论著

文章编号:1000-5404(2010)13-1446-03

几丁糖对高糖腹透液刺激大鼠腹膜间皮细胞 TGF-β1 表达的影响

徐家云[1],樊小军[2],常 洁[1],马 沙[1],高 翔[1],田祥银[1],董少卿[1],王青苗[1] (471003 河南 洛阳,河南科技大学第一附属医院肾内科[1];710061 西安,西安交通大学医学院电镜室[2])

[摘要] **目的** 探讨高糖腹透液(4.25%)对大鼠二代腹膜间皮细胞 TGF-β1 表达的影响及几丁糖(chitosan)的干预作用。**方法** 取第2代鼠腹膜间皮细胞(rat peritoneal mesothelial cells, RPMC)(经细胞形态和免疫组化鉴定),随机分为4组($n=4$),A 组即对照组:DMEM/F12 培养基培养;B 组:DMEM/F12 培养基中加入 4.25% 葡萄糖透析液;C 组:DMEM/F12 培养基中加入 4.25% 葡萄糖透析液 + 几丁糖 1.2 mg/L;D 组:DMEM/F12 培养基中加入 4.25% 葡萄糖透析液 + 几丁糖 0.4 mg/L。培养 24 h 收集细胞提取 RNA,48 h 收集细胞提取蛋白,RT-PCR 检测腹膜间皮细胞 TGF-β1 mRNA 的表达。Western 印迹检测 TGF-β1 的蛋白表达。**结果** ①RPMC 经高糖腹透液(4.25%)刺激后,TGF-β1 mRNA 和蛋白的表达均上升,与 0 h 比较,TGF-β1 mRNA 和蛋白的表达分别于 24、48 h 时达到高峰,A、B 两组比较差异有统计学意义($P<0.05$);②24 h 时,几丁糖使 TGF-β1 mRNA 的表达下降明显($P<0.05$),B 组分别为 A 组的 2.51 倍、C 组的 2.13 倍、D 组的 1.68 倍,D 组为 C 组的 1.26 倍且抑制程度与几丁糖浓度呈正相关($r=0.948$, $P<0.01$)。48 h 时,几丁糖使 TGF-β1 的蛋白水平下降明显,B 组分别为 A 组的 1.85 倍、C 组的 1.52 倍、D 组的 1.24 倍,D 组为 C 组的 1.23 倍。C、D 两组分别与 B 组比较差异有统计学意义($P<0.05$),且抑制程度与几丁糖浓度呈正相关($r=0.831$, $P<0.05$)。**结论** ① 高糖腹透液可刺激 RPMC TGF-β1 mRNA 和蛋白表达上调;②几丁糖可抑制腹膜纤维化的中枢性因子 TGF-β1 表达的活性。

[关键词] 高糖腹透液;腹膜间皮细胞;转化生长因子-β1;几丁糖
[中图法分类号] R459.5; R329.5; R977.6 [文献标志码] A

Effect of chitosan on expression of transforming growth factor-β1 in peritoneum mesothelial cells stimulated by high-glucose peritoneal dialysate

Xu Jiayun[1], Fan Xiaojun[2], Chang Jie[1], Ma Sha[1], Gao Xiang[1], Tian Xiangyin[1], Dong Shaoqing[1], Wang Qingmiao[1] ([1]Department of Nephrology, First Affiliated Hopital, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan Province, 471003; [2]Department of Electron Microscopy, Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xian, Shaanxi Province, 710061, China)

