

- 论著 -

# 地塞米松对大鼠肾小球系膜细胞增生水平的影响

肖建武<sup>1</sup>, 吴小川<sup>2</sup>, 易著文<sup>2</sup>

(1. 湘潭卫生学校儿科教研组, 湖南 湘潭 411100; 2. 中南大学湘雅二医院小儿肾脏病研究室, 湖南 长沙 410011)

**【摘要】** 目的 探讨地塞米松(DXM)对大鼠肾小球系膜细胞(GMCs)增生作用的影响。方法 培养大鼠GMCs细胞,分空白对照组、LPS组和DXM组。DXM选用3种浓度,分别为250 ng/孔、1 000 ng/孔和4 000 ng/孔。LPS终浓度为5 mg/孔。采用MTT掺入方法,于24 h和48 h观察3组中GMCs增生水平。结果 DXM组在浓度为4 000 ng/孔时48 h的增生水平为(0.251 ± 0.056) ng/L,低于LPS组和GMCs组[(0.787 ± 0.110), (0.678 ± 0.101) ng/L],差异有显著性( $P < 0.05$ )。DXM浓度为4 000 ng/孔时GMCs增生水平于48 h抑制最为显著。结论 DXM能抑制大鼠GMCs增生。

**【关键词】** 地塞米松;系膜细胞;增生;大鼠

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2002)06-0446-02

## Effect of Dexamethasone on Glomerulus Mesangial Cell Proliferation in Rats

XIAO Jian-Wu, WU Xiao-Chuan, YI Zhu-Wen

Department of Pediatrics, Health School of Xiangtan, Xiangtan, Hunan 411100, China

**Abstract:** **Objective** To study the effect of dexamethasone (DXM) on the proliferation of rat glomerulus mesangial cells (GMCs). **Methods** The GMCs lines of the rat were cultured *in vitro*. Both DXM and lipopolysaccharide (LPS) or LPS alone were added into the culture medium (DXM group or LPS group); in the others, neither DXM nor LPS was added and they were used as controls. The GMCs proliferative level was detected by the MTT method at 24 and 48 h of the experiment. **Results** The GMCs proliferative level in the DXM group of 4 000 ng/well at 48 h [(0.251 ± 0.056) ng/L] was lower than that of the LPS group [(0.787 ± 0.110) ng/L] and the controls [(0.678 ± 0.101) ng/L] ( $P < 0.05$ ); and the GMCs proliferative inhibition reached a peak at 48 h. **Conclusions** DXM may inhibit the proliferation of GMCs in rats.

**Key words:** Dexamethasone; Mesangial cell; Proliferation; Rat

肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cells, GMCs)增生是儿童肾脏疾病常见的病理特征,GM-Cs增生失衡是肾脏疾病病理进展的重要因素之一,抑制GMCs增生是治疗增生性肾脏病、防止病变恶化的关键环节<sup>[1]</sup>。临床上用于治疗肾脏疾病的许多药物都有抑制GMCs增生的作用。越来越多的临床资料证实,地塞米松(DXM)在临床上治疗肾脏疾病已取得一定的疗效,但其作用机制尚不清楚。本课题观察DXM对大鼠GMCs增生的作用,旨在初步探讨DXM治疗肾脏疾病的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大鼠肾小球系膜细胞株由上海长征医院梅长林教授提供,脂多糖和MTT液购自美国Sigma公司,地塞米松注射液由湖北襄樊恒生药业有限公司制造,酶联免疫检测仪(ELX-800)由美国Bio-Tc公司制造。

### 1.2 大鼠GMCs培养<sup>[2]</sup>

从液氮罐内取出冷冻管,37℃温水浴后离心,吸

[收稿日期] 2002-01-21; [修回日期] 2002-08-24

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题(No. 39800140),湖南省卫生厅科研立项课题(No. 2001-Y88)

[作者简介] 肖建武(1962-),男,硕士,高级讲师。

出细胞液,移入细胞培养瓶静置培养,培养液由20%胎牛血清、0.3 U/ml 胰岛素、100 U/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素、2.5 mg/L 二性霉素及D-缬氨酸改良的MEM (minimum essential medium) 组成。培养瓶置于5% CO<sub>2</sub>和18% O<sub>2</sub> 孵箱内。当系膜细胞长至贴壁时,用0.25%胰蛋白酶与0.04% 乙二胺四乙酸二钠等量混合,消化细胞,传代。第3代时,用RPMI 1640代替D-缬氨酸改良的MEM,其它成分相同。

### 1.3 实验分组

实验分3组,实验组即DXM组,由GMCs + LPS + DXM组成,LPS终浓度为每孔5 mg/L,DXM终浓度分别为250,1 000,4 000 ng/孔,每种浓度分别设5个复孔;对照组设2组,即LPS组和空白对照组,LPS组由GMCs + LPS组成,LPS终浓度为每孔5 mg/L。

