

调节相关,通过鼓室内给药,药物可以直接到达靶点,有效改善炎症因子的水平,调节内耳血管内皮功能,拮抗机体氧化应激水平,平衡机体氧化-抗氧化作用,保护患者的耳蜗功能。

总之,采用鼓室内给药鼠神经生长因子和泼尼松龙治疗突发性耳聋疗效确切,能有效改善耳聋和眩晕,提高临床耳鸣总有效率,改善炎症和氧化应激水平,但具体的机制还有待于进一步研究和探讨。

参考文献

1 顾兴智,尤乐都斯·克尤木,张华,等.金纳多注射液治疗突发性耳聋的疗效及安全性的系统评价[J].新疆医学,2012,42(12):4-8
 2 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会,中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会.突发性聋的诊断和治疗指南(2005年,济南)[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2006,41(8):569
 3 潘婧.中药耳聋2号治疗突发性耳聋的临床观察[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2014:19-20

4 钱怡,钟时勋,胡国华,等.突发性耳聋的分型治疗及预后分析[J].重庆医科大学学报,2015,8:1159-1163
 5 韦一,王德乐,王韶鉴,等.地塞米松与甲泼尼龙治疗突发性耳聋的临床疗效对比[J].中国全科医学,2014,17(27):3194-3196
 6 李欣,王锐,姜子刚,等.影响鼓室内激素治疗突发性耳聋的多因素分析[J].中华耳科学杂志,2010,8(4):437-440
 7 童静,谈齐峰,孟宪红,等.鼠神经生长因子与地塞米松联合注射治疗突发性耳聋的疗效观察[J].全科口腔医学电子杂志,2014,1(3):14-16
 8 汪洋,卢兵,谢慧星.高压氧联合地塞米松治疗突发性耳聋临床效果观察[J].河北医学,2015,21(2):295-297
 9 刘爱梅,刘涛,李红梅,等.山西省汾阳市城区居民突发性耳聋相关知识及行为现状调查[J].现代预防医学,2015,42(10):1812-1814
 10 张景波,杜兴娟,史亚军,等.早期应用自由基清除剂治疗突发性耳聋临床观察[J].山西医药杂志,2013,42(9):560-561
 (收稿日期:2015-11-11)
 (修回日期:2015-11-27)

肾小管上皮细胞在高糖环境下其间隙连接蛋白与细胞通透性的关系

杨黎 哈伟杰 王真

摘要 目的 观察肾小管上皮细胞在不同浓度葡萄糖干预下其间隙连接蛋白(connexin43)表达与细胞通透性的关系。方法 用不同浓度葡萄糖刺激肾小管上皮细胞,通过免疫荧光法检测 connexin43 蛋白的表达;用 RT-PCR 分析 connexin43 mRNA 的表达。使用 Transwell 小室法测定各组细胞对白蛋白的通透情况,并观察以上指标之间的变化有无相关性。**结果** 肾小管上皮细胞在高糖干预下间隙连接蛋白表达递减,单层肾小管上皮细胞通透性升高。**结论** 高糖环境下肾小管上皮细胞间隙连接蛋白的表达与细胞对白蛋白的通透性呈负相关。

关键词 间隙连接蛋白 上皮细胞 肾小管 白蛋白 通透性

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.06.047

Relationship of Connexin43 Expression and the Cellular Permeability in High Glucose Stimulated HKC Yang Li, Ha Weijie, Wang Zhen.
 Department of Emergency, Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100091, China

Abstract Objective To observe the expression of gap junction protein (connexin43) and the permeability of albumin of cultured human kidney tubular epithelial cells(HKC) which was stimulated with glucose, and the relationship between the expression of connexin 43 and the permeability of HKC. **Methods** The normal HKC was stimulated with glucose to detecte the expression of connexin43 protein of HKC in different groups. The expression of connexin43 protein and mRNA was detected by Immunity fluorecence and RT-PCR. Using Transwell cab we examined the permeability of albumin in different groups, and observed whether there was relevance between the connexin-43 expression and the cellular permeability. **Results** Different concentrations of glucose stimulated HKC, down-regulated the connexin-43 protein expression, and up-regulated the cell permeability. **Conclusion** The expression of gap junction protein and the permeability of HKC in high glucose is relevant.