[**Abstract**] Objective To study the effect of high-glucose peritoneal dialysate (4.25%) on expression of transforming growth factor-β1 (TGF-β1) in peritoneum mesothelial cells (PMC) and the interfering role of chitosan. Methods PMC (second generation), identified by their morphology and immunohistochemistry, were divided into group A (control group), group B, group C and group D, which were cultured with DMEM/F12, DMEM/F12 +4.25% glucose peritoneal dialysate, DMEM/F12 + 4.25% glucose peritoneal dialysate +1.2 mg/L chitosan, and DMEM/F12 +4.25% glucose peritoneal dialysate + 0.4 mg/L chitosan, respectively. RNA and protein were extracted from PMC, respectively, 24 and 48 h after culture. Expression of TGF-β1 mRNA and protein in PMC was detected by RT-PCR and Western blot analysis, respectively. Results The expression level of TGF-β1 mRNA and protein in PMC was higher after than before 4.25% glucose stimulation, and reached its peak at 24 and 48 h of culture, in groups A and B, respectively ($P<0.05$). Chitosan significantly up-regulated the expression of TGF-β1 mRNA and protein in PMC while it significantly down-regulated the expression of TGF-β1 mRNA at 24 h of culture. The expression of TGF-β1 mRNA was 2.51-fold, 2.13-fold, 1.68-fold higher in group B than in groups A, C, and D ($P<0.05$). Chitosan significantly decreased the expression of TGF-β1 protein at 48 h of culture. The expression of TGF-β1 protein was 1.85-fold, 1.52-fold, 1.24-fold lower in group B than in groups A, C, and D ($P<0.05$). Chitosan inhibited the expression of TGF-β1 protein in a concentration-dependent manner. Conclusion High glucose peritoneal dialysate (4.25%) can up-regulate the expression of TGF-β1 mRNA and protein in PMC. Chitosan can inhibit the expression activity of TGF-β1 during peritoneal fibrosis.

[**Key words**] high glucose peritoneal dialysate; peritoneum mesothelial cell; transforming growth factor-β1; chitosan

Corresponding author: Xu Jiayun, E-mail: xujiayun0285@163.com

[通信作者] 徐家云,E-mail: xujiayun0285@163.com

腹膜纤维化(peritoneal fibrosis,PF)是长期腹膜透析患者的重要并发症之一,最终因超滤衰竭而退出治疗[1]。近年研究证实,转化生长因子-β1(transforming growth factor-beta 1, TGF-β1)是各种组织发生纤维化的中枢性因子,已被公认。TGF-β1 不仅参与了腹膜纤维化发生、发展的全过程,而且在腹膜纤维化过程中起中枢作用[2-4]。水溶性几丁糖是一种具有良好生物相容性、生物可降解性及生物学活性的医用高分子多糖类物质,具有促进上皮细胞、内皮细胞生长而抑制成纤维细胞生长的生物特性。本研究通过检测 RPMC 中腹膜纤维化的中枢因子 TGF-β1 的表达,以观察高糖腹透液对 RPMC 中腹膜纤维化的中枢因子 TGF-β1 的影响,及几丁糖对其表达的干预作用,作为防治腹膜纤维化的重要切入点,并为几丁糖防治腹膜纤维化的进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

胎牛血清(FBS)、DMEM/F12 干粉培养基(Gibco 公司),胰蛋白酶(Amerasco 公司),Angiotensin Ⅱ(Sigma,USA),几丁糖购于上海其胜生物制剂有限公司,4.25% 腹透液为广州百特医疗用品公司产品,H_2-DCFDA(Molecular Probes,USA),Trizol 试剂(Invitrogen 公司),逆转录试剂盒(RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit ,Fermentas 公司),*Taq* DNA 聚合酶(Fermentas 公司),RNase 抑制剂(Gibco BRL 公司),焦碳酸二乙酯(DEPC,博彩公司),DNA 标准(DL2000,TaKaRa 公司),琼脂糖(Biolabs 公司),兔抗大鼠 TGF-β1(Santa Cruz,USA),兔抗大鼠 GAPDH 抗体(Dako 公司,Denmark),BCA 法蛋白浓度测定试剂盒(Pierce 公司),TEMED(Sigma 公司),其余化学试剂为国产分析纯。

