

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.12.040

高浓度葡萄糖溶液对人结肠癌上皮 Caco-2 细胞胆固醇吸收的影响

王 琼¹, 王丽媛¹, 张 莉¹, 倪玲芬²

(中国人民解放军第四医院:1. 检验科;2. 内科, 西宁 810007)

摘 要:目的 观察高浓度葡萄糖溶液对人结肠癌上皮 Caco-2 细胞胆固醇吸收的影响。方法 Caco-2 细胞培养基选择含有 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 37℃、5% CO₂ 条件下进行培养, 采用 CCK-8 检测细胞增殖, 酶标仪检测 450 nm 波长的吸光度(OD)值计算细胞增殖率, 确定葡萄糖溶液对 Caco-2 细胞的半数抑制浓度。将 Caco-2 细胞分为胆固醇组、胆固醇+依折麦布组、空白组, 检测 Caco-2 细胞胆固醇吸收量。采用 WB 检测 ABCG8、ABCG5、NPC1L1、SR-BI 蛋白表达水平。结果 CCK-8 检测结果显示, 在不同葡萄糖溶液浓度下, Caco-2 细胞增殖差异有统计学意义($P < 0.05$)。在 5.0、25.0、50.0 mmol/L 的葡萄糖溶液中, 胆固醇组 Caco-2 细胞胆固醇吸收量均明显高于胆固醇+依折麦布组, 且差异均有统计学意义($P < 0.05$), 但其差异随葡萄糖溶液浓度增加而减少。WB 检测结果显示, 高浓度葡萄糖溶液对 Caco-2 细胞胆固醇转运基因 ABCG8、ABCG5、SR-BI 的表达无明显影响, 但是对 NPC1L1 蛋白表达影响明显, 且差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 高浓度葡萄糖溶液可能通过增加 Caco-2 细胞中 NPC1L1 蛋白的表达起促进胆固醇重新吸收的作用, 这可能是导致糖尿病患者合并胆石症概率增加的重要因素。

关键词:葡萄糖; 人结肠癌上皮细胞; 胆固醇; 胆石症

中图法分类号:R735.3

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)12-1828-03

小肠上皮细胞是具有极性的柱状上皮细胞, 参与肠道的消化、吸收、分泌、免疫屏障和应激反应等过程, 黏膜上皮内含有大量的免疫细胞核免疫分子, 是机体内最大的免疫组织^[1-3]。近年来研究发现, 糖尿病患者体内血糖水平在长期得不到控制的情况下并发胆石症的概率明显升高, 其机制尚未完全明确, 但是与胆固醇在肠道吸收增加有明显关联^[4-5]。极化的单层人结肠癌上皮细胞 Caco-2 被认为是与小肠上皮细胞最为相似的细胞, 广泛作为小肠上皮细胞转运和代谢的体外模型使用^[6]。本研究观察高浓度葡萄糖溶液对人结肠癌上皮细胞 Caco-2 胆固醇吸收的影响, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 Caco-2 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞分库, DMEM 培养基、胰蛋白酶购自美国 Hyclone 公司, 胆固醇购自美国 Sigma 公司, 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, CCK-8 试剂盒购自日本同人化学研究所, 胆固醇检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。胆固醇微胶溶液配制方法: 将浓度为 3 mmol/L 的胆盐、30 mol/L 的甘油单油酸脂、 1.25×10^5 μ mol/L 的¹⁴C-胆固醇加入 DMEM 培养液中, 使用超声将其混合均匀, 通过 0.20 μ m 滤膜过滤, 在 37℃ 保温箱保存。将胆固醇抑制剂(依折麦布)溶于 0.2% DMSO 中, 保存于 37℃ 保温箱。

1.2 方法

1.2.1 Caco-2 细胞培养 培养基选择含有 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 37℃、5% CO₂ 条件下进行培

养, 培养液 2 d 更换 1 次, 直至细胞长至培养瓶容积的 80%~90%, 进行传代培养, 选择对数期和生殖状态均比较稳定的细胞, 采用 10% DMSO 冷冻于 -80℃ 的冰箱备用。

