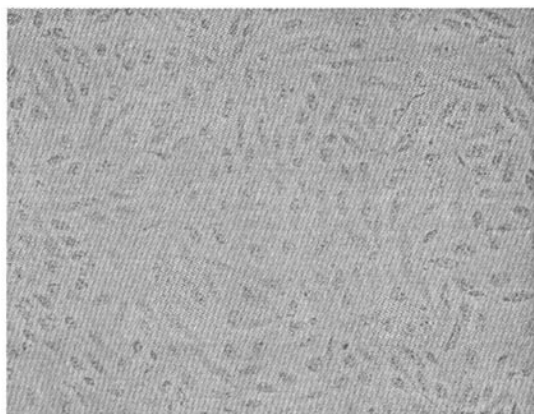


图 1 人肾小球系膜细胞原代培养第 21 天(×100)

2.2 免疫荧光化学鉴定结果 小鼠抗人 α-肌动蛋白、抗肌球蛋白单克隆抗体、抗结蛋白、抗波形蛋白

表达为阳性,其中波形蛋白表达(见图 2),细胞角蛋白、Ⅳ因子一抗表达为阴性,符合系膜细胞特征。



图 2 原代培养的肾小球系膜细胞波形蛋白表达阳性(×400)

2.3 高糖下 GMCs 表达 TGF-β1 的变化 与正常组相比,高糖组在 24、48、72 h 表达 TGF-β1 均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 高糖对系膜细胞表达 TGF-β1 的影响($n=6, \bar{x} \pm s, \text{pg/ml}$)

组 别	时间		
	24 h	48 h	72 h
NG	14.516 ± 4.423	18.683 ± 5.888	25.850 ± 3.114
HG	22.850 ± 2.345	34.266 ± 2.558	37.350 ± 3.286
<i>t</i>	3.627	6.907	5.874
<i>P</i>	< 0.05	< 0.01	< 0.01

3 讨论

3.1 转化生长因子 β 是一种具有多种生物学功能的蛋白多肽,在细胞的生长、分化和多种生理、病理过程中均起着重要作用^[2]。TGF-β 是介导糖尿病肾病发生、发展最主要的细胞因子,据报道 1 型和 2 型糖尿病动物模型和患者的肾小球、肾小管间质 TGF-β 的 mRNA 水平和蛋白表达均明显增加^[3],在以细胞外基质降解失常为主要机理的器官纤维化疾病的形成过程中起关键调节作用。在众多促纤维化细胞因子中,TGF-β1 被认为是最重要的促纤维化因子之一^[4],它能增加细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的合成、抑制 ECM 的降解,而 ECM 在肾小球的异常沉积是引起肾小球硬化的主要原因之一。TGF-β1 是引起肾小球硬化的主要介质,可能是通过促进系膜细胞合成细胞外基质,并促进其在系膜区沉积而起作用^[5]。

3.2 糖尿病肾病的组织学特征为肾小球基底膜增

厚、系膜体积增大和足细胞异常,肾小球系膜扩张,使肾小球毛细血管腔和滤过膜表面积受损,高血糖与糖尿病肾病密切相关,在糖尿病患者和动物模型中进行的干预性研究证实了控制高血糖具有肾脏保护作用,这与肾功能下降和蛋白尿的进展关系最为密切,高糖环境可以使细胞外基质蛋白如Ⅳ型和Ⅰ型胶原、层粘连蛋白及纤维连接蛋白等产生增多和降解减少^[6]。对于原代培养的人胚肾小球系膜细胞高糖环境下表达 TGF- β 1 变化一直鲜见报道,我们的研究显示高糖环境下人系膜细胞 TGF- β 1 的分泌在 24、48、72 h 均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),并且随着高糖培养时间的延长,系膜细胞分泌 TGF- β 1 的量逐渐增加,其中 24 h 段高糖与低糖组相比较 $P < 0.05$,48、72 h P 均 < 0.01 ,提示随着培养时间的延长,高糖对系膜细胞的影响愈加明显,由此可以推断,在 DN 患者体内,由于高血糖的持续存在,TGF- β 1 逐渐增加是 ECM 积聚的一个因素,这

可能是糖尿病肾病的病理基础之一。

参考文献

- 1 王海燕.肾脏病学[M].第3版.北京:人民卫生出版社,2008:643.
- 2 牛建昭,贾长恩.器官纤维化基础及中医药防治[M].北京:人民卫生出版社,2008:142.
- 3 黎磊石,刘志红.中国肾脏病学[M].北京:人民军医出版社,2008:631.
- 4 Jiang T, Che Q, Lin Y, et al. Aldose reductase regulates TGF- β 1-induced production of fibronectin and type IV collagen in cultured rat mesangial cells[J]. Nephrology, 2007, 11(2):105-112.
- 5 王丽娜,郝志宏,翁志媛,等.福辛普利对大鼠肾小球系膜细胞转化生长因子 β 1 蛋白及其 mRNA 表达的影响[J].实用儿科临床杂志,2006,21(13):841-842.
- 6 Ronald KC, Gordon CW, George LK, et al. Joslin's Diabetes Mellitus [M]. 14th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2007:886.

[收稿日期 2009-09-01][本文编辑 韦挥德 黄晓红]

论 著

体外受精治疗周期中剩余胚胎囊胚培养的临床价值

薛林涛, 黄莉, 何冰, 谭卫红, 成俊萍

作者单位: 530021 南宁,广西壮族自治区人民医院生殖医学与遗传中心

作者简介: 薛林涛(1982-),男,硕士,实习研究员,研究方向:生殖医学。E-mail:ltxgn@yahoo.com.cn

通讯作者: 黄莉,女,副研究员,研究方向:生殖医学。E-mail:hfireli@hotmail.com

[摘要] 目的 探讨体外受精治疗周期中 d3 移植和冷冻后剩余胚胎的体外发育潜能。方法 对剩余胚胎继续培养至囊胚期,观察其囊胚发育率和质量,并分析治疗周期中剩余胚胎囊胚形成情况和妊娠结局的关系。结果 收集 115 个 IVF/ICSI-ET 周期中的 603 枚剩余胚胎,囊胚培养后获得了 222 枚囊胚(36.82%),其中优质囊胚 49 枚(8.13%);36 个周期(31.30%)共获得 53 枚冷冻囊胚(8.79%);12 例含有剩余胚胎来源囊胚的解冻移植周期,临床妊娠 4 例; ≥ 6 细胞、2PN 来源胚胎囊胚形成率显著高于其他组($P < 0.05$);剩余胚胎有囊胚形成的周期临床妊娠率显著高于无囊胚形成组($P < 0.05$)。结论 根据 d3 胚胎形态学评分预测其发育潜能有一定局限性;通过囊胚培养筛选出剩余胚胎中具有发育潜能的并冷冻保存,是提高病人每个治疗周期可用胚胎数的可行方法;剩余胚胎囊胚形成情况可有效预测妊娠结局。

[关键词] 剩余胚胎; 发育潜能; 囊胚; 冷冻

[中图分类号] R 321.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2010)01-0023-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2010.01.08

Clinical value of extended culture to blastocyst stage of surplus embryos in in vitro fertilization treatment cycles XUE Lin-tao, HUANG Li, HE Bing, et al. Reproductive Medical and Genetic Center, the People's Hospital of