

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.02.004

## 腹膜透析液对腹膜间皮细胞 TLR2 和 TLR4 表达的影响\*

伍军,何敏,张健,何文飞,程兵

(汕头大学医学院附属粤北医院肾内科,广东韶关 512026)

**[摘要]** 目的 观察不同浓度葡萄糖(dextrose)腹膜透析液、艾考糊精(icodextrin)腹膜透析液对人腹膜间皮细胞 Toll 样受体 2(TLR2)和 TLR4 表达的影响。方法 体外培养人腹膜间皮细胞株第 5~10 代(HMrSV5,DMEM/F12 培养基含 10% 胎牛血清)用于实验研究。MTT 检测细胞活力,实验分为 5 组:阴性对照组、1.50% dextrose 组、2.50% dextrose 组、4.25% dextrose 组、7.5% icodextrin 组,应用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 TLR2 和 TLR4 的表达水平。结果 不同浓度 dextrose 腹膜透析液作用 24 h 对腹膜间皮细胞 TLR2 和 TLR4 的表达无明显影响。作用 48 h,1.50% dextrose 组、2.50% dextrose 组、4.25% dextrose 组 TLR2 分别降低(5.5±2.8)%、(31.4±7.5)%、(54.9±1.9)%、TLR4 分别降低(32.9±17.6)%、(47.7±13.5)%、(66.4±13.5)%;作用 72 h,1.50% dextrose 组、2.50% dextrose 组、4.25% dextrose 组 TLR2 表达分别降低(29.4±14.7)%、(38.9±9.9)%、(63.5±16.5)%、TLR4 表达分别降低(59.5±16.8)%、(63.1±9.5)%、(79.2±14.0)%;7.5% icodextrin 组 TLR2 和 TLR4 表达与阴性对照组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 dextrose 透析液下调 HMrSV5 TLR2 和 TLR4 的表达;icodextrin 透析液对 TLR2 和 TLR4 的表达无显著影响。

**[关键词]** 腹膜透析;人腹膜间皮细胞;Toll 样受体 2;Toll 样受体 4

**[中图分类号]** R459.5

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2016)02-0156-03

## Effect of peritoneal dialysis fluids on the expression of TLR2 and TLR4 on peritoneal mesothelial cells\*

Wu Jun, He Min, Zhang Jian, He Wenfei, Cheng Bin

(Department of Nephrology, the Affiliated Yuebei Hospital of Medical College of Shantou University, Shaoguan, Guangdong 512026, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of glucose-based peritoneal dialysis fluids and icodextrin-based peritoneal dialysis fluids on the expression of TLR2 and TLR4 on human peritoneal mesothelial cells. **Methods** Human peritoneal mesothelial cell line 5-10 generations(HMrSV5) was cultured in DMEM/F12 medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS). Cell viability and cell proliferation were assessed using MTT method. The experiment were divided into 5 different groups: group A (control group), 1.5% dextrose group, 2.5% dextrose group, 4.25% dextrose group and 7.5% Icodextrin group. Icodextrin group (aikau dextrin), TLR2 and TLR4 expression were detected by Western blot. **Results** Treatment with different concentrations of glucose-based peritoneal dialysis fluids for 24 h did not affect the expression of TLR2 and TLR4 protein. In addition, after stimulation for 48 h, 1.5% dextrose, 2.5% dextrose, 4.25% dextrose decreased TLR2 expression by (5.5±2.8)%, (31.4±7.5)%, (54.9±1.9)% respectively, TLR4 expression by (32.9±17.6)%, (47.7±13.5)%, (66.4±13.5)% respectively. Stimulation for 72 h, decreased TLR2 expression by (29.4±14.7)%, (38.9±9.9)%, (63.5±16.5)% respectively, TLR4 expression by (59.5±16.8)%, (63.1±9.5)%, (79.2±14.0)% respectively. There was no significant change in TLR2 and TLR4 protein expression on 7.5% icodextrin group. **Conclusion** Glucose-based peritoneal dialysis fluids, but not icodextrin-based peritoneal dialysis fluids downregulates expression of TLR2 and TLR4 by HMrSV5.