1.2.2 CCK-8 检测细胞增殖 将 Caco-2 细胞以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板, 设置 5 个复孔, 在培养箱中放置 12 h, 直至细胞贴壁, 分别加入浓度为 12.5、100.0、300.0、700.0、1 000.0、1 388.0 mmol/L 的葡萄糖溶液 50 μ L 进行 24 h 培养, 然后加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液, 再培养 2 h, 使用酶标仪检测 450 nm 波长的吸光度(OD)值, 计算细胞增殖率, 确定葡萄糖溶液对 Caco-2 细胞的半数抑制浓度。细胞增殖率 = $A2 + (A1 - A2) / 1 + (X/X0)$, 其中 A 为 3 次 OD 均值, X 为葡萄糖溶液浓度。

1.2.3 检测 Caco-2 细胞胆固醇吸收量 将 Caco-2 细胞分为胆固醇组、胆固醇+依折麦布组、空白组。胆固醇组: 向培养板中加入 100 μ mol/L 的胆固醇溶液及 5.0、25.0、50.0 mmol/L 的葡萄糖溶液, 孵育 24 h。胆固醇+依折麦布组: 向培养板中加入 100 μ mol/L 依折麦布和 100 μ mol/L 胆固醇溶液及 5.0、25.0、50.0 mmol/L 的葡萄糖溶液, 孵育 24 h。空白组: 向培养板中加入 DMEM 培养基及对应浓度的 DMSO。根据胆固醇测试说明书, 使用分光光度计比色, 测定 OD。胆固醇浓度 = (标本 OD 值 - 空白 OD 值) $\times$ 校准品浓度 / (校准 OD 值 - 空白 OD 值) $\times$ 待测标本蛋白浓度。重复 3 次试验取平均值作为最终检测结果。

1.2.4 WB 检测 ABCG8、ABCG5、NPC1L1、SR-BI

蛋白表达 将 Caco-2 细胞分为葡萄糖组、葡萄糖+依折麦布组、对照组。葡萄糖组:分别加入 5.0、25.0、50.0 mmol/L 的葡萄糖溶液。葡萄糖+依折麦布组:分别加入 5.0、25.0、50.0 mmol/L 的葡萄糖溶液和 100 μmol/L 依折麦布。对照组:加入 100 μmol/L 依折麦布。各组均培养 24 h,然后洗涤细胞,加入 RIPA 裂解液,对细胞总蛋白进行提取。使用 BCA 蛋白定量试剂对其进行蛋白定量,使用 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒配制 10%分离胶及 5%浓缩胶,电泳,然后转运蛋白至 PVDF 膜,加入 5%牛奶封闭 2 h,加入一抗,4 ℃孵育过夜,加入二抗,室温孵育 1.5 h,使用电化学发光试剂盒显影,凝胶图像系统对各蛋白条灰度值进行分析,试验操作重复 3 次,取平均值。以目的蛋白与内参照 GAPDH 灰度值的比较作为目的蛋白表达水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件对数据进行处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度葡萄糖溶液对 Caco-2 细胞增殖的影响 CCK-8 检测结果显示,葡萄糖溶液浓度为 12.5、100.0、300.0、700.0、1 000.0、1 388.0 mmol/L 时,Caco-2 细胞增殖率分别为 $(1.381 \pm 0.051)\%$ 、 $(1.239 \pm 0.069)\%$ 、 $(0.737 \pm 0.031)\%$ 、 $(0.334 \pm 0.020)\%$ 、 $(0.315 \pm 0.022)\%$ 、 $(0.284 \pm 0.009)\%$,不同葡萄糖溶液浓度 Caco-2 细胞增殖率差异有统计学

意义($P < 0.05$),葡萄糖溶液对于 Caco-2 细胞半数抑制浓度为 281.18 mmol/L。

2.2 不同浓度葡萄糖溶液对 Caco-2 细胞胆固醇吸收量的影响 见表 1。在 5.0、25.0、50.0 mmol/L 的葡萄糖溶液中,胆固醇组 Caco-2 细胞胆固醇吸收量均明显高于胆固醇+依折麦布组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),但其差异随葡萄糖溶液浓度增加而减少。

表 1 不同浓度葡萄糖溶液对两组 Caco-2 细胞胆固醇吸收量比较($\bar{x} \pm s$)				
葡萄糖溶液浓度(mmol/L)	组别	Caco-2 细胞胆固醇吸收量(mmol/L)	<i>t</i>	<i>P</i>
5.0	胆固醇组	0.281±0.039	59.463	0.000
	胆固醇+依折麦布组	0.043±0.009		
25.0	胆固醇组	0.384±0.067	29.751	0.000
	胆固醇+依折麦布组	0.182±0.011		
50.0	胆固醇组	0.392±0.052	19.822	0.000
	胆固醇+依折麦布组	0.273±0.030		

