

大鼠 Thy-1 肾炎增殖病变及 sublytic C5b-9 致其肾小球系膜细胞增生的实验研究

赵 聃,李 妍,周建博,张 婧,邱 文*,王迎伟*

(南京医科大学微生物与免疫学系,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:检查大鼠 Thy-1 肾炎(Thy-1 nephritis,Thy-1N)肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cell,GMC)的增生病变及亚溶解型(sublytic)C5b-9 复合物在 GMC 增殖中的作用。方法:复制大鼠 Thy-1N 模型,分别于注射 Thy-1 抗体后 18 h、3 d 和 7 d 时,取肾组织,用 real-time PCR 和 Western blot 方法检查其肾组织中细胞增殖指标,即细胞周期蛋白 D2(cyclin D2)和增殖细胞核抗原(proliferative cell nuclear antigen,PCNA)的 mRNA 丰度及蛋白表达水平。用免疫荧光观察肾小球中 C5b-9 复合物的沉积。同时,使用 BrdU 掺入法、光镜及电镜观察大鼠肾小球细胞的增殖情况。此外,体外培养大鼠 GMC,进行不同分组处理后再给予 sublytic C5b-9 刺激,用 ^3H -胸腺嘧啶核苷酸掺入法(^3H -thymidine incorporation, ^3H -TdR)检查 GMC 的增殖情况。结果:大鼠 Thy-1N 病变 18 h,肾组织中 cyclin D2、PCNA 表达和肾内 BrdU 阳性细胞数均开始升高,实验 3 d 和 7 d,其表达进一步提高。同时肾小球内可见 C5b-9 复合物沉积,部分 C5b-9 包绕的肾细胞形态完好。另形态学观察还发现,实验 18 h,部分 GMC 溶解坏死,而实验 3 d,GMC 数量明显增多,7 d 增加更为显著。体外实验中,大鼠 GMC 在 sublytic C5b-9 刺激后 18 h,其细胞增殖水平显著增高,而用 sublytic C5b-9 刺激 GMC 产生的培养上清处理正常的 GMC 后,亦能轻度刺激 GMC 增殖。结论:大鼠 Thy-1N 肾小球病变存在早期增殖和继发增生的病理改变,而 GMC 的早期增殖可能与 sublytic C5b-9 作用有关。

[关键词] Thy-1 肾炎;肾小球系膜细胞;增殖;亚溶解型 C5b-9 复合物

[中图分类号] R392.12

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)10-1343-08

The proliferative lesions of rat Thy-1 nephritis and the role of sublytic C5b-9 in glomerular mesangial cell proliferation

ZHAO Dan,LI Yan,ZHOU Jian-bo,ZHANG Jing,QIU Wen*,WANG Ying-wei*

(Department of Microbiology and Immunology,NJMU,Nanjing 210029,China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the proliferative lesions of glomerular mesangial cell (GMC) in Thy-1 nephritis (Thy-1N) rats and the role of sublytic C5b-9 complexes in GMC proliferation. **Methods:** Thy-1N rat model was constructed. The expression of cyclin D2, proliferative cell nuclear antigen (PCNA) in the renal tissues of rats at mRNA and protein levels were observed at 18 h, on day 3 (3 d) and day 7 (7 d) after Thy-1 Ab injection. The deposition of C5b-9 was detected in the glomerulus. Meanwhile, the proliferation of glomerular cells in rats was assessed by BrdU incorporation, light microscopy (LM) and electron microscopy (EM). Furthermore, rat GMC were cultured and divided into different groups, and then the proliferation of GMC exposed to sublytic C5b-9 was evaluated by ^3H -thymidine incorporation (^3H -TdR) analysis. **Results:** The expression of cyclin D2 and PCNA in the renal tissues and the number of glomerular BrdU-positive cells became increasing at 18 h in Thy-1N rats, and continue increasing on 3 d and 7 d. The deposition of C5b-9 was found in the glomerulus, and some cells were intact. Moreover, the number of GMC and the secretion of ECM were increased on 3d and became obvious on 7 d under LM and EM. The proliferation of GMC was increased at 18 h after sublytic C5b-9 stimulation *in vitro*. The supernatant of GMC induced by sublytic C5b-9 could also promote GMC proliferation of rat. **Conclusion:** Glomerular lesions in rats with Thy-1N include early and secondary GMC proliferation, while sublytic C5b-9 complexes might be involved in early GMC proliferation.

[Key words] Thy-1 nephritis; glomerular mesangial cell; proliferation; sublytic C5b-9 complexes

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(10): 1343-1350]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(31000396, 81072402);江苏省高校自然科学研究(10KJB310006);南京医科大学科技发展基金面上项目(09NJUM003);南京医科大学基础医学院青年教师培养基金(09JC007)

*通讯作者, E-mail: qiuwen@njmu.edu.cn; wangyw1508@jmu.edu.cn

人类肾小球肾炎中较常见的一种病理类型是系膜增生性肾小球肾炎(mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN)^[1]。其肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cell, GMC)过度增生和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)异常分泌是 MsPGN 的主要病变特征,患者最终形成肾小球纤维化,诱发肾功能衰竭,病死率高^[2]。由于目前 MsPGN 的病因及其发病机制尚未完全阐明,故深入研究导致 MsPGN 细胞增生和 ECM 分泌的机制,对于防治人类 MsPGN 具有十分重要的意义。

