

## 氟伐他汀对高糖腹透液诱导人腹膜间皮细胞纤维连接蛋白表达的影响

刘艳春, 刘佳\*, 徐亚光, 赵秀芬, 钱军, 孙彬, 邢昌赢

(南京医科大学第一附属医院肾内科, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨氟伐他汀(fluvastatin, Flu)对高糖腹透液(high-glucose peritoneal dialysate, HGPDS)诱导人腹膜间皮细胞(human peritoneal mesothelial cells, HPMCs)纤维连接蛋白(fibronectin, FN)表达的影响。方法:体外培养 HPMCs, 同步化 24 h 后, 分为正常对照组、HGPDS 组、HGPDS+Flu 组、单纯氟伐他汀组、DMSO 对照组, 各组分别刺激不同时间后, 噻唑蓝(MTT)检测各组细胞的活力, RT-PCR 检测 FN 的 mRNA 表达, ELISA 法检测上清液 FN 蛋白表达的变化。结果:与正常对照组比较, HGPDS 明显抑制细胞活力, HGPDS 联合 Flu 共同培养 24、36 h, 细胞活力有所恢复, 其中,  $1 \times 10^{-6}$  mol/L Flu 作用 24 h, 细胞活力改善差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与正常对照组比较, HGPDS 明显增加人腹膜间皮细胞 FN mRNA 及蛋白表达( $P < 0.05$ ), 并呈时间依赖性, 其中 FN mRNA 于 6 h 达高峰, FN 蛋白于 24 h 达高峰。Flu 可抑制 HGPDS 诱导的 FN 的高表达( $P < 0.05$ ), 并呈浓度依赖性。结论:HGPDS 诱导体外培养人腹膜间皮细胞 FN 表达增加, 此作用可被 Flu 抑制。

**[关键词]** 氟伐他汀; 高糖腹透液; 人腹膜间皮细胞; 纤维连接蛋白

**[中图分类号]** R692.5

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)07-908-05

### The effect of fluvastatin on the expression of fibronectin in human peritoneal mesothelial cells induced by high-glucose peritoneal dialysate

LIU Yan-chun, LIU Jia\*, XU Ya-guang, ZHAO Xiu-fen, QIAN Jun, SUN Bin, XING Chang-ying

(Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of fluvastatin(Flu) on the expression of fibronectin(FN) in human peritoneal mesothelial cells (HPMCs) induced by high-glucose peritoneal dialysate (HGPDS). **Methods:** After incubated in DMEM with 0.01%FBS for 24 h, cultured HPMCs were randomly divided into control group, HGPDS group, HGPDS+Flu group, Flu alone group and DMSO control group. HPMCs were treated for 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 h respectively and the cellular viability were detected by MTT colorimetry. The mRNA expression of FN was observed by RT-PCR. HPMCs were treated for 24 h and the levels of FN in the culture media were measured by ELISA. **Results:** The results of MTT revealed that lower viability was found in the cells treated with HGPDS and partially restored in cells treated with different concentrations of Flu at 24 h and 36 h when compared with control group. The significant improvement of cell viability was shown in Flu treatment at concentration of  $1 \times 10^{-6}$  mol/L at the time of 24 h ( $P < 0.05$ ). Compared with the normal control group, the mRNA and protein expressions of FN increased time-dependently in HPMCs treated with HGPDS ( $P < 0.05$ ), which peaked at 6 h and 24 h respectively. The fluvastatin significantly inhibited the effects of HGPDS on the expression of FN in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** HGPDS can increase FN expression in HPMCs, which will be inhibited by Flu.

**[Key words]** fluvastatin; high-glucose peritoneal dialysate; human peritoneal mesothelial cells; fibronectin

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(7): 908-912]

持续非卧床腹膜透析是终末期肾病患者的替代治疗方式之一,随着透析时间的延长,腹膜会发生纤维化,以致超滤衰竭。研究发现,高糖腹透液可以诱导

人腹膜间皮细胞致纤维化因子如转化生长因子(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)等产生增加及胞外基质纤维连接蛋白(fibronectin, FN)、IV型胶原等的合成增加<sup>[1]</sup>,参与腹膜纤维化。他汀类药物具有非依赖降脂的器官保护作用,近年发现他汀类药物具有抗炎反应、抗纤维化等作用<sup>[2-3]</sup>。而有关他汀类药

