

- [13] Bertrand J, Di Polo A, McKerracher L. Enhanced survival and regeneration of axotomized retinal neurons by repeated delivery of cell-permeable C3-like Rho antagonists[J]. *Neurobiol Dis*, 2007, 25(1): 65-72.
- [14] Schwab ME. Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11(12): 799-811.
- [15] Kubo T, Hata K, Yamaguchi A, et al. Rho-ROCK inhibitors as emerging strategies to promote nerve regeneration[J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13(24): 2493-2499.
- [16] 李成永, 樊永珍, 薛文海, 等. 针刺百会穴治疗脑梗塞的临床研究[J]. *上海中医药杂志*, 2006, 40(6): 19-20.
- [17] 许能贵, 周逸平, 许冠荪, 等. 电针大椎、百会穴对局灶性脑缺血大鼠脑血流量和自发脑电的影响[J]. *中国中医药科技*, 2001, 8(1): 3-4.
- [18] 梁艳桂, 谭峰, 陈杰, 等. MCAO 大鼠梗死灶对侧皮层 Nogo-A 的动态变化及电针干预[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2012, 29(12): 1073-1076.

(责任编辑: 刘淑婷)

高糖诱导的人近端肾小管上皮细胞损伤及机制的研究

邓茜, 孙惠力, 曾又佳, 徐华, 龚永慧, 李顺民

深圳市中医院, 广东 深圳 518033

[摘要] 目的: 观察高糖诱导人近端肾小管上皮细胞 (HK-2) 损伤及机制。方法: 细胞生长融合至约 80% 时, 用 DMEM 低糖培养基无血清同步化 48 h, 然后分为以下 7 组。①正常糖对照组 (5.5 mM 低糖 DMEM 培养基, NG); ②高糖 1 组 (15 mM 高糖 DMEM 培养基, HG1); ③高糖 2 组 (30 mM 高糖 DMEM 培养基, HG2); ④高糖 3 组 (45 mM 高糖 DMEM 培养基, HG3); ⑤高糖 4 组 (60 mM 高糖 DMEM 培养基, HG4); ⑥等渗 1 组 (30 mM 甘露醇 DMEM 培养基, HM1); ⑦等渗 2 组 (45 mM 甘露醇 DMEM 培养基, HM2)。观察不同糖浓度 (5.5~45 mM) 刺激 HK-2 细胞 24 h, 观察 I κ B α 和 p65 蛋白表达规律。MTT 比色法检测细胞活力。Western blot 法检测 I κ B α 和 p65 蛋白表达。结果: 高糖 2 组、高糖 3 组、高糖 4 组浓度呈依赖性对 HK-2 活力存在显著的抑制作用 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 高糖 2 组、高糖 3 组浓度的甘露醇对 HK-2 活力没有明显的抑制作用 ($P > 0.05$)。I κ B α 蛋白表达随着葡萄糖浓度的升高而依次降低, 而 p65 蛋白表达呈浓度依赖性升高, 高糖 2 组、高糖 3 组的葡萄糖与正常糖对照组比较, 差异有显著性或非常显著性意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 高糖诱导的 HK-2 毒性损伤呈一定的浓度依赖关系, 其机制与 NF- κ B 通路的激活有关, 与渗透压作用无明显关联。

[关键词] 糖尿病肾病; 近端肾小管上皮细胞 (HK-2); I κ B α ; p65; 高糖诱导

[中图分类号] R692.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 01-0164-04

Study on High Glucose-induced Human Proximal Renal Tubular Epithelial Cell Injury and Its Mechanism

DENG Qian, SUN Huili, ZENG Youjia, et al

Abstract: Objective: To investigate the toxic effects of high glucose on HK-2 cells and to explore its mechanism. Methods: When the cell fusion of HK-2 cells reached 80%, HK-2 cells were incubated with

[收稿日期] 2013-09-22

[基金项目] 广东省科技计划项目 (编号: 20110316); 深圳市科技计划项目 (编号: 20110421152)