1.2 RPMC 的分离与培养

健康清洁级 8 周龄雄性 SD 大鼠 4 只,体质量 180 ~ 200 g,由河南科技大学机能实验中心提供,每只肌肉注射 10% 水合氯醛 0.6 ~ 1.0 ml。待麻醉后向大鼠腹腔内注射 20 ~ 30 ml 0.25% 胰蛋白酶/0.02% EDTA 消化液。2 h 后断颈处死大鼠,75% 酒精全身浸泡消毒 5 min。将大鼠仰面放置于超净工作台上,沿腹白线依次剪开腹壁皮肤及肌肉,吸出腹腔内液体,移入 15 ml 离心管 1 500 r/min 离心 15min,弃上清,加入含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液,轻轻用吸管吹打使之成为细胞混悬液,分装于 25 cm^2 的细胞培养瓶中。再加入培养基使之总体积达到4 ~ 5 ml,放入条件为 37 ℃、95% 空气、5% CO_2 的细胞培养箱中培养。每 3 天更换 1 次培养基。免疫组织化学方法鉴定腹膜间皮细胞传代,将 2 代 RPMC(经细胞形态和免疫组化鉴定),随机分为 4 组(n = 4),A 组即对照组,DMEM/F12 培养基培养;B 组:DMEM/F12 培养基中加入 4.25% 葡萄糖透析液;C 组:DMEM/F12 培养基中加入 4.25% 葡萄糖透析液 + 几丁糖 1.2 mg/L;D 组:DMEM/F12 培养基中加入 4.25% 葡萄糖透析液 + 几丁糖 0.4 mg/L。培养 0、2、4、8、12、24 h 收集细胞提取 RNA,48 h 收集细胞提取蛋白[5]。

1.3 实时定量 PCR 引物合成序列

GAPDH 引物序列:正义 5′-ATGGTCTACATGTTCCAGTA-3′,反义 5′-TCAGATCCACAACGGATACA-3′,产物长度 590 bp;TGF-β1 引物序列:正义 5′-CAGGATTACAAGTTCCCGCCA-3′,反义 5′-CACTGTCCGCTGCCTTCAG-3′,产物长度 360 bp。

1.4 Western blot 检测 TGF-β_1 蛋白的表达

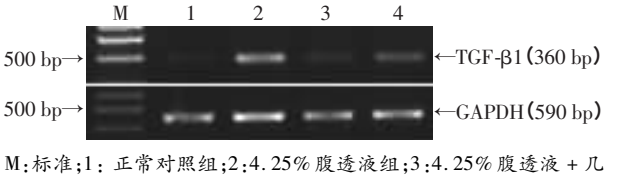
按文献[6]方法进行。取各组细胞,PBS 洗 2 遍,加入细胞裂解液,收获蛋白质,4 ℃,12 000 r/min,离心 15 min,Bradford 法测定浓度。取适量的蛋白质标本,10% 丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶上电泳,电压 90 V 30 min,140 V 60 min。室温恒压 100 V 维持 90 min。丽春红染色硝酸素纤维膜,观察蛋白转移结果。TBST 洗膜:室温下 10 min。5% 脱脂奶粉阻断:室温下轻摇 60 min。TBST 洗膜:室温下 10 min × 3 次。抗原抗体免疫反应加入 TBST 稀释的 TGF-β1(1∶500)或 GAPDH(1∶1 000)抗体孵育:4 ℃摇床轻摇过夜。TBST 洗膜:室温下 10 min × 3 次。分别与辣根过氧化物共轭的抗-兔的Ⅱ抗(1∶1 000)及 HRP-anti-biotin 抗体(1∶1 000)室温下孵育 1 h。TBST 洗膜:室温下 10 min × 3 次。显影、检测 ECL 发光。室温下将膜浸于发光剂中 1 min 后,取出膜甩去多余液体,将硝酸素纤维膜置于 2 张干净的保鲜膜之间,在暗室中对着 X-线胶片曝光 0.5 ~ 30 min。胶片投入自动洗片机中冲洗和烤干。用凝胶图像成像系统成像并用图像分析软件进行吸光度分析。

1.5 统计学处理

吸光度分析采用单位面积计算机图像扫描值减去背景值的均值表示信号强度,以 GAPDH 作为内参照,计算二者光密度的比值,并以对照组 0 h 作为基准,计算其他各实验组相对吸光度值,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用 SPSS 17.0 统计软件,组间比较采用单因素方差分析和 SNK-q 检验。双变量相关分析采用 Pearson 分析。

