

葡萄糖浓度波动对原代培养的大鼠血管细胞和肾细胞的影响

叶希韵 金百胜 申杰 王耀发

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要 探讨葡萄糖浓度波动对体外培养的原代大鼠血管细胞和肾细胞的影响。取SD大鼠的主动脉和肾脏进行血管细胞和肾细胞的体外原代培养, 每种细胞均分为6组: 正常对照组、持续高糖组、持续低糖组、波动组I、波动组II、波动组III。实验24 h后, 测定细胞乳酸脱氢酶(LDH)的泄漏率, 细胞液中的 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG)的活力, 细胞内还原型谷胱甘肽(GSH)和超氧化物歧化酶(SOD)的活力。结果表明葡萄糖浓度波动各组均能对大鼠血管细胞和肾细胞造成损伤, 使细胞外液LDH、NAG的泄漏量明显增加, 细胞内GSH、SOD活力明显减少, 与持续高糖组和持续低糖组比较差异显著($P < 0.001$)。且葡萄糖浓度波动对肾细胞的损伤比血管细胞更为明显。说明葡萄糖浓度波动能够导致大鼠血管细胞和肾细胞的损伤, 并且其损伤远远大于持续高糖或持续低糖的单独作用效果, 损伤的结果与低糖作用细胞的时间呈正相关, 在相同的损伤条件下肾细胞比血管细胞对葡萄糖浓度波动更为敏感, 损伤更为严重。

关键词 葡萄糖浓度波动; 血管细胞; 肾细胞; 细胞培养

糖尿病病人一天中的血糖浓度是呈锯齿形不断变化的, 餐后血糖水平快速升高是糖尿病病人典型和常见的临床现象。且餐后高血糖的危害性极大, 对糖尿病及其并发症的发生发展有重要的影响。研究表明糖尿病并发症易引起全身各脏器及组织发生病理改变, 包括心、脑、血管、眼、神经、肾脏等, 严重危害人体健康, 是导致糖尿病患者最终致死致残的重要原因^[1,2]。因此糖尿病患者通常采取长期服用降糖药物和使用胰岛素来控制血糖水平。但使用胰岛素和降糖药不当极易引发低血糖, 这样一天之内, 糖尿病患者血糖水平就要高高低低波动多次。低血糖对人体也十分有害, 尤其是对老年病人, 低血糖的危害更甚于高血糖。有报道指出一次严重的医源性低血糖或由此诱发的心血管事件可能会抵消一生维持血糖在正常范围所带来的益处^[3]。流行病学研究认为餐后高血糖和心血管疾病的发病率和病死率之间存在相关性, 而反复发作的低血糖反应又可加剧血糖波动, 血糖波动比持续高血糖对患者的损伤更为严重, 是糖尿病各种慢性并发症产生和加重的重要原因^[4,5]。

血糖波动对机体造成的严重危害目前仅限于流行病学和临床研究的报道, 尚未见从细胞学水平研

究血糖波动对血管细胞和肾细胞造成损伤的报道, 本实验通过大鼠血管细胞和肾细胞的体外原代培养, 建立了血糖波动的细胞模型, 旨在从细胞水平探讨葡萄糖浓度波动变化对体外培养的血管细胞和肾细胞造成的影响及可能的损伤机制。

1 材料与方法

1.1 材料

20日龄SD雄性大鼠购自国家啮齿类实验动物中心上海分中心; RPMI-1640培养基购自Gibco公司; 无糖培养基购自中国科学院生物物理所生化厂; 新生牛血清、辅酶I购自北京鼎国生物技术有限公司; 还原型谷胱甘肽(GSH)试剂盒、 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒均购自南京建成生物工程所。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养方法 取4只SD大鼠, 断颈处死, 用75%酒精浸泡消毒, 无菌情况下取出主动

收稿日期: 2005-11-07 接受日期: 2006-01-19

* 通讯作者。Tel: 021-62232405, Fax: 021-62233754, E-mail: xyue@bio.ecnu.edu.cn

脉和肾脏。将主动脉剪成环状,进行组织块贴壁培养。取肾脏用眼科剪将肾脏皮质部分剪成 1 mm^3 的小块,用 0.25% 胰蛋白酶在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 中消化,每 10 min 取出部分消化液,共消化 5 次,然后 $1\ 500\text{ r/min}$ 离心 10 min 。收集细胞进行原代培养。待血管细胞和肾细胞长满后进行传代培养,取第三代的体外培养细胞进行实验。将细胞接入 12 孔板,细胞数为 1×10^5 个/ml,每孔 2 ml 细胞悬液,每种细胞接 2 块细胞培养板,培养过夜。

