

高糖腹透液对腹膜间皮细胞分泌 VEGF 的影响及氟伐他汀的干预作用

武 侠, 刘 佳*, 刘艳春, 徐亚光, 赵秀芬, 钱 军, 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: 观察氟伐他汀(fluvastatin, Flu)对高糖腹透液(high-glucose peritoneal dialysate, HGPDS)诱导的人腹膜间皮细胞(human peritoneal mesothelial cells, HPMCs)分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的影响。方法: 体外培养 HPMCs, 同步化 48 h 后, 分组如下: 正常对照组、HGPDS 组、HGPDS+Flu 组、单纯 Flu 组。倒置显微镜观察各组细胞形态, RT-PCR 法检测各组 VEGF 的 mRNA 表达, Western blot 检测各组 VEGF 蛋白的表达。结果: 与正常对照组相比, 在 HGPDS 作用下, 48 h 后细胞由铺路石样转变为长梭形, 1×10^{-6} mol/L Flu 可部分逆转 HPMCs 的形态改变。与正常对照组相比, 在 HGPDS 作用下, 人腹膜间皮细胞 VEGF mRNA 及蛋白表达明显增多($P < 0.05$), 并呈时间依赖性, VEGF mRNA 和蛋白分别在 HGPDS 干预后 12 h 和 48 h 达高峰($P < 0.05$)。Flu 可明显抑制 HGPDS 诱导的 VEGF 的表达($P < 0.05$), 并呈浓度依赖性。结论: 适当浓度的 Flu 可以抑制 HGPDS 刺激体外培养人腹膜间皮细胞 VEGF 表达增加。

[关键词] 氟伐他汀; 高糖腹透液; 人腹膜间皮细胞; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R392.12

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)06-754-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20130608

The effect of high-glucose peritoneal dialysate and fluvastatin on the expression of vascular endothelial growth factor in human peritoneal mesothelial cells

Wu Xia, Liu Jia*, Liu Yanchun, Xu Yaguang, Zhao Xiufen, Qian Jun, Xing Changying

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

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of high-glucose peritoneal dialysate (HGPDS) and fluvastatin (Flu) on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human peritoneal mesothelial cells (HPMCs). **Methods:** After incubated in DMEM with 0.01% FBS for 48 h, HPMCs were randomly divided as follows: control group, HGPDS group, HGPDS+Flu group, Flu alone group. The phenotype changes of HPMCs were observed by light microscopy. The mRNA expression of VEGF was observed by RT-PCR. HPMCs were treated for 48 h and the levels of VEGF protein were measured by Western blot. **Results:** Compared with the normal control group, after incubation with HGPDS for 48 h, the cell morphology was changed from a typical cobblestone-like appearance to fibroblast-like appearance. Flu (1×10^{-6}) mol/L could partially improved the cell morphology changed by HGPDS. The mRNA and protein expressions of VEGF increased time dependently in HPMCs treated with HGPDS ($P < 0.05$), which peaked at 12 h and 48 h, respectively. Flu significantly inhibited the effects of HGPDS on the expression of VEGF in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). **Conclusion:** Flu could decrease VEGF expression in HPMCs which was induced by HGPDS.

[Key words] fluvastatin; high glucose peritoneal dialysate; human peritoneal mesothelial cells; vascular endothelial growth factor

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(6): 754-758]

腹膜透析(peritoneal dialysis, PD)已经成为终末期肾脏病(end stage renal disease, ESRD)的主要替代

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81170660);江苏省科技厅基础研究计划(自然科学基金)(BK2011849);江苏省卫生厅科研基金资助(H200317)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jiajj3@sina.com

治疗之一。长期的腹膜透析将导致腹膜功能的衰竭,腹膜功能的保护是腹膜透析面临的问题之一。腹膜表面的间皮细胞能够分泌多种物质,在长期的腹膜透析过程中,会通过分泌转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等增加来