**[基金项目]** 江苏省卫生厅科研基金资助(H200317)

\*通讯作者, E-mail: jiajj3@sina.com

物对腹膜纤维化中的防治作用的研究还不多,本研究拟探讨氟伐他汀(fluvastatin, Flu)对高糖腹透液(high-glucose peritoneal dialysate, HGPDS) 诱导人腹膜间皮细胞 (human peritoneal mesothelial cells, HPMCs) FN 表达的调节作用,为他汀类药物防治腹膜透析相关性腹膜纤维化提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

人腹膜间皮细胞株(HMrSV5)购自上海劲马生物科技有限公司,Flu (粉剂,北京诺华公司馈赠),DMEM 培养基、胎牛血清和青链霉素(美国 Gibco 公司),4.25%葡萄糖腹膜透析液(美国 Baxter 公司),RT-PCR 试剂盒、TRIzol (日本 TaKaRa 公司),FN ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司),噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司),酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

#### 1.2 方法

##### 1.2.1 细胞培养

HMrSV5 细胞于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱内生长,完全培养基为 DMEM 培养基(葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L)加 10%胎牛血清、青霉素 100 U/L、链霉素 100 U/L。2~3 d 换液,4~5 d 长满后用 0.25%胰蛋白酶消化传代,第 5~10 代细胞用于实验。

##### 1.2.2 MTT 检测细胞活力

对数生长期的 HMrSV5 细胞,以 4 × 10<sup>3</sup> 个/孔接种于 96 孔板,当细胞生长至 70%~80%融合后,用含 0.1%胎牛血清的 DMEM 培养液同步化 24 h,加入不同的处理因素,处理结束后,加入 MTT(5 mg/ml) 20 μl/孔继续孵育 4 h,小心吸去孔内培养液,加入

二甲基亚砷(DMSO)150 μl/孔,室温摇床振荡 10 min 使结晶物充分溶解,在酶联免疫检测仪 490 nm 波长测定每孔的吸光度值。细胞分组:①正常对照组(DMEM 培养基与完全培养基 1:1 稀释);②DMSO 对照组(DMEM 培养基与完全培养基 1:1 稀释,DMSO 浓度为 0.55 mg/ml);③高糖腹透液组(4.25%腹膜透析液与 DMEM 完全培养基 1:1 稀释,高糖腹透液);④HGPDS+Flu 组(4.25%腹膜透析液与 DMEM 完全培养基 1:1 稀释,Flu 浓度为 1 × 10<sup>-8</sup>、1 × 10<sup>-7</sup>、1 × 10<sup>-6</sup> mol/L);⑤单纯 Flu 组(DMEM 与完全培养基 1:1 稀释,Flu 浓度为 1 × 10<sup>-8</sup>、1 × 10<sup>-7</sup>、1 × 10<sup>-6</sup> mol/L)。同时以不加细胞只有培养基的孔为调零孔。每孔设 6 个复孔。

##### 1.2.3 RT-PCR 检测 FN mRNA 表达

细胞同步化 24 h 后,分为:①HGPDS 组,分别刺激 0、1、6、24 h;②正常对照组、HGPDS 组、HGPDS+Flu(1 × 10<sup>-8</sup>、1 × 10<sup>-7</sup>、1 × 10<sup>-6</sup> mol/L)组、单纯 Flu(1 × 10<sup>-6</sup> mol/L)组,均刺激 6 h。各组干预液配制方法同 MTT。干预结束后收集细胞。TRIzol 法提取细胞总 RNA,测定浓度后,取 1.0 μg 进行逆转录(按照逆转录试剂盒操作说明进行)获得 cDNA,反应体系为 20 μl。取 2 μl cDNA 模板进行 PCR 扩增,总反应体系为 50 μl。内参为 GAPDH,特异性引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成(表 1),反应结束后后分别取 PCR 产物各 5 μl,2.0%琼脂糖凝胶电泳(含 0.5 μg/ml 溴化乙锭),紫外灯下观察结果,图像分析软件进行 PCR 条带灰度扫描,以 GAPDH 为内参作半定量分析,数值以两者吸光度比值表示。同一实验重复 3 次。

