

[文章编号] 1674-8115(2011)07-0900-05

· 论 著 ·

尿毒症患者血清对体外培养的血管内皮细胞的损伤作用

李 聪, 郝 旭, 周 桥, 卢 颖, 王伟铭, 陈 楠

(上海交通大学医学院附属瑞金医院肾内科, 上海 200025)

[摘要] **目的** 探讨尿毒症患者血清干预对体外培养的血管内皮细胞的作用及临床意义。**方法** 分别以尿毒症患者和正常健康者血清(体积分数均为 25%)处理人脐静脉内皮细胞(HUVEC)(尿毒症血清组和正常血清组, $n=10$) 24 h, 设立空白对照组。光学显微镜观察细胞形态; 流式细胞术检测细胞凋亡率; Real-Time PCR 检测细胞内白介素 8(IL-8)、内皮素 1(ET-1) 和内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的 mRNA 表达; 收集细胞培养上清液, 酶联免疫 ELISA 法检测 IL-8 和 ET-1 的质量浓度, 硝酸盐还原法检测一氧化氮(NO)浓度。以不同体积分数(10%、15%、20%、25%)的尿毒症患者血清处理 HUVEC 24 h, MTS 比色法检测细胞增殖率。**结果** 与空白对照组和正常血清组比较, 尿毒症血清组 HUVEC 的细胞数量明显减少, 核固缩、边缘化, 胞质浓缩; 尿毒症血清组细胞凋亡率为 $(55.59 \pm 5.21)\%$, 显著高于正常血清组的 $(12.20 \pm 6.20)\%$ 和空白对照组的 $(0.38 \pm 0.31)\%$ ($P < 0.05$); 与正常血清组比较, 尿毒症血清组 HUVEC 中 IL-8、ET-1 mRNA 表达上调, eNOS mRNA 表达下调; 细胞培养上清中 IL-8、ET-1 的质量浓度升高, NO 浓度降低(均 $P < 0.05$)。不同体积分数尿毒症血清处理 HUVEC 的细胞增殖率均显著低于相应正常血清组和空白对照组($P < 0.05$)。**结论** 尿毒症患者血清干预使 HUVEC 细胞形态发生改变, 抑制细胞增殖并促进细胞凋亡, 使细胞 IL-8 和 ET-1 分泌增加而 NO 分泌减少, 导致血管内皮细胞功能受损。提示尿毒症患者长期处于慢性炎症状态, 心血管疾病的发病风险较高。

[关键词] 尿毒症; 血管内皮细胞; 白介素 8; 内皮素 1; 内皮型一氧化氮合酶

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.07.007

[中图分类号] R692.5

[文献标志码] A

In vitro injury effects of sera of patients with uremia on vascular endothelial cells

LI Cong, HAO Xu, ZHOU Qiao, LU Ying, WANG Wei-ming, CHEN Nan

(Department of Nephrology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the *in vitro* effects of sera of patients with uremia on vascular endothelial cells, and explore their clinical significance. **Methods** Human umbilical vascular endothelial cells (HUVEC) were treated with sera of patients with uremia (uremic serum group, $n=10$) and healthy controls (normal serum group, $n=10$) (volume fraction of 25% for both group) for 24 h, and blank control group was established. The cell morphology was observed by immunohistochemical staining, cell apoptotic rates were determined by flow cytometry, and Real-Time PCR was employed to detect the expression of interleukin-8 (IL-8), endothelin-1 (ET-1) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA in cells. The culture supernatant fluid was collected, the mass concentrations of IL-8 and ET-1 were measured by ELISA, and the concentration of nitric oxide (NO) was determined by nitrate reduction method. HUVEC were treated with sera of patients with uremia of different volume fractions (10%, 15%, 20% and 25%), and cell proliferation rates were determined by MTS method. **Results** The number of HUVEC in uremic serum group was smaller than those of blank control group and normal serum group, and condensed or fragmented nuclei and condensed cytoplasm were observed in uremic serum group. The cell apoptotic rate in uremic serum group [$(55.59 \pm 5.21)\%$] was significantly higher than those in normal serum group [$(12.20 \pm 6.20)\%$] and blank control group [$(0.38 \pm 0.31)\%$] ($P < 0.05$). Compared with normal serum group, the expression of IL-8 and ET-1 mRNA in HUVEC increased, the expression of eNOS mRNA in HUVEC decreased, the mass concentrations of IL-8 and ET-1 in cell supernatant fluid increased, and the concentration of NO decreased in uremic serum group. The cell proliferation rates of HUVEC treated with uremic sera of different volume fractions were significantly lower than corresponding ones in normal serum group and blank control group ($P < 0.05$).

