基础研究 文章编号:0253-3626(2010)09-1336-03

AngⅡ对大鼠腹膜间皮细胞 PAI-1 表达的影响及黄芪的干预作用

徐家云[1],刘章锁[1],马 沙[2],娄 丹[2],王宜娟[2],卢丹萍[2]
(1.郑州大学第一附属医院肾内科,郑州 450052;2.河南科技大学第一附属医院肾内科,洛阳 471003)

【摘 要】目的:探讨 AngⅡ对腹膜间皮细胞(Peritoneal mesothelial cells,RPMCs)纤溶酶原激活物抑制物(Plasminogen activator inhibitor-1,PAI-1)表达的影响,及二代腹膜间皮细胞经黄芪注射液(Astragelus,AGI)预处理后的干预作用。方法:体外培养 SD 大鼠原代腹膜间皮细胞至二代,静止 24 h 后,随机分为:正常对照组(A 组),AngⅡ(10^{-7} mol/L)组(B 组),AngⅡ+AGI(2 g/ml)组(C 组),AngⅡ+AGI(1 g/ml)组(D 组)。B 组:用 AngⅡ(10^{-7} mol/L)体外刺激 RPMCs,检测 0、2、4、8、12、24 h 基因水平的变化。C 组和 D 组:分别用 AGI(2 g/ml)、AGI(1 g/ml)预处理后,再行 AngⅡ(10^{-7} mol/L)体外刺激 RPMCs,基因水平在 4 h,蛋白水平在 24 h 观察以上各组各指标的变化情况。结果:①AngⅡ以时间依赖方式诱导 PAI-1 mRNA 表达上调,从 2 h 开始,持续至 12 h,以 4 h 为高峰,为 0 h 的 3.51±0.18 倍($P<0.05$),AngⅡ可诱导腹膜间皮细胞中 PAI-1 蛋白表达上调,以 24 h 为高峰,为 0 h 的 1.69±0.16 倍($P<0.05$)。②AGI 预处理后可显著阻断这种上调。4 h 时 AGI 使 PAI-1 的 mRNA 下降了 39.43%(C 组),37.28%(D 组),差异具有统计学意义($P<0.05$);24 h 时 AGI 使 PAI-1 的蛋白水平下降了 29.41%(C 组),24.12%(D 组),差异具有统计学意义($P<0.05$)。未观察到 AGI 对 PAI-1 的 mRNA 和蛋白的抑制程度依赖于 AGI 浓度,即 C 组与 D 组比较($P>0.05$)。结论:AGI 可通过抑制 PAI-1 的表达,减少腹膜间皮细胞外基质的过度积聚来延缓腹膜纤维化的发生与发展。

【关键词】血管紧张素Ⅱ;腹膜间皮细胞;纤溶酶原激活物抑制物;黄芪
【中国图书分类法分类号】R459.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-02-21

Effects of angiotensin Ⅱ on the expression of rat peritoneum mesothelial cells PAI-1 and and role of astragalus intervention

XU Jia-yun, et al
(*Department of Nephrology, the First Affiliated Hopital, Zhengzhou Universiti*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the role of angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ) and the effects of treatment with astragalus (AGI) on the expression of plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1) on rat peritoneal mesothelial cells(RPMCs) *Methods*: The RPMCs were cultured to the second generation in vitro, and were randomly assigned to the control group (groupA), the Ang Ⅱ (10^{-7} mol/L)group(groupB), the Ang Ⅱ +AGI(2 g/ml) Group(groupC) and the Ang Ⅱ +AGI(1 g/ml) group (groupD). Group B: RPMCs were stimulated with Ang Ⅱ (10^{-7} mol/L), RT-PCR was employed to detect the mRNA expression at 0,2,4,8,12,24 h; group C and group D cells were pretreated with AGI 2 g/ml and 1g/ml respectively before adding Ang Ⅱ, and the mRNA expression and protein expression were detected at 4h and 24 h respectively. *Results*: ①Ang Ⅱ stimulated PAI-1 mRNA expression in a time-dependent manner from 2 h up to 12 h and peaked at 4h, compared with 0 h group ($P< 0.05$), at the same time, PAI-1 protein expression were also upregulated by Ang Ⅱ in RPMCS and peaked at 24 h compared with 0 h ($P<0.05$). ②Treatment with AGI effectively downregulated Ang Ⅱ -induced PAI-1 mRNA and protein overexpression. Ang Ⅱ -induced PAI-1 mRNA overexpression were significantly downregulated by 39.43% and 37.28% with 2 g/ml and 1g/ml AGI treatment respectively after 4 h ($P<0.05$), while its protein overexpression were downregulated by 29.41% and 24.12% respectively after 24 h ($P<0.05$), and there were no differences of PAI-I expression between the treatment of different AGI concentration ($P>0.05$). *Conclusion*: AGI can inhibit the expression of PAI-1, to reduce the accumulation of extracellular matrix in RPMCs and prevent the progression of peritoneal fibrosis.