[作者简介] 邓茜 (1981-), 女, 博士研究生, 主治医师, 研究方向: 肾病诊治与研究。

[通讯作者] 李顺民, E-mail: zyylishunmin@126.com。

low sugar serum-free DMEM for 48 hours, and then were divided into 7 groups, normal glucose control group (5.5 mM low glucose DMEM), high glucose groups 1-4 (DMEM with HG at the concentrations of 15 mM, 30 mM, 45 mM, 60 mM, respectively), and isotonic mannitol groups 1-2 (DMEM with mannitol at the concentrations of 30 mM, 45 mM, respectively). After stimulation with glucose at the concentrations of 5.5-45 mM for 24 h, the cell viability of HK-2 cells was detected with MTT assay, and the protein expression levels of I κ B α and p65 were measured by Western blotting. **Results:** High glucose groups 2-4 had a significant inhibitory effect on cell viability of HK-2 cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Isotonic mannitol groups 1-2 had no significant inhibitory effect on cell viability of HK-2 cells ($P > 0.05$). I κ B α protein expression was decreased with the increase of glucose concentration, p65 protein expression was increased with the increase of glucose concentration, and the differences were significant between high glucose groups 2-3 and normal glucose control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** The toxic effect of high glucose on HK-2 cells is dose-dependent, which has no significant correlation with the osmotic pressure. NF- κ B pathway may be activated in high glucose-induced HK-2 cell injury.

Keywords: Diabetic nephropathy; Proximal renal tubular epithelial cells; I κ B α ; p65; High glucose-induced

近来研究表明,近端肾小管上皮细胞(HK-2)是促炎症效应细胞,在糖尿病肾病的发生发展中起着至关重要的作用^[1]。HK-2对机体血糖的变化是极其敏感的,糖尿病时,高糖刺激HK-2转运葡萄糖增多,导致细胞内葡萄糖负荷增加而造成HK-2损伤^[2]。NF- κ B信号通路是最主要的炎症信号通路,但其在糖尿病HK-2损伤中的作用尚不明确。故研究选择以体外培养的HK-2为研究对象,观察不同浓度高糖对HK-2细胞的毒性损伤和NF- κ B通路中心环节I κ B α 、p65的影响。

1 材料与方法

1.1 实验细胞 HK-2购自美国ATCC公司,批号:CRL-2190TM。

1.2 主要试剂 葡萄糖、甘露醇和MTT购自美国Sigma公司,I κ B α 、p65、 α -tubulin一抗和HRP标记的二抗购自美国CST公司。DEME/F12培养基和DMEM低糖培养基购自北京赛默飞生物化学有限公司。胎牛血清购自美国Gibico公司。BCA蛋白试剂盒购自美国Pierce公司。

1.3 细胞培养 用含10%胎牛血清的DMEM/F12完全生长培养基培养,培养条件为37 $^{\circ}$ C,95%湿度,5%CO₂的细胞培养箱,每周换液2~3次。当细胞生长融合至约80%时,用0.25%Trypsin/0.53%EDTA溶液消化、传代。

1.4 实验分组 当细胞生长融合至约80%时,用DMEM低糖培养基无血清同步化48h,然后分为以下7组。①正常糖对照组(5.5 mM低糖DMEM培养基,NG);②高糖1组(15 mM高糖DMEM培养基,HG1);③高糖2组(30 mM高糖DMEM培养基,HG2);④高糖3组(45 mM高糖DMEM培养基,HG3);⑤高糖4组(60 mM高糖DMEM培养基,HG4);⑥等渗1组(30 mM甘露醇DMEM培养基,HM1);⑦等渗2组(45 mM甘露醇DMEM培养基,HM2)。

1.5 MTT比色法 ①接种细胞:消化细胞制成细胞悬液,稀释适当比例,接种于96孔培养板中,每孔体积200 μ L。每组设置6个复孔,实验重复3次;②培养细胞:5%CO₂培养箱培养1天后,用无血清低糖DMEM培养基同步化48h,加不同浓度葡萄糖或不同浓度等渗甘露醇刺激24h。③呈色:培养结束前4h,培养板每孔加20 μ L MTT(5 mg/mL)工作液,继续培养4h,终止培养,吸弃孔内培养液,加入150 mL二甲基亚砜(DMSO)溶液,振荡混匀10 min,使甲膜充分溶解。④比色:选择490 nm波长,在酶标仪上检测各孔的吸光度值,记录结果。

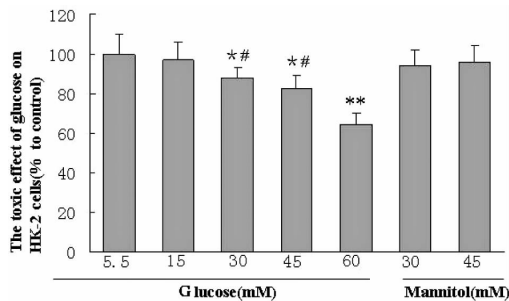
1.6 Western blot检测方法 各实验组干预24h,终止培养并提取细胞总蛋白。用1 \times 细胞裂解液配平BCA蛋白定量测得的各样品蛋白浓度,每孔总上样