改变腹膜的功能^[1-3]。现在用的腹膜透析液多为非生物相容性的,葡萄糖透析液就为最常用的一种,葡萄糖透析液由于含有多种葡萄糖降解产物(GDP),这些物质会改变腹膜正常结构,使间皮下基质增多,血管增生,通透性增加,最终可能发展为超滤衰竭^[4]。有报道 VEGF 在腹膜的通透性增加及血管增生方面发挥重要作用^[5]。本研究旨在探讨高糖腹透液(high-glucose peritoneal dialysate,HGPDS) 对人腹膜间皮细胞 (human peritoneal mesothelial cells,HPMCs)分泌 VEGF 的作用及氟伐他汀对腹膜间皮细胞的保护作用,此类作用尚未见文献报道。

1 材料和方法

1.1 材料

人腹膜间皮细胞株(HMrSV5,上海劲马生物科技有限公司);氟伐他汀(fluvastatin,Flu,粉剂,北京诺华公司馈赠);DMEM 培养基(粉剂)、青链霉素和胎牛血清(Gibco 公司,美国);4.25%葡萄糖腹膜透析液(Baxter 公司,美国);TRIZOL,RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司,日本);兔抗人 VEGF 多克隆抗体(Abcam 公司,美国);鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体(武汉博士德公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

HMrSV5 细胞在 37℃、5%CO₂ 的培养箱内生长,所用完全培养基为 DMEM 培养基(含葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L)添加 10%胎牛血清、链霉素 100 U/L 和

青霉素 100 U/L。2~3 d 换液,待长满后用 0.25%的胰蛋白酶消化传代,用于实验的为第 5~10 代细胞。

1.2.2 细胞形态观察

体外培养 HPMCs,同步化 48 h 后,分组如下:正常对照组、HGPDS 组、单纯 Flu 组、HGPDS+Flu 组。培养 48 h 后在倒置显微镜下观察细胞形态变化。

1.2.3 实验分组

HPMCs 被同步化 48 h 后,分为:①正常对照组(DMEM 培养基与完全培养基 1:1 稀释);②HGPDS 组(按 1:1 的比例稀释 4.25%腹膜透析液和 DMEM 完全培养基,分别刺激 0、6、12、24 h);③HGPDS+Flu(按 1:1 的比例稀释 4.25%腹膜透析液和 DMEM 完全培养基,所加 Flu 浓度为 1 × 10⁻⁶、1 × 10⁻⁷、1 × 10⁻⁸ mol/L)组;④单纯 Flu(按 1:1 的比例稀释 DMEM 和完全培养基,氟伐他汀浓度为 1 × 10⁻⁶ mol/L)组,按分组条件均干预细胞 12 h。干预结束后收集细胞。

1.2.4 RT-PCR 检测 VEGFmRNA 表达

用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,分光光度计测定浓度后,从总 RNA 中取 1.0 g 进行逆转录获得 cDNA,反应体系为 10 μl。取 1 μl cDNA 模板进行 PCR 扩增,该反应体系为 25 μl。GAPDH 作为内参,其特异性引物由上海英俊生物工程有限公司合成(表 1),扩增结束后后分别取 PCR 产物各 8 μl,2.5%琼脂糖凝胶电泳(含 0.6 pg/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 VEGF 及 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(℃)
VEGF	上游: ATGACGAGGGCCTGGACTGT	213	54
	下游: GGGATTCCTGGGCTTTCGTTT		
GAPDH	上游: GGGAGCCAAAAGGGTCATCATCTC	353	60
	下游: CCATGCCAGTGAGCTTCCCGTTC		

1.2.5 Western blot 检测 VEGF 蛋白的表达

用 0.01%胎牛血清的 DMEM 培养液同步化细胞 48 h 后,分组同 RT-PCR。干预结束后提取全蛋白,测浓度后,取 70 μg 上样,以 12%SDS-PAGE 电泳/转膜,用 5%脱脂奶粉在室温封闭 60 min,加入一抗 4℃过夜(兔抗人 VEGF 多克隆抗体,1:1 000),小鼠抗人单克隆 GAPDH 抗体(1:500,武汉博士德公司),HRP 标记的二抗(山羊抗兔、山羊抗鼠,1:5 000)室温孵育 60 min,ECL 显影。凝胶成像分析系统扫描后以 VEGF 与 GAPDH 条带灰度的比值表示