Key words Connexin43; Epithelial cell; Kidney tubule; Albumin; Permeability

作者单位:100091 北京世纪坛医院急诊科(杨黎、王真);102600 北京市大兴区人民医院急诊科(哈伟杰)

通讯作者:王真,主任医师,硕士生导师,电子邮箱:wangzhen1369@hotmail.com

在糖尿病的各种并发症中,肾脏病变被认为是其中严重和危害性最大的一种,而肾脏病变的一个重要早期特征便是尿液中发现微量的白蛋白,这些白蛋白在肾脏病变的预后中也是一个重要的因素。一般情况下,血浆蛋白经由肾小球滤过,其中的95%以上由近曲肾小管重吸收。过量的白蛋白的积聚会导致肾小管上皮细胞损伤增加。细胞间的连接主要有紧密连接、桥粒以及间隙连接这3种。间隙连接表达于肾血管内皮细胞、平滑肌细胞,并广泛存在于肾小管上皮细胞之间,并且对于其增殖、分化有一定的影响^[1-3]。研究表明,connexin43可以介导相邻细胞之间信息的传递,并且允许某些原子和分子穿过,所以间隙连接的量被改变之后便会直接及间接的影响到细胞间一些特定物质的通过性^[4]。笔者使用不同浓度的葡萄糖来刺激肾小管上皮细胞,观察connexin43的变化和检测细胞通透性的变化,进而分析并检验二者之间是否具有相关性,探讨通过改变细胞间隙连接的表达从而改变肾小管对白蛋白重吸收的可能性,从而为探索临床治疗慢性肾脏损伤提供一条新的思路。

材料与方 法

1. 材料:细胞培养粉(美国Gibco DMEM/F12),胎牛血清(四季青公司),FITC标记的山羊抗兔IgG(博奥森公司),兔抗connexin43的多克隆抗体(博奥森公司),荧光素标记的牛血清白蛋白(BSA-FITC博奥森公司),胰蛋白酶,RT-PCR试剂盒(TaKaRa公司);合成引物(上海生物工程技术公司);Trizol(TaKaRa公司)。

2. 方法:使用10%胎牛血清的细胞培养液在37℃和5%CO₂浓度的温箱中孵育人肾小管上皮细胞(HKC)。当HKC生长结合率达到60%~80%时开始同时培养,待24h后进行实验分组:①正常对照组(生理浓度);5.5mmol/L葡萄糖组;②10mmol/L葡萄糖组;③20mmol/L葡萄糖组;④30mmol/L葡萄糖组,在37℃及浓度5%CO₂条件下继续孵育48h,提取各组细胞总RNA进行指标的检测。

3. connexin43 mRNA的检测:按参考文献[5]方法合成β-actin寡核苷酸以及connexin43的引物,由大连宝生公司合成。然后使用RT-PCR试剂盒,并且按照说明书操作。通过凝胶成像对相关PCR的产物进行成像,计算灰度比值然后进行分析。

4. HKC细胞免疫荧光成像:当细胞80%融合后,4℃温度下浓度4%的多聚甲醛做细胞固定,20min后用PBS溶液仔细清洗3次,室温条件下进行透化处

理(Triton-X100浓度1%),40min后用PBS溶液反复清洗3遍,再加入BSA封闭(浓度为1%),20min常温下静置,然后加多克隆抗体(兔抗connexin43),1:100稀释,于4℃冰箱中静置放一夜,PBS溶液仔细清洗3次,再加FITC抗体(羊抗兔),1:100稀释,45min常温静置,最后使用荧光显微镜仔细观察和扫描成像。

5. 检测HKC通透性:使用Costar Corning(丹麦)的Transwell小室,将HKC接种于其多聚碳酸酯膜上,5%CO₂浓度孵箱进行细胞孵育培养,24h后孵育培养为细胞单层,然后再以胎牛血清1%含量的细胞培养液进行细胞的同步培养,培养24h后观察细胞情况,然后以无血清的细胞培养液培养,并于各个分组上室中加入浓度不同的葡萄糖溶液后放入孵箱继续培养12h,上述过程完成之后,使用PBS溶液仔细清洗3遍,0.1mg/ml荧光素标记的牛血清白蛋白(BSA-FITC)100μl依次加入上室,500μl PBS液依次加入下室,37℃孵箱继续孵育1h,然后检测下室PBS溶液的吸光度(490nm)。

