DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.04.042
第24卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 4
470 2002年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)04-0470-03

高糖对培养的肾小球系膜细胞产生 t-PA 及与其结合的影响

闫振成[1],张建国[1],李开龙[1],黄庆愿[2], 丽露[1] (第三军医大学:[1]附属大坪医院野战外科研究所肾内科,重庆 400042;[2]高原军事医学系病理生理学教研室、高原医学研究室,重庆 400038)

提 要:目的 观察高糖状态下系膜细胞与组织型纤溶酶原激活物(Tissue plasminogen, t-PA)结合力及系膜细胞产生 t-PA 活性改变与纤维连接蛋白(Fibronectin, FN)产生的影响。方法 采用体外人肾小球系膜细胞培养,放射性核素标记法测定系膜细胞与 t-PA 结合力,纤维蛋白酶谱法检测 t-PA 活性,酶联免疫分析检测 FN。结果 高糖可抑制系膜细胞与 t-PA 结合力,同时 t-PA 活性增加,FN 产生明显增多,并随着培养时间的延长,葡萄糖愈高,作用愈明显。结论 高糖致系膜细胞与 t-PA 结合力下降,t-PA 活性增加,同时可能其抑制物明显增多,导致细胞外基质积聚,可能是糖尿病肾病肾小球硬化发生的重要原因之一。

关键词:葡萄糖;系膜细胞;纤溶蛋白酶原激活物;组织型
中图法分类号:R322.61;R363.1;R392.11 文献标识码:A

Effects of high glucose on tissue plasminogen activator produced by cultured glomerular mesangial cells and its binding ability to the cells

YAN Zhen-cheng, ZHANG Jian-guo, LI Kai-long, HUANG Qing-yuan, DING Han-lu (Department of Nephrology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To observe the effects of high glucose on the production of tissue plasminogen activator (t-PA) by human glomerular mesangial cells (MC), its binding ability to the cells, and the role of fibronectin (FN) in this event. Methods Human MC were isolated and cultured under a high glucose condition. Fibrin enzymography was used to measure the activity of t-PA, and radioassay to detect the binding ability of t-PA to MC. FN was detected with ELISA. Results High glucose supressed the binding ability of t-PA to MC while significantly increased the production of t-PA and FN by MC. With the longer the MC were cultured with high glucose, the higher the concentration of glucose was, the more significant the effect was. Conclusion High glucose inhibits the binding ability of t-PA to MC and the t-PA activity is increased. At the same time, its inhibitor may increase significantly. All these factors may cause the accumulation of extracellular matrix, and contribute to glomerular sclerosis in patients with diabetic nephropathy.

Key words: glucose; mesangial cell; plasminogen activator; tissue-type

糖尿病肾病(Diabetic Nephropathy, DN)的发生与血糖控制的好坏及糖尿病病程密切相关。系膜弥漫性增生是 DN 的病理基础,因而系膜细胞在 DN 的发生发展中处于重要地位。t-PA 及纤溶蛋白酶原激活物抑制物(Plasminogen activator inhibitor, PAI)是纤溶系统的重要组成部分,在调控细胞外基质代谢上发挥重要作用。t-PA 可与系膜细胞结合后,使它们在细胞表面仍保持活性并免受其抑制物灭活,而发挥局部促纤溶的作用。可见 t-PA 在系膜细胞上结合多少直接影响其催化活性,从而影响纤溶和裂解细胞外基质(ECM)活性[1]。因此本实验采用高糖作用系膜细胞后观察其与 t-PA 结合力、t-PA 活性及 FN 产生的改变,为揭示 DN 发病机制提供重要的实验依据。

1 材料与方法

1.1 肾小球系膜细胞的培养和鉴定[2]