[基金项目] 上海市科委重大课题(08dz1900502) (Shanghai Science and Technology Committee Foundation, 08dz1900502)。

[作者简介] 李 聪(1984—), 女, 硕士生; 电子信箱: licong6521@163.com。

[通信作者] 陈 楠, 电子信箱: Chen-nan@medmail.com.cn。

Conclusion Treatment with sera of patients with uremia may change the morphology, inhibit the proliferation, promote the apoptosis, enhance the secretion of IL-8 and ET-1 and inhibit the secretion of eNOS and NO of HUVEC, and lead to the dysfunction of vascular endothelial cells. Patients with uremia are under chronic inflammatory state in a long term, and may have a greater risk of developing cardiovascular diseases.

[Key words] uremia; vascular endothelial cell; interleukin-8; endothelin-1; endothelial nitric oxide synthetase

血管内皮细胞衬于整个心血管系统的内表面,参与维持血液的正常流动状态,是形成心血管封闭管道系统的形态基础。现已证明,血管内皮细胞在维持血管内外物质转运、抗凝、抗血栓形成等方面发挥重要作用。

内皮功能正常的动脉在血流增加时因一氧化氮(NO)的释放而扩张,而内皮功能异常的动脉在血流增加时这种反应下降或消失,这种内皮细胞依赖的血流介导的血管舒张反应下降称为内皮功能障碍(endothelial dysfunction, ED)^[1]。Vita等^[1]发现:动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)高危人群可能已存在ED,其不仅从AS开始到后期出现临床症状的过程中扮演主要角色,而且对诸如猝死、急性心肌梗死、不稳定型心绞痛和卒中等心脑血管事件的发生具有预测作用。

受损的血管内皮细胞合成和释放内皮衍生性舒张因子(endothelium derived relaxing factor, EDRF) NO减少引起内皮依赖性舒张功能受损,而内皮素1(endothelin-1, ET-1)分泌增多,使ET-1/NO平衡失调导致血管收缩力增强,血管壁结构发生变化,血压升高。血管内皮细胞在抑制血管壁炎症方面具有重要作用,ED时各种炎症因子释放增多,血小板聚集能力增强,促凝物质增多,促使AS发展。

尿毒症患者的血液中积累了大量的毒素,而这些患者心血管并发症的发病率较高。目前,关于尿毒症患者血清对血管内皮细胞损伤的研究尚少;因此,本研究通过观察尿毒症患者血清对体外培养的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vascular endothelial cell, HUVEC)分泌炎症因子及内皮活性因子的影响,探讨尿毒症患者血清对血管内皮细胞的损伤作用。

1 材料与方法

1.1 材料

HUVEC细胞株(上海瑞金医院高血压研究所馈赠);Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit(Bender Medsystems);CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega)。无菌管收集10例尿毒症患者和10名健康志愿者全血各5 mL,3 000 r/min离心10 min分离血清,-80℃保存备用。

1.2 细胞培养和分组

1.2.1 细胞培养 将HUVEC置于含10%胎牛血清、0.1 g/L肝素的DMEM培养基中,移入细胞培养箱中,于37℃、5% CO₂及饱和湿度条件下培养。贴壁生长至融合状态,用0.25%胰蛋白酶-0.53 mmol/L EDTA消化,选择生长状态良好的细胞进行传代。将HUVEC以10⁴个/cm²接种在6孔板或96孔板,细胞贴壁融合达70%~80%时,更换为无血清的DMEM培养液培养过夜。

1.2.2 分组干预 收集细胞,分别以加入含不同体积分数(10%、15%、20%、25%)的尿毒症患者血清(尿毒症血清组)或健康人血清(正常血清组)或胎牛血清(空白对照组)的DMEM培养基处理24 h。

1.3 观察和检测

1.3.1 细胞形态学观察 选择25%尿毒症血清组及相应正常血清组和空白对照组HUVEC进行实验。盖玻片防脱片处理后放入6孔板中,每孔加入0.2%明胶2 mL,6孔板置细胞培养箱中,于37℃、5% CO₂及饱和湿度条件下孵育1 h,吸出明胶回收,将6孔板在无菌操作台吹干2 h。细胞爬片后,PBS冲洗2次,4%多聚甲醛固定30 min,PBS冲洗3次,每次5 min。1%BSA封闭,加入Monoclonal Anti-human CD31(R&D),4℃孵育过夜,DAB试剂盒显色,苏木精复染,盐酸乙醇分化,乙醇脱水。重复3次。光学显微镜下观察细胞形态。