表 1 FN、GAPDH 引物序列及产物大小

Table 1 PCR primer sequences and conditions of amplification

基因	引物序列(5'→3')	产物大小(bp)	退火温度(℃)
FN	上游:AGCCGCCACGTGCCAGGATTAC	439	54.0
	下游:CTTATGGGGGTGCCGTTGTGG		
GAPDH	上游:AGGTCCGAGTCAACGGATTTG	532	59.4
	下游:GTGATGCCATGGACTGTGTT		

##### 1.2.4 ELISA 检测 FN 蛋白表达

细胞以 1 × 10<sup>5</sup> 个/孔接种于 12 孔板中,当细胞生长至 70%~80%融合后同步化 24 h, 分组同 1.2.3, 其中 HGPDS 组分别刺激 0、6、12、24、48、72 h, Flu 组均刺激 24 h, 每组设 3 个复孔。处理结束后收集各组上清,采用双抗体夹心法,按 ELISA 试剂盒说明书测定 FN 的浓度。同时收集各孔细胞提取

细胞总蛋白,采用 BCA 法测定细胞总蛋白含量,各组 FN 蛋白含量均采用总蛋白进行校正。

#### 1.3 统计学方法

应用 SPSS13.0 统计软件对图像分析的数据进行统计学处理,所有数据的处理结果以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用多个样本均数比较的单因素方差分析,各组间两两比较采用 LSD-t 法,

$P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HGPDS 及 Flu 对细胞活力的影响

MTT 结果显示,与正常对照组比较,DMSO 及单纯 Flu 对细胞活力无明显影响 ( $P > 0.05$ ),含 HGPDS 处理的各组细胞活力与正常对照组相比,自 6 h 开始即有明显下降,持续至 72 h ( $P < 0.05$ )。与 HGPDS 组相比,HGPDS+Flu 各组作用 24、36 h 细胞活力有所恢复,其中,HGPDS+Flu ( $1 \times 10^{-6}$  mol/L) 共同作用 24 h 与单独 HGPDS 处理组相比,HMrSV5

细胞活力改善有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 1)。

### 2.2 HGPDS 及 Flu 对 FN mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示, FN mRNA 表达于 HGPDS 刺激 HMrSV5 细胞后 1 h 开始升高, 6 h 达高峰, 24 h 有所降低。与 0 h 相比, 6 h 及 24 h 升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 图 2)。加 Flu 干预 6 h 后, Flu  $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-7}$  mol/L 均可以明显降低 HGPDS 诱导的 FN 的高表达, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), Flu  $1 \times 10^{-8}$  mol/L 作用不明显 ( $P > 0.05$ )。与对照组比较, 单纯 Flu  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 对 FN mRNA 表达无明显影响 ( $P > 0.05$ , 图 3)。

