

高糖及糖基化终末产物对脾细胞活性影响的研究

(210093 南京) 南京大学生命科学院 韩冰 徐强

(510407 广州) 广州中医药大学 韩凌

【摘要】 目的 观察高糖及糖基化终末产物 (AGEs)对脾细胞生长和胞内钙的影响。方法 MTT法测定对细胞增殖活性的影响,流式细胞仪观察细胞周期及 Ca^{2+} 的变化。结果 高糖及 AGEs均可使脾细胞增殖活性明显增加,且进入 S期细胞数明显增多,AGEs组脾细胞内 Ca^{2+} 水平升高。结论 糖尿病时脾细胞内钙增加,可能使脾细胞增殖能力增强。

【关键词】 糖尿病 脾 糖基化终末产物 细胞周期 钙

Effects of glucose and AGEs on activity of spleen cells Han Bing, Xu Qiang, Han Ling 1 School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093

【Abstract】 Objective To observe the effect of glucose and AGEs on the growth and $[Ca^{2+}]_i$ of spleen cells. Methods The spleen cells were exposed to glucose and AGEs. The proliferation was measured by MTT assay, and the change of cells cycles and $[Ca^{2+}]_i$ were observed by flow cytometer (FCM). Results Glucose and AGEs promoted the growth of spleen cells. FCM results showed that the cells in S Phase and $[Ca^{2+}]_i$ obviously increased. Conclusion The increased $[Ca^{2+}]_i$ maybe result in the proliferation of spleen cells on diabetes.

【Key words】 Diabetes Spleen AGEs Cell cycle $[Ca^{2+}]_i$

糖尿病病人存在免疫功能紊乱,但其发生机制迄今尚不明了。为此,笔者检测了高糖和糖基化终末产物 (AGEs)作用下脾细胞的增殖、细胞周期变化及胞内钙水平,旨在了解糖尿病的发生发展中对免疫系统的影响。

材料与方 法

一、主要试剂 ① DMEM培养基;② 不含酚红的 1640;③ 牛血清白蛋白;④ 噻唑蓝;⑤ 二甲亚砜;⑥ 碘化丙啶 (PI)综合染液 Fura₂ AM

二、仪器 CO₂培养箱、倒置显微镜、超净工作台、BIO-RAD model 550、FACScan流式细胞仪 (Epics XL流式细胞仪, Coulter)。

三、AGEs的制备 将 40 mg/ml血清白蛋白与 500 mmol/L的 D葡萄糖和苯甲基磺酰氟 (BMSF)共同溶于 0.2 mol/L磷酸缓冲液 (PBS, PH=7.2)中,经 0.22 μm滤膜过滤除菌后,置 37℃培养箱内孵化 60天。孵化结束后,未结合的物质通过对 PBS的广泛透析而除去,然后用 0.22 μm滤膜过滤除菌,同时取样用荧光分光光度计 (激发/发射波长: 370/440 nm)检测其荧光强度。经检测 AGE-BSA的强度分别为其对照物的 178倍。

四、P染液的配置 生理盐水 129.6ml, PI 0.5mg, RNA酶 2 mg, 10% Triton-100 0.5ml,枸橼酸钠 200 mg加蒸馏水至 200 ml,调 PH 7.2~7.6,置 4℃

冰箱中避光保存备用。

五、检测方法

1. 细胞培养 小鼠放血处死,在 75%酒精里浸泡,无菌取脾脏,研磨过筛,离心,低渗破红细胞膜,洗涤 2次,悬浮于 DMEM培养液中,接种。

2. MTT检测 2×10⁶/ml细胞接种于 96孔培养板内。给予 20 mmol/L高糖及 800 μg/ml AGEs同一水平组以 6孔并列。然后,再置入 37℃含 5% CO₂及 100%湿度培养箱内培养 24 h取出后测 MTT以吸光度值 (A)反映细胞增殖水平。

3. 细胞周期检测 2×10⁶/ml细胞接种于 6孔培养板内,给予高糖及 AGEs 24 h后,刮下细胞,将单细胞悬液离心沉淀弃上清,用 PBS洗涤 2次,调细胞浓度为 1×10⁶/ml,加 1 ml P综合染液,置 4℃冰箱染色 30 min,离心洗去 P染液,加少许 PBS上机检测。

4. 细胞内 Ca^{2+} 检测 PBS洗涤脾细胞后,加入不含酚红的 1640培养液,加入 3 μmol/L Fura₂ AM标记游离 Ca^{2+} ,孵育 30 min,用 PBS洗去细胞外 Fura₂ AM加入新鲜培养液,上机。

六、统计学处理 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异进行 Student t 检验。

结 果

结果显示,高糖及 AGEs均可使脾细胞增殖活

性明显增加,且进入 S 期细胞数明显增多, AGE 组脾细胞胞内 Ca^{2+} 水平升高,与正常对照组比较差异显著,见附表。

附表 高糖及 AGE 对脾细胞增殖活性和胞内 Ca^{2+} 水平的影响

组别	A	Ca^{2+} (U)	S 期细胞比率 (%)
对照组	0.378 ± 0.025	152.71 ± 17.97	1.37 ± 0.12
AGE 组	0.672 ± 0.051**	300.68 ± 16.01*	13.03 ± 1.98*
葡萄糖组	0.641 ± 0.084**	166.46 ± 21.45	8.07 ± 0.91*