6. 统计学方法:各组数据使用SPSS 15.0软件进行统计学分析,符合正态分布的计量资料数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示,方差分析法比较多组间的数据,采用直线相关分析对变量进行比较,t检验方法检验组间数据,以P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同浓度葡萄糖对connexin43 mRNA表达的影响:RT-PCR显示,加入不同浓度的葡萄糖10、20、30mmol/L后HKC connexin43 mRNA表达呈现递减的趋势,与对照组做比较,差异有统计学意义(P<0.05),如图1所示。

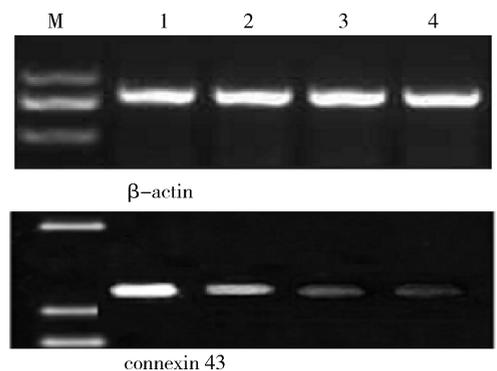


图1 HKC connxin43 mRNA的表达

1. 正常对照组;2. 10mmol/L葡萄糖组;3. 20mmol/L葡萄糖组;
4. 30mmol/L葡萄糖组

2. 不同浓度的葡萄糖对 connexin43 蛋白表达的影响:48h 时 A、B、C、D 组细胞 connexin43 蛋白的平均荧光强度分别为 80.656 ± 2.272 、 64.379 ± 5.432 、 49.5711 ± 2.826 、 34.914 ± 3.876 。以上结果发现 connexin43 的表达主要在细胞膜上,观察为点状及线

状的绿色荧光。通过加入不同浓度的葡萄糖 10、20、30mmol/L 后,HKC connexin43 的平均荧光强度及其表达的量有明显的下降,通过与正常对照组的比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),如图 2 所示,RT-PCR 的结果与之相一致。

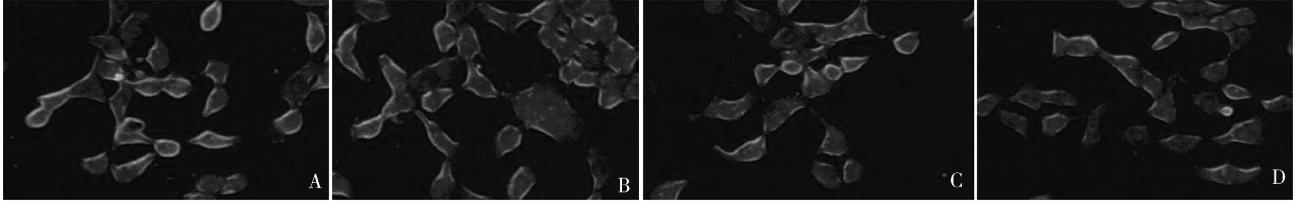


图 2 免疫荧光成像 HKC connexin43 蛋白表达 ($\times 100$)

A. 正常对照组;B. 10mmol/L 葡萄糖组;C. 20mmol/L 葡萄糖组;D. 30mmol/L 葡萄糖组

3. 荧光分光光度计检测不同分组肾小管上皮细胞的通透性:加入不同浓度葡萄糖(10、20、30mmol/L)后,HKC 对白蛋白的通透性呈现为递增趋势,与对照组进行统计检验,差异有统计学意义($P < 0.05$),如图 3 所示。经统计学直线相关分析,不同浓度葡萄糖干预下,肾小管上皮细胞 connexin43 蛋白的表达与单层肾小管上皮细胞通透性呈负相关(图 4),相关系数 0.934。