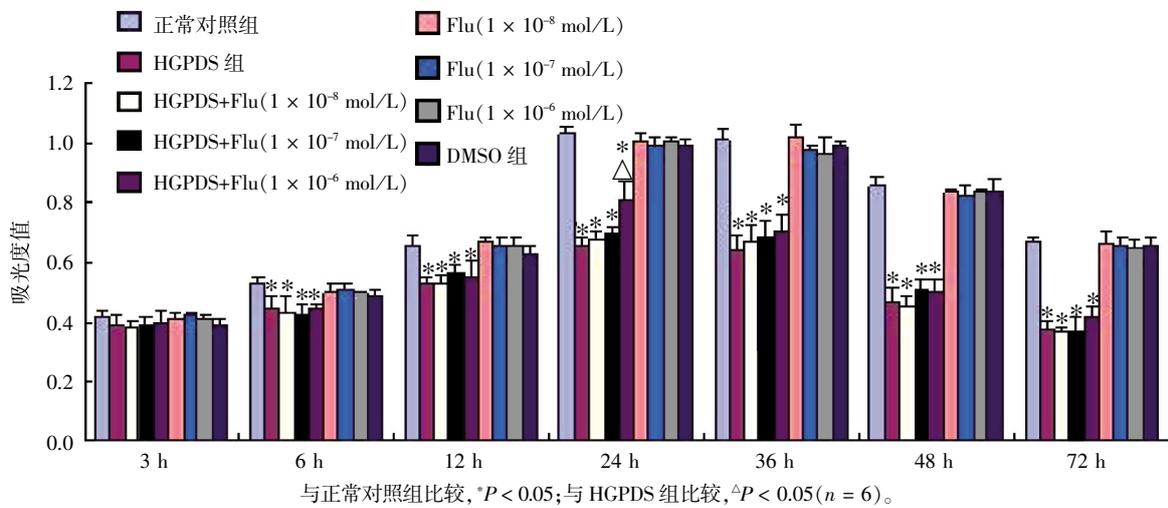


图 1 HGPDS 及 Flu 对 HMrSV5 细胞活力的影响

Figure 1 The HMrSV5 cellular viability influenced by HGPDS and fluvastatin

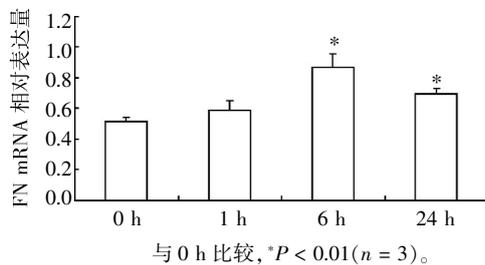
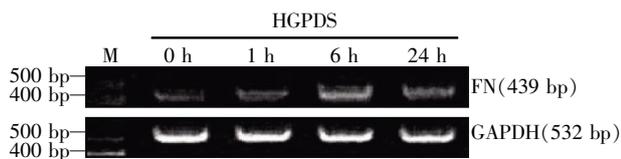


图 2 HGPDS 作用不同时间 FN mRNA 表达的变化

Figure 2 Effects of HGPDS on the FN mRNA expression

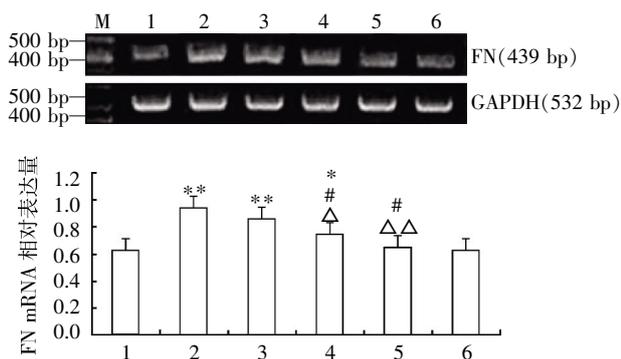
### 2.3 HGPDS 及 Flu 对 FN 蛋白表达的影响

ELISA 结果显示, HGPDS 刺激 HMrSV5 细胞后, FN 蛋白表达于 6 h 开始升高, 24 h 达高峰, 后逐渐降低, 与 0 h 相比, 24、48、72 h 升高明显, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ , 表 2)。Flu  $1 \times 10^{-6}$ 、

$1 \times 10^{-7}$  mol/L 作用细胞 24 h 均可以明显降低 HGPDS 诱导的 FN 的高表达, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), Flu  $1 \times 10^{-8}$  mol/L 作用不明显 ( $P > 0.05$ )。与对照组比较, 单纯 Flu  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 对 FN mRNA 表达无明显影响 ( $P > 0.05$ , 表 3)。

## 3 讨论

腹膜透析是终末期肾脏病的主要替代治疗方法之一, 含葡萄糖非生理性腹透液的使用是导致腹膜结构和功能受损的主要因素。研究提示, 高糖腹透液本身对 HPMCs、腹腔内固有细胞以及宿主防御机制均有毒性作用, 并可导致 HPMCs 的凋亡和脱落<sup>[4]</sup>。此外, 葡萄糖腹透液在热消毒过程中产生大量的糖降解产物(GDPs), 远期的不良反应还包括加速糖基化终末产物(AGEs)的产生<sup>[5]</sup>, 引起腹膜新生血管形成、腹膜血管损害、糖尿病样改变以及腹膜纤维化, 最终导致腹膜衰竭、退出腹膜透析。Zareie 等<sup>[6]</sup>研究发现, 在接受腹膜透析的大鼠模型中, HGPDS 组可



M: DNA marker; 1: 正常对照组; 2: HGPDS 组; 3: HGPDS+Flu ( $1 \times 10^{-8}$  mol/L) 组; 4: HGPDS+Flu ( $1 \times 10^{-7}$  mol/L) 组; 5: HGPDS+Flu ( $1 \times 10^{-6}$  mol/L) 组; 6: 单纯 Flu ( $1 \times 10^{-6}$  mol/L) 组。与 1 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 2 组比较, # $P < 0.01$ ; 与 3 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  ( $n = 3$ )。

