短篇论著

文章编号:1000-5404(2008)23-2242-02

灯盏花素对高糖环境近端小管上皮细胞钠钾ATP酶活性的影响

杜 飞,高 原,姚 君,王兴红 (遵义医学院珠海校区生理学教研室,广东 珠海 519041)

摘 要:目的 观察灯盏花素(breviscapine, Bre)对高糖环境原代培养的近端小管上皮细胞(proximal tubule epithelial cells, PTEC)钠钾ATP酶(Na^+, K^+-ATPase)活性的影响。**方法** 手工微分离法原代培养PTEC,MTT法检测不同浓度的灯盏花素作用72 h对PTEC增殖的影响,以确定合适的灯盏花素实验浓度。将细胞分为5组:正常对照组(NC组)、高糖组(HG组)、小剂量灯盏花素组、中剂量灯盏花素组、大剂量灯盏花素组,每组设6个复孔,作用72 h。液闪法测定PTEC钠钾ATP酶活性。**结果** HG组PTEC钠钾ATP酶活性显著高于NC组($P<0.01$),小剂量组与HG组比较无统计学意义,中剂量组与HG组比较明显降低($P<0.05$),大剂量组显著降低($P<0.01$)。**结论** 高糖环境下PTEC的钠钾ATP酶活性明显升高;灯盏花素对高糖环境原代PTEC钠钾ATP酶活性的升高有明显的抑制作用;其对糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)的防治作用可能部分通过抑制PTEC钠钾ATP酶活性实现。

关键词: 灯盏花素;糖尿病肾病;近端小管上皮细胞;钠钾ATP酶

中图法分类号: R329.26 **文献标识码:** A

近端小管细胞膜上的钠钾ATP酶在钠、葡萄糖和氨基酸等物质重吸收过程中起关键性作用。近年的研究证实,在链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的糖尿病大鼠早期,其近端小管和皮质小管的钠钾ATP酶活性及其α_1-和β_1-亚单位的表达均显著升高,与糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)的发生发展有显著的相关性[1]。本室以往的研究也证明2型糖尿病大鼠近端小管钠钾ATP酶活性明显升高[2]。许多基础研究和临床观察均表明,灯盏花素(breviscapine, Bre)对DN有明显的预防和治疗作用,但其具体机制仍未探明。本实验观察其对高糖环境原代培养的近端小管上皮细胞(proximal tubule epithelial cells, PTEC)钠钾ATP酶活性的影响,旨在进一步阐明灯盏花素对DN的预防和治疗机制,为其临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

灯盏花素购于昆明龙津药业有限公司(批号20050701),胰蛋白酶、DMEM购于Gibco公司,胎牛血清购于北京索莱宝科技有限公司,MTT购于碧云天生物技术研究所,[γ-^{32}P]ATP购于北京福瑞生物工程公司核酸研究室。

1.2 培养液

DMEM培养液:含10%胎牛血清,葡萄糖5 mmol/L,100 U/ml青霉素,100 U/ml链霉素。高糖DMEM培养液:在DMEM培养液中加葡萄糖至25 mmol/L。

1.3 液闪液及孵育液

液闪液:含质量浓度为0.5% PPO(2,5-二苯基恶唑)和0.05% POPOP(1,4-双-2-15-苯基恶唑苯)与体积分数为55%二甲苯和45%乙二醇二甲醚的溶剂混合配制,置于棕色容器内存放,过夜使用。孵育液A:含50 mmol/L NaCl,5 mmol/L KCl,10 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L EGTA, 100 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L Na_2 ATP, [γ-^{32}P]ATP(85 Bq/μl),调节pH值为7.4;孵育液B:10 mmol/L $MgCl_2$,1 mmol/L EGTA,150 mmol/L Tris-HCl,10 mmol/L Na_2 ATP,4 mmol/L ouabain,[γ-^{32}p]ATP(85 Bq/μl),调节pH值为7.4。

1.4 方法

1.4.1 PTEC的培养 用本教研室的改良Doucet手工微分离法分离大鼠单根近端小管,将肾近端小管置入2 ml DMEM培养液的培养瓶中,置于37 ℃,体积分数为5% CO_2的培养箱中原代培养,于第3天更换第1次培养液,7~8 d细胞基本铺满瓶底。