**[Key words]** peritoneal dialysis; human peritoneal mesothelial cells; Toll-like receptor 2; Toll-like receptor 4

传统含葡萄糖(dextrose)腹膜透析液(简称“腹透液”)使用乳酸盐作为标准缓冲液(pH 5.2~5.5),dextrose 作为渗透剂。大量研究已经证实,乳酸盐 dextrose 腹透液的低 pH 值和高渗透性可抑制白细胞、腹膜间皮细胞、腹腔巨噬细胞和成纤维细胞的功能,长期暴露于生物不相容的腹透液被认为是影响宿主对感染的抵抗及对腹膜结构和功能产生负面影响的因素之一,而宿主对感染的抵抗能力下降是影响腹膜炎发生率和严重程度的重要因素<sup>[1-4]</sup>。Toll 样受体(TLR)是机体天然免疫防御机制的重要组成部分,其中,TLR2 主要识别革兰阳性细菌

细胞壁成分,TLR4 主要识别革兰阴性细菌细胞壁成分,在防御细菌感染中发挥重要作用。配体结合 TLR2 和 TLR4 可诱导激活共同的下游信号通路包括 NF- $\kappa$ B、MAPK(ERK、p38、JNK)及 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  等炎症因子的分泌<sup>[5]</sup>。那么,dextrose 腹透液对腹膜间皮细胞 TLR2 和 TLR4 的表达有无影响?此外,作为新型腹膜透析液,艾考糊精(icodextrin)腹透液是否影响 TLR2 和 TLR4 的表达?目前尚无相关报道。本研究拟在体外水平观察不同浓度 dextrose 腹透液、icodextrin 腹透液对腹膜间皮细胞 TLR2 和 TLR4 表达的影响。

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81200555)。 作者简介:伍军(1979-),副主任医师,博士,主要从事腹膜透析的基础与临床研究。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂 细胞:人腹膜间皮细胞株(HMrSV5)购自 ATCC 公司。主要试剂:不同浓度 dextrose 腹透液(1.50% dextrose,2.50% dextrose,4.25% dextrose),icodextrin 腹透液(7.5% icodextrin)由中国广州百特医疗有限公司提供。四甲基-偶氮唑蓝 [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide,MTT]购自美国 Sigma 公司。兔抗人 TLR2 多克隆抗体、兔抗人 TLR4 单克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 方 法

1.2.1 不同种类腹膜透析液对 HMrSV5 细胞活力的影响

HMrSV5 细胞株的体外培养、传代,将细胞按  $1 \times 10^4$ /mL( $200 \mu\text{L}$ )接种于 96 孔培养板,同步化培养 24 h。实验分为 5 组:阴性对照组(加同体积培养基)、1.50% dextrose 组、2.50% dextrose 组、4.25% dextrose 组、7.5% icodextrin 组,不同种类腹膜透析液作用细胞 24、48、72 h,无细胞接种孔为空白对照;作用时间结束,加入  $20 \mu\text{L}$  MTT( $5 \text{ mg/mL}$ )于  $37^\circ\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  培养 4 h,吸弃培养孔液体,加入二甲基亚砜(DMSO)  $150 \sim 200 \mu\text{L}$  置摇床上低速振荡  $10 \sim 15 \text{ min}$ ,使结晶物充分溶解,连续光谱光密度读板仪  $490 \text{ nm}$  处测量各孔的吸光度(A)值,计算细胞存活率=(腹透液刺激组-空白对照组)/(阴性对照组-空白对照组) $\times 100\%$ 。

1.2.2 不同种类腹透液对 HMrSV5 细胞 TLR2 和 TLR4 表达的影响

HMrSV5 细胞株按上述分组方法同步化培养 24 h,各组受试因素分别作用 24、48、72 h 后收集细胞,提取总蛋白,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 TLR2 和 TLR4 的表达。

1.3 统计学处理 采用 SPSS15.0 统计软件进行分析处理,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验或单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同种类腹透液对 HMrSV5 细胞活力的影响