【Key words】*Angiotensin Ⅱ; Perioneal mesothelial cells; Plasninogen activator inhibitor-1; Astragalus*

作者介绍:徐家云(1964-),男,主任医师,博士,
研究方向:慢性肾衰基础与临床研究。
通讯作者:刘章锁,男,教授,E-mail:zhangsuoliu@Sina.com。
基金项目:河南省医学科技攻关计划基金资助项目(编号:200903112)。

腹膜纤维化是长期腹膜透析患者的重要并发症之一,其病理特征为细胞外基质(Extracelluar matrix,ECM)沉积引起腹膜增厚、纤维化[1]。在高糖刺激下,腹膜间皮细胞纤连蛋白(Fibronectin,FN)、层粘蛋白(Laminin,LN)等合成增加,细胞外基质积聚,导致腹膜纤维化[2]。纤维化不仅表现在细胞外基质增多上,其降解减少也是另一重要方面。纤溶酶是降解细胞外基质的主要酶类之一,纤溶酶原激活物抑制物(Plasminogen activator inhibitor-1,PAI-1)通过抑制纤溶酶原激活物而抑制纤溶酶活性,使 ECM 降解减少,导致 ECM 积聚[3,4]。色谱指纹图谱证实黄芪注射液(Astragalus,AGI)有稳定的清除自由基、抗氧化的色谱峰[5],超微结构证实 AGI 能延缓高糖环境对腹膜纤维化的发生发展[6,7]。为此,本研究重点观察 AGI 对 PAI-1 的表达的影响,以揭示其对腹膜间皮细胞细胞外基质积聚过程的影响,寻找出其防治腹膜纤维化的理论依据。

1 材料与方法

1.1 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);AGI (正大青春宝药业有限公司生产,国药准字 Z33020179, 每支 10 ml 相当于原材料 20 g);Trizol 试剂(Invitrogen 公司);逆转录试剂盒 (RevertAidTM 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 Marker(DL2000,TaKaRa 公司);琼脂糖(Biolabs 公司);兔抗大鼠 PAI-1 (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 大鼠腹膜间皮细胞的分离与培养[8]

健康清洁级雄性 SD 大鼠,体重 180~220 g,由河南科技大学机能实验中心提供,每只肌肉注射 10%水合氯醛约 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% 乙二胺四乙酸消化液。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 离心管中。1 500 r/min 离心 15 min,弃上清,加入含 10%胎牛血清的 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 d 更换 1 次培养基。免疫组织化学方法鉴定腹膜间皮细胞,将 2 代腹膜细胞随机分为以下 4 组:正常对照组,Ang Ⅱ (10^{-7}mol/L)组,Ang Ⅱ +AGI(2 g/ml)组,Ang Ⅱ +AGI(1 g/ml)组。前 2 组用无血清的 DMEM/ F12 培养基培养;后 2 组提前孵育 1 h 行干预处理。在合适的时间点,观察以上各组基因和蛋白的表达情况。

1.3 Western 印迹

按文献报道方法[9]。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 p47phox(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 不等。胶片投入自动洗片机中冲洗和烤干。于凝胶成像系统进行目的蛋白及内参照 GAPDH 条带灰度分析。

1.4 实时定量 RT-PCR 检测

总 RNA 提取按照 Trizol 试剂说明书操作。取 2 μg 总 RNA 按反转录试剂盒说明书合成 cDNA。用实时定量 PCR 仪(美国 MJResearch)检测 mRNA 的表达。定量 PCR 反应体系:SYBR Green Mix 7.5 μl,引物各 0.3 μl, cDNA1.0 μl,加三蒸水补足至 15 μl。反应条件:94℃预变性 5 min,92℃变性 15 s 60℃退火并延伸 1 min, 共 40 循环,72℃终末延伸 10 min。PCR 产物于 1.2%琼脂糖凝胶电泳 Fluorechem™8900 凝胶成像系统成像,以目的基因与内参照 GAPDH 积分吸光度的比值作为定量值进行统计分析。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物合成序列

