

文章编号: 1005-8982(2004)20-0139-01

# 外源性谷胱甘肽对肾小管细胞氧化应激的影响

黄 珀<sup>1</sup>, 邓 勇<sup>2</sup>, 张春燕<sup>1</sup>, 陈 蓉<sup>1</sup>

(泸州医学院 1.病理生理学教研室, 2.附属医院 泌尿外科, 四川 泸州 646000)

**摘要:** 目的 观察外源性谷胱甘肽对肾小管上皮细胞氧化应激性损伤的作用。方法 利用离体培养肾小管细胞建立氧化应激性损伤的模型, 观察小管细胞形态结构的改变及细胞存活率、乳酸脱氢酶(lactated dehydrogenase, LDH) 释放量、脂质过氧化产物丙二醛(malondialdehyde, MDA) 含量的变化。结果  $H_2O_2$  所致肾小管细胞损伤, 表现为细胞存活率降低, LDH 释放增加, 细胞的脂质过氧化产物 MDA 含量增加。还原型谷胱甘肽能提高细胞存活率, 降低 LDH 释放, 减轻脂质过氧化反应。结论  $H_2O_2$  可导致肾小管氧化应激性损伤, 外源性给予还原型谷胱甘肽对损伤的肾小管上皮细胞有保护作用。

**关键词:** 氧化应激; 过氧化氢; 肾小管细胞; 谷胱甘肽

中图分类号: R 692

文献标识码: B

还原型谷胱甘肽是细胞内主要的抗氧化物, 它能提供含巯基的半胱氨酸, 清除自由基抗脂质过氧化。近年来, 活性氧自由基对肾脏的损伤作用已引起人们广泛的重视, 肾小管上皮细胞氧化应激性损伤可见于各种肾脏疾患如急性慢性肾小球病变、缺血-再灌注损伤、肾中毒等<sup>[1-3]</sup>。本实验旨在观察  $H_2O_2$  对肾小管细胞的损伤效应和外源性给予还原型谷胱甘肽对肾小管上皮细胞氧化应激性损伤的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂和仪器

DMEM 培养基(Gibco 生产), 无糖 DMEM 培养基(Gibco 生产), NRKSIE 鼠肾小管细胞株(购于华西医科大学内科实验室), 乳酸钠(国产分析纯试剂)。

### 1.2 肾小管细胞培养

NRKSIE 鼠肾小管细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, 将小管细胞分离成单个细胞悬液, 用含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37℃ 5.00%  $CO_2$  孵箱中培养。每 24 小时更换培养液 1 次, 培养 2, 3 d, 待细胞生长成片备用。

### 1.3 实验分组

转种于 96 孔板, 细胞密度为 104 个/mL, 孵育 24 h 后分四组。对照组: 磷酸缓冲液作用 60 min。  $H_2O_2$  组: 培养液中加入  $H_2O_2$ , 浓度为 5 mmol/L 作用 60 min。GSH 组: 培养液中加入还原型谷胱甘肽终浓度为 5 mmol/L, 作用 60 min。GSH+ $H_2O_2$  组: 先加入还

原型谷胱甘肽终浓度为 5 mmol/L, 再加入浓度为 5 mmol/L  $H_2O_2$  作用 60 min。

### 1.4 检测方法

活细胞率测定: 用 MTT 显色法<sup>[4]</sup>测定细胞存活率。细胞转种于 96 孔板, 培养 72 h, 每孔加入 50  $\mu$ L MTT (5 g/L), 孵育 4 h, 去上清液, 加入二甲亚砜 100  $\mu$ L, 全自动酶标仪测 570 nm 的吸光度值 ( $A_{570}$  nm 表示), 活细胞数与  $A_{570}$  nm 值成正比。活细胞率 = 实验组吸光度值 / 对照组吸光度值  $\times$  %。乳酸脱氢酶(lactated dehydrogenase, LDH) 释放量测定用自动生化分析仪测定。丙二醛(malondialdehyde, MDA) 含量测定采用南京建成生物工程研究所提供的 MDA 试剂盒, 比色法测 MDA。取肾小管细胞组化染色(Preston 法) 显示 LDH。原位包埋, 行扫描电镜观察线粒体改变。

### 1.5 统计学处理

所得数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 用 SAS 统计软件作方差分析。

## 2 结果

### 2.1 细胞组化染色和电镜观察结果

光镜下, 对照组细胞膜完整, 胞浆内富含兰色的 LDH 颗粒。 $H_2O_2$  组, 细胞膜完整性遭到明显破坏, 兰色的 LDH 颗粒漏出到细胞外, GSH+ $H_2O_2$  组细胞膜破坏有明显减轻, LDH 颗粒漏出减少。扫描电镜观察, 对照组线粒体嵴排列致密整齐。 $H_2O_2$  线粒体肿胀明显、嵴排列疏松紊乱, 外膜出现断裂和缺损。

(下转第 143 页)

收稿日期: 2003-11-17

面了解功能恢复情况,另一方面发现复发者及时治疗,减少病残的机会。

参 考 文 献:

[1] 陆裕朴,胥少汀,葛宝丰,等.实用骨科学[M].北京:人民军医出版社,1999:2231-2233.  
[2] 王澍寰.手外科学[M].第 2 版.北京:人民卫生出版社,1999:753-754.  
[3] Booth KC, Campbell GS, Chase DR. Giant cell tumor of tendon

sheath with intraosseous invasion: A case report[J]. J Hand Surg, 1995,20:100-102.  
[4] 李 淳,韦加宁,赵俊会,等.86 例上肢腱鞘巨细胞瘤长期随访结果[J].中华外科杂志,2001,17:151-153.  
[5] Prakash P, Vikas G, Rajes M. Giant cell tumor of the tendon sheath:is radiotherapy indicated to prevent recurrence after surgery[J]? The Journal of Bone and Joint Surgery, 2002, 85-b: 571-573.