VEGF 的相对表达量。

1.3 统计学方法

应用 SPSS13.0 统计软件统计学处理,所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,各组间两两比较采用 LSD-t 法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HGPDS 对细胞形态的影响

正常人腹膜间皮细胞形态呈铺路石样,细胞之

间连接紧密,HGPDS 干预 HPMCs 48 h 后形态发生改变,由正常的铺路石样像长梭形转变,细胞间隙增大。而加用 Flu 1×10^{-6} mol/L 作用 48 h 后,细胞细胞形态与 HGPDS 干预比较有明显恢复。单纯 Flu 1×10^{-6} mol/L 对细胞形态没有影响(图 1)。

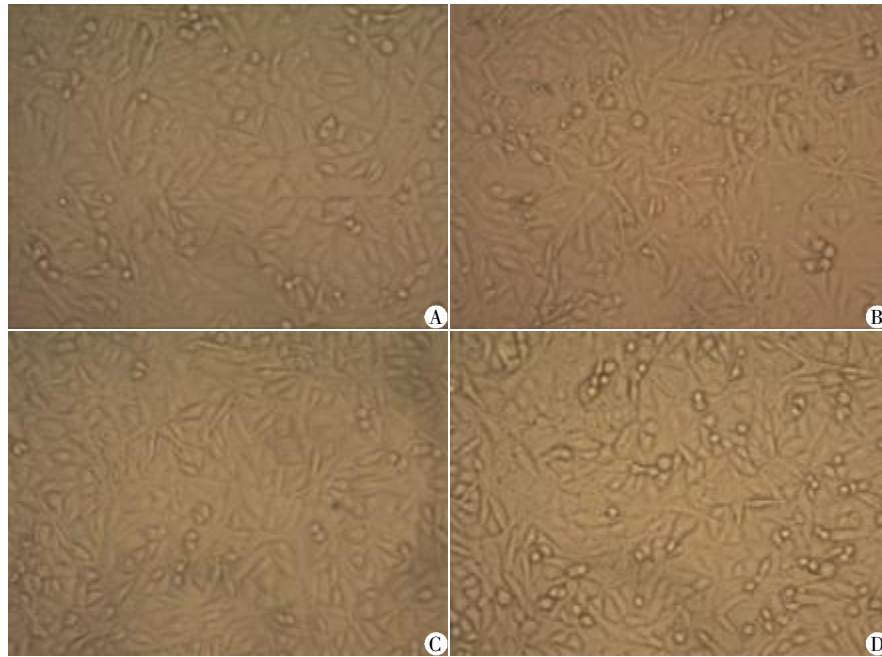
2.2 HGPDS 及 Flu 对 VEGF mRNA 表达的影响

HGPDS 干预腹膜间皮细胞时 VEGF mRNA 的表达量呈时间依赖性增高,12 h 达峰值。Flu 1×10^{-6}

mol/L 可以明显减少高糖腹透液组 VEGF mRNA 的表达($P < 0.05$)。Flu 1×10^{-7} mol/L 与 1×10^{-8} mol/L 的作用无统计学意义($P > 0.05$,图 2)。