大鼠 Thy-1 肾炎(Thy-1 nephritis, Thy-1N),又称抗胸腺细胞血清性肾炎(anti-thymocyte serum nephritis, ATSN),因其病理变化类似于人类 MsPGN,多被用于人类 MsPGN 的实验研究^[3]。Yamamoto 等^[4]报道,大鼠 Thy-1N 发病早期(24 h 内),肾内大部分 GMC 出现溶解、坏死,而发病 3 d 时,可查见明显的 GMC 继发增生,7 d 时则更加明显。本课题组前期的研究则发现,大鼠 Thy-1N 早期(12~18 h),在部分 GMC 发生凋亡、坏死的同时,另一部分 GMC 则表达了增殖细胞核抗原(proliferative cell nuclear antigen, PCNA),同时 GMC 的表面可见 C5b-9 复合物包绕,提示, GMC 可能出现了早期增殖反应,其早期增殖或许与亚溶解型(sublytic)C5b-9 复合物作用有关^[5]。

在人类细胞中,细胞周期蛋白 cyclin D 在 G1 期含量升高、作为细胞周期中 G1/S 检查点的重要调控因子,对细胞周期起正性调节作用^[6]。cyclin D 分为 D1、D2、D3 三种亚型。不同细胞可以表达不同亚型,同一细胞也可以表达两种以上的亚型^[7]。本课题组前期基因芯片检查的结果已揭示,大鼠 Thy-1N 发病 3 h,其肾组织中 cyclin D2 的 mRNA 丰度明显增加。PCNA 是真核生物复制复合体的核心成分,作为 DNA 聚合酶 δ (Pol δ)的辅助蛋白,它能增强该酶的活性,促进 DNA 的复制^[8]。PCNA 在 G0~G1 期细胞中表达较少, G1 晚期表达量大幅增加, S 期达到高峰, G2~M 期明显下降,其量的变化与 DNA 合成一致^[9],故常被用作检测细胞增殖的指标。由于大鼠 Thy-1N 早期,部分 GMC 可表达 PCNA。故本研究选择了 cyclin D2 和 PCNA 作为观察 GMC 增殖的指标之一。

5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-deoxyuridine, BrdU),是一种胸腺嘧啶核苷类似物,能够在细胞增殖时(S 期),代替胸腺嘧啶渗入正在复制的 DNA 分子^[10]。活体注射或细胞培养加入 BrdU,而后利用抗 BrdU 单克隆抗体进行标记,经过免疫组化或荧光染

色观察,能反映细胞的 DNA 复制活性(即细胞增殖情况)。故本研究中,以 BrdU 掺入实验作为细胞增殖活性的又一参数,同时配以光镜和电镜检查肾小球系膜区的组织病理变化。

除此之外,本研究还在体外培养了大鼠 GMC,用人工质控的 sublytic C5b-9 复合物刺激 GMC,观察其对 GMC 增殖的影响。其目的在于,阐明大鼠 Thy-1N 病变中 GMC 增殖的规律,并探讨 sublytic C5b-9 在 GMC 增殖中可能发挥的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 180~200 g (B&K 公司, 英国); 大鼠 GMC (HBZY-1, 武汉大学中国典型培养物保藏中心); Thy-1 抗体 (Thy-1 Ab) 根据文献由本室制备^[4]; 逆转录试剂盒 (ReverTra Ace- α -TM, Toyoba 公司, 日本); BrdU (Sigma 公司, 美国); 小鼠抗 BrdU 和小鼠抗大鼠 PCNA 的抗体 (Thermo 公司, 美国); 小鼠抗大鼠 C5b-9 抗体 (Hy-cult 公司, 荷兰); 羊抗大鼠 cyclin D2 的抗体 (Santa Cruz 公司, 美国); 补体来自 10 名健康志愿者新鲜血清 (normal human serum, NHS)。

1.2 方法

1.2.1 复制大鼠 Thy-1N 模型

取雄性 SD 大鼠 18 只 (180~200 g), 腹腔注射 Thy-1 抗体 (0.75 ml/100 g)^[11], 诱导大鼠 Thy-1 肾炎 (Thy-1N)。同时设正常兔血清 (NS) 对照 18 只 (0.75 ml/100 g)。注射 Thy-1 抗体或 NS 后 18 h、3 d 和 7 d 时, 取大鼠肾组织 (每个时间点 6 只), 标本分别做: ① real-time PCR 和 Western blot 检查; ② 石蜡切片; ③ 电镜切片^[11]。

1.2.2 GMC 的培养和实验分组

将细胞种于 MEM 培养液中, 置于孵箱培养。当 GMC 生长至 50% 融合时, 分别做 3 种处理 ($n = 3$), 即: ① sublytic C5b-9 组: MEM 中加入 Thy-1 抗体 (50 μ l/ml) 于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 孵箱内培养 30 min, 取出经 PBS 缓冲液洗 1 次, 加入 NHS (40 μ l/ml, 提供补体) 在孵箱内按所需时间培养; ② Supernatant treatment 组: 将 sublytic C5b-9 刺激 GMC 18 h 后的细胞培养上清收集, 加入到未受刺激的 GMC 中, 培养 18 h; ③ MEM 组: 仅用 MEM 培养 18 h。

1.2.3 real-time PCR 测定 Thy-1N 大鼠肾组织中 cyclin D2 和 PCNA 的 mRNA 丰度

利用 Primer express 设计引物及探针 (表 1)。采

用 TRIzol 一步法抽提大鼠肾组织总 RNA。取 1 μg 总 RNA 作为模板, 逆转录成 cDNA, 再用 real-time PCR 检测各基因的 mRNA。反应参数为 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min、

95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min、95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 后两步重复 40 个循环, 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 进行单点荧光检测。以 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算实验结果。