2.3 不同浓度葡萄糖溶液对 Caco-2 细胞胆固醇转运基因 ABCG8、ABCG5、NPC1L1、SR-BI 表达的影响 见表 2。WB 检测结果显示,高浓度葡萄糖对 Caco-2 细胞胆固醇转运基因 ABCG8、ABCG5、SR-BI 表达无明显影响,但对 NPC1L1 基因表达的影响明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 不同浓度葡萄糖溶液对两组 Caco-2 细胞转运蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)					
葡萄糖溶液浓度(mmol/L)	组别	ABCG8	ABCG5	NPC1L1	SR-BI
5.0	葡萄糖组	0.403±0.031	0.574±0.069	0.276±0.018	0.457±0.035
	葡萄糖+依折麦布组	0.398±0.049	0.582±0.045	0.059±0.003	0.461±0.055
	<i>t</i>	0.862	0.971	118.915	0.614
	<i>P</i>	0.390	0.333	0.000	0.540
25.0	葡萄糖组	0.449±0.052	0.581±0.067	0.567±0.022	0.472±0.053
	葡萄糖+依折麦布组	0.443±0.067	0.593±0.047	0.057±0.004	0.482±0.039
	<i>t</i>	0.707	1.466	228.079	1.520
	<i>P</i>	0.480	0.144	0.000	0.130
50.0	葡萄糖组	0.467±0.057	0.611±0.029	0.574±0.005	0.509±0.076
	葡萄糖+依折麦布组	0.460±0.072	0.608±0.059	0.071±0.009	0.498±0.066
	<i>t</i>	0.762	0.456	488.557	1.093
	<i>P</i>	0.447	0.649	0.000	0.276

3 讨 论

Caco-2 细胞模型是一种结构和功能与分化的小肠上皮细胞非常类似的细胞,其具有微绒毛等结构及小肠刷状缘上皮相关的酶系,因此往往应用在模拟肠转运的相关研究中^[7]。本研究通过 Caco-2 细胞的这种特性观察高浓度葡萄糖溶液对其胆固醇吸收情况的影响,以此验证高浓度葡萄糖对人体小肠细胞胆固醇吸收的影响。

胆石症是成年人好发的一种消化系统疾病,其发

病率随年龄增长而升高^[8-9]。胆石症的病因尚未完全清楚,但是认为所有影响胆固醇与胆汁酸浓度比例改变及造成胆汁淤滞的因素均可影响胆结石形成,因为胆汁酸减少或者胆固醇过多均可导致胆汁中的胆固醇呈现过饱和状态,从而使其沉淀析出,形成胆结石,而影响这一过程的因素有多种^[10]。近年来研究表明,血糖控制不佳的糖尿病患者,其合并胆石症的概率比非糖尿病患者高 1~2 倍^[11]。

本研究 CCK-8 检测结果显示,在不同浓度葡萄

糖溶液中, Caco-2 细胞增殖差异有统计学意义($P < 0.05$), 葡萄糖对于 Caco-2 细胞半数抑制浓度为 281.18 mmol/L。Caco-2 细胞增殖率随葡萄糖浓度升高而降低, 在 5.0、25.0L、50.0 mmol/L 的葡萄糖溶液中, 胆固醇组 Caco-2 细胞胆固醇吸收量均明显高于胆固醇+依折麦布组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 但其差异随葡萄糖溶液浓度增加而减少, 说明依折麦布能够降低胆固醇的吸收率。从基因角度来看, WB 检测结果显示, 高浓度葡萄糖对 Caco-2 细胞胆固醇转运基因 ABCG8、ABCG5、SR-BI 表达无明显影响, 但是对 NPC1L1 基因表达影响明显, 且差异有统计学意义($P < 0.05$)。NPC1L1 基因在 Caco-2 细胞中出现高表达, 说明这是胆固醇在肠道吸收过程中起关键作用的转运蛋白, 因此, 在调节小肠对胆固醇的重吸收过程中起重要作用, 是胆固醇吸收抑制剂依折麦布分子的作用靶点。