1.2.2 实验分组 每种细胞分为 6 组:正常对照组(葡萄糖浓度为 5 mmol/L)、持续高糖组(葡萄糖浓度为 20 mmol/L)、持续低糖组(葡萄糖浓度为 2 mmol/L)、波动组 I(葡萄糖浓度为 2 mmol/L 和 20 mmol/L 波动, 2 h 低糖和 4 h 高糖培养为一波动周期)、波动组 II(6 h 低糖和 18 h 高糖培养为一波动周期)、波动组 III(12 h 低糖和 12 h 高糖培养为一波动周期)。每组 4 孔,作用细胞时间为 24 h 后,收集各孔培养液及细胞。

1.2.3 实验指标测定 GSH、NAG、SOD、LDH均按试剂盒方法测定。

LDH泄漏率(%)=

$$\frac{\text{细胞外液LDH酶活}}{\text{细胞内液LDH酶活} + \text{细胞外液LDH酶活}} \times 100\%$$

1.2.4 统计学方法 实验数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异比较采用 t 检验,以上统计用Microsoft Excel 2000统计软件完成。

2 结果

2.1 葡萄糖浓度波动变化对血管细胞和肾细胞LDH泄漏率的影响

与正常组相比,实验各组血管细胞和肾细胞的LDH泄漏率均有明显的增加,且波动各组比持续高糖组和持续低糖组LDH泄漏率的增加更为明显,尤以波动组 III(12 h 低糖和 12 h 高糖波动)的增幅最为明显($P < 0.001$)。实验结果说明葡萄糖浓度波动变化会引起细胞膜通透性增加,细胞内酶外泄,同时在相同情况下肾细胞比血管细胞LDH泄漏率更显著,见表1。

2.2 葡萄糖浓度波动变化对血管细胞和肾细胞NAG活性的影响

与正常组相比,血管细胞、肾细胞培养液中NAG活性均有明显的增加,实验结果表明波动各组

对肾细胞NAG活性的影响最为明显,与持续高糖组和持续低糖组比较,差异非常显著($P < 0.001$),说明葡萄糖浓度波动变化对肾细胞的损伤比对血管细胞更为明显,而肾细胞对葡萄糖浓度波动变化的作用更为敏感,见表2。

2.3 葡萄糖浓度波动变化对血管细胞和肾细胞GSH活性的影响

与正常组相比,血管细胞、肾细胞的GSH含量均有明显的降低,且波动各组比持续高糖组和持续低糖组各组细胞内GSH的活性下降得更为明显。实验结果表明葡萄糖浓度波动变化会引起血管细胞和肾细胞抗氧化能力的降低,从而导致细胞损伤。在相同情况下肾细胞比血管细胞的GSH活性下降得更加显著,见表3。

2.4 葡萄糖浓度波动变化对血管细胞和肾细胞SOD活性的影响

与正常组相比,血管细胞和肾细胞的细胞内SOD活性均有明显的下降,且波动各组下降得更为明显,同时在相同情况下肾细胞比血管细胞的SOD活性下降更为显著($P < 0.001$),说明葡萄糖浓度波动变化给肾细胞带来的氧化损伤比血管细胞更为严重,波动组 III比其他波动组对细胞的氧化损伤更明显,见表4。

表1 葡萄糖浓度波动变化对血管细胞和肾细胞LDH泄漏率的测定结果(%)

组别	样本数	血管细胞	肾细胞
正常组	4	21.34 ± 0.17	25.84 ± 0.23
高糖组	4	$29.14 \pm 0.26^{**}$	$33.25 \pm 0.25^{**}$
低糖组	4	$31.56 \pm 0.31^{**}$	$36.17 \pm 0.34^{**}$
波动组 I	4	$35.29 \pm 0.25^{***\Delta}$	$40.31 \pm 0.28^{***\Delta\Delta}$
波动组 II	4	$36.81 \pm 0.22^{***\Delta}$	$43.68 \pm 0.19^{***\Delta\Delta}$
波动组 III	4	$38.73 \pm 0.18^{***\Delta\Delta}$	$47.74 \pm 0.21^{***\Delta\Delta}$

与正常组比较: * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$; 各波动组与持续高糖组比较: # $P < 0.05$ 、## $P < 0.01$; 各波动组与持续低糖组比较: $\Delta P < 0.05$ 、 $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

表2 葡萄糖浓度波动变化对血管细胞和肾细胞NAG活性的测定结果(u/L)