表 1 各基因引物及探针序列

Table 1 The sequences of primers and probes for different genes

	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	探针序列(5'→3')
cyclin D2	CACCGACAACCTCTGTGAAG	CAGAGCGATGAAGGTCTG	CAGGAGCTGCTGGAGTGGGAAC
PCNA	AATCCCAGAACAGGAGTACAG	CTATGGACACAGCTTCCTCTT	ATGCCATCTGGTGAATTTGCACGTAT
β -actin	TCACCCACACTGTGCCATCTA-TGA	CATCGGAACCGCTCATTGCC-GATAG	ACGCGCTCCCCATGCCATCCTGCGT

1.2.4 Western blot 检查 Thy-1N 大鼠肾组织中 cyclin D2 和 PCNA 的蛋白表达

取肾组织, 加入裂解液进行裂解, 裂解物离心, 取上清煮沸 5 min 使蛋白变性, 而后上样电泳, 再将蛋白转到 PVDF 膜上。将 PVDF 膜封闭后放进一抗中(4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜), TBST 洗涤 10 min \times 3 次。将 PVDF 膜放进二抗中孵育(室温 1 h), 洗涤后加入 ECL 发光液进行曝光。

1.2.5 免疫荧光检测 Thy-1N 大鼠肾小球 C5b-9 沉积情况

于注射 Thy-1 抗体和正常兔血清后 18 h, 取出大鼠肾组织, 切片后使用 C5b-9 抗体和 FITC 标记二抗, 进行免疫反应, 随后观察绿色荧光。

1.2.6 BrdU 掺入法检查 Thy-1N 大鼠肾小球细胞增生程度

从诱导肾炎的前 1 d 开始, 每间隔 12 h, 给大鼠腹腔注射 BrdU (5 mg/100g)^[10]。分别于注射 Thy-1 抗体后 18 h、3 d 和 7 d 取出肾组织, 切片后使用 BrdU 抗体和 FITC 标记二抗, 进行免疫反应, 并观察绿色荧光, 每个标本随机选择 100 个最大直径的肾小球, 计数肾小球内 BrdU 阳性细胞数, 并取均值。

1.2.7 HE 染色观察 Thy-1N 大鼠肾组织形态学变化

取实验 18 h、3 d 和 7 d 各组大鼠肾组织标本制成石蜡切片。HE 染色后显微镜下观察肾组织结构并计算肾小球细胞总数, 即每个标本计数 100 个最大直径的肾小球内细胞数, 取均值表示结果。

1.2.8 电镜分析 Thy-1N 大鼠肾组织超微结构的改变

取实验 18 h、3 d 和 7 d 各组大鼠肾组织标本, 制成超薄切片, 电镜观察 GMC 的形态结构等超微结构的病理改变。

1.2.9 采用 ^3H -TdR 法测定大鼠 GMC 的增殖情况

将细胞接种于 96 孔板后, 给予 GMC 不同的刺

激(分组见上)。给予刺激后随即加入 ^3H -thymidine (18.5 \times 10⁴ Bq/L) 继续培养 18 h。培养结束后, 用 PBS 缓冲液冲洗, 加入胰蛋白酶消化细胞。分别将细胞收集在玻璃纤维滤纸上。送同位素室测定每分钟放射性脉冲数(count per minute, cpm)。

1.3 统计学方法

所得数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS11.0 软件分别进行单因素方差分析和两因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Thy-1N 大鼠肾组织中 cyclin D2 和 PCNA 的表达情况

2.1.1 肾组织中 cyclin D2 和 PCNA mRNA 的表达

大鼠腹腔注射 Thy-1 抗体诱导 Thy-1N, 分别于 18 h、3 d 和 7 d 3 个时间段, 取肾脏并提取组织总 RNA。应用 real-time PCR 检查 Thy-1N 大鼠肾组织中 cyclin D2 和 PCNA 的 mRNA 丰度。结果表明, 大鼠腹腔注射 Thy-1 抗体 18 h 后, 其肾组织中 cyclin D2 和 PCNA 的 mRNA 表达开始升高, 并于 3 d 和 7 d 时明显增多(图 1)。

2.1.2 肾组织中 cyclin D2 和 PCNA 蛋白的表达

为了确证 Thy-1N 肾组织中 cyclin D2、PCNA 的表达情况。分别于上述相同的 3 个时间段, 提取肾组织蛋白, 并行 Western blot 检查其 cyclin D2 和 PCNA 的蛋白含量。结果发现, 大鼠 Thy-1N 18 h 其肾组织中 cyclin D2 和 PCNA 表达即开始升高, 3 d 和 7 d 增加更明显(图 2), 其变化趋势与上述 mRNA 是一致的。

2.2 Thy-1N 大鼠肾小球 C5b-9 沉积

为了确定大鼠 Thy-1N 早期 C5b-9 的沉积, 本研究使用免疫荧光检测 Thy-1N 大鼠肾小球细胞上 C5b-9 沉积情况。结果表明, 大鼠注射 Thy-1 抗体 18 h 后, 肾小球细胞上有明显的 C5b-9 沉积, 且部