与对照组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

讨 论

较长时间的高血糖会诱导生存期较长的组织结构如蛋白质的分子改变,即蛋白质的非酶糖基化,这些改变并不随血糖恢复正常而消失,而是呈持续存在,乃至继续发生病理性改变。单核吞噬细胞、T 淋巴细胞都有 AGE 受体,通过受体介导细胞效应,细胞在摄取、降解和清除 AGE 的同时,也发生生长状态与合成功能的变化,使生物活性物质如一氧化氮、内皮素、细胞因子和组织成分如胶原蛋白、弹性蛋白含量和作用失去平衡。AGE 受体属于免疫球蛋白超家族,其基因位于第 6 染色体的主要组织相容性复合体内,而第 6 染色体包含有许多与炎症和免疫

反应有关的基因, AGE 的受体后效应多数与炎症及免疫过程有关^[1]。

本实验结果表明,高糖及 AGE 组其吸光度值和 S 期细胞比率均明显高于对照组,表明在糖尿病状态下,尤其在糖尿病中后期, AGE 形成过多时,脾细胞增殖显著。 Ca^{2+} 作为淋巴细胞激活增殖过程中的信息分子,在传递抗原等外界分子刺激、启动相关基因的传导及其后传递过程中发挥重要作用,从而使免疫增强^[2]。本实验结果提示, AGE 诱导了脾细胞胞内 Ca^{2+} 增加,使脾细胞增殖能力增强,从而诱发相应的免疫反应。

总之,在糖尿病发生和发展过程中,特别是中后期,免疫细胞增殖,相应的免疫功能也提高,因而产生慢性炎症反应,可能加快糖尿病病情的发展。

参 考 文 献

- 1 Yamagishi S, Takauchi M, Inagaki Y et al. Role of advanced glycation end products (AGEs) and their receptor (RAGE) in the pathogenesis of diabetic microangiopathy. *Int J Clin Pharmacol Res*, 2003, 23(1): 129
- 2 王冠蕾,关永源. 细胞钙运动和 T 淋巴细胞活化信号转导机制. *中国药理学通报*, 1996, 12(6): 481

收稿日期: 2004 9 10

破伤风抗毒素致血清病 1 例

(448000 荆门) 湖北省荆门市第一人民医院 刘忠红

患者 女性, 39 岁, 已婚。因右手食指被铁钉刺伤, 经外科医生局部包扎处理后, 遵医嘱注射破伤风抗毒素 (TAT), 注射前皮试结果阴性, 注射后未感特殊不适, 观察 20 min 后离开医院。1 周后, 注射局部发痒, 检查注射局部有一直径约 3 cm 的丘疹, 即自行热敷。随之, 大腿外侧皮肤瘙痒, 搔抓后, 均起大小不等的丘疹, 继而扩散至颈部、腰部。次日晨起后感恶心、呕吐、头昏、心慌, 立即卧床休息, 1 h 后自觉症状逐渐好转, 颈部、腰部斑丘疹消退, 注射局部仍发痒, 双上肢、双下肢瘙痒, 再次就诊。诊断为 TAT 所致的血清病, 口服息思敏 1 粒后, 过敏症状逐渐好转, 连服 2 天后, 注射局部丘疹消失。痊愈后随访, 患者一般情况良好, 无任何异常。

讨 论

血清病是指见于注射异种血清后在病人身上所出现的综合征。由于自动免疫的方法的发展和广泛使用, 已经使得急性血清病的发生率大为减少。本例病人用药前、后均未用过其它药物, 未接触其它过敏物质, 非过敏体质, 根据其局部

丘疹, 7 天致病期, 全身斑丘疹, 继之恶心、呕吐、头昏、心慌, 经用息思敏后即逐渐好转, 确认为 TAT 所致的血清病。

血清病属 III 型超敏反应 (变态反应), 系由抗原、抗体复合物所造成的组织损伤, 故又称为免疫复合物疾病或免疫复合物型或血管炎型。其病因为一次输入多量的抗原后, 引起抗体的产生。形成的抗体, 与尚未完全排除而又逐渐吸收的抗原结合, 在抗原过量的条件下, 形成循环免疫复合物, 引起免疫复合物病。其致病期为 7~12 天。常见的引起人类急性血清病的抗原包括许多异种蛋白质类及非蛋白质类药物 (半抗原), 还有非蛋白类物质。急性血清病常为医源性疾。本病例为异种蛋白质类 (TAT) 引起的, 7 天后致病。本例发病呈现一过性特点。

预防: ① 详细询问过敏史, 用药史。② 准确、熟练掌握皮试结果判断, 脱敏注射法, 注射完毕必须留诊 20 min 并注意观察患者有无特殊变化及异常感觉。③ 凡注射 TAT 者 (虽皮试阴性, 注射后当时无任何不适) 注意随访, 7~12 天追踪观察。

收稿日期: 2004 8 12