2.3 HGPDS 及 Flu 对 VEGF 蛋白表达的影响

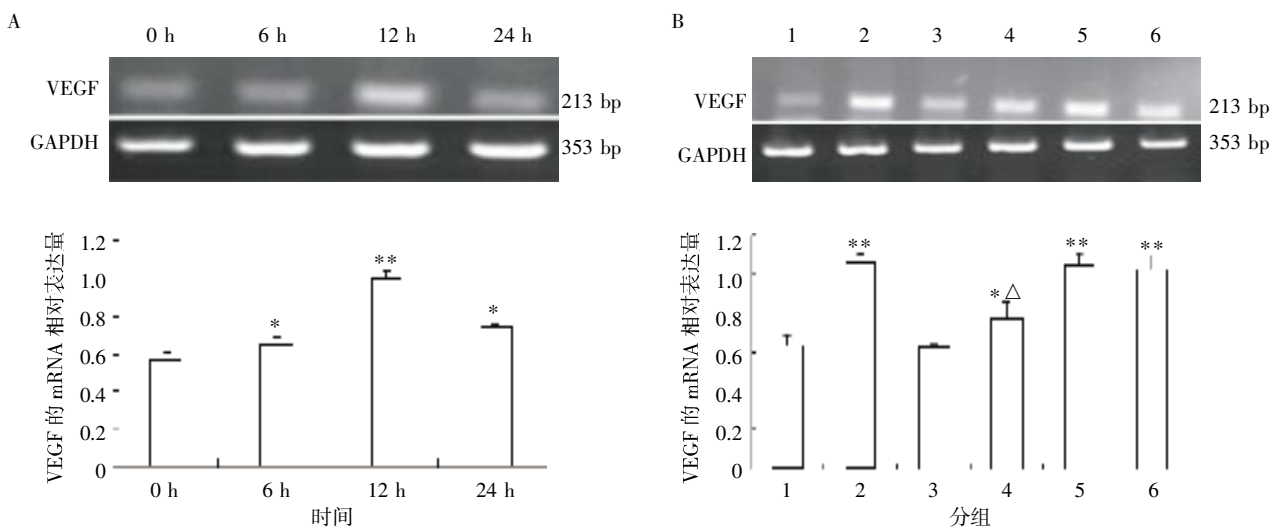
HGPDS 干预 HPMCs 后,VEGF 随干预时间的延长表达逐渐增加,48 h 时 VEGF 蛋白表达最高(图 3)。Flu 可以部分降低 HGPDS 诱导的 VEGF 的高表达, 1×10^{-6} mol/L 浓度的作用最明显(图 4)。



A:正常对照组;B:HGPDS;C:HGPDS + Flu(1×10^{-6} mol/L)组;D:单纯 Flu 组。

图 1 HGPDS 对细胞形态的影响($\times 10$)

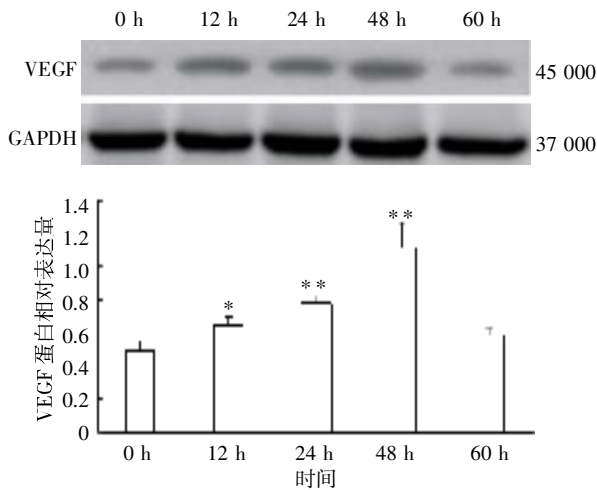
Figure 1 HGPDS on the morphologic changes of cultured HPMC($\times 10$)



A:HGPDS 单独作用于腹膜间皮细胞不同时间 VEGF mRNA 的表达。与 0 h 比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ ($n = 3$);B:不同组细胞作用于腹膜间皮细胞 VEGF mRNA 的表达。1:正常对照组;2:HGPDS 组;3:单纯 Flu 组;4:HGPDS + Flu(1×10^{-6})mol/L;5:HGPDS + Flu(1×10^{-7})mol/L;6:HGPDS + Flu(1×10^{-8})mol/L。与 1 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 2 组比较, $\Delta P < 0.05$ ($n = 3$)。

