维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)06-0801-03

高糖对脑微血管内皮细胞活力和内皮素-1 的影响

胡怀东[1],陈莉芬[2],胡长林[2]

(1 重庆医科大学附属第二医院内分泌科,重庆 400010;2 重庆医科大学附属第二医院神经内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨体外培养条件下高糖状态对大鼠脑皮质微血管内皮细胞(Brain microvascular endothelial cells,BMEC)的影响。方法:建立大鼠脑皮质微血管内皮细胞体外培养模型,用透射电镜观察正常浓度(5.05mmol/L)和高浓度(15mmol/L、30mmol/L)葡萄糖培养基中培养 24h 后内皮细胞的超微结构变化,用 MTT 法评价内皮细胞活力,采用放射免疫方法测定内皮素-1(Endothelin-1,ET-1)含量,用原位杂交法测定 ET-1 mRNA 表达。结果:高浓度葡萄糖可使内皮细胞超微结构损伤,细胞活力降低,ET-1 分泌显著上调,并呈剂量依赖性损伤细胞,但 ET-1 mRNA 表达无明显变化。结论:高糖对脑皮质微血管内皮细胞有显著的损伤作用,ET-1 升高在糖尿病微血管病变早期可能起主要作用。

【关键词】脑微血管内皮细胞;高糖;内皮素-1

【中国图书分类法分类号】R587.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-04-06

Effects of high glucose concentration on endothelin-1 and activity of cultured brain microvascular endothelial cells

HU Huaidong, et al

(*Department of Endocrinology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of high glucose on rat brain microvascular endothelial cells (BMEC). *Methods*: Brain microvascular endothelial cells(BMEC)of Wistar rat cerebral cortex were cultured in 5.05mmol/L glucose, 15 and 30mmol/L glucose media respectively for 24h, and then BMEC activity or injury was assayed by observing cell ultramicrostructures morphology and adopting methyl thiazolyl tetrazolium(MTT)assay. The ET-1 concentrations were evaluated by radioimmunoassay. Situ hybridization used to detect the ET-1 mRNA expression. *Results*: The BMEC activity and viability assessed by MTT were decreased when glucose concentrations rose. The ultrastructure of BMEC was damaged and the content of ET-1 in BMEC media was increased. Furthermore, ET-1 mRNA expression was not induced by high concentration of glucose. *Conclusions*: High concentration of glucose has a significant effect of BMEC injury. The data suggest that ET-1 may play important role in the early state of diabetic microvascular complications.

【key words】Brain microvascular endothelial cells; High glucose; Endothelin-1

高糖血症既是糖尿病的病变特征又是导致糖尿病血管并发症的主要原因,糖尿病微血管病变是糖尿病并发多种器官损害的病理基础,而血管内皮损伤是糖尿病微血管病变发生的主要因素之一。本研究用含高浓度葡萄糖的培养液培养脑微血管内皮细胞后,观察内皮细胞的活力和 ET-1 表达的变化规律,以了解高血糖在血管病变早期的作用。

1 材料与方法

作者介绍:胡怀东(1970-),男,讲师,博士,主要研究方向:1.糖尿病慢性并发症;2.病毒性肝炎、原发性肝癌免疫发病机制及免疫治疗。

基金项目:重庆市卫生局医学科研资助项目(2004-B-86)。

1.1 材料

1~5 天的 Wistar 乳鼠由重庆医科大学实验动物中心提供。正常浓度葡萄糖(5.05 mmol/L)M199 培养基和胎牛血清均购自美国 Hyclone 公司,Ⅶ胶原酶、胰蛋白酶为美国 Sigma 公司产品;Ⅷ因子相关抗原及免疫组化试剂盒为北京中山生物制品公司产品。ET-1 放免试剂盒由北京东亚免疫技术研究所提供。