用无菌 Hank 氏液洗净胎肾表面血迹,剥离肾包膜,剪碎肾皮质于 100 目筛网研磨后,过 150 目筛网,最后在 200 目筛网上收集肾小球,镜下观察为 99%,加入 0.1% Ⅳ型胶原酶(Sigma 公司)消化后,离心收集消化的肾小球,培养液为含 20% FCS 的 RPMI1640。14 d 细胞布满瓶底,然后传代培养。取培养第 3~6 代的细胞接种于内置玻片的培养皿中培养,长满玻片后,用冷丙酮固定。按 S-P 试剂盒所述方法进行操作,用小鼠抗人第Ⅷ因子相关抗原的单克隆抗体(北京中山公司)和小鼠抗人 Vimentin 多克隆抗体进行细胞免疫组化鉴定。

1.2 实验分组及时相点设置

按培养液中葡萄糖浓度不同,分为 3 组,A 组:对照组,系膜细胞培养液中葡萄糖浓度为 5 mmol/L;B 组:葡萄糖浓度为 30 mmol/L 的系膜细胞培养液;C 组:葡萄糖浓度为 60 mmol/L 的系膜细胞培养液,每组 10 复孔;于实验 24、48、72 h 后进行检测各项指标。

1.3 t-PA 放射性核素标记[3]

将 1 mCi $Na^{125}I$(北京原子能研究所)、t-PA(Sigma 公司)10 μg 溶于 250 μl PBS 液中,采用 Iodogen 法,将上述两者加入管壁含有 100 μg Iodogen 的离心管中,将混合液通过用 0.1% 人血清白蛋白(HSA)、磷酸钠缓冲液平衡的 Sephadex-G25 柱,用部分收集器收集洗脱液,于 ^{125}I 放免测量仪测定 cpm 值,第一峰为碘化 t-PA,用于测定用药。

1.4 ^{125}I-t-PA 与 MC 结合的测定

收集各组各时相点细胞后,用 PBS 1% HSA 缓冲液,每孔加

作者简介:闫振成(1966—)男,河北省张家口市人,博士研究生,主治医师,主要从事肾小球疾病发病机制的研究,发表论文 11 篇。电话:(023)68757446

收稿日期:2001-09-05;修回日期:2001-11-27

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

400 μl 的 ^{125}I-t-PA (4.33× 10^5 /孔), 4 ℃作用 30 min, 收集细胞, PBS 冲洗 3 次, 每孔加 0.1% 胰蛋白酶 400 μl, 溶细胞成悬液, 取 300 μl/孔于 ^{125}I 放免测量仪测定 cpm 值。

1.5 纤维蛋白酶谱法检测系膜细胞培养上清 t-PA 的活性

采用文献[4, 5]方法进行。留取上述培养上清液, 以 Amicon-10 离心柱进行浓缩, 加等量非还原型电泳缓冲液于含有 0.1% 牛纤维蛋白底物的 10% SDS-PAGE 胶上电泳 1.5 h, 然后用 2.5% Triton-100 室温洗涤 1 h, 转移至底物缓冲液中 37 ℃反应过夜, 固定 2 h, 考马氏亮蓝染色 20 min, 脱色 45 min, 最后采用凝胶图像分析系统照相并进行半定量分析。

1.6 ELISA 法检测 FN

以小鼠抗人 FN 单克隆抗体包被 96 孔培养板 4 ℃过夜后, PBS 洗涤, 1% BSA 封闭, 加入条件培养上清, 37 ℃孵育 2 h, PBS 洗涤, 加兔抗人 FN 抗体, 室温孵育 1 h, 洗涤, 加辣根过氧化酶标记的羊抗兔 IgG 孵育 30 min, 洗涤, 以 1, 2 二氨基苯显色, 12.5 mmol/L 硫酸终止反应。于酶联检测仪上 492 nm 的吸光度 A 值。计算上清液中 FN 的含量, 以 ng/10^6 细胞数表示。

1.7 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验。

2 结果

2.1 ^{125}I-t-PA 与肾小球系膜细胞结合力(以 cpm 值表示)