图 2 HGPDS 及 Flu 对 VEGF mRNA 表达的影响

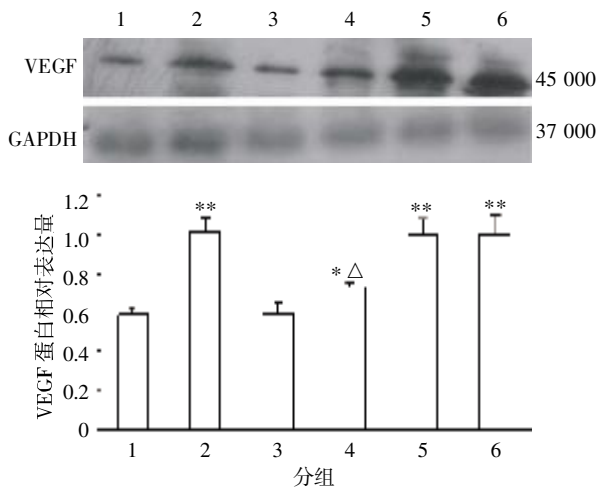
Figure 2 Flu and HGPDS on the expression of VEGF mRNA



与 0 h 相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n = 3$)。

图 3 HGPDS 对 VEGF 蛋白表达的影响

Figure 3 HGPDS on the expression of VEGF protein



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

图 4 Flu 对 HGPDS 诱导的 HGPDS VEGF 蛋白表达的影响
Figure 4 Flu on the expression of VEGF protein induced by HGPDS

3 讨论

腹膜透析已经成为治疗终末期肾衰的主要替代治疗方法之一,而腹膜功能的有效透析的关键。腹膜间皮细胞作为腹膜的最外层,对维持腹膜的功能和结构起着重要作用^[6-7]。HGPDS 对腹膜间皮细胞的损伤包括紧密连接的断裂,细胞极性的缺失和迁徙性的增加。本研究用 HGPDS 干预 48 h 后,腹膜间皮由铺路石样转变为梭型,细胞间隙增加,证明了 HGPDS 对腹膜间皮细胞的损伤,与文献报道相符。

超滤衰竭是导致腹透病人退出腹透的原因之

一,非生物相容性的 HGPDS 在腹膜的结构和功能中起着重要的作用。文献报道 HGPDS 会导致腹膜 VEGF 分泌增加,血管增生,近而导致小分子通透性增加,超滤衰竭^[8-9]。本研究用 HGPDS 干预 HPMCs 后,VEGF mRNA 和蛋白均呈时间依赖性增高,首次在体外证明用腹膜透析液可以促进人腹膜间皮细胞 VEGF 的分泌,之前的文献多是对腹膜透析液中的糖基化终末产物的研究,本干预更接近现实透析情况。那么 Flu 是否可以改善 HGPDS 对于 HPMCs VEGF 的影响,本课题组做了进一步的研究。

Flu 属于羟甲基戊二酰辅酶 A(HMG-CoA)还原酶抑制剂之一,它能够通过影响甲羟戊酸等一系列中间产物的产生,干扰小 GTP 蛋白如 Ras、Rac 和 Rho 等的活化,影响细胞信号由胞外向胞内的传递,进而影响细胞的多种生物学功能^[10-11]。近年来,关于 Flu 独立于降脂以外的作用研究较多,包括抗炎,抗氧化应激等作用。本课题组之前研究发现 HGPDS 可以促进腹膜间皮细胞分泌纤维连接蛋白,促进腹膜间皮细胞的凋亡,而 Flu 可以降低 HGPDS 诱导的腹膜间皮细胞分泌的纤维连接蛋白,同时降低腹膜间皮细胞的凋亡^[12]。本研究显示 HGPDS 可以使腹膜间皮细胞发生形态学变化,Flu 可以部分逆转这些变化,同时可以减少 VEGF 的分泌,推测可对超滤衰竭的发生起到延缓作用,但有待进一步的临床试验验证。Flu 可以通过上调 Bcl-2 的表达来减少内皮细胞的氧化应激的损伤,也可通过抑制还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶的活性从而起到抗氧化作用^[13-14],通过抑制胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)的活化进而起到抗炎作用^[15]。本实验中 Flu 通过何种细胞信号通路影响腹膜间皮细胞分泌 VEGF 的影响,有待进一步研究。