组别	样本数	血管细胞	肾细胞
正常组	4	3.58 ± 0.21	3.64 ± 0.18
高糖组	4	$5.72 \pm 0.19^*$	$6.76 \pm 0.21^*$
低糖组	4	$5.97 \pm 0.27^*$	$7.32 \pm 0.25^{**}$
波动组 I	4	$6.51 \pm 0.18^*$	$11.03 \pm 0.31^{***\Delta\Delta}$
波动组 II	4	$6.98 \pm 0.20^{***}$	$12.25 \pm 0.22^{***\Delta\Delta}$
波动组 III	4	$7.76 \pm 0.24^{***\Delta}$	$13.98 \pm 0.27^{***\Delta\Delta}$

与正常组比较: * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$; 各波动组与持续高糖组比较: # $P < 0.05$ 、## $P < 0.01$; 各波动组与持续低糖组比较: $\Delta P < 0.05$ 、 $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

表3 葡萄糖浓度波动变化对血管细胞和肾细胞 GSH 含量的测定结果(u/mg)

组别	样本数	血管细胞	肾细胞
正常组	4	753.1 ± 19.4	716.4 ± 22.4
高糖组	4	616.2 ± 21.5*	522.6 ± 24.3*
低糖组	4	563.5 ± 17.3*	483.1 ± 18.7**
波动组 I	4	487.6 ± 22.1***#	359.2 ± 23.5***#Δ
波动组 II	4	452.3 ± 24.2***#Δ	326.3 ± 26.1***#Δ
波动组 III	4	406.7 ± 20.8***#Δ	287.5 ± 19.3***#Δ

与正常组比较: * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$; 各波动组与持续高糖组比较: # $P < 0.05$ 、## $P < 0.01$; 各波动组与持续低糖组比较: Δ $P < 0.05$ 、ΔΔ $P < 0.01$ 。

表4 葡萄糖浓度波动变化对血管细胞和肾细胞 SOD 活性的测定结果(u/mg)

组别	样本数	血管细胞	肾细胞
正常组	4	23.56 ± 0.17	24.32 ± 0.22
高糖组	4	18.14 ± 0.26*	19.17 ± 0.25*
低糖组	4	17.25 ± 0.31*	17.65 ± 0.34**
波动组 I	4	14.64 ± 0.25***#Δ	13.29 ± 0.28***#Δ
波动组 II	4	13.81 ± 0.19***#Δ	11.87 ± 0.19***#Δ
波动组 III	4	12.37 ± 0.22***#Δ	9.34 ± 0.26***#Δ

与正常组比较: * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$; 各波动组与持续高糖组比较: # $P < 0.05$ 、## $P < 0.01$; 各波动组与持续低糖组比较: Δ $P < 0.05$ 、ΔΔ $P < 0.01$ 。

3 讨论

糖尿病患者由于自身调节代谢能力的衰退或丧失, 在内、外环境如气候变化、饮食不当、紧张劳累、情绪波动等因素发生微小变化都会导致血糖水平较大的波动。本实验选用培养的血管细胞和肾细胞作为研究的实验材料, 是因为血管细胞功能受损是引起动脉粥样硬化和糖尿病血管病变的早期病理生理变化的原因。血管细胞具有调节血管舒缩、增殖、分泌等重要功能, 血管细胞功能紊乱参与了糖尿病人血管病变的发生。大量研究表明在糖尿病引起的血管病变中, 高血糖是使血管细胞功能紊乱

的关键因素^[6]。高浓度的葡萄糖能抑制血管内皮细胞增殖和加速细胞的死亡^[7]。肾脏是糖尿病并发症的主要靶器官之一, 糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病并发症危害最大的并发症之一, 又是其致死致残的主要原因, 在西方国家, 糖尿病肾病是导致终末期肾衰竭的第一位原因^[8]。因此从细胞水平着手研究血糖波动的细胞机制, 建立体外血糖波动细胞模型可以排除动物神经、体液等因素对细胞的影响, 有其优点和可操作性。

本实验研究发现人为的葡萄糖浓度波动变化能够导致体外培养的大鼠血管细胞和肾细胞的明显损伤, 其损伤机制可能与增加细胞膜通透性, 导致细胞内各种酶外泄量增加和细胞抗氧化能力明显下降有密切关系, 具体机制还有待进一步阐明。并且波动作用比同样浓度的高糖或低糖单独作用于细胞的损伤更为严重, 波动的损伤还与低糖作用细胞的时间呈正相关; 同时研究还发现在相同的情况下肾细胞比血管细胞对葡萄糖浓度波动的损伤更为敏感, 损伤更为严重。那么为什么肾细胞比血管细胞对葡萄糖浓度波动更敏感? 这与糖尿病肾病的发病机制有什么关系? 造成肾细胞损伤的机制是什么? 肾细胞膜上有没有葡萄糖波动的作用靶点或受体? 等等。这一系列的问题还需要进一步的深入探索。