量为 50~60 μg 。电泳：积层胶电压 90 V，待蛋白在积层胶和分离胶交界线压薄后，换成电压 130 V 至溴酚蓝达分离胶底部，结束电泳。转膜：恒压 100 V，时间 120 min。丽春红染色。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。孵育一抗，4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜。室温孵育二抗 1 h。化学发光、显影、定影。在凝胶成像和化学发光图像分析系统上扫描和进行灰度分析。每组实验重复 3 次。

1.7 统计学方法 应用 SPSS16.0 统计软件进行分析。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，多组间比较采用完全随机设计的单因素方差分析，并进行两两比较。

2 结果

2.1 各组 HK-2 细胞活力情况比较 见图 1。MTT 比色法结果发现：不同糖浓度呈浓度依赖性对 HK-2 细胞活力存在抑制作用，与正常糖对照组比较，高糖 1 组无差异 ($P > 0.05$)，高糖 2 组、高糖 3 组、高糖 4 组浓度差异有显著性或非常显著性意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；高糖 2 组、高糖 3 组与高糖 4 组比较，差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)；高糖 2 组与高糖 3 组比较，差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。与正常糖对照组比较，等渗 1 组、等渗 2 组对 HK-2 细胞活力没有明显的抑制作用 ($P > 0.05$)；等渗 1 组与等渗 2 组比较，差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

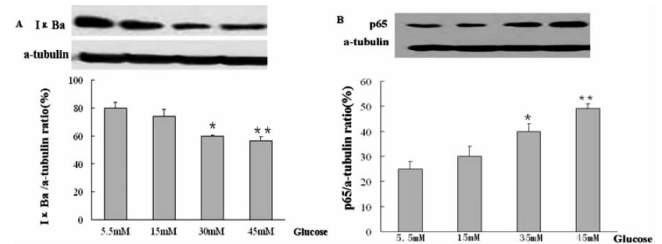


与正常糖对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与高糖 4 组比较，# $P < 0.05$

图 1 各组 HK-2 细胞活力情况比较

2.2 各组 HK-2 细胞 I κ B α 和 p65 蛋白表达情况比较 见图 2。结果发现：I κ B α 蛋白表达随着葡萄糖浓度的升高而逐渐降低，与正常糖对照组比较，高糖 2 组、高糖 3 组差异有显著性或非常显著性意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；高糖 2 组与高糖 3 组比较，差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。p65 蛋白随葡萄糖浓度的升高而表达上调，高糖 2 组、高糖 3 组与正常糖对照组

比较，差异有显著性或非常显著性意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；高糖 2 组与高糖 3 组比较，差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。



与正常糖对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

图 2 各组 HK-2 细胞 I κ B α 和 p65 蛋白表达情况比较

3 讨论

糖尿病肾病是糖尿病主要的微血管并发症之一。Brownlee M^[3]指出高糖对细胞的毒性作用，取决于细胞调节葡萄糖吸收的机制及下调葡萄糖吸收的能力。HK-2 对葡萄糖的重吸收不依赖于胰岛素。因此，HK-2 对机体血糖的变化是极其敏感的。近来，许多研究证实近端肾小管损伤在糖尿病肾病的发生发展中起着至关重要的作用，而这主要源于 HK-2 促炎症和促纤维化的作用^[1]。糖尿病的各种代谢底物，如尿蛋白、高糖、晚期糖基化终产物及其中间体、血管紧张素等，通过激活一系列的细胞内信号通路，促进 HK-2 分泌促炎症、促纤维化分子及上皮细胞向间质细胞转分化，造成肾小管间质炎症、纤维化及肾功能损伤^[1]。

本研究采用 MTT 比色法观察了不同浓度高糖对 HK-2 的毒性作用，结果发现 30~60 mM 浓度的葡萄糖呈浓度依赖性对 HK-2 活力存在显著的抑制作用。同时，30 mM、45 mM 浓度的甘露醇对 HK-2 活力没有明显的抑制作用。这提示高糖诱导的 HK-2 毒性损伤呈一定的浓度依赖关系，且与渗透压作用无明显关联。由于 60 mM 浓度的葡萄糖对细胞活力的抑制最为明显，结合国内外相关文献研究及死亡细胞过多会影响实验结果的经验，故本实验计划选择 5.5~45 mM 浓度的葡萄糖进行下一步的实验。

