DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.06.046
第23卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 6
2001年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2001

文章编号:1000-5404(2001)06-0723-03

论著

高糖对培养肾小球内皮细胞细胞膜流动性影响的研究

闫振成[1],贾昆霞[1],张建国[1],黄庆愿[2],朱妙珍[1], 涵露[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,重庆 400038)

提 要:目的 观察高糖状态下肾小球内皮细胞过氧化损伤与内皮细胞膜流动性改变的关系。方法 采用体外人肾小球内皮细胞培养,八木组织测量之TBA法测定脂质过氧化产物丙二醛,Prendergast法测定细胞膜流动性,Fura-2双波长荧光法检测细胞内钙离子含量的变化。结果 高糖对肾小球内皮细胞可致过氧化损伤,使细胞膜流动性明显增高,细胞内钙含量增加,随着培养时间的延长,糖浓度愈高,作用愈明显。结论 高糖致内皮细胞过氧化损伤影响细胞膜流动性改变,可能是糖尿病肾病发生的始动因素。

关键词:葡萄糖;内皮细胞;肾小球;脂质过氧化作用;细胞膜流动性
中图法分类号:R322.61;R343;R329.27 文献标识码:A

Effect of high concentration glucose on membrane fluidity of cultured human glomerular endothelial cells

YAN Zhen-cheng, JIA Kun-xia, ZHANG Jian-guo, HUANG Qing-yuan, ZHU Miao-zhen, DING Han-lu (Department of Nephrology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Congqing 400042, China)

Abstract: Objective To observe the retationship of lipoperoxidation induced injury of human glomerular endothelial cells (GEC) and the membrane fluidity of GEC in high concentration glucose. Methods The culture of human GEC was established, thiobarbituric acid fluoriphotometry was used to measured MDA, Prendergast's method was used to detect the membrane fluidity of GEC, and the $[Ca^{2+}]i$ was determined by Fura-2/AM. Results The membrane fluidity and $[Ca^{2+}]i$ of GEC were increased significantly in high concentration glucose induced injury of GEC by lipid peroxidation, and the higher the concentration of glucose, the more significant the effect as the cultured time went on. Conclusion The increased membrane fluidity caused by lipid peroxidation in high concentration glucose may be one of the initiating factors for diabetic nephropathogenesis.

Key words: glucose; endothelial cell; glomerulus; lipid peroxidation; cell membrane fluidity

内皮细胞是肾小球的重要细胞成分,在原发性或继发性肾小球疾病发生发展过程中的作用日益受到重视。内皮细胞直接暴露于循环因素,易受损伤或结构改变,导致内皮细胞滤过功能损害,并产生活性致病因子,从而引发肾小球损伤的瀑布效应。高血糖一直被认为是与糖尿病并发症关系最为密切的因素之一,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。我们曾研究发现高糖可致内皮细胞损伤,但损伤对内皮细胞结构或功能影响如何?我们观察高糖作用内皮细胞后,脂质过氧化损伤,细胞膜流动性,细胞内钙含量变化,进一步揭示高血糖在糖尿病肾病发生及发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 肾小球内皮细胞的培养和鉴定[1]

用无菌Hank氏液洗净肾表面血迹,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%,离心去上清,沉淀为肾小球,加入0.02% Ⅱ型胶原酶(Sigma公司)消化后,离心去沉淀的细胞,置于培养瓶,加入内皮细胞培养液(20% FCS的M199培养液,含肝素5 U/ml,内皮细胞生长因子(Sigma公司)2 mg/ml,胰岛素,转铁蛋白及硒各5 μg/ml),培养4 h后,洗去未贴壁细胞,贴壁的细胞为内皮细胞,然后根据内皮细胞的形态,以机械划除法进行纯化[2]。培养的内皮细胞用兔抗人Ⅷ因子抗体进行鉴定。选择第3代生长良好的内皮细胞为实验对象。

1.2 实验分组及时相点设置

内皮细胞分别在下列条件下实验,按培养液中葡萄糖浓度不同,分为3组:A组(对照组)上述内皮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的内皮细胞培养液;C组葡萄糖浓度为60 mmol/L的内皮细胞培养液,每组10复孔;于实验24、48、72 h后进行检测各项指标。