引物名称	引物序列	产物长度(bp)
GAPDH	正义 5'-ATGGTCTACATGTTCCAGTA-3'	590 bp
	反义 5'-TCAGATCCACAACGGATACA-3'	
PAI-1	正义 5'-ATGGAACAAGAATGAGATCA-3'	486 bp
	反义 5'-TCAAAGGGTGCTGCAATGAAC-3'	

1.5 统计学处理

应用 SPSS17.0 统计软件进行分析。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,计算两者吸光度的比值,并以对照组或 0 h 组作为基准,计算其它各实验组相对吸光度值,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析和 SNK-q 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

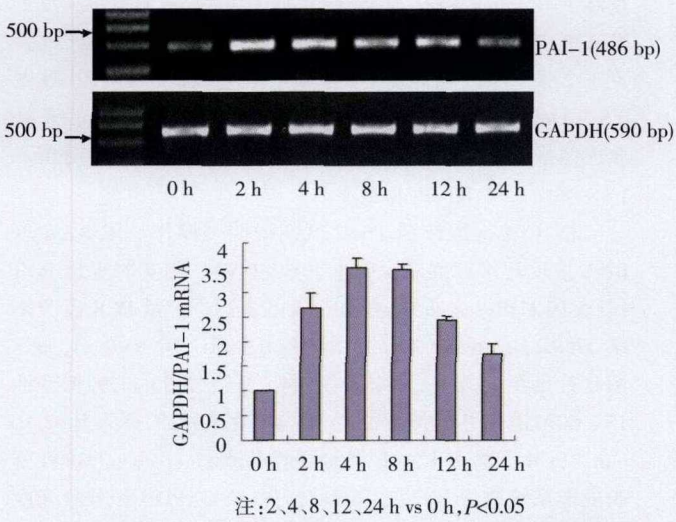
2.1 Ang Ⅱ对 RPMCs 中 PAI-1mRNA 表达的影响

实时 RT-PCR 结果显示,通过检测 0、2、4、8、12、24 h 基因水平的变化,表明 Ang Ⅱ以时间依赖方式诱导 PAI-1 mRNA 表达上调,从 2 h 开始,持续至 12 h,以 4 h 为高峰,为 0 h

的 3.51 ± 0.18 倍($P < 0.05$)(图 1)。Western blot 结果显示,Ang Ⅱ可诱导腹膜间皮细胞中 PAI-1 蛋白表达上调,以 24 h 为高峰,为 0 h 的 1.69 ± 0.16 倍($P<0.05$)(图 3)。

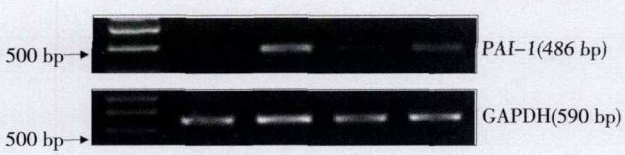
2.2 AGI 对 Ang Ⅱ诱导 RPMCsPAI-1 的干预作用

实时 RT-PCR 结果显示,Ang Ⅱ可明显诱导 RPMCs PAI-1 的 mRNA 和蛋白表达上调,AGI 预处理后可显著阻断这种上调。4 h 时 AGI 使 PAI-1 的 mRNA 下降了 39.43%(C 组),37.28%(D 组),差异有统计学意义($P<0.05$)(图 2),Western blot 结果显示,24 h 时 AGI 使 PAI-1 的蛋白水平下降了 29.41%(C 组)%,24.12%(D 组),差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 3)。未观察到 AGI 对 PAI-1 的 mRNA 和蛋白的抑制程度依赖于 AGI 浓度,即 C 组与 D 组比较($P>0.05$)。



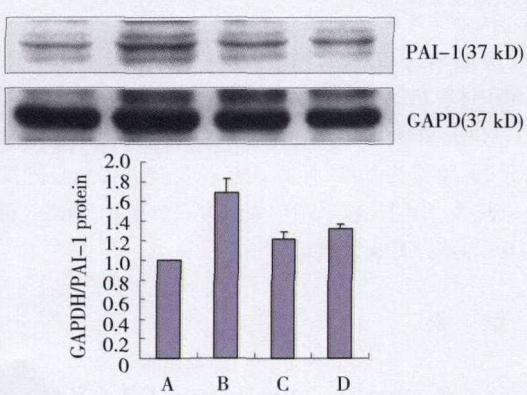
注:2、4、8、12、24 h vs 0 h,$P<0.05$

图 1 AngII 诱导 RPMC PAI-1 mRNA 的表达情况(n=4)