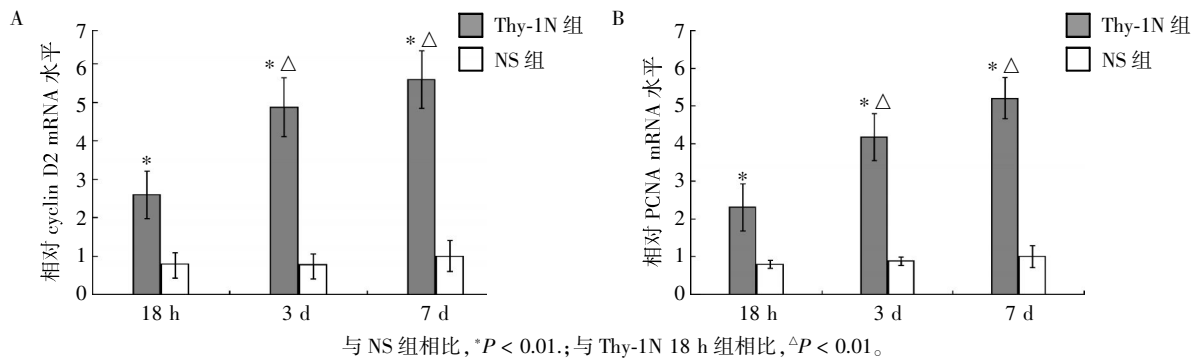


图 1 两组大鼠肾组织 cyclin D2 和 PCNA mRNA 的丰度变化

Figure 1 The mRNA levels of cyclin D2 and PCNA in the rat renal tissues of two groups

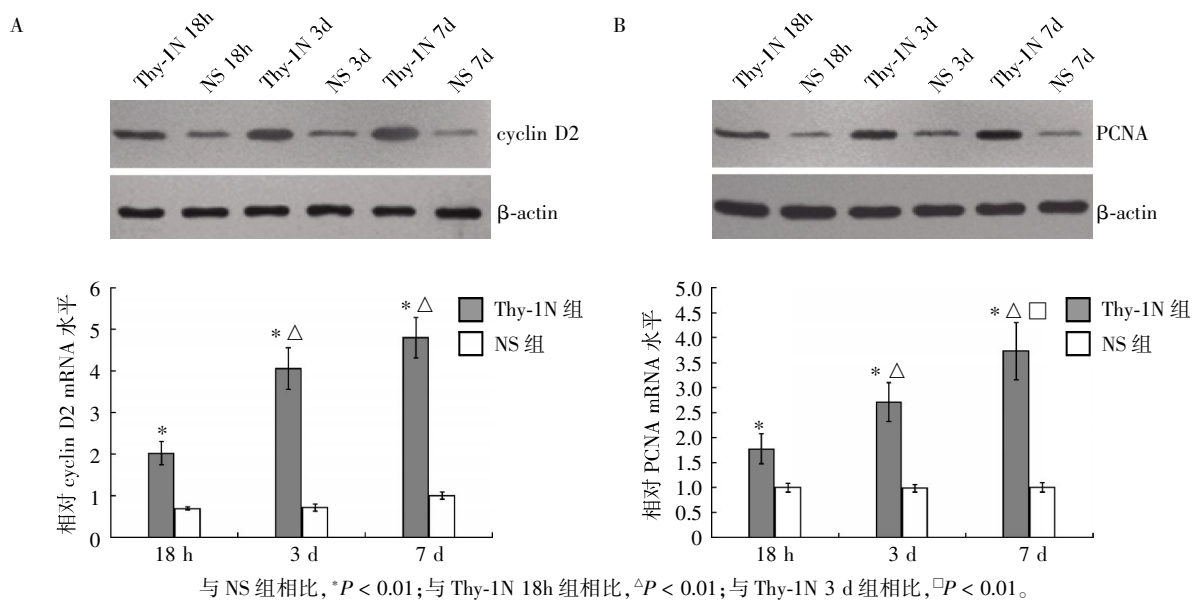


图 2 两组大鼠肾组织 cyclin D2 和 PCNA 蛋白的表达

Figure 2 The protein levels of cyclin D2 and PCNA in the rat renal tissues of two groups

分 C5b-9 包绕的肾细胞形态完好, 而正常兔血清 (NS) 组大鼠未见明显的 C5b-9 沉积 (图 3)。

2.3 Thy-1N 大鼠肾小球细胞 BrdU 摄入情况

为了确定大鼠 Thy-1N 各时相细胞的增殖水平, 本研究使用 BrdU 掺入法观察肾小球细胞增殖的情况 (分组及时间段选取同上)。免疫荧光检测大鼠肾小球细胞 BrdU 摄入量, 计数 BrdU 阳性细胞数。结果表明, 大鼠注射 Thy-1 抗体 18 h 后, 肾小球 BrdU 阳性细胞数显著增加, 3 d 进一步增多, 7 d BrdU 阳性细胞数增加更为明显 (图 4)。

2.4 Thy-1N 大鼠增生的形态学观察

2.4.1 光镜观察并计数肾小球细胞总数

HE 染色光镜观察肾小球变化并计数肾小球内细胞总数。结果表明, 大鼠腹腔注射 Thy-1 抗体 18 h 后, 肾小球细胞总数显著减少, 这可能与部分肾小球细胞溶解坏死有关。而 3 d 肾小球细胞总数较 NS

组明显增多, 7 d 增多更为显著。表明随着病程的进展, 肾小球细胞逐渐增生 (图 5)。

2.4.2 电镜检查肾小球 GMC 增殖情况

为了确定 Thy-1N 肾小球内细胞的增加是否确系 GMC 增生所致, 本实验通过电镜进一步观察肾小球的超微结构。结果发现, 大鼠腹腔注射 Thy-1 抗体 18 h 后, 肾小球系膜区的部分 GMC 呈现溶解坏死, 但残留的 GMC 形态完好。实验 3 d GMC 数量开始增多, ECM 分泌也有所增多, 7 d 系膜细胞数明显增加, ECM 分泌也显著增多 (图 6)。