1.3.2 MTS比色法检测细胞增殖 选择10%、15%、20%、25%尿毒症血清组及相应正常血清组和空白对照组HUVEC进行实验。每孔加20 μL Cell Titer 96[®] Aqueous One Solution Reagent,置细胞培养箱中,于37℃、5% CO₂及饱和湿度条件下孵育2 h,测490 nm波长的吸光度值。另设不加细胞的含有与实验孔同样体积CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Reagent的细胞培养基作为本底。3个复孔,重复3次实验。计算各组细胞增殖率。

1.3.3 流式细胞术检测细胞凋亡 选择25%尿毒症血清组及相应正常血清组和空白对照组HUVEC进行实验。收集细胞,PBS冲洗2次,用1×结合缓冲液调节细胞为1×10⁶个/mL,取100 μL细胞加入5 μL Annexin-V,避光反应10 min,再加入100 μL结

合缓冲液和 1 μL PI,混匀后上流式细胞仪检测细胞凋亡。重复 3 次,取均值。

1.3.4 Real-Time PCR 检测 选择 25% 尿毒症血清组及相应正常血清组 HUVEC 进行实验。TRIzol 法提取 RNA 后反转录合成 cDNA,Real-Time PCR 检测内皮细胞白介素 8(interleukin-8,IL-8)、ET-1 和内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase,eNOS)的 mRNA 表达。Real-Time PCR 引物序列见表 1,由 bioT-NT 公司合成。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预反应 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环。重复 3 次。

1.3.5 ELISA 双抗夹心法检测 收集 25% 尿毒症血清组及相应正常血清组和空白对照组 HUVEC 细胞培养上清液,ELISA 双抗夹心法检测 IL-8 和 ET-1。按照试剂盒(RayBiotech)说明书进行操作。加入 100 μL 标准品和 100 μL 标本于相应反应板孔中。轻轻混匀 30 s,封住板孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 90 min。每孔加入 350 μL 洗涤液洗板 5 次;然后加入 100 μL 1 \times 生物

素,混匀封板,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 60 min;洗板 5 次,加入 100 μL 1 \times 辣根过氧化物酶,混匀封板,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min;洗板 5 次,每孔加入 50 μL 显色液 A 和 50 μL 显色液 B,混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 暗处温育 15 min;加入 100 μL 终止液,混匀,测 450 nm 波长的吸光度值并换算为质量浓度(pg/mL)。重复 3 次,取均值。

1.3.6 硝酸盐还原法检测 收集 25% 尿毒症血清组及相应正常血清组和空白对照组 HUVEC 细胞培养上清液,硝酸盐还原法检测 NO。按照试剂盒(Beyotime)说明书进行操作。在酶联板相应孔中加入样品稀释液、标准品、样品各 60 μL ,然后加入 2 mmol/L NADPH 5 μL 、FAD 10 μL 、Nitrate Reductase 5 μL ,混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min;加入 LDH buffer 10 μL 、LDH 10 μL ,混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 再孵育 5 min;加入 Griess Reagent I 和 Griess Reagent II 各 50 μL ,混匀后室温孵育 10 min;测 450 nm 波长的吸光度值并计算 NO 浓度($\mu\text{mol/L}$)。重复 3 次,取均值。

表 1 PCR 引物序列及产物长度

Tab 1 Sequences of primers and size of products for PCR

基因	上游引物序列(5'→3')	下游引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
IL-8	TCAGAGACAGCAGAGCACAC	TTAGCACTGCTTGGCAAAAC	171
ET-1	ATGATTTGGGTCAACACTC	CTAGCAGATTGGCATCTATT	128
eNOS	CCACTGACATGCGGACGAC	CTTGCTTTCCACAGCGGACGAC	116
β -actin	AAGGTGACAGCACTCGGT T	TGTTGCGACTTGGGAGAGG	195

1.4 统计学方法

应用 GraphPad prism 5 软件进行统计学处理。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。Real-Time PCR 检测结果经 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 处理后采用非配对 t 检验进行比较分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