如表 1 所示, 高糖作用 24 h 后, 3 组间无明显差异; 48 h 后, A 组明显高于 B 组和 C 组($P<0.05$), 且 B 组和 C 组间差异明显($P<0.05$); 72 h 后, A 组明显高于 B 组和 C 组($P<0.01$), B 组明显高于 C 组($P<0.01$)。

表 1　高糖对 ^{125}I-t-PA 与系膜细胞的结合力的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of high glucose on the binding of t-PA to MC($\bar{x}\pm s$)

Group	24 h	48 h	72 h
A	36 994.1+2 437.7	35 005+1 552	34 329.5+3 047.1
B	35 468.1+3 206.8	32 582+1 836.2△	30 659.7+1 627.6△△
C	34 206.4+2 408.1	29 294.1+3 361.3△△★	26 896+3 033△△★★

△: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* Group A; ★: $P<0.05$, ★★: $P<0.01$ *vs* Group B

2.2 高糖对培养的人系膜细胞上清液 t-PA 活性的影响

如表 2 所示, 高糖作用 24 h 后, 三组间系膜细胞上清液 t-PA 的活性无明显差异; 48 h 后, A 组明显低于 B 组和 C 组($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 且 B 组和 C 组间差异明显($P<0.05$); 72 h 后, A 组明显低于 B 组和 C 组($P<0.01$), B 组明显低于 C 组($P<0.01$)。

表 2　高糖对人系膜细胞上清液 t-PA 活性的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effect of high glucose on the activity of t-PA in cultured MC supernatants($\bar{x}\pm s$)

Group	24 h	48 h	72 h
A	0.86+0.077	0.91+0.088	1.09+0.135
B	0.94+0.061	1.2 +0.2△	2.14+0.36627.6△△
C	1.0 +0.085	1.5 +0.26△△★	3.56+0.2△△★★

△: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* Group A; ★: $P<0.05$, ★★: $P<0.01$ *vs* Group B

2.3 高糖对培养人系膜细胞产生 FN 的影响

如表 3 所示, 高糖作用 24 h 后, 三组间系膜细胞产生 FN 无明显差异; 48 h 后, A 组明显低于 B 组和 C 组($P<0.01$), 且 B 组和 C 组间差异明显($P<0.05$); 72 h 后, A 组明显低于 B 组和 C 组($P<0.01$), B 组明显低于 C 组($P<0.01$)。

表 3　不同浓度葡萄糖对系膜细胞产生 FN 的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Effect of high glucose at different concentrations on the production of FN in MC culture supernatant($\bar{x}\pm s$)

Group	24 h	48 h	72 h
A	227.6+19.4	251.7+33.58	249.4+15.4
B	234.1+13.32	325.8+28.84△△	386.7+53.5△△
C	250.3+38.36	362.7+26.04△△★	475.9+34.9△△★★

△: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* Group A; ★: $P<0.05$, ★★: $P<0.01$ *vs* Group B

3 讨论

DN 典型病理改变是结节性肾小球硬化, 系膜区基质积聚也是 DN 的特征性改变, 系膜区基质积聚是由于细胞外基质成分合成增多, 另外, 细胞外基质降解减少可能也是一个重要原因。目前认识到纤溶系统不仅起着维持血液中凝血与纤溶平衡的作用, 而且参与了细胞外基质的降解[6]。PA 及 PAI 则是调节该系统活性的重要物质, PA 激活的纤溶酶可直接降解纤维蛋白及其 ECM 成分, 因此肾小球硬化及间质纤维化的发生与 PA/PAI 失衡密切相关[7]。