综上所述, 高浓度葡萄糖溶液可能通过增加 Caco-2 细胞中 NPC1L1 蛋白的表达起到促进胆固醇重吸收的作用, 这可能是导致糖尿病患者增加合并胆石症概率的重要因素。

参考文献

- [1] 陈锐, 王展, 黄寿奖, 等. 高血糖环境对胃癌组织及胃癌细胞 P 糖蛋白和拓扑异构酶 2a 表达的影响[J]. 浙江医学, 2015, 37(23): 1887-1890.
- [2] 孙启天, 高宇, 刘晓燕, 等. 高糖、高胰岛素及二甲双胍对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响[J]. 承德医学院学报, 2014, 31(1): 1-3.
- [3] ZHAO W, CHEN R, ZHAO M, et al. High glucose promotes gastric cancer chemoresistance in vivo and in vitro

[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(1): 843-850.

- [4] 任关侠, 周健, 张妍春. 高浓度葡萄糖对人晶状体上皮细胞迁移的影响[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(4): 1646-1650.
- [5] YOON J J, LEE Y J, KIM J S, et al. Betulinic acid inhibits high glucose-induced vascular smooth muscle cells proliferation and migration [J]. J Cell Biochem, 2010, 111(6): 1501-1511.
- [6] GOURIET F, SABA Y, DELAUNAY E, et al. Incidental diagnosis of colonic tumor by PET/CT in infectious endocarditis[J]. J Infect, 2013, 67(1): 88-90.
- [7] ORTEGA-CANDIL A, RODRÍGUEZ-REY C, CABRERA-MARTÍN M N, et al. 18F-FDG PET/CT imaging of schwannoma mimicking colorectal cancer metastasis[J]. Rev Esp Med Nucl Imagen Mol, 2013, 32(5): 332-333.
- [8] 张国旭, 郭佳. PET/CT 在结肠癌诊断中的应用现状[J]. 医学综述, 2012, 18(12): 1914-1916.
- [9] OH J R, MIN J J, SONG H C, et al. A stepwise approach using metabolic volume and SUVmax to differentiate malignancy and dysplasia from benign colonic uptakes on 18F-FDG PET/CT[J]. Clin Nucl Med, 2012, 37(6): e134-e140.
- [10] KIM B H, KIM S J. Diagnostic value of metabolic tumor volume assessed by 18F-FDG PET/CT added to SUVmax for characterization of thyroid 18F-FDG incidentaloma[J]. Nucl Med Commun, 2013, 34(9): 868-876.
- [11] 王大龙, 于丽娟, 田墨涵. (18)F-FDG PET/CT 显像在结肠癌术前分期中的价值[J]. 临床放射学杂志, 2012, 31(1): 70-74.

(收稿日期: 2017-10-30 修回日期: 2018-01-25)

• 临床探讨 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2018.12.041

孕妇产前期并发糖代谢异常对新生儿的影响

尕项卓玛¹, 简勤勤², 秦风雪³

(1. 青海省西宁市第二人民医院产科 810000; 2. 青海省人民医院妇产科, 西宁 810000; 3. 青海省交通医院产科, 西宁 810000)

摘要:目的 探究孕妇产前期并发糖代谢异常对新生儿的影响。方法 回顾性分析 2013 年 1 月至 2017 年 1 月西宁市第二人民医院收治的 76 例孕妇产前期孕母的临床资料, 依据孕母是否合并糖代谢异常将其分为糖代谢异常组(22 例)和非糖代谢异常组(54 例)。比较两组孕母胎盘病理、并发症和新生儿并发症情况。结果 糖代谢异常组绒毛膜羊膜炎发生率明显高于非糖代谢异常组, 差异有统计学意义($\chi^2 = 2.569, P = 0.012$); 糖代谢异常组早产、羊水过多、胎儿宫内窘迫发生率明显高于非糖代谢异常组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 糖代谢异常组与非糖代谢异常组早产儿、大于胎龄儿、小于胎龄儿、高胆红素血症、新生儿呼吸窘迫综合征、低体质量儿发生率比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 孕妇产前期并发糖代谢异常孕妇不良妊娠结局发生率较高。

关键词: 孕妇产前期; 糖代谢异常; 孕妇产前期; 胎盘; 新生儿

中图分类号: R715.3

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)12-1830-03

孕妇产前期是常见的妊娠期并发症之一, 我国发病率为 9.4%~10.4%, 是指孕 20 周后出现的舒张压 $\geq$