1.4.2 MTT法检测不同浓度的灯盏花素对细胞增殖的影响 以2×10^4 ml^{-1}细胞数接种于96孔板,细胞生长至铺满70%~80%时换无血清培养液,孵育24 h使细胞同步化,加入不同灯盏花素浓度的高糖DMEM培养液,使灯盏花素终浓度分别为0.1、1、10、20、50、100、200 μmol/L,作用72 h,阴性对照组加入等体积的DMEM高糖培养液,空白对照组加等体积的DMEM培养液,每组设6个复孔。MTT法测细胞增殖程度。

MTT结果显示,当灯盏花素浓度为0.1、1、10、20 μmol/L时,吸光度分别为(0.683±0.480)、(0.683±0.085)、(0.642±0.087)、(0.623±0.041),与HG组(0.645±0.022)比较,无明显差异($P>0.05$);当灯盏花素浓度为50、100、200 μmol/L时,吸光度分别为(0.476±0.028)、(0.377±0.022)、(0.097±0.006),与HG组比较,显著性降低($P<0.01$);与NC组(0.678±0.005)比较,灯盏花素浓度为20、50、100、200 μmol/L

基金项目: 珠海市科技局资助(PC200310057)
Supported by Zhuhai Administration of Science & Technology of China (PC200310057)

作者简介: 杜 飞,男,贵州省遵义市人,硕士,医师,主要从事糖尿病肾病发病机制方面的研究,现在遵义医学院三附院肾内科。E-mail: feifei632@yahoo.com.cn

通信作者: 高 原,E-mail: gy60211@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-09-29;**修回日期:** 2008-03-31

时,细胞增殖显著性降低($P<0.01$)。所以本实验选择 5、10、20 μmol/L 的灯盏花素浓度干预高糖条件下培养的原代 PTEC,可尽量减少细胞增殖程度不同对实验的影响。

1.4.3　实验分组　　根据 MTT 结果将细胞分为 5 组:正常对照组(NC 组,含 5 mmol/L D-葡萄糖)、高糖组(HG 组,含 25 mmol/L D-葡萄糖)、高糖 + 低剂量灯盏花素组(HG + 5 μmol/L 灯盏花素组)、高糖 + 中剂量灯盏花素组(HG + 10 μmol/L 灯盏花素组)、高糖 + 大剂量灯盏花素组(HG + 20 μmol/L 灯盏花素组),作用 72 h 后取样观察,每组设 6 个复孔。

1.4.4　PTEC 钠钾 ATP 酶活性的测定[3]　　将分组处理的 PTEC 消化并移至离心管中,用 4 ℃ PBS 冲洗 2 次,100 × g 离心 10 min,弃上清。加蒸馏水 100 μl,然后 -80 ℃与 37 ℃水浴 2 次快速低渗、冻融处理,放入 4 ℃冰箱。再取 30 μl 上述处理好的细胞置于预先贴附在不锈钢弯盘约 0.5 cm × 0.5 cm 大小的锡箔纸上,取相同体积的蒸馏水作空白对照,分别加 1 μl 孵育液 A 或孵育液 B 测定总 ATPase 和镁 ATPase 活性,37 ℃水浴 15 min,然后将弯盘转移到碎冰上,分别加入 5 μl 4 ℃ 质量浓度为 5% 三氯醋酸终止反应,将锡箔纸连同全部液体一起转移到 2 ml 质量浓度为 10% 活性碳悬液中,混匀后 100 × g 离心 10 min,取上清液 500 μl 加入含 5 ml 液闪液的液闪计数瓶中,用液体闪烁计数器(上海核所日环光电仪器有限公司)计数 1 min 液体闪烁计数值(cpm)。

总 ATPase 和镁 ATP 酶活性的差值即钠钾 ATP 酶的活性。空白管用于测定无酶(不含近端肾小管上皮细胞)水解 ATP 的结果。以每小时每毫克肾小管上皮细胞的钠钾 ATP 酶解离出的无机磷酸的量($pmoli \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$)代表肾小管上皮细胞的钠钾 ATP 酶活性。同时将样本做蛋白定量,将其标化。

钠钾 ATP 酶活性($pmol \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$) = (X - B)/蛋白浓度 × 样本体积 × 孵育时间(h) × SRA。X 为待测样本的液体闪烁计数值,B 为空白对照管的液体闪烁计数值,SRA 为[γ-^{32}P] ATP 的比活性。