1.2 脑微血管内皮细胞的培养与鉴定

1~5 天的 Wistar 新生大鼠取脑,去除大血管、软脑膜、脑干、小脑和大脑髓质,匀浆,经孔径 75 μm 尼龙网过滤匀浆悬液,冰冷 Hank's 液洗涤、离心收集滤网上面的微血管段,0.1‰的Ⅶ胶原酶消化后离心,沉淀物加入含 15%胎牛血清的 M199 培养液制成细胞悬液,转入 35ml 塑料培养瓶中,放入 37℃,5%CO_2 孵箱内静置培养,待细胞生长至融合单层

维普资讯 http://www.cqvip.com

后,0.25%胰酶消化细胞传代,得到纯化的脑微血管内皮细胞。血管内皮细胞进行Ⅷ因子相关抗原免疫细胞化学方法鉴定,证实为内皮细胞,纯度达 95%以上。本实验均使用培养第三代的微血管内皮细胞。

1.3 实验分组

待培养 BMEC 融合时进行实验,细胞随机分成 3 组,各浓度组分别培养 24 h。

1) 正常组:正常生长内皮细胞、培养液葡萄糖浓度为 5.05 mmol / L。

2) 高糖 1 组:用高糖 M199 培养液,葡萄糖终浓度为 15mmol / L。

3)高糖 2 组:用高糖 M199 培养液,葡萄糖终浓度为 30 mmol / L。

1.4 BMEC 超微结构观察细胞

BMEC 经 2%戊二醛溶液固定后,常规电镜样品制备,透射电镜观察其超微结构变化。

1.5 MTT 法细胞活力测定

细胞接种于 96 孔培养板贴壁生长 24h 后,每孔加入 20μl MTT 继续培养 4h 后,离心(2000 r/min × 5 min),弃上清,每孔加入 200μl 二甲基亚砜溶解紫色结晶,置全自动酶标仪上测出每孔吸光度值(A 值),测定波长为 570nm。

1.6 ET-1 含量测定

细胞以 3×10^4/ml 接种于 24 孔培养板中,每组六孔。各组细胞培养至所选时间,收集培养上清液 100μl,按 ET-1 试剂盒说明书操作,测定 ET-1 含量。

1.7 原位杂交检测 ET-1mRNA 表达

ET-1 原位杂交检测试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司,所用探针为地高辛标记的寡核苷酸探针。探针序列为:(1)5'- GATTA TTTGC CCATG ATCTT CTCTC TGCTG TTCGT -3'(2)5'-CCACC TGGAC ATCAT CTGGG TCAAC ACTCC CGAGC-3'。

细胞培养于放置盖玻片的 24 孔板内,将长有细胞的盖玻片取出后按如下步骤操作:4%多聚甲醛固定后 PBS 漂洗,并用预杂交液于 37℃作用 2 h 后,在 ET-1 寡核苷酸探针杂交液中 43℃孵育 30 h,1:400 抗地高辛抗体 37℃孵育 4 h,BCIP/NBT 显色系统显色,原位杂交阴性对照采用杂交液中未加探针的方法,其余相同。

1.8 数据处理及统计学分析

原位杂交的结果在显微镜下经图像分析系统 (北航 CM-2000b) 进行密度扫描,测得每个视野内平均吸光度 A 值,应用 SPSS 统计软件处理。实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,$P<0.05$ 为差异有显著意义。

2 结 果

2.1 BMEC 超微结构的观察

电镜观察正常 BMEC 呈长椭圆形,细胞核内染色质细密,具典型的高尔基体、内质网和线粒体,核周胞浆丰富,质膜和核膜完整(见图 1)。高浓度葡萄糖(15mmol / L)刺激 24h 后,内皮细胞出现胞质水肿,内质网及线粒体肿胀,细胞凋亡可见典型的凋亡小体(见图 2)。高浓度葡萄糖(30mmol / L)刺激 24h 后,内皮细胞核染色质边集,胞浆溶解,细胞坏死(见图 3)。