2.5 体外 sublytic C5b-9 刺激 GMC 增殖的情况

为了确定 sublytic C5b-9 能否诱导 GMC 增殖及其可能的机制, 本实验体外培养了大鼠 GMC, 然后给予 sublytic C5b-9 复合物刺激, 随后采用 ³H-TdR 法对 GMC 增殖情况进行测定。同时, 将 sublytic C5b-9 刺激 GMC 后的细胞培养上清取出, 再去培养

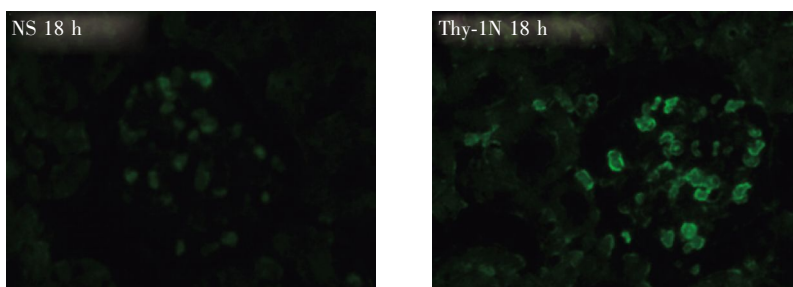
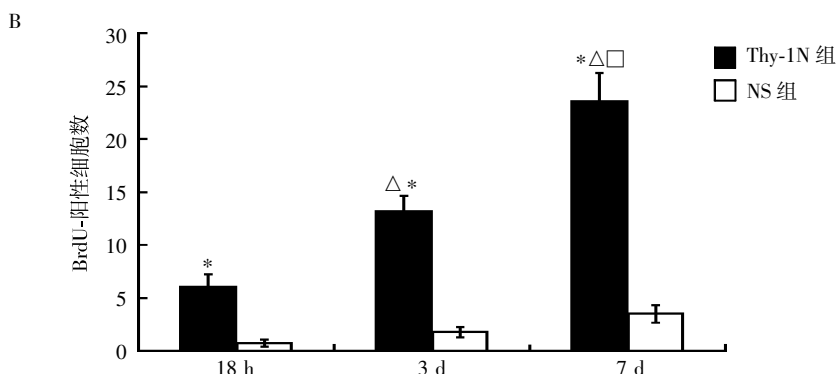
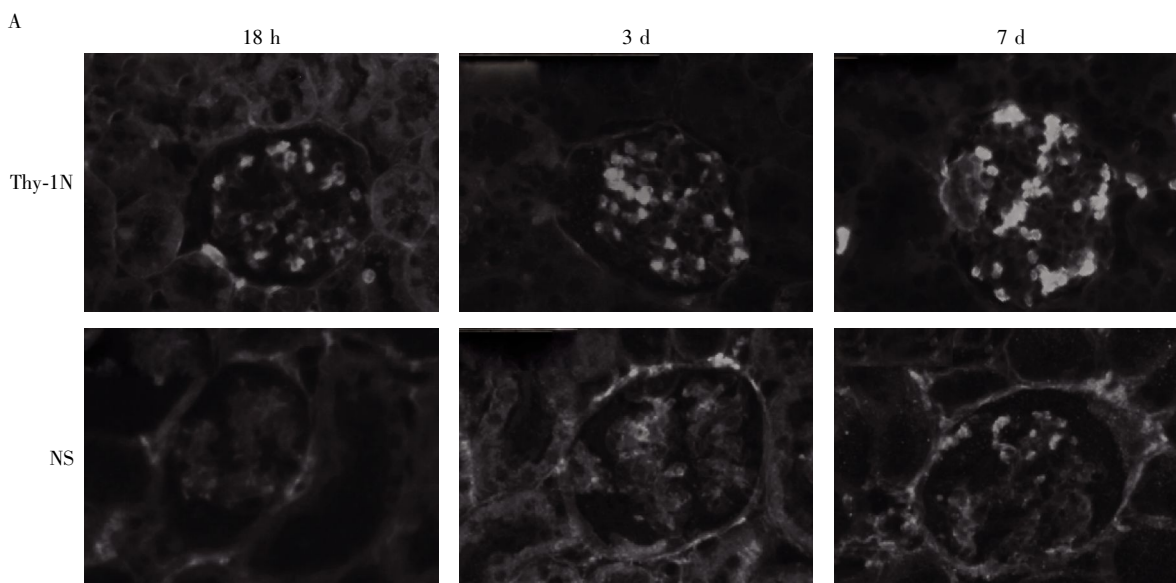


图 3 两组大鼠肾小球 C5b-9 的沉积情况($\times 400$)

Figure 3 The deposition of C5b-9 in rat glomerulus of two groups ($\times 400$)



A: BrdU 掺入实验观察肾小球细胞的增生情况($\times 400$); B: 计数 BrdU 阳性细胞数, 与 NS 组相比, $*P < 0.01$.; 与 Thy-1N 18 h 组相比, $\Delta P < 0.01$; 与 Thy-1N 3 d 组相比, $\square P < 0.01$ 。