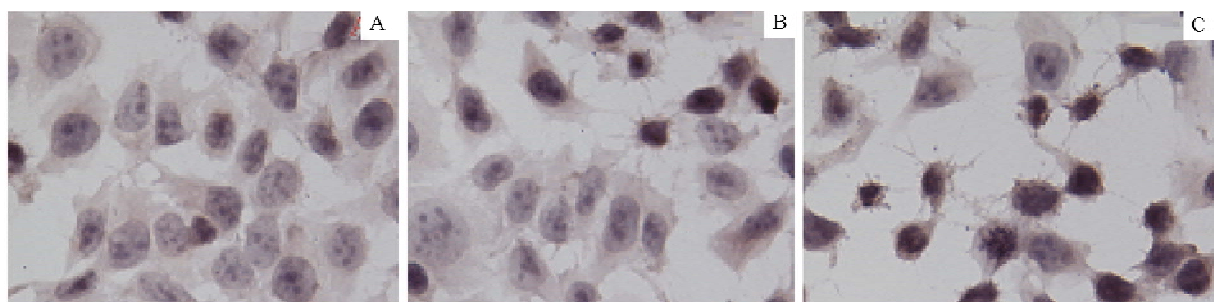
2.1 细胞形态学改变

光学显微镜观察发现:空白对照组 HUVEC 生长

致密,呈多角形,如铺路石状;细胞核大,细胞贴壁,胞体上突起向四周伸展。正常血清组 HUVEC 中的正常细胞数量较多,大部分细胞形态与空白对照组 HUVEC 基本一致。25% 尿毒症血清组 HUVEC 数量明显减少,核固缩、边缘化,胞质浓缩(图 1)。

2.2 细胞增殖率比较

MTS 比色法检测结果显示:与相应正常血清组和空白对照组比较,不同体积分数尿毒症血清组的细胞增殖率明显低下,组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),在一定范围内呈现量效关系(图 2)。



A. 空白对照组; B. 正常血清组; C. 尿毒症血清组。

图 1 免疫细胞化学染色光学显微镜观察 HUVEC 形态学改变 $\times 400$

Fig 1 Morphological changes of HUVEC observed by light microscopy with immunocytochemical staining $\times 400$

2.3 细胞凋亡率比较

流式细胞仪检测结果显示:25%尿毒症血清组、正常血清组和空白对照组 HUVEC 的细胞凋亡率分别为 $(55.59 \pm 5.21)\%$ 、 $(12.20 \pm 6.20)\%$ 和 $(0.38 \pm 0.31)\%$,组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$) (图 3)。

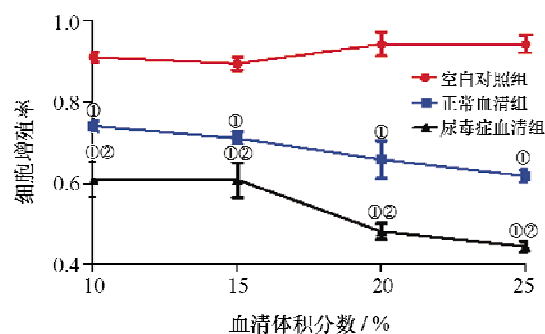
2.4 HUVEC 中 IL-8、ET-1、eNOS mRNA 表达比较

Real-Time PCR 检测结果显示:与正常血清组比较,25%尿毒症血清组 HUVEC 的 IL-8 和 ET-1 mRNA 表达显著上调,eNOS mRNA 表达明显下调,两组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$) (图 4)。

2.5 细胞培养上清液中 IL-8、ET-1 和 NO 浓度比较

ELISA 检测结果显示:正常血清组和尿毒症血清组细胞培养上清液中 IL-8 质量浓度分别为 $(495.3 \pm 11.89) \text{ pg/mL}$ 和 $(643.6 \pm 45.40) \text{ pg/mL}$,ET-1 的质量浓度分别为 $(42.11 \pm 0.6213) \text{ pg/mL}$ 和 $(47.78 \pm$