1.50% dextrose 组、4.25% dextrose 组、7.5% icodextrin 组腹透液作用 24 h 各组细胞存活率分别为  $(98.4 \pm 3.9)\%$ 、 $(99.4 \pm 7.3)\%$ 、 $(72.0 \pm 16.2)\%$ 、 $(98.1 \pm 6.2)\%$ ;腹透液作用 48 h 各组细胞存活率分别为  $(94.4 \pm 11.4)\%$ 、 $(92.7 \pm 9.20)\%$ 、 $(71.2 \pm 7.0)\%$ 、 $(94.8 \pm 8.1)\%$ ;腹透液作用 72 h 各组细胞存活率分别为  $(73.4 \pm 3.9)\%$ 、 $(79.3 \pm 9.4)\%$ 、 $(60.5 \pm 5.4)\%$ 、 $(79.5 \pm 7.1)\%$ ,见图 1。

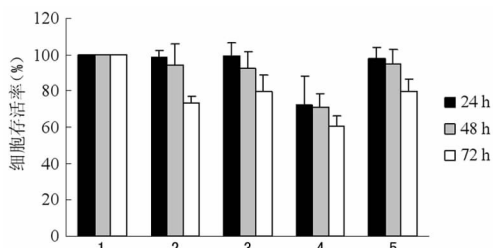


图 1 不同种类腹膜透析液对 HMrSV5 细胞活力的影响

2.2 不同种类腹透液对 HMrSV5 细胞 TLR2 和 TLR4 表达的影响

与阴性对照组比较,各腹透液作用 24 h 各透析液对腹膜间皮细胞 TLR2 和 TLR4 表达无显著影响,见图 2。腹膜

透析液作用 48 h 后 1.5% dextrose 组、2.5% dextrose 组、4.25% dextrose 组 TLR2 表达分别降低  $(5.5 \pm 2.8)\%$ 、 $(31.4 \pm 7.5)\%$  ( $P < 0.05$ )、 $(54.9 \pm 1.9)\%$  ( $P < 0.05$ ),与阴性对照组比较,后两组差异有统计学意义;TLR4 表达分别降低  $(32.9 \pm 17.6)\%$  ( $P < 0.01$ )、 $(47.7 \pm 13.5)\%$  ( $P < 0.01$ )、 $(66.4 \pm 13.5)\%$  ( $P < 0.01$ ),与阴性对照组比较差异有统计学意义。7.5% icodextrin 组 TLR2 和 TLR4 表达分别下降  $(4.4 \pm 4.5)\%$  和  $(8.9 \pm 8.6)\%$ ,与阴性对照组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),见图 3。与阴性对照组比较,腹透液作用 72 h 后 1.5% dextrose 组、2.5% dextrose 组、4.25% dextrose 组 TLR2 表达分别降低  $(29.4 \pm 14.7)\%$  ( $P < 0.05$ )、 $(38.9 \pm 9.9)\%$  ( $P < 0.05$ )、 $(63.5 \pm 16.5)\%$  ( $P < 0.05$ ),与阴性对照组比较差异有统计学意义;TLR4 表达分别降低  $(59.5 \pm 16.8)\%$  ( $P < 0.01$ )、 $(63.1 \pm 9.5)\%$  ( $P < 0.01$ )、 $(79.2 \pm 14.0)\%$  ( $P < 0.01$ ),与阴性对照组比较差异有统计学意义;7.5% icodextrin 组 TLR2 和 TLR4 表达分别下降  $(5.3 \pm 3.3)\%$  和  $(1.2 \pm 11.9)\%$ ,与阴性对照组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),见图 4。