图 4 两组大鼠肾小球细胞的增生情况

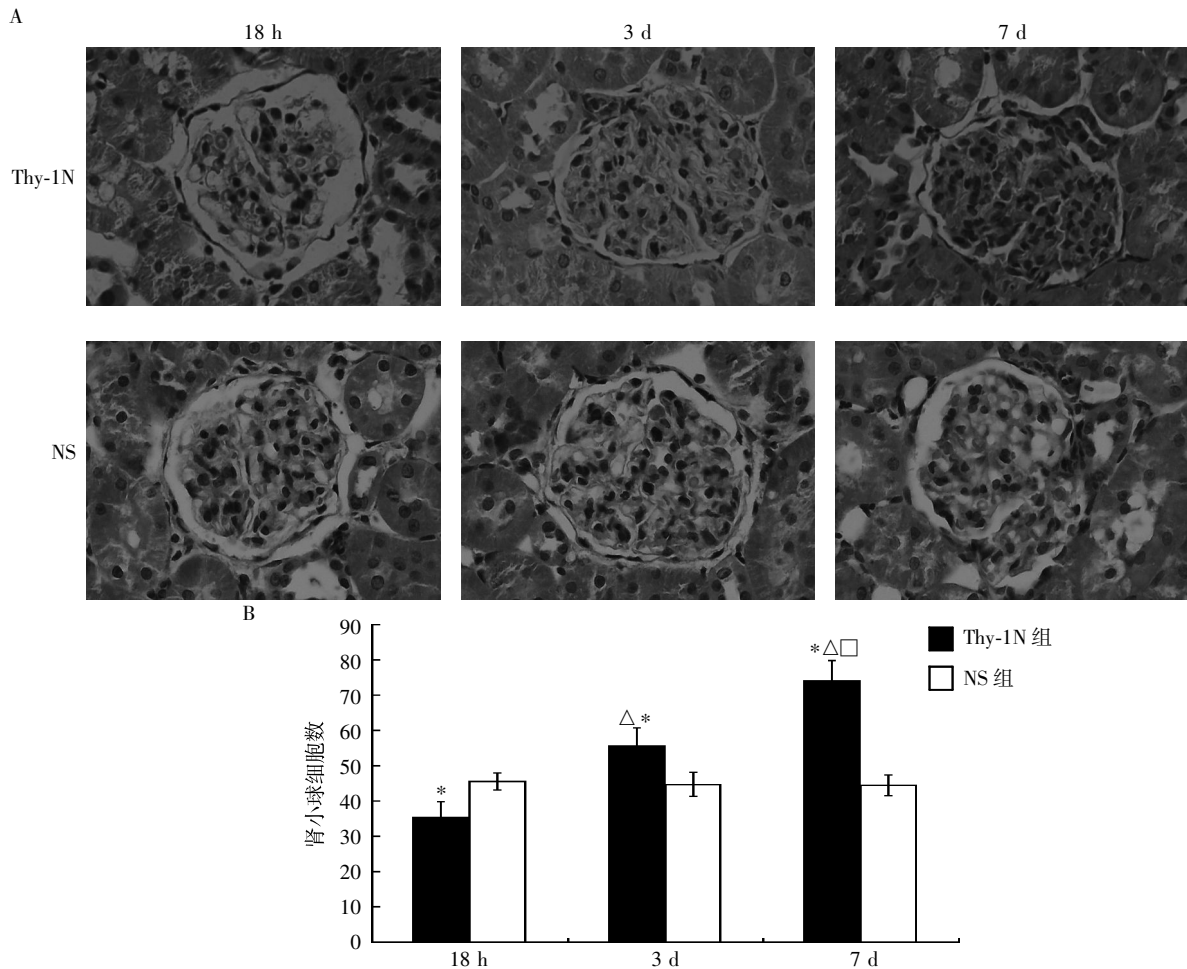
Figure 4 The proliferation of glomerular cells in rats of two groups

正常的 GMC, 观察其对 GMC 的促增殖作用。结果发现, 用 sublytic C5b-9 刺激 GMC 后 18 h, 细胞出现明显的增殖反应, 而用其培养上清去处理正常培养的 GMC (supernatant treatment 组), 亦可以诱导 GMC 增殖, 但效果明显弱于 sublytic C5b-9 直接处理的 GMC (图 7)。提示 sublytic C5b-9 诱导的 GMC 增殖, 一部分可能是 sublytic C5b-9 的直接刺激所致,

而另一部分则可能与其诱生的细胞因子的继发作用有关。

3 讨论

GMC 是肾小球内重要的固有细胞, 占肾小球细胞总数的 30%~40%, 其功能和作用主要表现为: ①支持作用: GMC 及其分泌的 ECM 构成系膜区, 填充



A: HE 染色光镜观察两组大鼠肾小球增生情况(x 400); B: 计数两组大鼠肾小球内细胞数, 与 NS 组相比, * $P < 0.01$; 与 Thy-1N 18 h 组相比, [△] $P < 0.01$; 与 Thy-1N 3 d 组相比, [□] $P < 0.01$ 。