1.5　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析,组间的比较用 t 检验。

2　结果

HG 组 PTEC 钠钾 ATP 酶活性与 NC 组比较,显著升高[分别为(1 882.86 ± 154.01)、(1 028.43 ± 35.29) $pmol \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$, $P<0.01$],小剂量组和中剂量组仍显著高于 NC 组[分别为(1 876.64 ± 174.46)、(1 450.98 ± 132.26)、(1 028.43 ± 35.29) $pmol \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$, $P<0.05$];但中剂量组明显低于 HG 组($P<0.05$),大剂量组[(1 255.24 ± 135.18) $pmol \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$]较 HG 组显著性降低($P<0.01$),与 NC 组比较无明显差异($P>0.05$)。

3　讨论

有学者认为近端小管中钠与葡萄糖的转运过强,使钠盐在该处过度重吸收是 DN 发病的关键。STZ 诱导的糖尿病大鼠早期主要是肾小管重吸收的增加。Scherzer 等[1]观察到用 STZ 诱导的糖尿病大鼠早期,其近端小管和皮质小管的钠钾 ATP 酶活性及其 α_1-和 β_1-亚单位的表达均显著升高,与 DN 的发生、发展有显著的相关性。本室以往的研究也证明 2 型糖尿病大鼠近端小管钠钾 ATP 酶活性明显升高。体外高糖环境培养细胞是目前体外模拟糖尿病模型的一种重要手段。本实验采用高糖环境原代培养的 PTEC,观察到其钠钾 ATP 酶活性明显升高。

目前临床上对 DN 尚无根治的措施,主要是对症治疗和改善症状为主。亓翠玲等[4]采用 Bre 治疗 84 例 DN 患者,疗效较好。Bre 主要有扩张脑血管,降低血管阻力,增加脑血流量,改善微循环,抗血小板聚集等作用。目前已有许多学者分别从肾脏的氧化应激[5]、肾脏蛋白激酶 C 毒性[6]、肾组织巨噬细胞浸润[7]、肾小球转移生长因子 β1 和结缔组织生长因子的表达[8]等方面,就 Bre 对 DN 的早期防治机制进行了探讨,证明 DN 早期有明显的保护作用。本室也研究发现,Bre 在大鼠糖尿病早期对肾小管钠钾 ATP 酶活性增强有限制作用[9]。本实验用不同剂量的灯盏花素干预高糖环境原代培养的 PTEC,发现能明显的抑制其钠钾 ATP 酶活性的升高,并且有明显的剂量依赖性。提示灯盏花素对 DN 早期的防治作用可能与抑制 PTEC 钠钾 ATP 酶活性增加有关,但其具体机制有待进一步的研究。

参考文献:

[1] Scherzer P, Popovtzer M M. Segmental localization of mRNAs encoding Na^+, K^+-ATPase alpha$_1$- and beta$_1$-subunits in diabetic rat kidneys using RT-PCR[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002, 282(3): F492 - F500.

[2] 刘　红, 罗　蕾, 高　原. 2 型糖尿病大鼠近球小管 Na^+,K^+-ATPase 活性变化[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(20): 2062 - 2064.

[3] Gao Y, Luo L, Liu H. An improved approach for determination of Na^+-K^+-ATPase activity in single proximal tubule of rat[J]. Sheng Li Xue Bao, 2007, 59(3): 382 - 386.

[4] 亓翠玲, 亓立勇. 灯盏花素治疗糖尿病肾病的疗效观察[J]. 实用糖尿病杂志, 2006, 2(1): 23.

[5] 马　丽, 朱邦豪, 陈健文, 等. 灯盏花素对糖尿病大鼠肾脏氧化应激的影响[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(9): 1030 - 1033.

[6] 李　英, 吴文清, 张益民, 等. 野黄芪甙原对糖尿病大鼠肾脏蛋白激酶 C 活性作用的研究[J]. 中华肾脏病杂志, 2000, 16(2): 89 - 92.

[7] 林　辉, 吴永贵, 齐向明, 等. 灯盏花素对糖尿病大鼠肾组织巨噬细胞浸润的影响[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(6): 734 - 738.

[8] 吴永贵, 林　辉, 钱　浩, 等. 灯盏花素与 LY333531 对糖尿病大鼠肾脏的保护作用[J]. 中华肾脏病杂志, 2004, 20(6): 429 - 433.

[9] 沈东波, 高　原, 杜　飞. 灯盏花素在大鼠糖尿病早期对近球小管钠钾 ATP 酶活性的影响[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(7): 917 - 920.

(编辑　王　红)