NF- κ B 信号通路是最主要的炎症信号通路，其介导的炎症反应在糖尿病肾病的病理发展过程中起着十分重要的作用。I κ B α 、p65 是 NF- κ B 炎症信号通路的中心环节^[4]。I κ B α 是 p65 的抑制蛋白。正常状

态下,大部分细胞 p65 与其抑制性蛋白 I κ B α 结合,以非活性的状态存在于细胞浆中。NF- κ B 通路激活的关键环节在于 I κ B α 磷酸化降解 I κ B α 蛋白,使 p65 解离出来^[5]。本研究发现,I κ B α 蛋白表达呈浓度依赖性降低,而 p65 蛋白表达呈浓度依赖性升高,提示高糖刺激 HK-2 细胞下调 I κ B α 蛋白和上调 p65 蛋白表达,呈一定的浓度依赖关系;高糖诱导的 HK-2 毒性损伤的机制,可能与 NF- κ B 通路的激活有关。

综上所述,高糖诱导的 HK-2 毒性损伤呈一定的浓度依赖关系,其机制与 NF- κ B 通路的激活有关,与渗透压作用无明显关联。

[参考文献]

[1] Tang SC, Lai KN. The pathogenic role of the renal

proximal tubular cell in diabetic nephropathy [J]. Nephrol Dial Transplant, 2012, 27(8): 3049-3056.

[2] Vallon V, Thomson SC. Renal function in diabetic disease models: the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney [J]. Annu. Rev. Physiol, 2012, 74: 351-375.

[3] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism [J]. Diabetes, 2005, 54(16): 1615-1625.

[4] Viatour P, Merville MP, Bours V, et al. Phosphorylation of NF- κ B and I κ B proteins: implications in cancer and inflammation [J]. Trends Biochem Sci, 2005, 30(1): 43-52.

[5] Ghosh S, Karin M. Missing Pieces in the NF- κ B puzzle [J]. Cell, 2002, 109(Suppl): S81-S96.

(责任编辑:马力)

益气祛风理血法对哮喘大鼠肺组织病理形态的影响

陈治珍¹, 刘华¹, 许双虹², 郑梅芳¹, 陈嘉³, 杨巧红³, 罗菲¹

1. 广州中医药大学第一附属医院儿科, 广东 广州 510405

2. 深圳市中医院, 广东 深圳 518033

3. 广州中医药大学, 广东 广州 510405

[摘要] 目的: 观察益气祛风理血法代表方小儿喘咳液对哮喘大鼠肺组织病理形态的影响。方法: 大鼠 60 只, 随机分为空白对照组, 病理模型组, 孟鲁司特钠组, 小儿喘咳液高、中、低剂量组各 10 只。空白对照组: 予生理盐水 1 mL/100 mg 灌胃。病理模型组: 予生理盐水 1 mL/100 mg 灌胃。喘咳液小剂量组: 予含生药 2.5 g/mL 的小儿喘咳液 1 mL/100 mg 灌胃; 喘咳液中剂量组: 予含生药 5 g/mL 的小儿喘咳液 1 mL/100 mg 灌胃; 喘咳液大剂量组: 予含生药 10 g/mL 的小儿喘咳液 1 mL/100 mg 灌胃; 孟鲁司特钠组: 予孟鲁司特 125 mg/kg 灌胃。给药 70 天。结果: 病理模型组大鼠出现不同程度的呼吸困难症状, 体重增加不明显, 孟鲁司特组及喘咳液各组大鼠一般情况比病理模型组要好。孟鲁司特组与病理模型组比较, 支气管壁的慢性炎症较明显, 杯状细胞增生、黏膜增生并突向管腔较轻, 肺气肿及肺间质性炎较轻, 嗜酸性粒细胞浸润少见。喘咳液高、中、低剂量组上述病理表现均较模型组轻, 特别是杯状细胞的增生较轻, 其中喘咳液高剂量组上述病理改变最轻, 优于孟鲁司特组; 喘咳液中、低剂量组上述病理改变程度与孟鲁司特组相似。结论: 益气祛风理血法可改善支气管的慢性炎症, 减轻支气管黏膜及杯状细胞的增生等病理改变。

[关键词] 哮喘; 益气祛风理血法; 小儿喘咳液; 肺组织病理形态; 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 0256-7415 (2014) 01-0167-04

[收稿日期] 2013-05-24

[基金项目] 广东省科技计划项目 (编号: 20090315)

[作者简介] 陈治珍 (1964-), 女, 副主任医师, 研究方向: 小儿呼吸系统疾病和血症。

[通讯作者] 刘华, E-mail: liuhua0321@126.com。