2.2 不同浓度葡萄糖对 BMEC 活力的影响(见表 1)

由附表可知,不同浓度高糖组脑微血管内皮细胞活性均明显下降,与正常组比较有显著性差异($P<0.01$)。葡萄糖浓度越高,内皮细胞活性越低($P<0.01$)。

2.3 不同浓度葡萄糖对 BMEC ET-1 含量的影响(见表 1)

表 1 不同浓度葡萄糖对 BMEC 活力、ET-1 含量、ET-1mRNA 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞活力(A 值)	ET-1 含量 (pg/ml)	ET-1mRNA (A 值)
正常组	0.61 ± 0.09	160.19 ± 32.34	0.16 ± 0.03
高糖 1 组	0.42 ± 0.06[a]	292.25 ± 47.72[a]	0.14 ± 0.02
高糖 2 组	0.31 ± 0.07[a][a][a]	378.77 ± 56.56[a][a]	0.16 ± 0.03

注:[a]P<0.05 与正常组比较,[a][a]$P<0.01$ 与正常组比较,[a]$P<0.05$ 与高糖 1 组比较,[a][a]$P<0.01$ 与高糖 1 组比较

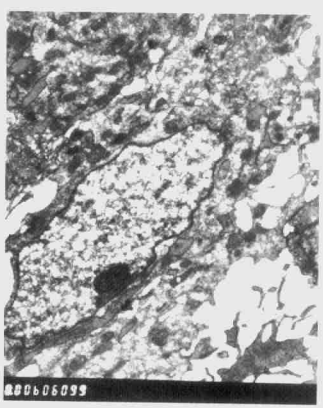


图 1 正常组:内皮细胞超微结构基本正常(×8000)

由附表可知,BMEC 经高浓度葡萄糖刺激后,培养上清液中 ET-1 含量明显增加($P<0.01$),且与葡萄糖浓度成正相关。

2.4 不同浓度葡萄糖对 BMEC ET-1mRNA 表达水平的影响(见表 1)

维普资讯 http://www.cqvip.com

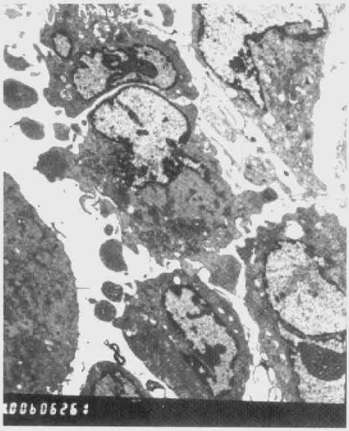


图 2 高糖 1 组：内皮细胞凋亡，可见凋亡小体（×4000）



图 3 高糖 2 组：内皮细胞坏死，核边集，胞浆溶解（×8000）

由表 1 可知，三组 BMEC ET-1mRNA 水平比较无明显差异（$P>0.05$），高浓度葡萄糖对 ET-1mRNA 表达水平无明显影响。

3 讨 论

糖尿病血管病变是糖尿病患者死亡的主要原因，血管内皮细胞易受高血糖损害，而内皮细胞损伤和功能的紊乱是导致糖尿病血管病变的重要因素。为阐明高血糖在糖尿病微血管病变早期发病中的作用，我们利用体外培养脑微血管内皮细胞进行了研究，发现高糖培养 24h 后微血管内皮细胞超微结构明显损伤，表现为核染色质固缩，凝聚成团块，细胞肿胀、凋亡和坏死等。MTT 比色分析是一种检测细胞生长和存活的灵敏方法，重复性好。活细胞线粒体的琥珀酸脱氢酶可将黄色的 MTT 还原为蓝紫色结晶物，而死亡细胞则无此功能，通过测定吸光度即可反映细胞活性。本文研究显示高糖组的 A 值明显较正常组降低，并且随着糖浓度的加大细胞的存活率不断降低，说明活细胞数目减少，细胞生长受到了抑制。总之，高浓度葡萄糖对体外培养的脑微血管内皮细胞具有明显的损伤作用。