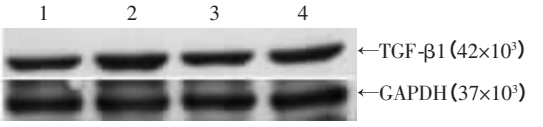
2 结果

实时 RT-PCR 结果显示,与 0 h 比较,高糖腹透液刺激 RPMC 4 h 时 TGF-β1 mRNA 表达开始上升,24 h 时达到高峰,B 组分别为 A 组的 2.51 倍、C 组的 2.13 倍、D 组的 1.68 倍,D 组为 C 组的 1.26 倍。高糖腹透液可明显刺激 RPMC TGF-β1 mRNA 表达上调,几丁糖可显著阻断这种上调。24 h 时,几丁糖使 TGF-β1 mRNA 的表达下降明显($P < 0.05$),且对 TGF-β1 mRNA 表达的抑制程度与其浓度呈正相关($r = 0.948$, $P < 0.01$)(图 1)。Western blot 结果显示,与 0 h 比较,高糖腹透液刺激 RPMC 8 h 时 TGF-β1 蛋白表达开始上升,48 h 时达到高峰,B 组分别为 A 组的 1.85 倍、C 组的 1.52 倍、D 组的 1.24 倍,D 组为 C 组的 1.23 倍。48 h 时,几丁糖使 TGF-β1 的蛋白水平下降明显($P < 0.05$)且对 TGF-β1 蛋白表达的抑制程度与其浓度呈正相关($r = 0.831$, $P < 0.05$,图 2)。



M:标准;1:正常对照组;2:4.25% 腹透液组;3:4.25% 腹透液 + 几丁糖 1.2 mg/L 组;4:4.25% 腹透液 + 几丁糖 0.4 mg/L 组

图 1 24 h 时几丁糖对高糖腹透液刺激 RPMC TGF-β1 mRNA 表达的影响



1：正常对照组；2：4.25%腹透液组；3：4.25%腹透液+几丁糖1.2 mg/L组；4：4.25%腹透液+几丁糖0.4 mg/L组

图2 48 h时几丁糖对高糖腹透液刺激RPMC TGF-β1蛋白表达的影响

3 讨论

随着腹膜透析患者生存率的不断提高，腹膜超滤失败这一远期并发症逐渐得到重视。长期腹膜透析可导致腹膜结构和功能的改变，如腹膜间皮细胞肥大、间皮细胞层完整性的丧失、腹膜血管增生和间质纤维化等腹膜结构的改变，继而在功能上表现为毒素清除和超滤能力下降，导致腹膜透析相关性腹膜纤维化综合征[7,8]。

几丁糖与植物纤维素的结构和功能相似，被称作“动物纤维素”，并表现出“生物相容性好、生物降解性好、生物活性优异”等特性，而被广泛用于医药保健、生态农业、绿色工业等所涉及的200多个领域，显现出巨大的科学价值、社会效益和经济价值[9]。医用几丁糖是由蟹壳提纯的高分子化合物几丁质(chitin)经脱N-乙酰基再深加工后制成的一种聚氨基葡萄糖，是一种具有良好生物相容性、生物可降解性及生物学活性的医用高分子多糖类物质，对成纤维细胞有明显抑制作用，已广泛用于外科手术预防组织粘连，其防止术后组织粘连的机制有：①医用几丁糖凝胶具有选择性促进上皮细胞、内皮细胞生长而抑制成纤维细胞生长的生物特性，从而促进组织生理性修复，抑制疤痕形成，减少组织粘连。②医用几丁糖凝胶具有局部止血作用及抑制血纤维蛋白束形成，从而减少了因血肿机化而造成的组织粘连。③医用几丁糖凝胶有润滑作用及生物屏障作用，能有效地阻止粘连发生[10-12]。