讨 论

蛋白尿是糖尿病肾病进展的特征之一,其出现往往伴随着肾功能慢性、进行性的减退,因而对其发生及发展的机制的研究广受关注。正常情况下,肾小球滤过膜会阻挡血浆中的高分子质量蛋白,肾小球滤过后只有少量的低分子蛋白可以进入肾小管,而其中的绝大部分又会在近曲小管部位被重吸收利用。有部分研究实验表明,白蛋白是尿蛋白中的主要成分,肾小管上皮细胞会通过吞饮受体来重吸收白蛋白以及脂蛋白等物质,其重新吸收的位置则是在肾脏的近曲小管。肾小管上皮细胞损伤的发生与白蛋白的积聚有关,白蛋白的大量聚积影响到各种纤维化因子以及炎症因子的表达,导致肾小管上皮细胞发生凋亡或者增殖,且诱导其转化为肌成纤维细胞,造成肾脏纤维化的发生和发展^[6-8]。故此,如果肾小管上皮细胞增加对白蛋白的通透性,便可导致白蛋白更多的进入和积聚在肾脏间质,从而进一步加剧了其对于肾小管上皮细胞的损伤。

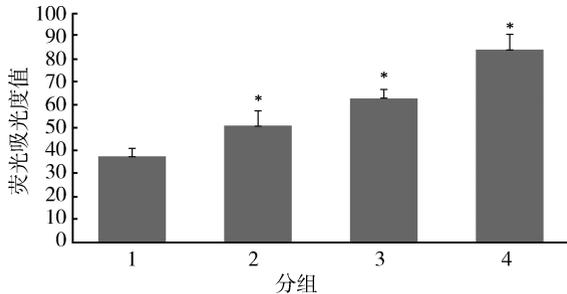


图 3 不同浓度葡萄糖对单层 HKC 通透性的影响

1. 正常对照组;2. 10mmol/L 葡萄糖组;3. 20mmol/L 葡萄糖组 4. 30mmol/L 葡萄糖组。与正常对照组比较,* $P < 0.05$

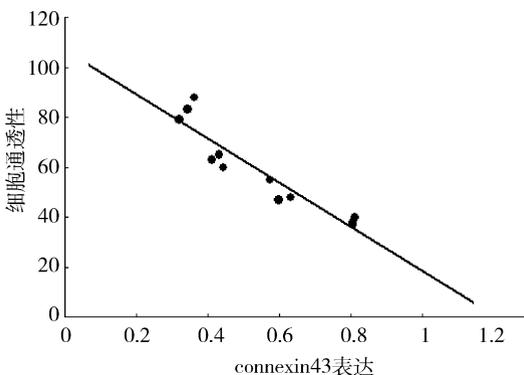


图 4 单层肾小管上皮细胞 connexin43 的表达与细胞通透性相关性分析

细胞之间可以通过其间的间隙连接来进行信息及物质的交换,所以间隙连接对细胞具有极其的重要作用。间隙连接蛋白是细胞间隙连接的主要组份,其主要组成是 connexin43 蛋白,connexin43 蛋白在肾脏中亦有分布,而且是肾小管细胞间隙连接组份的最重要的连接蛋白之一。近年来,有部分研究表明,通过增强 connexin43 蛋白的表达能够使转分化标志 α -SMA, vimentin 蛋白表达减少,在一定程度上缓解肾小管上皮细胞向肌成纤维细胞的转化,进而减缓肾脏纤维化的进展^[9]。并有研究发现,早期糖尿病肾病的大鼠模型中微量尿蛋白的增加以及尿液中肌酐的升高均与 connexin43 在肾脏表达下降具有一定

的关系^[10]。因此,细胞间连接的研究在糖尿病肾病的发病机制和临床治疗的指导方面显得十分必要。

本实验通过培养 HKC,使用不同浓度的葡萄糖刺激、干预,制造人为高糖环境,对肾小管上皮细胞 connexin43 的表达以及其细胞通透性的改变进行系统的观察和检测,从而分析肾小管上皮细胞 connexin43 的表达和肾小管上皮细胞对白蛋白的通透性之间是否具有相关性。本次实验的结果显示,随着加入葡萄糖浓度的增加,肾小管上皮细胞 connexin43 的表达呈逐渐减少的趋势,随着间隙连接蛋白在肾小管上皮细胞间的表达的减少,白蛋白通过单层的肾小管上皮细胞的通透性呈现出逐渐增加的趋势,经过数据的相关性分析证明二者之间的变化呈负相关,提示在不同浓度的葡萄糖刺激下,间隙连接蛋白发生了改变,从而影响到了其表达的情况。随着葡萄糖刺激浓度的增加,间隙连接的改变越发显著,而其改变则很可能又影响到了肾小管上皮细胞吞饮受体蛋白的表达,进一步影响到细胞对白蛋白的通透性,但是其中具体的机制以及其信号转导的途径仍有待于进一步的研究和证实。