血管内皮细胞参与机体的凝血、免疫、物质转运和生物活性物质释放等重要的生命活动[1]。内皮细胞功能异常在糖尿病血管病变中发挥重要作用，其主要特征之一表现为内皮细胞异常凋亡导致血管结构异常及促凝、促黏附等功能活化[2]。受损内皮细胞与血流及血管壁其他细胞相互作用，分泌多种细胞因子，从而启动动脉粥样硬化形成过程。

高糖导致内皮功能紊乱的机制尚不完全清楚，目前认为主要与以下环节有关：①高糖刺激能使内皮细胞发生氧化应激，氧化应激又能产生大量 ET 造成内皮细胞损伤，对糖尿病早期血管病变的产生起一定的作用。②糖基化终末产物增加，引起内皮细胞增生异常，并促进细胞死亡[3,4]。③产生过多的氧自由基损害细胞膜蛋白、酶和核酸，使细胞增殖率下降。④多元醇途径的激活，导致 NADH 堆积，进一步产生功能性缺氧，同时伴有从丙酮酸到乳酸的转变。⑤通过直接刺激糖酵解途径实现的。高糖诱导细胞复制损害的可能机制与乙酰 Co-A 的过多产生有关，而乙酰 Co-A 来自加强的糖酵解过程。⑥一些细胞因子如 TGF-β1 产物的自分泌释放[5]。这些机制可能独立或共同参与血管内皮损伤，有助于糖尿病血管并发症的发生和发展。

ET-1 是目前已知的最强的血管收缩剂，是血管内皮细胞损伤或过分活化的主要标志之一，它的稳定表达对于维持血管基础张力至关重要。ET-1 增多在动脉粥样硬化尤其糖尿病血管并发症中具有重要的作用[6-9]。本实验结果显示，高浓度葡萄糖呈浓度依赖性促进 ET-1 的分泌，但并不增加

（下转第 807 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

活时间进一步延长。提示经 GPS 动员的 PBMNC 能够重建小鼠造血功能，也证明了移植的 PBMNC 中含有大量的 HSPC。脾集落形成实验是检测小鼠造血干细胞的经典实验方法，利用该实验可以检测造血干细胞的相对数量[5]。对小鼠血液和骨髓中CFU-S的观察结果证明血液和骨髓中的干细胞处于动态平衡，造血干细胞在外周血或非造血器官中都不能正常发育，通过血液循环迁移的干细胞最终将回归造血器官的一定位置才能行使其生理功能。如果把 HSPC 移植到造血衰竭小鼠中，那么骨髓和脾脏中的 HSPC 必然会增殖、分化，重建造血功能，在 HSPC 移植后比较短的时间内，脾脏将会发挥它短期造血重建作用，即从外周血分布到脾脏的 HSPC 开始增殖、分化，那么脾脏在外观和重量上也会发生相应地改变。所以我们通过观察移植后小鼠脾脏的湿重和脾集落的计数来检测移植到小鼠体内的 HSPC。实验结果表明移植后 12 天 GPS 组的脾脏在形态上明显比 NS 组大；GPS 组的脾湿重和 CFU-S 数显著高于 NS 组，更进一步说明移植到小鼠体内的 PBMNC 中含有较多的 HSPC，同时在脾脏表面也形成了造血细胞集落。前面的实验结果已经间接地证明了 HSPC 植入成功。但为排除受体造血功能自行恢复的可能性，遗传学的直接证明才最具有说服力。哺乳动物 Y 染色体上存在性别决定区，即 Sry 基因。Y 染色体的 Sry 基因作为细胞本身基因组的标志，在细胞分裂、分化和增殖过程中，不会发生减弱和丢失现象，因此作为追踪移植细胞存活或植入的标志，明显优于其它的转基因方法[6,7]。我们采用 PCR 法检测移植后受体小鼠外周血细胞 Sry 基因，鉴定其造血来源。结果发现：移植后 GPS 组第 90 天存活小鼠，经 Y 染色体 PCR 分析，均检出了 581 bp Y 染色体序列，证实雌性受体小鼠重建的造血细胞来自雄性供体小鼠。本研究初步观察到 GPS 动员出的 HSPC 对小鼠造血功能重建的作用，为进一步探讨 GPS 的动员作用及其机理提供了理论与实验依据。