### 1.4 大鼠 GMCs 增生水平的测定<sup>[3]</sup>

将GMCs种入96孔板中,每孔含200 μl FCS的RPMI 1640液中置(2~4) × 10<sup>3</sup>个细胞,周围孔加200 μl 培养液,5% CO<sub>2</sub> 孵箱,37 培养至细胞贴壁(一般为12 h,显微镜观察确定),吸出上清,加入无血清RPMI 1640 200 μl/孔同步12~24 h,吸出上清。LPS,DXM按上述分组分别加入孔中后,5% CO<sub>2</sub> 孵箱37 培养至24 h,48 h,在设定时间结束前4 h,每孔加入5 mg/ml MTT(四甲基偶氮唑蓝)10 μl,放入5% CO<sub>2</sub> 孵箱,37 培养4 h,吸出上清,控干,每孔加入DMSO(二甲基亚砷)200 μl,轻摇动,室温避光,让其反应10 min,用酶联免疫检测仪(ELX-800)测量,以每孔于波长570 nm处的吸光度(A<sub>570</sub>)表示。细胞增生水平的抑制强度 = 1 - (LPS组吸光度 - 实验组吸光度) / GMCs组吸光度<sup>[4]</sup>。

### 1.5 统计学分析

每组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有统计应用SPSS 10.0统计软件包处理。采用直线相关分析、单因素方差分析,两两比较,进行统计分析,方差齐者采用LDS检验,方差不齐者采用Tamhane检验。

## 2 结果

当DXM浓度为4 000 ng/孔和1 000 ng/孔时,48 h DXM组GMCs增生水平低于LPS和空白对照组,差异有显著意义( $P < 0.01$ 或 $0.05$ );LPS组和空白对照组的GMCs增生水平差异无显著性( $P > 0.05$ )。DXM组各浓度之间存在明显剂量-效应负

相关(24 h Pearson 相关系数 = -0.807,  $P < 0.05$ ; 48 h Pearson 相关系数 = -0.839,  $P < 0.01$ )。24 h和48 h均以浓度4 000 ng/孔抑制作用最强,各浓度DXM对大鼠GMCs增生的抑制均以48 h强于24 h,差异有显著性( $P < 0.05$ )。空白对照组、LPS组及DXM组在24 h GMCs增生水平差异无显著性( $P > 0.05$ )。见表1。

表1 DXM对大鼠GMCs增生水平的影响

Table 1 Effect of DXM on the rat glomerulus mesangial cell proliferation level (n = 5,  $\bar{x} \pm s$ , ng/L)

组别	大鼠 GMCs 增生水平	
	24 h	48 h
空白对照组	0.886 ± 0.128	0.678 ± 0.101
LPS组	0.921 ± 0.134	0.787 ± 0.110
DXM组(ng/孔):250	0.948 ± 0.131	0.696 ± 0.112 <sup>c</sup>
1 000	0.861 ± 0.126	0.559 ± 0.127 <sup>c,d,e</sup>
4 000	0.541 ± 0.119	0.251 ± 0.056 <sup>a,b,e</sup>

注: a与LPS组比较  $P < 0.01$ ; b与空白对照组比较  $P < 0.01$ ; c与LPS组比较  $P < 0.05$ ; d与空白对照组比较  $P < 0.05$ ; e与同组/同浓度24 h比较  $P < 0.05$

## 3 讨论

大鼠肾小球系膜细胞常作为体外研究肾脏病变发生机制和药物疗效的细胞模型,系膜细胞增生及炎症介质的释放在肾脏疾病的发生、发展及肾小球硬化中具有重要的作用<sup>[5]</sup>,药物抑制细胞增生及炎症介质的释放是阻断肾脏病变进展的关键环节之一,临床上常采用糖皮质激素治疗多种免疫性肾小球疾病,它是肾脏病领域里应用最广泛的一种免疫抑制剂,能有效地抑制多种免疫活性因子的基因表达,从而使某些肾脏疾病得到完全或部分的缓解。DXM是目前常用于临床治疗肾脏病的一种糖皮质激素<sup>[6]</sup>。

LPS能诱导大鼠GMCs表达IL-10 mRNA,促进GMCs增生<sup>[7]</sup>,但本实验LPS组与空白对照组GMCs增生水平,在统计学上没有差异,可能是由于LPS诱导大鼠GMCs表达IL-10 mRNA的时间在48 h后,因而在48 h内没有观察到GMCs明显增生效果。DXM浓度为250 ng/孔时,GMCs的增生水平不受影响,当DXM浓度达到1 000 ng/孔和4 000 ng/孔时,细胞的增生水平均较空白对照组和LPS组降低。我们所用的细胞为等量的同代细胞,在相