图 3 不同浓度 Flu 对 HGPDS 诱导的 FN mRNA 表达的影响  
Figure 3 Effect of fluvastatin on the HGPDS-stimulated mRNA expression of FN

表 2 HGPDS 作用不同时间 FN 蛋白表达的变化

Table 2 Effect of HGPDS on the FN protein expression ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

时间(h)	FN(ng/mg pro)
0	119.41 $\pm$ 6.82
6	133.64 $\pm$ 25.72
12	141.87 $\pm$ 19.68
24	204.06 $\pm$ 22.79**
48	178.07 $\pm$ 4.86***
72	161.36 $\pm$ 23.32**

与 0 h 比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 24 h 比较, # $P < 0.01$ 。

表 3 氟伐他汀对 HGPDS 诱导的 FN 蛋白表达的影响

Table 3 Effect of fluvastatin on the HGPDS-stimulated FN protein expression ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	FN(ng/mg pro)
正常对照组	119.87 $\pm$ 6.58
HGPDS 组	200.19 $\pm$ 15.57*
HGPDS+Flu ( $1 \times 10^{-8}$ mol/L) 组	192.03 $\pm$ 19.22*
HGPDS+Flu ( $1 \times 10^{-7}$ mol/L) 组	167.54 $\pm$ 10.21* $\Delta$
HGPDS+Flu ( $1 \times 10^{-6}$ mol/L) 组	159.78 $\pm$ 7.88* $\Delta\Delta$
单纯 Flu ( $1 \times 10^{-6}$ mol/L) 组	117.55 $\pm$ 5.93

与正常对照组比较, \* $P < 0.01$ ; 与 HGPDS 组比较, # $P < 0.01$ ; 与 HGPDS+Flu ( $1 \times 10^{-8}$  mol/L) 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

以增加肠系膜静脉中白细胞数量, 腹膜血管生成增加, 同时伴随发生的还有肠系膜和壁层腹膜的纤维化。Flessner 等<sup>[7]</sup>在大鼠的研究中也发现, 进行腹膜透析的大鼠腹膜血管生成增加, 腹膜组织增厚, 炎症因子表达增加。因此, 研究 HGPDS 对腹膜的损伤并早期干预是延长腹膜透析时间的关键因素。

FN 是纤维化过程中重要的胞外基质, 当腹膜受

损时, FN 分泌增多, 可吸引纤维母细胞聚集在受损腹膜的周围, 而纤维母细胞不仅可以合成前炎症细胞因子, 还可以合成胶原蛋白成分, 进而导致腹膜增厚, 最终发生超滤衰竭。刘映红等<sup>[8]</sup>发现高糖刺激 HPMCs 后, 细胞增殖明显受到抑制, 细胞表达 FN 明显高于对照组。刘虹等<sup>[9]</sup>的研究也发现高浓度葡萄糖刺激人腹膜间皮细胞后, 不仅致纤维化因子 TGF- $\beta$ 1 表达增加, 胞外基质 FN 的表达也明显增加。HGPDS 首先诱导腹膜 TGF- $\beta$ 1 表达增加, 进而促进 FN 合成增加, 转染 TGF- $\beta$ 1 的反义 RNA 后, HPMCs 表达 FN 明显下降<sup>[10]</sup>。本研究结果显示, HGPDS 作用下的 HPMCs 细胞活力明显下降, FN 表达明显增加, 进一步证明了 HGPDS 对腹膜间皮细胞的损伤。

研究发现, 他汀类药物具有非依赖降脂的多效性作用, 可通过抑制甲羟戊酸代谢产物的合成, 使小分子鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 (如 ERK、Ras、Rho、Rac) 不能定位于细胞膜, 抑制细胞内多种信号转导, 从而调节细胞因子和纤维化因子的合成, 减少细胞外基质合成, 发挥抗炎抗纤维化等保护作用<sup>[2-3]</sup>。本研究中, Flu 可以抑制 HGPDS 诱导的 HPMCs 内 FN 的表达增加, 但是实现此作用的机制还不清楚。Schaafsma 等<sup>[11]</sup>研究发现斯伐他汀可以抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的气道成纤维细胞 FN 的合成增加, 且此作用可被外源性甲羟戊酸阻断。另有研究报道, HGPDS 可以诱导大鼠腹膜间皮细胞内活性氧产生增加, 阿托伐他汀可以抑制此作用<sup>[12]</sup>。近几年, 作为多种信号通路功能性交汇点的血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶 1 (serum and glucocorticoid induced kinase 1, SGK1) 也越来越得到重视<sup>[13-15]</sup>。因此, 氟伐他汀是通过抑制小 G 蛋白还是通过抑制氧化应激抑或通过 SGK1 通路影响 HGPDS 诱导的 HPMC 内 FN 表达增加, 还需要进一步研究。