1.3 过氧化脂质的测定

采用八木组织测量之TBA法[3],测定各组细胞及培养液中过氧化脂质稳定产物丙二醛(MDA)的含量。

1.4 细胞膜流动性的测定

将实验各组收集的内皮细胞采用Prendergast等的方法,用胰酶将内皮细胞消化,用PBS缓冲液洗涤细胞3次,加入含有1,6-二甲基-1,3,5己三烯(1,6-phenylhexa-1,3,5triene,DPH)的PBS缓冲液1 ml,于37 ℃水育箱温育30 min,在带有恒温荧光偏振光Hitachi-800型分光光度计上测0°~0°、0°~90°、90°~90°、90°~0°的荧光强度Ⅰ,推算出细胞膜的微粘度。DPH作为一种荧光剂,它能掺入到细胞膜的脂质区,使后者成为全反构型,即唯一能发荧光的构型。而DPH长轴接近于和脂肪链分子长轴平行,所以荧光偏振度能很好地反映膜脂质区的流动性,定量

作者简介:闫振成(1966-),男,河北省张家口市人,硕士,主治医师,主要从事肾病免疫发病机制方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68757446

收稿日期:2000-09-29;修回日期:2001-04-15

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

的说明膜脂质分子的运动情况。

校正因子 $G = I_{90°\sim0°} / I_{90°\sim90°}$

偏振度 $P = (I_{90°\sim0°} - GI_{90°\sim90°}) / (I_{90°\sim0°} + GI_{90°\sim90°})$

微粘度 $= 2P / (0.46 - P)$

P 值越大，微粘度越大，膜流动性越小，反之亦然。

1.5 细胞内 Ca^{2+} 浓度测定[4]

将经胰酶消化的细胞立即测定 Ca^{2+}，Fura-2 双波长荧光法，激发和发射光栅均为 10 nm，激发光波长 340 nm，发射光波长 500 nm，用荧光检测仪依次检测静息荧光强度 F，加入 Triton X-100 破坏细胞膜后的最大荧光强度 Fmax 及再加入 EDTA 结合全部 Ca^{2+} 后的最小荧光强度 F_{min}，按以下公式计算：$Ca^{2+} = kd \cdot (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$ kd 常数 224，单位 nmol/L。

1.6 统计学处理

采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 肾小球内皮细胞鉴定结果

倒置显微镜下可见细胞呈卵圆形、圆形或小梭形，兔抗人Ⅷ因子抗体染色呈阳性反应。

2.2 高糖作用肾小球内皮细胞后 MDA 含量

表 1 所示，高糖作用内皮细胞 24 h 后 MDA 含量与对照组差异无显著性（$P > 0.05$）；而在 48 h 作用后，C 组和 B 组 MDA 含量明显高于 A 组（$P < 0.01$），B 组与 C 组间差异无显著性（$P > 0.05$）；在 72 h 作用后，B 组和 C 组 MDA 含量均明显高于 A 组（$P < 0.01$），且 C 组明显高于 B 组（$P < 0.01$）。

表 1 高糖作用肾小球内皮细胞后 MDA 含量的比较

Tab 1 Comparison of MDA produced by high glucose cultured GEC

Group	MDA (nmol/L)		
	24 h	48 h	72 h
A	3.71±0.25	3.65±0.29	3.58±0.19
B	3.86±0.52	5.21±0.66△△	6.61±0.82△△
C	3.95±0.27	5.63±0.30△△	7.92±0.71△△★★

△△: $P < 0.01$ *vs* group A; ★★: $P < 0.01$ *vs* group B

2.3 高糖对肾小球内皮细胞细胞膜流动性的影响

如表 2 所示，高糖作用 24 h 后，3 组间肾小球内皮细胞膜微粘度无明显差异（$P > 0.05$）；48 h 后，C 组明显低于 A 组和 B 组（$P < 0.05$），且 A 组和 B 组间无明显差异（$P > 0.05$）；作用 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（$P < 0.05$）；随着高糖作用时间的延长，肾小球内皮细胞细胞膜微粘度明显下降（$P < 0.05$）。

表 2 高糖对肾小球内皮细胞细胞膜微粘度（泊）的影响

Tab 2 Effect of high glucose on membrane fluidity of glomerular endothelial cells

Group	24 h	48 h	72 h
A	2.04±0.16	2.07±0.15	2.02±0.12
B	2.1±0.09	2.05±0.1	1.92±0.11△
C	2.03±0.17	1.94±0.11△★	1.8±0.10△△★

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

2.4 高糖对肾小球内皮细胞内钙的影响

如表 3 所示，高糖作用 24 h 后，3 组间内皮细胞内钙水平无明显差异（$P > 0.05$）；48 h 后，C 组细胞内钙水平明显较 A 组增高（$P < 0.05$）；72 h 后，C 组明显高于 A 组和 B 组（$P < 0.05$），且 B 组明显高于 A 组（$P < 0.05$）。

表 3 高糖对肾小球内皮细胞内钙水平的影响

Tab 3 Effect of high glucose on the level of cytosilic free calcium (Ca^{2+}) i of glomerular endothelial cells