图 5 两组大鼠肾小球病理改变

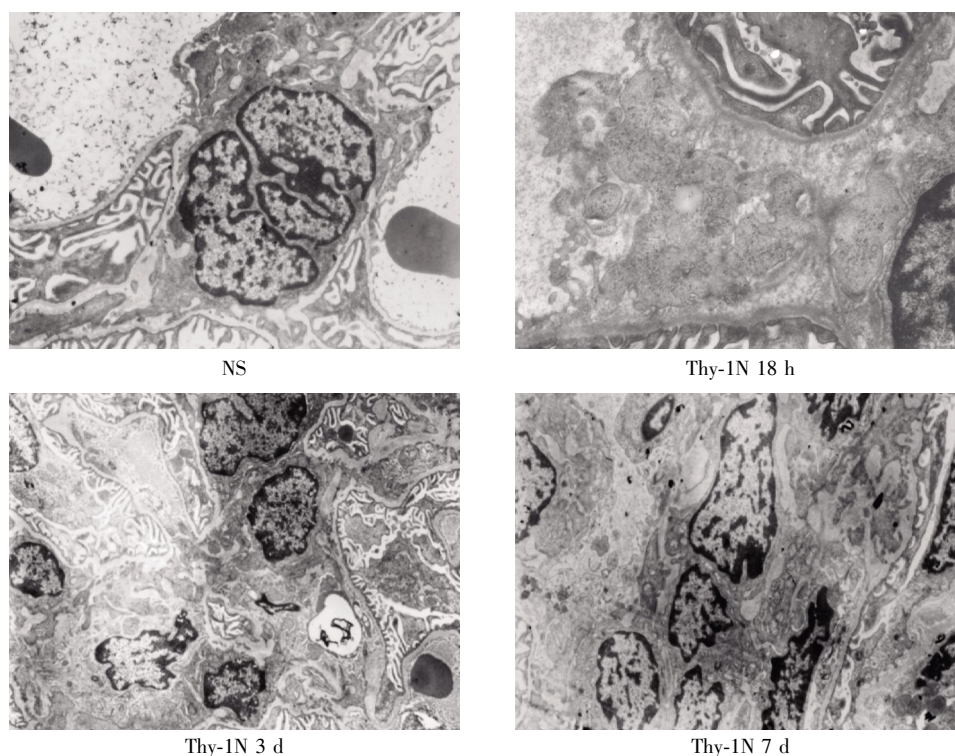
Figure 5 The glomerular pathological changes in rats of two groups

于毛细血管祥之间,能维持肾小球毛细血管的完整性和稳定性;② 收缩功能:GMC 可通过其收缩活动控制肾血流量^[12]; ③ 吞噬作用:GMC 表面有 Fc 和 C3b 等受体,能吞噬包括免疫复合物在内的多种大分子,并以此种方式清除沉积于系膜区的大分子物质^[13];④ 分泌效应:GMC 可释放肾素、MCP-1、IL-1、collagen VI 和 FN 等,参与炎症反应。故 GMC 异常增生会引起肾小球滤过功能的改变,导致临床肾炎的发生。因此,研究大鼠 Thy-1N 中 GMC 增生的规律,可为 MsPGN 的防治提供实验依据。

本实验在复制大鼠 Thy-1N 模型后,通过光镜和电镜观察发现,大鼠 Thy-1N 发病早期(18 h),肾内部分 GMC 出现了溶解坏死,但 3 d 已见明显的 GMC 增生和 ECM 分泌,7 d 则更加明显,这与 Yamamoto 等^[4]报道基本一致。然而,本研究还发现,Thy-1N 发病早期(18 h),在部分 GMC 溶解的同时,肾小球内 cyclin D2 和 PCNA 的表达已开始上调,同

时,肾小球细胞的 BrdU 摄入也显著增加,但此时,肾小球细胞总数却并未增加,可能的原因是:① BrdU 检测的是细胞 DNA 合成(S 期),此时 GMC 可能尚未完成有丝分裂,因此细胞数量并没有增加;② 大鼠 Thy-1N 早期(18 h),在补体 C5b-9 复合物的攻击下,部分 GMC 溶解坏死,导致肾小球 GMC 总数下降。故对于 GMC 的早期增殖,可能通过 HE 染色等方法不能及时看到,只有通过 BrdU 掺入法或分析细胞周期蛋白的表达才能查见。

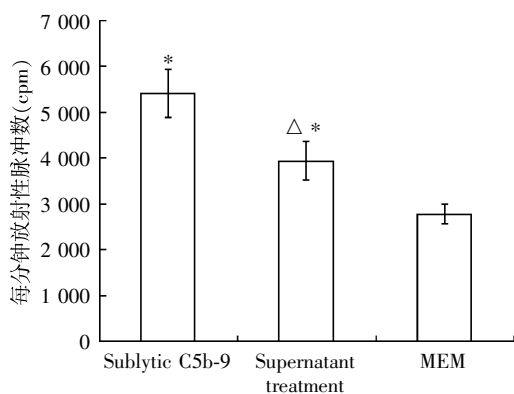
上述体内实验的结果提示,在大鼠 Thy-1N 发病早期,除了有部分 GMC 在补体作用下出现了溶破以外,部分 GMC 出现了增殖反应。业已发现,大鼠 Thy-1N 病变具有补体依赖性^[11],补体 C5b-9 是补体活化后产生的最终效应分子,插入靶细胞膜后能导致细胞穿孔溶解。但在有核细胞,补体调节蛋白能阻止 C9 分子在胞膜上的聚合,且妨碍 C5b-9 插入靶细胞膜的磷脂双层,致使形成的 C5b-9 不能造成靶



电镜观察显示,肾炎 18 h 部分 GMC 呈现溶解坏死($\times 12\ 000$);3 d GMC 明显增生,ECM 开始增多($\times 3\ 500$);7 d GMC 增生和 ECM 积聚更为显著($\times 5\ 000$),NS 组未见异常超微结构的改变($\times 5\ 000$)。

图 6 两组大鼠肾小球系膜区超微结构的改变

Figure 6 The mesangial ultrastructure in rats of two groups



与 MEM 组相比, * $P < 0.01$; 与 sublytic C5b-9 组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