注:A. 正常对照组;B. Ang Ⅱ(10^{-7} mol/L)组;C. Ang Ⅱ+AGI(2 g/ml)组;D. Ang Ⅱ+AGI(1 g/ml)组

图 2 AGI 对 AngII 诱导的 PAI-1 mRNA 表达的影响(4 h 时,n=4)



注:A. 正常对照组;B. Ang Ⅱ(10^{-7} mol/L)组;C. Ang Ⅱ+AGI(2 g/ml)组;D. Ang Ⅱ+AGI(1 g/ml)组;A 与 B,B 与 C,B 与 D,$P<0.05$;C 与 D,$P>0.05$

图 3 AGI 对 AngII 诱导的 PAI-1 蛋白表达的影响(24 h 时,n=4)

3 讨 论

腹膜纤维化是腹膜透析的重要并发症,不断探讨其发病机制、寻找新的治疗靶点是腹膜透析进一步发展的迫切需要。凝血纤溶系统与细胞外基质腹膜纤维化是以细胞外基质沉积在腹膜为组织学特征,细胞外基质(Extracell ular matrix,ECM)的沉积是 ECM 合成与降解失衡的结果。ECM 的过度积聚可能由两方面因素引起:一是 ECM 的产生过多,二是 ECM 的降解减少。ECM 降解蛋白酶主要包括,丝氨酸蛋白酶类,基质蛋白酶,其中 PA 是纤溶系统的关键酶性系,是纤溶酶原转化成纤溶酶的催化剂,PA 的活性受 PAI-1,2,3 的调控,其中 PAI-1 最重要[10]。新近研究表明,肾脏细胞外基质合成、降解失衡与重塑并最终导致细胞外基质积聚是各种肾病发展至终末期肾衰的共同病理表现,而调控细胞外基质代谢的细胞外基质降解酶类的表达与活性异常在其中发挥重要的作用[11]。*AGI 中有多种生物活性成分,色谱指纹图谱证实 AGI* 有稳定的清除自由基、抗氧化的色谱峰[5]。多种抗氧化剂如三甲氧苄嗪、普罗布考等防治腹膜纤维化的研究仅局限于动物实验,并未在临床中应用。AGI 在防治腹膜纤维化方面应用较广,因此,基于临床我们的研究重点在于观察 AGI 对腹膜间皮细胞外基质积聚过程起调节作用的 PAI-1 表达的影响。研究结果表明,Ang Ⅱ能从基因和蛋白水平上明显上调 PAI-1 的表达,从而减少 ECM 的降解,导致腹膜间皮细胞外基质积聚,ECM 重构,提示在腹膜间皮细胞中,Ang Ⅱ起到了致纤维化因子的作用,因此,Ang Ⅱ在腹膜纤维化中的角色应引起我们的重视。而 AGI 能抑制由 Ang Ⅱ刺激的腹膜间皮细胞纤溶酶原激活物抑制物(PAI-1)基因及蛋白表达的上调。由此可知,AGI 具有一定的调节细胞外基质降解酶系统的作用,其防治腹膜纤维化发生与发展的作用,部分是通过其抑制 PAI-1 的表达,减少腹膜间皮细胞外基质的过度积聚来实现的。该研究为 AGI 防治腹膜纤维化发生与发展提供了新的治疗靶点。

参 考 文 献

[1] Hung K Y,Huang J W,Tsai T J,et al. Peritoneal Fibrosing Syndrome: Pathogenetic Mechanism and Current Therapeutic Strategies[J]. J Chin Med Assoc,2005,68(9):401-405.

[2] Vargha R, Endemann M, Kratochwill K, et al. Ex vivo reversal of in vivo transdifferentiation in mesothelial cells grown from peritoneal dialysate effluents[J].Nephrol Dial Transplant,2006,21(10):2943-2947.

[3] YamaguchiY,Iwano M,Suzuki D,et al. Epithelial-mesenchymal transition as a potential explanation for podocyte depletion in diabetic-nephropathy[J]. Am J Kidney Dis,2009,54(4): 653-664.

[4] Rossini M,Infante,Stallone,et al. Rapamycin inhibits PAI-1 expression and reduces interstitial fibrosis and glomerulosclerosis in chronic allograft nephropathy[J]. Transplantation, 2008, 85 (1) :125-134.