Group	24 h	48 h	72 h
A	128.1±10.97	127.6±10.42	127.1±7.58
B	129.6±10.73	131.8±8.45	134.4±6.78△
C	131.9±8.53	136.6±7.19△	141.5±6.53△△★

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

3 讨论

糖尿病肾病的发生及发展是多因素综合作用的结果，其中糖代谢异常即高血糖，以令人信服的临床资料肯定了其在糖尿病肾病发生及发展中的重要作用。现已证实内皮细胞在致病因素作用下，可分泌活性介质，在肾小球疾病发生发展中的作用愈益受到重视[5]。肾小球内皮细胞是特殊的毛细血管内皮细胞，从功能上看它主要是滤过屏障而不是物质交换。由于内皮细胞在肾小球的特殊位置，易受血液中物质如血糖和炎性介质的影响，它的结构和功能改变可能是肾小球硬化发生的始动因素。

Sabina 等[6] 研究认为，高血糖可抑制内皮细胞复制，内皮细胞长时间处于高血糖环境中，可导致细胞凋亡加剧，甚至过度死亡。研究主要是针对外周血管内皮细胞，由于肾小球内皮细胞的特性与其它血管内皮细胞差异较大，因而需要分离肾小球内皮细胞进行研究，有助于进一步阐明糖尿病肾病的发生发展。现在大量的报道了高糖对肾小球系膜细胞的影响，由于肾小球内皮细胞培养较为困难，现极少报道高糖对肾小球内皮细胞的结构和功能的影响，尤其是对内皮细胞膜流动性的影响。本实验观察高糖作用内皮细胞后发现其可导致过氧化损伤，随着时间的延长，损伤愈益明显，糖浓度愈高，损伤愈益明显。同时我们应用荧光偏振的方法测定高糖对内皮细胞膜流动性的影响，该方法目前仍是最佳的膜流动性的检测手段，被国内外所采用。高糖作用 48 h 后，内皮细胞膜流动性明显增加，随着时间的延长更加明显，糖浓度愈高，影响愈益明显。结果提示，高糖对肾小球内皮细胞可致过氧化损伤，同时严重影响内皮细胞膜流动性，且内皮细胞内钙含量明显增高，细胞内钙变化与脂质过氧化损伤和膜流动性的变化较为一致。Roger 等[7] 研究发现，肾小球系膜细胞在高糖环境中，其收缩性改变呈细胞内 Ca^{2+} 依赖性，因而，高糖影响内皮细胞膜流动性的机制可能也是 Ca^{2+} 依赖性。细胞膜为脂蛋白类构成的液态双层膜，正常的细胞要求有适度的膜流动性。从我们的实验结果发现，高糖致内皮细胞过氧化损伤，可能致细胞骨架发生改变，而引起膜流动性的增加，致肾小球内皮细胞的屏障功能减低等发生一系列病理变化，

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

导致对白蛋白和其他大分子物质的通透性增加。内皮细胞过氧化损伤后膜流动性的增高, 可能触发肾小球局部血液动力学改变, 血小板聚集, 凝血酶活化, 纤维蛋白沉积和微血栓形成[8]; 也可能使肾小球基底膜硫酸乙酰肝素减少, 而增加基底膜通透性[9]; Lee 等[10] 通过动物实验证实, 肾小球内皮细胞的损伤是引起肾小球系膜病变及肾小球硬化的始动因素。损伤的内皮细胞还可能通过细胞间通讯诱发而促进系膜细胞的病变, 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[11]。

高糖对肾小球内皮细胞过氧化损伤主要是通过氧化作用和非酶糖化机制, 形成糖化终产物(Advanced glycosylation end products, AGES), 其能催化脂质过氧化反应, 随着时间延长, AGES 形成的增多, 脂质过氧化损伤更加明显, 明显影响组织和细胞的结构和功能[11~13]。另外高血糖还可引起二酯酰甘油(Diacylglycerol, DAG)含量增高, 细胞内钙含量的增高, 激活蛋白激酶 C(Protein kinase C, PKC), 而引起高凝、低纤溶和高血粘度的形成, 促进糖尿病肾病的发生和发展[14]。糖代谢紊乱引起内皮细胞损伤不仅影响肾脏, 而且还可延及其它器官如脑、胰腺、心脏等, 主要通过改变血管张力及血液动力学, 激活凝血系统和血小板而导致糖尿病血管病变, 因而, 高血糖是糖尿病肾病发生发展中的重要因素。

参考文献:

[1] 陈香美, 于力方, 陈中华, 等. 肾小球内皮细胞培养及产生细胞外基质的研究[J]. 中华医学杂志, 1995, 75(1): 25—28.