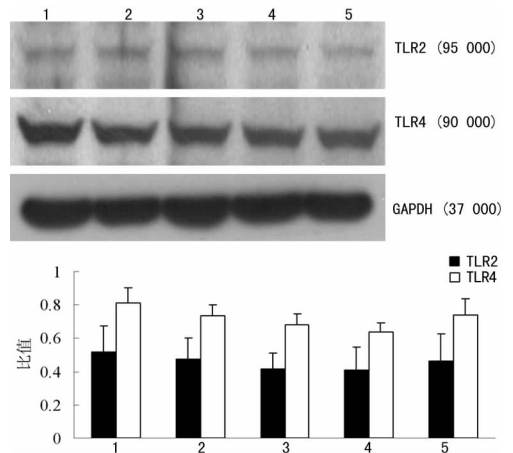


图 2 不同种类腹透液作用 24 h 对 HMrSV5 细胞 TLR2 和 TLR4 表达的影响

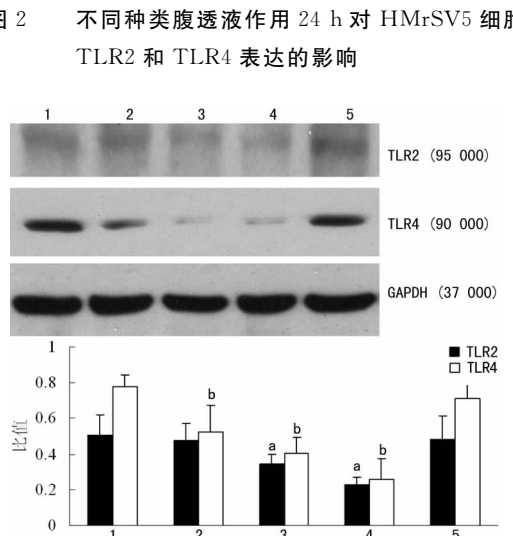
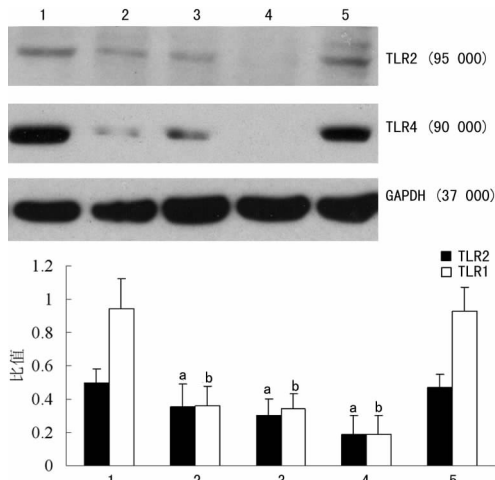


图 3 不同种类腹透液作用 48 h 对 HMrSV5 细胞 TLR2 和 TLR4 表达的影响



1:阴性对照组;2:1.50% dextrose 组;3:2.50% dextrose 组;4:4.25% dextrose 组;5:7.5% icodextrin 组;<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,<sup>b</sup>: $P < 0.01$ ,与阴性对照组比较。

图4 不同种类腹透液作用72 h对HMγSV5细胞TLR2和TLR4表达的影响

### 3 讨 论

TLR是I型跨膜蛋白受体,其特征是胞外区存在富含亮氨酸的重复序列,胞内区约有200个氨基酸与白细胞介素-1(IL-1),I型受体和IL-18受体有高度同源性,称为Toll/IL-1受体同源区(TIR),共同构成TLR向下游进行信号传递并最终激活NF- $\kappa$ B p65的核心元件。髓样分化因子88(MyD88)是与TIR作用的关键衔接蛋白,其招募IL-1受体相关激酶(IRAK)和肿瘤坏死因子受体相关因子6(TRAF6),激活NF- $\kappa$ B和MAPK信号,最终启动一系列靶基因的转录。其中,TLR2主要识别革兰阳性细菌胞壁成分,TLR4主要识别革兰阴性细菌胞壁成分,同时还介导吞噬和自噬防御病原微生物、抗原提呈等,从而在防御病原微生物感染中发挥重要作用<sup>[6-9]</sup>。早期研究已证实腹膜间皮细胞表达TLR4及其附属功能蛋白,腹膜间皮细胞TLR4在细菌内毒素诱导趋化因子、炎症因子中发挥关键作用,有可能成为腹腔细菌感染的重要干预靶点<sup>[10]</sup>。

本研究发现,dextrose腹透液显著下调腹膜间皮细胞TLR2和TLR4的表达,作者推测TLR2和TLR4表达下降可能导致腹膜间皮细胞对病原微生物识别、抗原提呈、下游信号转导等功能下降,进而导致腹腔局部免疫防御功能降低。国外学者研究发现,他汀类药物下调外周血CD14<sup>+</sup>单核细胞TLR4的表达,下调TLR4的功能结果是TLR4配体LPS诱导的IRAK-1激酶活性下降,LPS诱导的TNF- $\alpha$ 、IL-12和B7-1表达降低<sup>[11]</sup>。维生素D<sub>3</sub>下调外周血单核细胞TLR2和TLR4的表达,维生素D<sub>3</sub>预处理的单核细胞对LTA(脂胞壁酸,TLR2配体)和LPS刺激的反应降低,表现为配体诱导的ERK1/2、p38 MAPK及NF- $\kappa$ B信号减弱,进而下游TNF- $\alpha$ 表达下降<sup>[12]</sup>。研究显示阿托伐他汀下调单核细胞白血病细胞(THP-1)TLR4的表达,NF- $\kappa$ B活性减弱,LPS诱导的TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 表达下降<sup>[13]</sup>。国内学者研究发现,黄芪多糖下调心肌细胞TLR4表达,NF- $\kappa$ B活性减弱,LPS诱导的TNF- $\alpha$ 的表达下降<sup>[14]</sup>;全氟化碳下调肺泡II型上皮细胞(A549细胞)TLR4表达,NF- $\kappa$ B活性减弱<sup>[15]</sup>。本研究结果与这些报道类似,进一步的dextrose腹透液对TLR2和TLR4下游信号分子的研究正