[5] 张 磊,聂 磊,王唯红.黄芪注射液色谱指纹图谱与抗氧化作

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)09-1339-05

Survivin 反义寡核苷酸联合 TCS 诱导食管癌细胞 Eca-109 凋亡的研究

陈玉龙,邓华瑜
(重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 survivin 反义寡核苷酸(Antisense oligodeoxynucleotide,ASODN)联合 TCS 诱导细胞凋亡的作用及其分子机制。方法:以食管癌细胞 Eca-109 为实验对象,将实验分 6 组:未处理组、脂质体组、survivin 正义寡核苷酸组(Sense oligodeoxynucleotide,SODN)、survivin 反义寡核苷酸组(Antisense oligodeoxynucleotide,ASODN)、天花粉蛋白组(Trichosan thein,TCS)、survivin 反义寡核苷酸联合天花粉蛋白组。各处理因素作用食管癌细胞 Eca-109 48 h,RT-PCR 检测 Eca-109 细胞 survivin mRNA 表达变化;Western blot 检测 Survivin、Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达变化;AnnexinV-FITC/PI 双染法检测 Eca-109 细胞早期凋亡率。结果:ASODN 组、TCS 组和联合组的 survivin mRNA 和 Survivin 蛋白表达水平明显降低,联合组较单独药物组(ASODN 组、TCS 组)降低,而以上 3 组的早期凋亡率和 Caspase-3 蛋白表达水平明显升高,联合组较单独药物组增高($P<0.05$);TCS 组和联合组细胞的 Bcl-2 蛋白的表达水平明显降低,Bax 蛋白的表达增加。结论:TCS 联合 survivin 的 ASODN 在诱导 Eca-109 细胞的凋亡方面,能够发挥协同作用;TCS 和 survivin 的 ASODN 共同抑制 survivin 基因表达,TCS 下调 Bcl-2 蛋白表达和上调 Bax 蛋白表达,分别激活 caspase 级联反应上游、下游途径,是两药发挥协同作用的分子基础。

【关键词】食管癌;反义寡核苷酸;凋亡
【中国图书分类法分类号】R735.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-07-08

Apoptosis of Eca-109 cells treated with antisense oligodeoxynucleotide targeting survivin and trichosanthin

CHEN Yu-long, et al
(*Department of Pathophysiology, College of Bacial Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effects of antisense oligodeoxynucleotide targeting survivin and trichosanthin on the apoptosis of human esophageal carcinoma Eca -109 cells and its molecular mechanisms. *Methods*: The experimental Eca-109 cells were divided into six groups: untreated group, lipofectamine group, sense oligodeoxynucleotide targeting survivin group (SODN), antisense oligodeoxynucleotide targeting survivin group(ASODN), trichosanthin group, and antisense oligodeoxynucleotide targeting survivin and trichosanthin group. Expression of survivin mRNA was detected by RT-PCR. Expressions of Survivin, Bcl-2, Bax, and Caspase-3 proteins were detected by Western blot. The rate of early apoptosis was detected by AnnexinV-FITC/PI double stain. *Results*: Expressions of survivin mRNA and protein of the ASODN group, the TCS group, and the combination group were significantly decreased. The combined group had significantly lower expression than the single group (SODN group or the TCS group). However, the early apoptosis rates and expression of caspase-3 protein in the ASODN group, the TCS

作者介绍:陈玉龙(1982-),男,硕士,
研究方向:肿瘤免疫与肿瘤药理。
通讯作者:邓华瑜,女,教授,E-mail:cqdenghy@163.com。

用的相关分析[J].中药材,2009,32(11):1757-1760.
[6] 舒 静,王 怡,张晓云.黄芪注射液拮抗高糖腹膜透析液对腹膜皮细胞紧密连接的影响[J].上海中医药大学学报,2007,21(4):50-53.
[7] 徐家云,王俊霞,孟晓青,等.黄芪注射液对大鼠腹膜透析效能及腹膜超微结构的影响[J]河南科技大学学报,2006,24(2):81-83.
[8] Zhang Y F, Yang X, Zhang Y J, et al.Peroxisome proliferator -activated receptor-gamma is expressed by rat peritoneal mesothelial cells: Its potential role in peritoneal cavity local defense[J].Am J Nephrol, 2006, 26(6):602-611.
[9] Rhyu D Y, Yang Y Q, Ha H, et al. Role of reactive oxygen species in TGF-β-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.
[10] 刘伏友.腹膜透析腹膜纤维化的机制及防治[J]. 中国血液净化, 2007, 6(12):640-642.
[11] Okada H, Kalluri R. Cellular and molecular pathways that lead to progression and regression of renal fibrogenesis[J].Current Molecular Medicine, 2005, 5(5):467-474.

(责任编辑:张学颖)