[2] 司徒镇强, 吴年正. 细胞培养[M]. 北京: 世界图书出版公司, 1999. 186—187.

[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] 卢步峰, 黄诒森, 鲁友明. 用 Fura-2 双波长荧光法测定神经细胞内游离钙[J]. 生物化学与生物物理学进展, 1994, 21(3): 275—278.

[5] Vaughan D E, Lazos S A, Tong K. Angiotesin Ⅱ regulates expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells[J]. J Clin Invest, 1995, 95(3): 995—1 001.

[6] Baumgartner-Parzer S M, Wagner L, Pettermann M, *et al*. High-glucose-triggered apoptosis in cultured endothelial cells[J]. Diabetes, 1995, 44(11): 1 323—1 327.

[7] Hurst R D, Steranovic Z S, Munk S, *et al*. Glomerular mesangial cell altered contractility in high glucose is Ca^{2+} independent[J]. Diabetes, 1995, 44(7): 759—766.

[8] 黄敬泽, 王　健, 张阅珍, 等. 血管内皮细胞损伤在Ⅱ型糖尿病血管病变中的意义[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2000, 16(3): 169—171.

[9] Jensen T. Pathogenesis of diabetic vascular diseases: evidence for the role of reduced heparin sulfate proteoglycan[J]. Diabetes, 1997, 46(Suppl 2): S98—100.

[10] Lee L K, Meger T N, Pollock A S, *et al*. Endothelial cell injury intates glomerular sclerosis rat-remnant kidney[J]. J Clin Invest, 1995, 96(2): 953—958.

[11] Salahudeen A K, Kanji V, Recelhoff J F, *et al*. Pathogenesis of diabetic nephropathy: a radical approach[J]. Nephrol Dial Transplant, 1997, 12(2): 664—668.

[12] Fu M X, Wells-knecht K J, Blackledge J A, *et al*. Glycation, glycoxidation, and cross-linking of collagen by glucose. Kinetic, mechanism, and inhibition of late stage of the Maillard reaction[J]. Diabetes, 1994, 43(6): 676—683.

[13] Giardino I, Diane Edelstein, Micheal Browniee. BCL-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation end products in bovine endothelial cells[J]. J Clin Invest, 1996, 97(6): 1 422—1 428.

[14] Horie K, Miyata T, Maeda K, *et al*. Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. Implication for glyoxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. J Clin Invest, 1997, 100(11): 2 995—3 004.

(编辑　潘式文)

(上接 722 页)

这些病人免疫功能低下有多种慢性疾病, 抗病能力差, 是院内感染的高危人群。

在院内感染发生部位中呼吸道感染占首要地位, 其原因: ①肿瘤患者免疫功能低下; ②呼吸道同外界空气直接相通; ③院内空气中存在大量病菌, 肿瘤患者住院时间较长且经常不愿开窗保持室内空气流通, 尤其在较寒冷的冬、春季节; ④空调的广泛、长时使用, 在无良好通风、换气条件下更易造成病菌繁殖, 增加感染发生机会; ⑤对于长期卧床、病情重的病人, 没有切实做到经常翻身、拍背, 加上咳痰无力, 导致气道分泌物引流不畅等。

院内感染与肿瘤治疗方法有较密切联系。肿瘤患者采用综合治疗的方法很有必要。但手术、放疗、化疗对患者免疫功能均有较大打击, 尤其是手术及全身化疗, 感染的发生同治疗后机体免疫功能进一步下降有密切关系。因此应安排好治疗顺序, 避免不必要的反复治疗, 术中及术后注意加强感染防治, 掌握好放化疗时机, 避免超剂量放疗和化疗, 尽可能减少放疗和化疗的副反应, 减少并发症的发生, 同时在术后及全身化疗后恰当地预防性使用抗生素可能对防止感染发生有一定作用。

不合理地应用抗生素和激素与院内感染的发生有关。肿瘤患者在治疗过程中, 对抗生素和激素的应用一定要有的放矢, 合理应用。抗生素和激素的滥用是造成院内感染的重要因素之一。临床医生在预防性及经验性使用抗生素时应慎重、恰当, 在明确存在感染时应及早进行细菌培养及药敏实验为正确选择抗感染药物、避免滥用提供依据。但目前临床上在细菌培养及药敏实验方面仍不够重视。

关键词: 院内感染; 肿瘤; 放化疗
中图法分类号: R73-31　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 孙代艳, 吴克慧, 刘一新. 116 例急性肿瘤死亡病例医院感染调查[J]. 中华医院感染学杂志, 2000, 10(6): 430.

[2] 汤钊猷 主编. 现代肿瘤学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1993. 441—443.

(编辑　陈聪连)

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