参 考 文 献

[1] 戴 勤、王亚平、周开昭、等. 人参多糖对粒单系造血祖细胞增殖分化的影响[J].基础医学与临床，2004；24(1)：52-55.

[2] 吴 宏、姜 蓉、王亚平. 人参多糖和当归多糖诱导人内皮细胞表达造血生长因子的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志，2002；22(9)：687-690.

[3] 唐佩弦. 造血干祖细胞移植的生物学基础[J].中国病理生理杂志，2000；16(10)：932-934.

[4] 韩忠朝. 造血干细胞理论与移植技术[M].郑州：河南科学技术出版社，2000.11.

[5] 王绮如、谭孟群、程腊梅. 造血生理学[M].长沙：中南大学出版社，2005.24.

[6] Hawkins AL, Jones RJ, Zehabauer BA, et al. Fluorescence in situ hybridization to determine engraftment status after murine bone marrow transplant [J]. Cancer Genet Cytogenet, 1992；64(2)：145-148.

[7] Yan XQ, Briddell R, Hartley C, et al. Mobilization of long-term hematopoitic reconstituting cells in mice by the combination of stem cell factor plus granulocyte colony-stimulating factor [J]. Blood, 1994；84(8)：795-797.

(上接第 803 页)

ET-1mRNA 的水平。ET-1 生成增加可使细胞表面特性改变，血管收缩舒张异常，抗血小板凝集作用也减弱，促进动脉粥样硬化，在糖尿病微血管病变早期可能起主要作用。干预高血糖所介导的 ET-1 的分泌，有可能减轻高血糖对内皮细胞的损害，有助于防治糖尿病血管并发症的发生发展。

参 考 文 献

[1] Michiels G. Endothelial cell functions [J]. J Cell Physiol, 2003；196：430-443.

[2] Laight DW, Carrier MJ, Anggard EE. Endothelial cell dysfunction and the pathogenesis of diabetic macroangiopathy[J]. Diabetes Metab Res Rev, 1999；15：274-282.

[3] De Vriese AS, Verheuren TJ, Van de Voorde J, et al. Endothelial dysfunction in diabetes[J]. Br J Pharmacol, 2000；130：963-974.

[4] Lee IK, Kim HS, Bae JH. Endothelial dysfunction：its relationship with acute hyperglycaemia and hyperlipidemia [J]. Int J Clin Pract Suppl, 2002；129：59-64.

[5] Miginn S, Poronnik P, King M, et al. High glucose and endothelial cell growth：novel effects independent of autocrine TGF-β 1 and hyperosmolarity[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2003；284：C1374-1386.

[6] Chen Y, McCarron RM, Golech S, et al. ET-1- and NO-mediated signal transduction pathway in human brain capillary endothelial cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2003；284(2)：C243-249.

[7] Chang CZ, Winardi D, Lin CL, et al. Attenuation of hemolysate-induced cerebrovascular endothelial cell injury and of production of endothelin-1 and big endothelin-1 by an endothelin-converting enzyme inhibitor[J]. Surg Neurol, 2002；58(3-4)：181-187.

[8] Bousette N, Giaid A. Endothelin-1 in atherosclerosis and other vasculopathies[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2003；81(6)：578-587.

[9] Lam HC. Role of endothelin in diabetes vascular complication[J]. Endocrine, 2001；14(3)：277-284.