本实验发现, Flu 可以降低 HGPDS 诱导的人腹膜间皮细胞 FN 的表达, 为他汀类药物临床防治腹膜纤维化提供了新的理论依据。但是具体机制还有待于进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Loureiro J, Aguilera A, Selgas R, et al. Blocking TGF- $\beta$ 1 protects the peritoneal membrane from dialysate-induced damage[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(9): 1682-1695
- [2] Wei JL, Ma CY, Zhang YD, et al. Synergistic effects of pravastatin and pioglitazone in renal tubular epithelial cells induced by transforming growth factor-beta1 [J]. Cell Biol Int, 2007, 31(5): 451-458

[3] Xie JY, Chen N, Ren H, et al. Angiotensin II-mediated activation of fibrotic pathways through ERK1/2 in rat peritoneal mesothelial cells [J]. *Ren Fail*, 2010, 32(7): 871-879

[4] Zareie M, Hekking LH, Welten AG, et al. Contribution of lactate buffer, glucose and glucose degradation products to peritoneal injury *in vivo* [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2003, 18(12): 2629-2637

[5] Boulanger E, Grossin N, Wautier MP, et al. Mesothelial RAGE activation by AGEs enhances VEGF release and potentiates capillary tube formation [J]. *Kidney Int*, 2007, 71(2): 126-133

[6] Zareie M, van Lambalgen AA, ter Wee PM, et al. Better preservation of the peritoneum in rats exposed to amino acid-based peritoneal dialysis fluid [J]. *Perit Dial Int*, 2005, 25(1): 58-67

[7] Flessner MF, Credit K, Richardson K, et al. Peritoneal inflammation after twenty-week exposure to dialysis solution; effect of solution versus catheter-foreign body reaction [J]. *Perit Dial Int*, 2010, 30(3): 284-293

[8] 刘映红, 刘伏友, 张浩, 等. 高糖对人腹膜间皮细胞的增殖和损伤及分泌细胞因子的影响 [J]. *中南大学学报(医学版)*, 2006, 31(4): 575-579

[9] 刘虹, 彭佑明, 刘伏友, 等. Troglitazone 对人腹膜间皮细胞 TGF- $\beta$ 1 和纤维连接蛋白表达的影响 [J]. *中南大学学报(医学版)*, 2007, 32(3): 473-479

[10] Liu F, Liu H, Peng Y, et al. Inhibition of TGF- $\beta$ 1 expression in human peritoneal mesothelial cells by pcDU6 vector-mediated TGF- $\beta$ 1 shRNA [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2006, 11(1): 23-28

[11] Schaafsma D, McNeill KD, Mutawe MM, et al. Simvastatin inhibits TGF $\beta$ 1-induced fibronectin in human airway fibroblasts [J]. *Respir Res*, 2011, 24(12): 113

[12] Carrión B, Pérez-Martínez FC, Monteagudo S, et al. Atorvastatin reduces high glucosetoxicity in rat peritoneal mesothelial cells [J]. *Perit Dial Int*, 2011, 31(3): 325-331

[13] Bergler T, Stoelcker B, Jeblick R, et al. High osmolality induces the kidney-specific chloride channel CLC-K1 by a serum and glucocorticoid-inducible kinase 1 MAPK pathway [J]. *Kidney Int*, 2008, 74(9): 1170-1177

[14] Yamahara H, Kishimoto N, Nakata M, et al. Direct aldosterone action as a profibrotic factor via ROS-mediated SGK1 in peritoneal fibroblasts [J]. *Kidney Blood Press Resm*, 2009, 32(3): 185-193

[15] Won M, Park KA, Byun HS, et al. Protein kinase SGK1 enhances MEK/ERK complex formation through the phosphorylation of ERK2; implication for the positive regulatory role of SGK1 on the ERK function during liver regeneration [J]. *J Hepatol*, 2009, 51(1): 67-76

[收稿日期] 2012-04-10