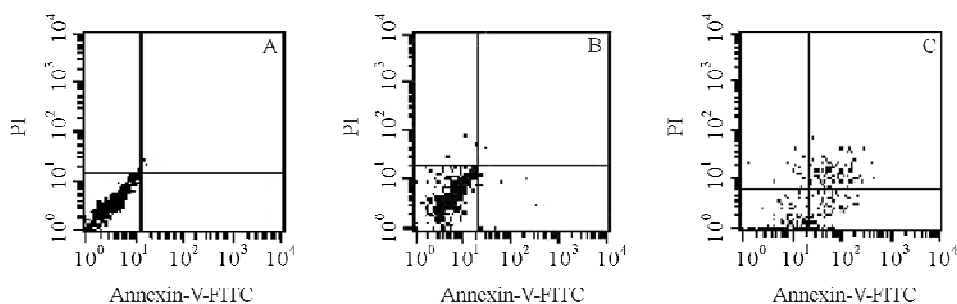
$1.070) \text{ pg/mL}$,组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。硝酸盐还原法检测结果显示:正常血清组和尿毒症血清组细胞培养上清液中的 NO 浓度分别为 $(49.30 \pm 0.97) \mu\text{mol/L}$ 和 $(11.81 \pm 4.36) \mu\text{mol/L}$,组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。



① $P < 0.05$ 与空白对照组比较; ② $P < 0.05$ 与正常血清组比较。

图 2 各组 HUVEC 细胞增殖率比较

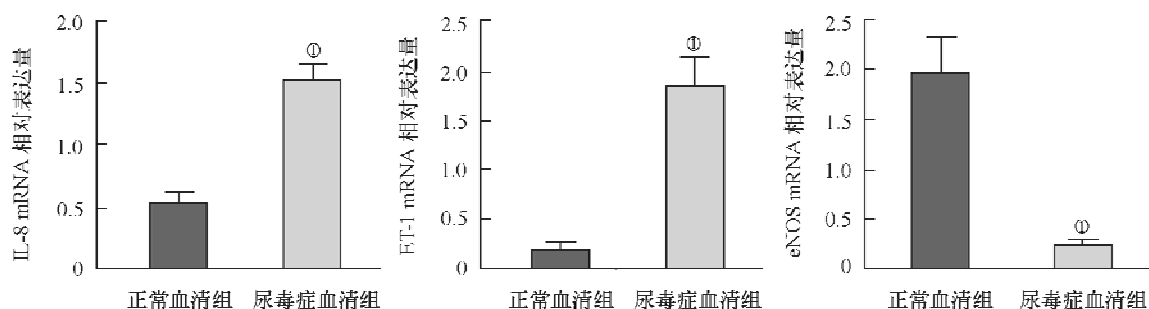
Fig 2 Proliferation of HUVEC in each group



A. 空白对照组; B. 正常血清组; C. 尿毒症血清组。

图 3 各组 HUVEC 细胞凋亡率比较

Fig 3 Apoptosis of HUVEC in each group



① $P < 0.05$ 与正常血清组比较。

图 4 正常血清组与尿毒症血清组 HUVEC 的 IL-8、ET-1、eNOS mRNA 表达比较

Fig 4 Expression of IL-8, ET-1 and eNOS mRNA in HUVEC of normal serum group and uremic serum group

3 讨论

慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 是导致心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 及死亡的危险因素之一^[2];尤其是发展至终末期肾病 (end-stage renal disease, ESRD) 的患者风险明显升高。CKD 与 CVD 密切相连,不仅具有共同的危险因素和

发病机制,而且互为因果,交互动联。一方面,心脑血管疾病位居我国死亡原因的首位,而 CKD 是 CVD 发生的独立危险因素;另一方面 CVD 是 CKD 患者最主要的并发症和死亡原因,慢性肾脏衰竭患者 CKD 的病死率是普通人群的 35 倍。

心血管损害是尿毒症毒素最重要的毒性作用之一,因为 CVD 是引起 ESRD 患者死亡的主要原因^[3]。

ESRD 患者 AS 的发生率比同龄一般人群高 10 ~ 15 倍,发病年龄提前至 30 ~ 40 岁,被称之为“加速性 AS”。ESRD 患者 AS 加速发生的原因尚未阐明,多数学者认为与 ESRD 患者普遍存在高血压、高脂血症等传统危险因素和一些尿毒症所特有的危险因素有关,后者包括微炎症、氧化应激和羰基应激等近年受到关注的病理生理征象。尿毒症的诸多并发症(如贫血、微炎症等)也对心血管的结构和功能产生影响;其中微炎症可以通过多种机制使 CKD 患者发生 CVD。营养不良和微炎症可促进心血管钙化的发生^[4]。心血管钙化被认为是促成 CKD 和 ESRD 患者因心血管事件而死亡的因素。CKD 患者的微炎症状态与前促凝素和血小板激活因子(血浆血管假性血友病因子和可溶性 P-选择素)有关,而这些因子又可引起内皮功能紊乱^[5]。