参考文献 (References)

- [1] 李 妮等. 中国慢性病预防与控制, 2004, 12: 143
- [2] Temelkova-Kurktschiev TS et al. *Diabetes Care*, 2000, 23: 1830
- [3] Cryer PE et al. *Diabetes Care*, 2003, 26: 1902
- [4] Prato SD. 国外医学内分泌学分册, 2003, 23: 155
- [5] Li W et al. *Diabetologia*, 1996, 39: 537
- [6] 高 鑫. 中华老年多器官疾病杂志, 2004, 3: 6
- [7] Su J. *Chin Med J (Engl)*, 2002, 115: 1582
- [8] 洪昱钧. 北京中医杂志, 2002, 21: 187

The Effect of Glucose Fluctuation on Primary Cultured Vascular Cells and Kidney Cells of Rat

Xi-Yun Ye*, Bai-Sheng Jing, Jie Shen, Yao-Fa Wang

(The College of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, Chian)

Abstract To explore the effect of glucose fluctuation on vascular cells and kidney cells. Use SD rat artery and kidney in primary culture vascular cells and kidney cells *in vitro*. Each kind of cells was divided into 6 groups as follows: control group, continuous high glucose group, continuous low glucose group, fluctuation group I (each cycle includes low glucose 2 hours, high glucose 4 hours), fluctuation group II (low glucose 6 hours, high glucose 18 hours) and fluctuation group III (low glucose 12 hours, high glucose 12 hours). After 24 hours cultivation, we detected the leakage of LDH, NAG activity in each culture medium and activity of GSH and SOD in cells. The vascular cells and kidney cells were harmed in all fluctuation groups. The leakage of LDH and NAG increased evidently while the enzyme activity of GSH and SOD decreased obviously, compared with continuous high glucose group and continuous low glucose group ($P < 0.001$). During the experiment, we found that the kidney cells are more sensitive to the damage of glucose fluctuation. Glucose fluctuation can do harm to rat vascular cells and rat kidney cells, and it also has relations with the time of low glucose cultivation. Under the same condition, kidney cells are more sensitive to the damages than vascular cells.

Key words glucose fluctuation; vascular cells; kidney cells; cell cultivation

Received: November 7, 2005 Accepted: January 19, 2006

*Corresponding author. Tel: 86-21-62232405, Fax: 86-21-62233754, E-mail: xyue@bio.ecnu.edu.cn

中国细胞生物学学会医学细胞生物学学术大会在杭州召开

中国细胞生物学学会医学细胞生物学学术大会于 2006 年 5 月 19 日~21 日在杭州召开。来自全国各省、市、自治区及香港特别行政区的 200 多位专家学者参加了本次大会。

大会开幕式由中国细胞生物学学会医学细胞生物学专业委员会主任委员宋今丹教授致开幕词。中国细胞生物学学会理事长、中国科学院上海生命科学研究院院长裴钢院士作了主题讲话。本次大会承办单位浙江理工大学副校长朱泽飞教授致欢迎词。学术委员会名誉主任委员刘新垣院士宣布了荣获浙江省细胞生物学学会荣誉奖和贡献奖人员名单,并由刘新垣院士、裴钢院士、孔祥复院士、郝水院士等给获奖者颁奖。裴钢院士宣布了浙江省细胞生物学学会第四届理事会常务团体理事、团体理事名单。开幕式后全体代表合影留念。

中国医科大学宋今丹教授、2005 年国家杰出青年科学基金获得者中科院上海生命科学研究院戈宝学教授、香港大学林李家宓教授和美国哈佛大学回国博士后浙江大学周天华教授分别作了“细胞内质网结构及其合成的某些蛋白质”、“固有免疫系统的信号转导机制”、“Cancer biology and gene therapy”、“细胞驱动蛋白 Dynein 调控机制的新进展”的大会报告,内容十分精彩。

会议共收到 100 多篇论文摘要,到会代表分“染色体、基因、蛋白质”、“医学细胞生物学和生物医药产业”、“干细胞、细胞分化和发育生物学”、“免疫细胞生物学、细胞精细结构与功能”、“新技术新方法、细胞生物学教学”及“植物细胞工程和生物反应器”等 6 个专题进行交流讨论。会议安排紧凑有序,会场气氛热烈。

本次大会由中国细胞生物学学会医学细胞生物学专业委员会、浙江省细胞生物学学会和福建省细胞生物学学会主办,浙江理工大学生物工程研究所、浙江大学细胞生物学研究所及浙江省肿瘤研究所承办。

(浙江省细胞生物学学会李继承教授供稿)