在进行中。

icodextrin腹透液含7.5%多聚dextrose,是谷物淀粉的水解产物,相对分子质量为16 800~22 000,渗透浓度为284 mmol/L,低于1.50% dextrose组的346 mmol/L,2.50% dextrose组的396 mmol/L,4.25% dextrose组的485 mmol/L。因其相对分子质量较大、不易透过腹膜吸收,故能在较长时间内持续发挥超滤作用,且其生物相容性优于dextrose腹透液<sup>[16-17]</sup>。本研究发现,icodextrin腹透液对间皮细胞TLR2和TLR4的表达无明显影响,提示icodextrin可能不影响TLR介导的腹腔局部免疫防御机制,进一步的icodextrin腹透液对TLR2和TLR4下游信号分子的研究正在进行中。作者推测,上述机制可能是icodextrin腹透液的生物相容性优于dextrose腹透液的机制之一。

综上所述,dextrose腹透液下调腹膜间皮细胞TLR2和TLR4的表达,icodextrin腹透液对腹膜间皮细胞TLR2和TLR4的表达无显著影响,本研究从新的角度证实传统dextrose腹透液的长期使用有可能降低腹腔局部防御能力。

### 参考文献

- [1] Chaudhary K, Khanna R. Biocompatible peritoneal dialysis solutions: do we have one? [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2010, 5(4): 723-732.
- [2] Qayyum A, Oei EL, Paudel K, et al. Increasing the use of biocompatible, glucose-free peritoneal dialysis solutions [J]. World J Nephrol, 2015, 4(1): 92-97.
- [3] Cho Y, Johnson DW, Craig JC, et al. Biocompatible dialysis fluids for peritoneal dialysis [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2014, 3(3): 84-92.
- [4] Cho Y, Johnson DW. Does the use of neutral pH, low glucose degradation product peritoneal dialysis fluids lead to better patient outcomes? [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2014, 23(2): 192-197.
- [5] Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways [J]. Science, 2003, 300(5625): 1524-1525.
- [6] Blander JM, Medzhitov R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors [J]. Science, 2004, 304(5673): 1014-1018.
- [7] Xu Y, Jagannath C, Liu XD, et al. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity [J]. Immunity, 2007, 27(1): 135-144.
- [8] Rosadini CV, Kagan JC. Microbial strategies for antagonizing Toll-like-receptor signal transduction [J]. Curr Opin Immunol, 2015, 32c: 61-70.
- [9] 周立华, 李军, 邹娜妹, 等. TLR2和TLR4相关疾病与药物的研究进展 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(7): 767-770.
- [10] Kato S, Yuzawa Y, Tsuboi N, et al. Endotoxin-induced chemokine expression in murine peritoneal mesothelial cells: the role of toll-like receptor 4 [J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(5): 1289-1299.
- [11] Methe H, Kim JO, Kofler S, et al. Statins decrease Toll-like receptor 4 expression and downstream (下转第 163 页)