综上所述,本研究发现高糖环境下肾小管上皮细胞间的间隙连接蛋白的表达与细胞对白蛋白的通透性相关,白蛋白进入和积聚在肾小管间质中的量可以通过控制和改变肾小管细胞间隙连接的量进行影响和改变,进而影响到各种纤维化因子以及炎症因子的表达,以期减缓肾脏纤维化的进程和发展,为治疗慢性肾脏疾病提供了一个新的思路和靶点。

参考文献

- Hanner F, Sorensen CM, et al. Connexins and the kidney [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2010, 298(5): R1143 - 1155
- Li S, Nomata K, Hayashi T, et al. Transient decrease in gap junction expression during compensatory renal growth in mice [J]. *Urology*, 2002, 60(4): 726 - 730
- Brehm R, Ruttinger C, Fischer P. Transition from preinvasive carcinoma in situ to seminoma is accompanied by reduction of connexin43 expression in Sertoli cells and ger cell [J]. *Neoplasia*, 2006, 8(6): 499 - 509
- Soares AR, Martins - Marques T, et al. Gap junctional protein Cx43 is involved in the communication between extracellular vesicles and mammalian cells [J]. *Sci Rep*, 2015, 19(5): 13243
- Marcus RG, England R, Nguyen K, et al. Ahered renal expression of the insulin responsive glucose transporter GLUT4 in experimental diabetes mellitus [J]. *Am J Physiol*, 1994, 267(5 pt 2): F816 - F824
- Abbate M, Zoja C, Remuzzi G. How does proteinuria cause progressive renal damage? [J]. *J AM Soc Nephrol*, 2006, 17(11): 2974 - 2984
- Cravedi P, Remuzzi G. Pathophysiology of proteinuria and its value as an outcome measure in chronic kidney disease [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2013, 76(4): 516 - 523
- Gorritz JL, Martinez - Castelao A. Proteinuria; detection and role in native renal disease progression [J]. *Transplant Rev: Oalando*, 2012, 26(1): 3 - 13
- Abed A, Toubas J, Kawadas P, et al. Targeting connexin43 protects against the progression of experimental chronic kidney disease in mice [J]. *Kidney international*, 2014, 86(4): 768 - 779
- Hu C, Cong XD, Dai DZ, et al. Argirein alleviates diabetic nephropathy through attenuating NADPH oxidase, Cx43, and PERK in renal tissue [J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2011, 383(3): 309 - 319

(收稿日期:2015 - 11 - 22)

(修回日期:2015 - 12 - 22)

475 例血友病患者登记与管理的回顾性分析

周寅 李魁星 肖娟

摘要 目的 通过对笔者医院血友病中心近年来儿童血友病患者的登记和管理数据进行回顾性分析,以总结经验、提高对血友病登记和管理的认识,为进一步制定符合中国国情的儿童血友病综合管理模式提供依据。**方法** 收集笔者医院血友病中心自 2007 年 12 月 1 日 ~ 2014 年 10 月 31 日登记的所有儿童血友病病例有关数据并进行统计分析。**结果** 共收集到 475 例病例资料,分别来自全国 28 个省、市、自治区;血友病 A414 例(87.16%),血友病 B61 例(12.84%);重型 359 例(75.58%),中间型 74 例(15.58%),轻型 42 例(8.84%);仅 132 例(27.79%)有血友病家族史。临床分型与初次出血年龄有相关性($P < 0.01$)初

作者单位:100730 中国医学科学院北京协和医院儿科(周寅、肖娟),血液科(李魁星)

通讯作者:肖娟,电子信箱:xiaojuan@pumch.cn