内皮细胞作为血管内皮基本的结构和功能单位,它的一个重要功能就是发挥屏障功能、调节血管内外的物质交换、维持内环境的稳定,使邻近或远端的组织器官免受损害。本研究发现在尿毒症患者血清的刺激下,HUVEC 细胞形态发生改变,核固缩,胞质浓缩;细胞增殖受到抑制。尿毒症患者血清还可使 HUVEC 的细胞凋亡率上升;但本实验发现,正常人血清也可使 HUVEC 细胞发生凋亡及使细胞增殖受到抑制,其原因可能是正常人血清中也有一些复杂的细胞因子,在体外培养或处理的过程中,也可诱导细胞凋亡及抑制细胞增殖;或者在操作的过程中,损失了一些抑制细胞凋亡的细胞因子,使部分细胞发生了凋亡;还可能因为 HUVEC 细胞株比较脆弱,培养条件比较严格,人的血清中成分复杂,而未经过处理的胎牛血清更适合细胞生长。

尿毒症患者长期遭受慢性炎症,导致内皮损伤^[6],而这又是 AS 发病的关键因素^[7]。作为炎症因子的代表,IL-8 是由 IL-1 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)等从巨噬细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞诱导产生的炎性介质,在炎症和免疫反应中起重要的调节作用。体外实验^[8]表明:IL-8 有显著的中性粒细胞趋化作用;其作用呈剂量依赖性,快速而持久;通过动员 Ca^{2+} 内储,增加 Ca^{2+} 内流使细胞内游离 Ca^{2+} 浓度增加,诱导细胞变形反应、脱颗粒反应,引起细胞呼吸爆发,使活性氧产生的速率及总量增加;IL-8 水平与活性氧的释放呈显著正相关。IL-8 可诱导产生溶酶体、毒性代谢产物并激活花生四烯酸-5-脂氧化酶产生白三烯,使血管通透性增

加,血浆蛋白渗出;还能促进粒细胞增生。体内实验也证实,IL-8 能活化中性粒细胞,增加超氧阴离子和 H_2O_2 释放,从而造成细胞的损伤。此外,IL-8 对淋巴细胞和其他免疫细胞也有趋化和活化作用。Kukieika 等^[9]在动物实验中发现,心肌缺血 3 ~ 4 h 后,可在心肌组织中检测到 IL-8 mRNA,且 IL-8 mRNA 的表达与心肌损伤程度呈正相关。在本研究中,尿毒症患者的血清可使 HUVEC 产生大量 IL-8,使 HUVEC 受到损伤。

内皮素是迄今所知作用最强、持续最久的缩血管活性多肽。人体内的内皮素有 3 种异形肽,其中 ET-1 主要在内皮细胞内表达,通过旁分泌方式调节局部血管紧张度;其通过激活钙通道,增加钙离子内流,促进血管平滑肌细胞收缩。在内皮损伤时,ET-1 合成或释放增加,并与其在血管平滑肌细胞上的受体结合,调节血管的紧张度而使血管收缩,同时作为一种生长因子,ET-1 通过刺激血管平滑肌细胞增殖,参与并促进高血压的发生和发展。NO 是内皮细胞膜上 eNOS 产生的舒张因子,有很强的舒血管和对抗血小板凝集的功能,通过 cGMP 或 cAMP 途径降低细胞内钙离子浓度或阻断钙离子内流,使平滑肌细胞舒张。在正常情况下,ET-1 与 NO 保持平衡状态。本研究结果显示:在尿毒症患者的血清刺激下,HUVEC ET-1 mRNA 表达上调,ET-1 合成和分泌增加,而 HUVEC eNOS mRNA 表达下调,NO 合成和分泌减少,致使内皮功能失衡。

综上所述,尿毒症患者心血管事件增多可能与尿毒症毒素在体内的蓄积及长期慢性炎症因子的刺激,激活了体内炎症反应,使血管内皮细胞产生大量炎症因子,血管收缩/舒张因子失衡,最终导致内皮功能受损有关。

[参考文献]

- [1] Vita JA, Keaney JF Jr. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? [J]. *Circulation*, 2002, 106(6): 640-642.
- [2] Zoccali C. Traditional and emerging cardiovascular and renal risk factors: an epidemiologic perspective [J]. *Kidney Int*, 2006, 70(1): 26-33.
- [3] Van Biesen W, De Bacquer D, Verbeke F, et al. The glomerular filtration rate in an apparently healthy population and its relation with cardiovascular mortality during 10 years [J]. *Eur Heart J*, 2009, 28(4): 478-483.
- [4] Schwarz U, Buzello M, Ritz E, et al. Morphology of coronary artery atherosclerotic lesions in patients with end-stage renal failure [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2000, 15(2): 218-223.