( 汤映平 编辑 )

( 上接第 139 页 )

GSH+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组细胞线粒体肿胀轻微,结构基本正常。  
2.2 细胞存活率及自由基代谢的改变

5 mmom/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用于培养肾小管细胞,60 min 后,肾小管细胞存活率降低,LDH 释放量增加,与对照组有显著差异( *P*<0.01)。脂质过氧化产物 MDA 含量升高明显高于对照组( *P*<0.01)。GSH+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组细胞存活率升高,LDH 释放量明显减少,MDA 含量增高均有降低,与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比差异具有显著性( *P*<0.01)。见附表。

附表 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对培养肾小管细胞存活率、LDH 释放量及 MDA 的影响

组别	存活率( % )	LDH( U/L )	MDA( nmol/L )
对照组	96.62	53.0± 4.1	8.02± 0.16
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	51.48	185.0± 7.3	18.92± 0.93
GSH 组	97.15	52.0± 2.9	7.68± 0.35
GSH 组 +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	91.07	84.0± 5.4	12.35± 0.85

结果提示,5 mmom/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可导致肾小管细胞氧化应激性损伤,外源性给予还原型谷胱甘肽可减轻 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致的氧化性损伤。

3 讨 论

肾小管氧化性损伤在肾脏的缺血 - 再灌注损伤和中毒性损伤中起着重要作用。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 虽不是自由基,但它属活性氧类,有高反应性,可促进自由基的生成,引发生物膜的脂质过氧化反应,导致细胞的坏死和凋亡<sup>[5]</sup>。一般情况下,生物体内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 常被酶系统所清除,如过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶<sup>[6]</sup>。但在一些损伤因素的作用下,细胞内氧化代谢产物增加,或细胞中抗氧化机制不足时,活性氧堆积并对细胞产生毒性作用,这种状态称之为氧化应激。在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 复制的肾小管氧化应激损伤的模型中,细胞的损伤非常明显,表现为细胞存活率降低,细胞膜完整性破坏,LDH 释放增加,线粒体体积肿大,线粒体溶

解明显增多,数目减少,细胞的脂质过氧化产物 MDA 含量增高。

在本实验中,还原型谷胱甘肽对细胞形态、代谢等均有保护作用。谷胱甘肽是谷氨酸,半胱氨酸,甘氨酸组成的三肽物质,还原型谷胱甘肽是其主要的活性状态,也是细胞内主要的抗氧化物,它能提供含巯基的半胱氨酸,结合自由基等有害物质,能清除过氧化氢或其他过氧化物,抗脂质过氧化,减轻自由基对肾小管细胞的损伤<sup>[7]</sup>。此外还原型谷胱甘肽的细胞保护作用与其降解产物甘氨酸有关,甘氨酸具有强大的稳定细胞膜的功能<sup>[8]</sup>,故补充外源性还原型谷胱甘肽可维持生物膜的完整性,稳定膜蛋白,减轻细胞损伤。

参 考 文 献:

[1] Baliga R, Ueda N, Walker PD, et al. Oxidant mechanisms in toxic renal failure[J]. Drug Metab Rev, 1999, 31(4): 971-997.  
[2] Aragno M, Cutrin JC, Mastrocola R, et al. Oxidant stress and kidney dysfunction due to ischemia/reperfusion in rat[J]. Kidney Int, 2003, 64(3): 836-843.  
[3] 梁 明,侯凡凡,刘志强,等.终末期肾病患者脂质过氧化水平的变化[J].肾脏病与透析肾移植杂志,2003,12(4):324-326.  
[4] Ryan MJ, Johnson G, Kirk J, et al. HK-2:An immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney[J]. Kidney Int, 1994(1), 45: 48-57.  
[5] Baek SM, Kwon CH, Kim JH, et al. Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells [J]. J Lab Clin Med, 2003, 142(3): 178-186.  
[6] 张剑白,李淑霞,米 延.新生儿败血症患儿血中过氧化脂质\谷胱甘肽过氧化物酶和维生素 E 的观察[J].中国现代医学杂志,1998,8 (2):13-16.  
[7] 顾取良,吴梧桐.谷胱甘肽药理和临床研究新进展[J].药理生物技术,2001,8(1):47-50.  
[8] 黄瑞平,余翠琴.还原型谷胱甘肽的临床应用[J].浙江中医学院学报,2003,27(5):87-88.

( 唐小玲 编辑 )