图 7 各组 GMC 的增殖水平

Figure 7 The proliferation of GMC in various groups

细胞的穿孔破裂,这种 C5b-9 复合物称为亚溶解型(sublytic)C5b-9 复合物^[14]。有研究显示,sublytic C5b-9 能激活细胞多条信号转导途径,促使细胞合成并释放某些炎症因子和生物活性物质,导致细胞出现多种生物学效应^[15-16]。本研究发现,大鼠 Thy-1N 发病早期,肾小球内有补体 C5b-9 包绕 GMC,此时 GMC 并未溶破,提示此种 C5b-9 是亚溶解剂量的。据此,大鼠 Thy-1N 病变中 GMC 早期增殖可能与 sublytic C5b-9 作用相关。

为了阐明 sublytic C5b-9 在大鼠 Thy-1N 病变中的促增殖作用,本研究体外培养了大鼠 GMC,并质控了 sublytic C5b-9 复合物的形成,结果发现 sublytic C5b-9 刺激 GMC 后 18 h,其 ³H-thymidine 摄入明显增多。提示 sublytic C5b-9 确能诱导 GMC 的增殖反应。将用 sublytic C5b-9 处理 GMC 后的培养上清取出,用于培养正常的 GMC,结果显示该培养上清也可诱导 GMC 增殖,但其效果明显弱于 sublytic C5b-9 的直接刺激。提示 sublytic C5b-9 诱导 GMC 增殖反应,可能部分是 sublytic C5b-9 的直接作用所致,而由 sublytic C5b-9 诱导产生的某些细胞因子也可能发挥了一些间接的促增殖效应。

综上所述,本研究的结果提示,在大鼠 Thy-1N 发病中,除了因溶解坏死后继发 GMC 增生外,部分 GMC 在肾炎早期即出现增殖反应,其可能与 sublytic C5b-9 作用相关。另体外实验证实,用 sublytic C5b-9 刺激 GMC 确可促进其增殖。这些结果为阐明大鼠 Thy-1N 早期 GMC 增殖及其可能的机制提供了必要的实验依据。

[参考文献]

[1] Wang G, Kwan BC, Lai FM, et al. Elevated levels of miR-

- 146a and miR-155 in kidney biopsy and urine from patients with IgA nephropathy [J]. *Dis Markers*, 2011, 30(4): 171-179
- [2] Barratt J, Smith AC, Feehally J. The pathogenic role of IgA1 O-linked glycosylation in the pathogenesis of IgA nephropathy [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2007, 12(3): 275-284
- [3] Tokuyama H, Kim S, Zhang Y, et al. Protein kinase C ss inhibition ameliorates experimental mesangial proliferative glomerulonephritis [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2011, 16(7): 649-655
- [4] Yamamoto T, Wilson CB. Quantitative and qualitative studies of antibody-induced mesangial cell damage in the rat [J]. *Kidney Int*, 1987, 32(4): 514-525
- [5] Fosbrink M, Cudrici C, Tegla CA, et al. Response gene to complement 32 is required for C5b-9 induced cell cycle activation in endothelial cells [J]. *Exp Mol Pathol*, 2009, 86(2): 87-94
- [6] Woods M, Pant R, Mallya SM. Cyclin D1 and cyclin D-dependent kinases enhance oral keratinocyte proliferation but do not block keratinocyte differentiation [J]. *Int J Oncol*, 2010, 37(6): 1471-1475
- [7] Fatrai S, Elghazi L, Balcazar N, et al. Akt induces beta-cell proliferation by regulating cyclin D1, cyclin D2, and p21 levels and cyclin-dependent kinase-4 activity [J]. *Diabetes*, 2006, 55(2): 318-325
- [8] Toueille M, Saint-Jean B, Castroviejo M, et al. The elongation factor 1A: a novel regulator in the DNA replication/repair protein network in wheat cells? [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2007, 45(2): 113-118
- [9] Emanuele MJ, Ciccio A, Elia AE, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-associated KIAA0101/PAF15 protein is a cell cycle-regulated anaphase-promoting complex/cyclosome substrate [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(24): 9845-9850
- [10] Kimoto M, Yura Y, Kishino M, et al. Label-retaining cells in the rat submandibular gland [J]. *J Histochem Cytochem*, 2008, 56(1): 15-24
- [11] Qiu W, Che N, Feng X, et al. Apoptosis of glomerular mesangial cells induced by sublytic C5b-9 complexes in rats with Thy-1 nephritis is dependent on Gadd45gamma upregulation [J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39(11): 3251-3266
- [12] Kurogi Y. Mesangial cell proliferation inhibitors for the treatment of proliferative glomerular disease [J]. *Med Res Rev*, 2003, 23(1): 15-31
- [13] Baricos WH, Reed JC, Cortez SL. Extracellular matrix degradation by cultured mesangial cells; mediators and modulators [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2003, 228(9): 1018-1022
- [14] Lee HM, Oh BC, Lim DP, et al. Role of complement regulatory proteins in the survival of murine allo-transplanted Sertoli cells [J]. *J Korean Med Sci*, 2007, 22(2): 277-282
- [15] Liu H, Tian N, Arany I, et al. Cytochrome P450 2B1 mediates complement-dependent sublytic injury in a model of membranous nephropathy [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(52): 40901-40910
- [16] 邱文, 车楠, 周建博, 等. Sublytic C5b-9 诱导肾小球系膜细胞产生的 TSP-1 和 TGF- β 1 对其合成 FN 和 collagen IV 的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2011, 31(11): 1543-1549

[收稿日期] 2012-04-29

喜 讯

本刊再次入编《中文核心期刊要目总览》2011 年版(第 6 版)之综合医药卫生类核心期刊,这是本刊连续 4 届被确定为中文核心期刊。