从前的观点认为，引起腹膜结构功能改变的最主要因素是固有成纤维细胞的激活及其他细胞的浸润，但近来许多研究使大家对腹膜纤维化发生机制的认识更深入更全面。研究[4,13,14]表明，慢性PD患者的肌成纤维细胞、积聚的细胞外基质以及血管的再生可来源于激活的腹膜固有成纤维细胞，也可来源于间皮细胞的转分化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)，其中，经EMT而形成的肌成纤维细胞是参与腹膜纤维化的最主要细胞。因此，临床上对EMT的防治可能会延缓腹膜纤维化的进程。在腹膜间皮细胞发生EMT的进程中，虽然多种相关因子参与其中，但TGF-β1起到中枢性的作用。因此，我们的实验以大鼠腹膜间皮细胞为受试对象，以几丁糖为干扰因素，以TGF-β1的基因和蛋白表达为观察目标，以初步探讨几丁糖对腹膜间皮细胞EMT及腹膜纤维化的防治作用。我们的研究结论：①高糖腹透液可刺激大鼠腹膜间皮细胞TGF-β1 mRNA和蛋白表达上调；②几丁糖可抑制腹膜纤维化的中枢性因子TGF-β1表达的活性。由此可认知，几丁糖对高糖腹透液刺激下腹膜纤维化发生发展的过程确有抑制作用，该研究有可能为腹膜纤维化的防治带来新的希望。

参考文献：

[1] Krediet R T, Lindholm B, Rippe B. Pathophysiology of peritoneal membrane failure[J]. Perit Dial Int, 2000, 20(Suppl 4): S22-S42.

[2] Mizuiri S, Ohashi Y, Hemmi H, *et al*. Effects of new peritoneal dialysis solutions, pyridoxamine and AT1 receptor blocker, on TGF-beta1 and VEGF expression in rat peritoneal mesothelial cells[J]. Am J Nephrol, 2009, 30(3): 295-302.

[3] De-Vriese A S, Tilton R G, Mortier S, *et al*. Myofibroblast transdifferentiation of mesothelial cells is mediated by RAGE and contributes to peritoneal fibrosis in uraemia[J]. Nephrol Dial Transplant, 2006, 21(9): 2549-2555.

[4] Takahashi S, Taniguchi Y, Nakashima A, *et al*. Mizoribine suppresses the progression of experimental peritoneal fibrosis in a rat model[J]. Nephron Exp Nphrol, 2009, 112(2): e59-e69.

[5] Yang X, Ye R, Kong Q, *et al*. CD40 is expressed on rat peritoneal mesothelial cells and upregulates ICAM-1 production[J]. Nephrol Dial Transplant, 2004, 19(6): 1378-1384.

[6] Rhyu D Y, Yang Y, Ha H, *et al*. Role of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(3): 667-675.

[7] Shimizu M, Ishibashi Y, Taki F, *et al*. Endothelin(B) receptor blocker inhibits high glucose-induced synthesis of fibronectin in human peritoneal mesothelial cells[J]. Perit Dial Int, 2006, 26(3): 393-401.

[8] Szeto C C, Chow V C, Chow K M, *et al*. Enterobacteriaceae peritonitis complicating peritoneal dialysis: a review of 210 consecutive cases[J]. Kidney Int, 2006, 69(4): 1245-1252.

[9] 侯春林，顾其胜 主编. 几丁质与医学[M]. 上海：上海科学技术出版社，2001，53-55.

[10] 王德娟，莫家骢，潘仕荣，等. 羧甲基壳聚糖预防大鼠术后腹膜粘连的研究[J]. 中山大学学报：医学科学版，2008，29(3)：287-293.

[11] Sahin M, Cakir M, Avsar F M, *et al*. The effects of anti-adhesion materials in preventing postoperative adhesion in abdominal cavity(anti-adhesion materials for postoperative adhesions)[J]. Inflammation, 2007, 30(6): 244-249.

[12] 章志量，周卸来. 壳聚糖对预防大鼠腹膜粘连作用的研究[J]. 中国药学杂志，2006，41(5)：343-346.

[13] Kim J J, Li J J, Kim K S, *et al*. High glucose decreases collagenase expression and increases TIMP expression in cultured human peritoneal mesothelial cells[J]. Nephrol Dial Transplant, 2008, 23(2): 534-541.

[14] Hung K Y, Huang J W, Chiang C K, *et al*. Preservation of peritoneal morphology and function by pentoxifylline in a rat model of peritoneal dialysis: molecular studies[J]. Nephrol Dial Transplant, 2008, 23(12): 3831-3840.

（**收稿**：2010-03-21；**修回**：2010-04-08）

（编辑 龙 亮）