- human umbilical mesenchymal stem cells across umbilical vein endothelial monolayers[J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(4):426-436.
- [11] Everaert BR, Van Craenenbroeck EM, Hoymans VY, et al. Current perspective of pathophysiological and interventional effects on endothelial progenitor cell biology: focus on PI3K/AKT/eNOS pathway[J]. *Int J Cardiol*, 2010, 144(3):350-366.
- [12] Pedersen TO, Blois AL, Xing Z, et al. Endothelial microvascular networks affect gene-expression profiles and osteogenic potential of tissue-engineered constructs [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(3):52.
- [13] 王伟, 刘德红, 李卓成, 等. 转染 VEGF 基因对内皮祖细胞生长的影响研究[J]. *中国实验诊断学*, 2015, 19(3):355-358.
- [14] 白丽萍, 赵志红, 陈冲, 等. 正常成人粒细胞集落刺激因子动员外周血内皮祖细胞的生物学特性[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(32):5190-5196.
- [15] Wang QR, Wang F, Zhu WB, et al. GM-CSF accelerates proliferation of endothelial progenitor cells from murine bone marrow mononuclear cells in vitro [J]. *Cytokine*, 2009, 45(3):174-178.
- [16] Aguirre A, Planell JA, Engel E. Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 400(2):284-291.
- [17] Iwasaki H, Kawamoto A, Tjwa M, et al. PIGF repairs myocardial ischemia through mechanisms of angiogenesis, cardioprotection and recruitment of myo-angiogenic competent marrow progenitors[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9):e24872.
- [18] Melchiorri AJ, Nguyen BN, Fisher JP. Mesenchymal stem cells: roles and relationships in vascularization[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2014, 20(3):218-228.
- [19] Wang JA, Chen TL, Jiang J, et al. Hypoxic preconditioning attenuates hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*. 2008, 29(1):74-82.
- [20] Chen J, Xavier S, Moskowitz-Kassai E, et al. Cathepsin cleavage of sirtuin 1 in endothelial progenitor cells mediates stress-induced premature senescence [J]. *Am J Pathol*, 2012, 180(3):973-983.
- [21] Overman JR, Farré-Guasch E, Helder MN, et al. Short (15 minutes) bone morphogenetic protein-2 treatment stimulates osteogenic differentiation of human adipose stem cells seeded on Calcium phosphate scaffolds in vitro [J]. *Tissue Eng Part A*, 2013, 19(3/4):571-581.
- [22] Chou YF, Zuk PA, Chang TL, et al. Adipose-derived Stem cells and BMP2; Part1. BMP2-treated adipose-derived stem cells do not improve repair of segmental femoral defects[J]. *Connect Tissue Res* 2011, 52(2):109-118.
- [23] Zuk P, Chou YF, Mussano F, et al. Adipose-derived stem cells and BMP2; Part2. BMP2 maynot influence the osteogenic fate of human adipose-deriveds tem cells[J]. *Connect Tissue Res*, 2011, 52(2):119-132.
- [24] 温丽. 血管内皮祖细胞对大鼠骨髓间充质干细胞生物学特性调控作用的研究[D]. 西安:第四军医大学, 2013.
- [25] Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues [J]. *J Histochem Cytochem*, 2006, 54(4):385-395.

(收稿日期:2015-09-10 修回日期:2015-10-10)

(上接第 158 页)

- signaling in human CD14<sup>+</sup> monocytes[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(7):1439-1445.
- [12] Sadeghi K, Wessner B, Laggner U, et al. Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns[J]. *Eur J Immunol*, 2006, 36(2):361-370.
- [13] Yang SS, Li R, Qu X, et al. Atorvastatin decreases Toll-like receptor 4 expression and downstream signaling in human monocytic leukemia cells[J]. *Cell Immunol*, 2012, 279(1):96-102.
- [14] 孙雪芳, 王洪新, 梁灵君, 等. 黄芪多糖通过 TLR4/NF-κB 信号通路抑制脂多糖诱导的大鼠心肌细胞肥大[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(2):208-212.
- [15] 秦鑫, 秦蕾, 刘又宁. 全氟化碳通过下调 TLR4/NF-κB 信号通路抑制脂多糖刺激 A549 细胞分泌 TNF-α 的研究[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2015, 9(1):84-87.
- [16] Teitelbaum I. Ultrafiltration failure in peritoneal dialysis: a pathophysiologic approach[J]. *Blood Purif*, 2015, 39(1/3):70-73.
- [17] Cho Y, Johnson DW, Badve S, et al. Impact of icodextrin on clinical outcomes in peritoneal dialysis: a systematic review of randomized controlled trials [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2013, 28(7):1899-1907.

(收稿日期:2015-09-18 修回日期:2015-10-14)

# 欢迎投稿

# 欢迎订阅