(下转第447页)

发现铁染色阳性增强现象主要见于脑组织受损区,且其傍血管现象明显,有局部的脑出血。由于病灶对侧亦同时受到缺氧损伤,因此不完全排除该侧脑组织中出现类似局部脑出血现象。

实验中我们发现铁染色阳性神经胶质增多的程度超过铁染色阳性细胞增多的程度,可能与损伤后局部细胞已坏死裂解有关。本实验于缺血缺氧后24 h可见铁染色增强现象,一周后最明显,提示铁染色增强可能发生于缺血缺氧后中晚期,而不适于作为考察缺血缺氧损伤的早期指标。

众所周知,缺血缺氧损伤后因NMDA受体激活及钙离子内流增加使得细胞内钙超负荷导致细胞损伤,铁染色的增强是否与钙内流有关值得进一步研究。

(图见彩色插页)

#### [参 考 文 献]

[1] Taylor EM, Morgan EH. Developmental changes in transferrin and iron uptake by the brain in the rat[J]. Brain Res Dev Brain Res, 1990, 55(1): 35 - 42.

- [2] Roskams JA, Connor JR. Iron, transferrin and ferritin in the rat brain during development and aging[J]. J Neurochem, 1994, 63(2): 709 - 716.
- [3] Lesnefsky EJ. Tissue iron overload and mechanisms of iron-catalyzed oxidative injury[J]. Adv Exp Med Biol, 1994, 366: 129 - 146.
- [4] Connor JR, Menzies SL, St. Martin SM. A histochemical study of iron, transferrin, and ferritin in Alzheimer's diseased brains[J]. J Neurosci Res, 1992, 31(1): 75 - 83.
- [5] Kienzl E, Puchinger L, Jellinger K. The role of transition metals in the pathogenesis of Parkinson's disease[J]. J Neurol Sci, 1995, 134(Suppl): 69 - 78.
- [6] Dietrich RB, Bradley WG Jr. Iron accumulation in the basal ganglia following severe ischemic-anoxic insults in children[J]. Radiology, 1988, 168(1): 203 - 206.
- [7] Connor JR, Pavlick G, Karli D. A histochemical study of iron-positive cells in the developing rat brain[J]. J Comp Neurol, 1995, 355(1): 111 - 123.
- [8] Pleasure D, Kim SU, Silberberg D. In vitro studies of oligodendroglial lipid metabolism [A]. In: Norton WH. Oligodendroglia [M]. New York: Plenum Press, 1984, 175 - 197.
- [9] Dorrepaal CA, Berger HM, Benders MJNL. Nonprotein-bound iron in postasphyxial reperfusion injury of the newborn[J]. Pediatrics, 1996, 98(5): 883 - 889.

(本文编辑:俞燕)

(上接第444页)

同的实验条件下,经DXM作用后,细胞的增生水平明显降低,说明体外培养的GMCs增生水平降低是由DXM所引起的。刺激24 h和48 h后,GMCs的增生水平均在DXM浓度为4 000 ng/孔时抑制最为明显,且以48 h的抑制作用表现最强,这可能是DXM治疗肾脏病的机制之一。我们之所以选择24 h和48 h作为两个观测点,是因为此期大鼠GMCs自身增生水平稳定,超过72 h后GMCs的增生水平随培养时间的延长而降低。

通过观察DXM在不同浓度和时间对大鼠GMCs的增生抑制作用,证实DXM浓度达一定值后对大鼠GMCs增生有明显抑制作用,该作用大小与DXM剂量有关。

#### [参 考 文 献]

- [1] 易著文. 小儿临床肾脏病学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1998, 273 - 287.
- [2] 潘晓勤,王晓燕,姜新猷. 肾小球系膜细胞培养及鉴定 [J]. 南京医科大学学报, 1995, 15(6): 222 - 224.
- [3] 张平,章崇杰,刘杰. 改良MTT法检测自然杀伤细胞的活性 [J]. 华西医科大学报, 1996, 27(2): 213 - 215.
- [4] Shanand SI. Cell-cycle control and renal disease [J]. Kidney Int, 1997, 52(8): 294 - 308.
- [5] Marx J. How the glucocorticoids suppress immunity [J]. Science, 1995, 270(12): 232 - 241.
- [6] Ray A. Glucocorticoids (letter) [J]. Science, 1995, 270(9): 1103 - 1111.
- [7] John RS. Cytokines [J]. Kidney Int, 1993, 43(8): 565 - 569.

(本文编辑:尹飞,俞燕)