过去研究显示, 高糖通过增加系膜细胞产生细胞因子和 ECM, 且在高糖情况下系膜基质降解是减少的。但对高糖如何影响纤溶各个环节, 尤其是高糖对系膜细胞与 t-PA 结合力的影响, 仍有待研究。t-PA 在血栓形成、细胞外基质积聚等许多疾病病理生理过程中有重要作用。它可影响 PAI-1 的活性, 具有一定的调节作用[5]。在系膜细胞膜上存在 u-PA 的受体, t-PA 和 u-PA 可通过生长因子区域与 u-PA 受体结合, 使它们在细胞表面保持活性, 可见 t-PA 发挥促纤溶作用有赖于正常系膜细胞的结构和功能。本实验观察高糖对系膜细胞与 t-PA 结合力的影响, 高糖作用 48 h 后, 系膜细胞与 t-PA 的结合力明显下降, 随着时间的延长更加明显, 糖浓度愈高, 影响愈益明显($P<0.05$)。并观察高糖作用系膜细胞后, t-PA 的产生随着糖浓度和时间的增加而逐渐增高, 同时, FN 也发生同样的改变。我们曾观察到高糖对肾小球系膜细胞可致过氧化损伤, 这可能严重影响系膜细胞与 t-PA 结合力, t-PA 为纤溶酶原活化为纤溶酶的催化剂, 尽管 t-PA 产生增多, 但由于高糖可致 PAI-1 的增加[8], 最终导致 t-PA 的综合活性减弱, 这些导致纤溶功能减弱, 再加上系膜细胞产生纤维蛋白的增多, 细胞外基质降解减少, 细胞外基质积聚增多, 促进 DN 肾小球硬化的发生和发展。过去人们往往用肾脏局部高凝状态与低纤溶能力来解释肾脏局部纤维蛋白沉积的现象[4]。我们的研究显示, 高糖的情况下, 系膜细胞 t-PA 的产生是增多的, 纤

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

维蛋白同样增多，而发生纤维蛋白沉积可能是由于 t-PA与系膜细胞表面结合的减少而增加了 PAI-1 对其的灭活。这可能是糖尿病血管病变和糖尿病肾病肾小球硬化发生发展的重要因素之一。

参考文献：

[1] Baricos W H, Cortez S L, El-Dahar S S, *et al*. ECM degradation by cultured human endothelial cell is mediated by a PA/plasmin/MMP-2 cascade[J]. Kidney Int, 1995, 47(4): 1 039—1 047.

[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(3)，222—223.

[3] 米小轶，宋继谒. 内皮细胞损伤对组织型纤溶酶原激活物结合力的影响[J]. 中华病理学杂志，1995, 24(3): 156—158.

[4] 蔡广研，陈香美，付博等. 纤维蛋白对肾小球内皮细胞表达纤溶酶原激活物及纤溶酶原激活物抑制物的作用[J]. 中华肾脏病杂志，2001, 17(1): 11—15.

[5] Roger Lacave, Eric Rondeau, Satochi Ochi, *et al*. Characterization of a plasminogen activator and its inhibitor in human mesangial cells[J]. Kidney Int, 1989, 35(3): 806—811.

[6] Vassalli J D., Sappino A P, Belin D. The plasminogen activator /plasmin system[J]. J Clin Invest, 1991, 88(9): 1 067—1 072.

[7] Magnatri P. Extracellular matrix remodeling by metalloproteinases and plasminogen activator[J]. Kidney Int, 1995, 47(Suppl): 12—14.

[8] Elizabeth J. Fisher, Susan V. Mclennan, Dennis K. Yue, *et al*. High glucose reduces generation of plasmin activity by mesangial cells[J]. Microvascular Research, 1997, 53(1), 173—178.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)04-0472-01

卡介苗素治疗 42 例慢性荨麻疹的临床疗效观察

Clinical effect of BCGs on chronic urticaria in 42 patients

林自华，吕中法，金永南，王 平 （第三军医大学附属新桥医院皮肤科，重庆 400037）

慢性荨麻疹是临床上常见、易复发的皮肤病，其治疗方法虽多，但疗效均不甚理想，特别是对预防其复发无有效的方法。近年来研究发现慢性荨麻疹与体内辅助性 T 细胞亚类失衡有关，一些细菌多糖核酸如卡介苗素(BCGs)等具有调节和恢复体内辅助性 T 细胞亚类平衡的作用[1]。根据这一原理，我们用卡介苗素治疗 42 例慢性荨麻疹患者，取得良好疗效，现报告如下。