(下转第 941 页)

- (4): 247 - 249.
- [6] Stadler M, Pacini G, Petrie J, et al. Beta cell (dys)function in non-diabetic offspring of diabetic patients[J]. *Diabetologia*, 2009, 52(11): 2435 - 2444.
- [7] 安雅莉,高妍,朱倩,等. 中国新诊断 2 型糖尿病胰岛素分泌和胰岛素抵抗特点调查[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2008, 24(3): 256 - 260.
- [8] Marl A, Gastaldelli A, Natali A, et al. Characterization of beta-cell function impairment in first-degree relatives of type 2 diabetes subjects: modeling analysis of 24-h triple-meal tests[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 288(3): E541 - E546.
- [9] Sathiyapriya V, Bobby Z, Agrawal A, et al. Protein glycation, insulin sensitivity and pancreatic beta cell function in high-risk, non-diabetic, first degree relatives of patients with type 2 diabetes[J]. *Indian J Physiol Pharmacol*, 2009, 53(2): 163 - 168.
- [10] Shanker J, Kanjilal S, Rao VS, et al. Adult nontwin sib concordance rates for type 2 diabetes, hypertension and metabolic syndrome among Asian Indians: the Indian Atherosclerosis Research Study[J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2007, 3(6): 1063 - 1068.
- [11] Valdez R. Detecting undiagnosed type 2 diabetes: family history as a risk factor and screening tool[J]. *J Diabetes Sci Technol*, 2009, 3(4): 722 - 726.
- [12] Dunkley AJ, Taub NA, Davies MJ, et al. Is having a family history of type 2 diabetes or cardiovascular disease a predictive factor for metabolic syndrome? [J] *Prim Care Diabetes*, 2009, 3(1): 49 - 56.
- [13] Amini M, Horri N, Zare M, et al. People with impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose are similarly susceptible to cardiovascular disease: A study in first-degree relatives of type 2 diabetic patients[J]. *Ann Nutr Metab*, 2010, 56(4): 267 - 272.
- [14] Jeong SU, Kang DG, Lee DH, et al. Clinical characteristics of type 2 diabetes patients according to family history of diabetes[J]. *Korean Diabetes J*, 2010, 34(4): 222 - 228.
- [15] Iraj B, Taheri N, Amini M, et al. Should the first degree relatives of type 2 diabetic patients with isolated impaired fasting glucose be considered for a diabetes primary prevention program? [J] *J Res Med Sci*, 2010, 15(5): 264 - 269.
- [16] Janghorbani M, Amini M. Normalization of glucose intolerance in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010, 88(3): 295 - 301.
- [收稿日期] 2011-05-11 [本文编辑] 王淑平

(上接第 904 页)

- [5] Landray MJ, Wheeler DC, Lip GY, et al. Inflammation, endothelial dysfunction, and platelet activation in patients with chronic kidney disease: the chronic renal impairment in Birmingham (CRIB) study[J]. *Am J Kidney Dis*, 2004, 43(2): 244 - 253.
- [6] Pawlak K, Naumnik B, Brzóska S, et al. Oxidative stress - a link between endothelial injury, coagulation activation, and atherosclerosis in haemodialysis patients[J]. *Am J Nephrol*, 2004, 24(1): 154 - 161.
- [7] Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? [J] *Circulation*, 2004, 109(21Suppl 1): II27 - II33.
- [8] Wozniak A, Betts WH, Murphy GA, et al. Interleukin-8 primes human neutrophils for enhanced superoxide anion production[J]. *Immunology*, 1993, 79(4): 608 - 615.
- [9] Kukielka GL, Smith CW, LaRosa GJ, et al. Interleukin-8 gene induction in the myocardium after ischemia and reperfusion *in vivo* [J]. *J Clin Invest*, 1995, 95(1): 89 - 103.
- [收稿日期] 2011-04-19 [本文编辑] 王淑平