总之,本研究表明 Flu 可以部分逆转 HGPDS 对腹膜间皮细胞的影响,保护腹膜的功能,有望为 Flu 应用于防治腹膜功能恶化提供新的依据。

[参考文献]

- [1] He Z, Potter R, Li X, et al. Stretch of human mesothelial cells increases cytokine expression[J]. Adv Perit Dial, 2012, 28(1): 2-9
- [2] Loureiro J, Aguilera A, Selgas R, et al. Blocking TGF- β 1 protects the peritoneal membrane from dialysate-induced damage[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(9): 1682-1695
- [3] Mizutani M, Ito Y, Mizuno M, et al. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) is increased in peritoneal

dialysis patients with high peritoneal solute transport rate [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*,2010,298 (3):F721-733

[4] Davies SJ,Phillips L,Naish PF,et al. Peritoneal glucose exposure and changes in membrane solute transport with time on peritoneal dialysis [J]. *J Am Soc Nephrol*,2001,12(5):1046-1051

[5] Aroeira LS,Aguilera A,Selgas R,et al. Mesenchymal conversion of mesothelial cells as a mechanism responsible for high solute transport rate in peritoneal dialysis:role of vascular endothelial growth factor[J]. *Am J Kidney Dis*,2005,46(5):938-948

[6] Aroeira LS,Aguilera A,Sanchez-Tomero JA,et al. Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients:pathologic significance and potential therapeutic interventions [J]. *J Am Soc Nephrol*,2007,18(7):2004-2013

[7] Yanez-Mo M,Lara-Pezzi E,Selgas R,et al. Peritoneal dialysis and epithelial-to- mesenchymal transition of mesothelial cells[J]. *New Engl J Med*,2003,348 (5):403-413

[8] Nessim SJ,Perl J,Bargman JM. The renin-angiotensin-aldosterone system in peritoneal dialysis:is what is good for the kidney also good for the peritoneum? [J]. *Kidney International*,2010,78(1):23-28

[9] 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

[10] Kwak B,Mulhaupt F,Myit S,et al. Statins as a newly recognized type of immunomodulator[J]. *Nat Med*,2000,6(12):1399-1402

[11] Bussolati B,Deregibus MC,Fonsato V,et al. Statins prevent oxidized LDL-induced injury of glomerular podocytes by activating the phosphatidylinositol3-kinase/AKT-signaling pathway[J]. *J Am Soc Nephrol*,2005,16(7):1936-1947

[12] 刘艳春,刘 佳,徐亚光,等. 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[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*,2012,32(7):908-912

[13] Xu SZ,Zhong W,Watson NM,et al. Fluvastatin reduces oxidative damage in human vascular endothelial cells by upregulating Bel-2[J]. *J Thromb Haemost*,2008,6(4):692-700

[14] Bandoh T,Sato EF,Mitani H,et al. Antioxidative potential of fluvastatin via the inhibition of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH) oxidase activity[J]. *Biol Pharm Bull*,2003,26(6):818-822

[15] Chen JC,Huang KC,Lin WW. HMG-CoA reductase inhibitors upregulate heme oxygenase-1 expression in murine RAW264.7 macrophages via ERK,p38 MAPK and protein kinase G pathways[J]. *Cell Signal*,2006,18(1):32-39

[收稿日期] 2013-02-27

我刊现已启用网上稿件管理系统，作者登陆
<http://jnmunjmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
 审理情况。