1 材料和方法

1.1 病例选择

87 例慢性荨麻疹均为我科门诊和病房患者，随机分成两组。治疗组 42 例，其中男 25 例，女 17 例；年龄 8～57 岁，平均(23.6±6.3)岁；病程 4 个月到 23 年，平均(3.2±1.1)年。对照组45 例，其中男 24 例，女 21 例；年龄 6～62 岁，平均(21.3±7.5)岁；病程 4 个月到 25 年，平均(3.5±1.2)年。经统计学处理两组间无显著差别。所有患者治疗前后均查三大常规和肝肾功能。

1.2 治疗方法

对照组给抗组胺药特非那丁或扑尔敏等及外用止痒剂等常规治疗方法；治疗组在对照组治疗的基础上加用卡介苗素(由长沙九芝堂药业公司生产，规格 0.5 mg/支)治疗，＞13 岁每次 1 mg，＜13 岁每次 0.5 mg，肌肉注射，隔日 1 次，共治疗 8 周，随访 6 月。

1.3 疗效评定

①临床治愈：皮疹完全消退，自觉症状消失；②显效：皮疹消退≥70%，基本无自觉症状；③有效：皮疹消退≥30%，有轻度瘙痒症状；④无效：皮疹、自觉症状均无明显变化。

作者简介：林自华(1953－)，男，四川省资中市人，副教授，主要从事皮肤病及整形美容方面的研究，发表论文 10 余篇。电话：(023)68755406

收稿日期：2001-06-12；修回日期：2001-09-20

2 结果

其临床疗效见表 1。治疗组 6 月内复发的病例症状均较前减轻，而对照组复发的病例症状与治疗前类似。两组病例治疗后均无明显的副作用发生，血尿类常规和肝肾功能均无异常变化。

表 1 卡介苗素治疗 42 例慢性荨麻疹的疗效观察[*n*(%)]

组别	*n*	治愈	显效	有效	无效	总有效	6月内复发
治疗组	42	13(30.9)	22(52.4)	5(11.9)	2(4.8)	40(95.2)	12(28.6)
对照组	45	8(17.8)	15(33.3)	10(22.2)	12(26.7)	33(73.3)	34(75.6)

两组间总有效率比较：$\chi^2=7.72$，$P<0.01$；复发率比较：$\chi^2=19.2$，$P<0.001$

3 讨论

慢性荨麻疹是临床上常见的变态反应性皮肤病，有报道随着医学的发展和人民生活水平的提高，细菌等特异性感染性疾病的发病率明显降低，而机体接触尘螨、宠物等的机率升高，这些环境因素的变化刺激机体产生所谓的“过敏状态”，从而导致慢性荨麻疹、哮喘等过敏性疾病的发病率上升[1~3]。目前临床上常用的糖皮质激素和抗组胺药由于只是针对慢性荨麻疹的病理过程进行治疗，并未对机体的“过敏状态”进行纠正，是治标而非治本，因此只能暂时缓解症状，不能控制复发。

卡介苗素是卡介苗的提取物，它可通过稳定肥大细胞膜、减少肥大细胞脱颗粒，也可通过刺激机体产生 IgG 抗体，竞争性抑制肥大细胞膜上的 IgE 受体，起到抗过敏作用；同时卡介苗素也可通过刺激机体的细胞免疫，调节和恢复体内辅助性 T 细胞亚类的平衡，平衡体液免疫，纠正机体的“过敏状态”，达到治本的目的。本研究根据这一原理用卡介苗素对慢性荨麻疹进行治疗，结果表明卡介苗素与抗组胺药联用，能控制慢性荨麻疹的症状，同时卡介苗素可明显降低该病的复发，达到预防和

（下转 478 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net