

论著·基础研究      doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.27.008

高糖对大鼠腹膜间皮细胞分泌细胞因子的影响及苦参碱的干预作用

朱士彦<sup>1</sup>,甘 平<sup>2</sup>,廖 彧<sup>1</sup>,巫建芳<sup>1</sup>,龙贵华<sup>1</sup>

(1. 广东省佛山市顺德区龙江医院肾内科 528318;2. 贵阳医学院附属医院肾内科,贵阳 510000)

**[摘要]** **目的** 研究高糖刺激下大鼠腹膜间皮细胞分泌肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 及苦参碱的干预作用,探讨腹膜纤维化发生机制。**方法** 通过体外培养大鼠腹膜间皮细胞(PMCs),依据加入药物浓度分成 5 组:2.5%葡萄糖组( $n=15$ ,A 组);低糖苦参碱组(2.5%葡萄糖, $n=15$ ,B 组);4.25%葡萄糖组( $n=15$ ,C 组);高糖苦参碱组(4.25%葡萄糖, $n=15$ ,D 组);对照组( $n=15$ ,E 组,仅加不含血清的 DMEM-F12 BMSC 培养基),分别于第 24、48、72 小时收集培养上清液,采用 ELISA 法测定各组培养上清液中 TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta_1$  浓度的变化,同时观察各组大鼠腹膜间皮细胞光镜下的表现。**结果** 光镜下,可见 E 组和 B 组腹膜间皮细胞小,呈卵圆形或圆形,生长较为密集。A、C、D 组腹膜间皮细胞大、呈梭形或多边形,分布较为稀疏;在 A 组,培养上清液中 TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta_1$  水平较 E 组无明显统计学变化( $P>0.05$ );而在 C 组,培养上清液中 TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta_1$  水平较 E 组增加明显,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。在 B 组和 D 组中,PMCs 分泌 TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta_1$  水平 B 组较 A 组减少,差异无统计学意义( $P>0.05$ );D 组较 C 组明显下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 苦参碱能拮抗高糖致大鼠腹膜间皮细胞分泌 TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta_1$ ,从而保护腹膜间皮细胞。

**[关键词]** 葡萄糖;苦参碱;肿瘤坏死因子  $\alpha$ ;转化生长因子  $\beta_1$ ;腹膜间皮细胞

**[中图分类号]** R459.5      **[文献标识码]** A      **[文章编号]** 1671-8348(2016)27-3770-03

**The influence of high glucose on cytokine secreted by peritoneal mesothelial cells in rats and the intervention effect of matrine**  
Zhu Shiyan<sup>1</sup>, Gan Ping<sup>2</sup>, Liao Yu<sup>1</sup>, Wu Jianfang<sup>1</sup>, Long Guihua<sup>1</sup>  
(1. Department of Nephrology, the Hospital of Longjiang, Foshan, Guangdong 528318, China; 2. Department of Nephrology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou 510000, China)

**[Abstract]** **Objective** This study was designed to investigate the effect of matrine on high glucose-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) overexpression in rat peritoneal mesothelial cells (PMCs), and to explore the possible mechanism in the peritoneal fibrosis. **Methods** The rat PMCs were incubated in vitro, and then assigned into 5 groups on the basis of the added drug concentrations: 2.5% glucose group ( $n=15$ , A); Glucose + 2.5% matrine group ( $n=15$ , B); 4.25% glucose group ( $n=15$ , C); Glucose + 4.25% matrine group ( $n=15$ , D); Blank control group ( $n=15$ , control group, added the DMEM/F12 medium). The levels of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta_1$  in the supernatants were measured by ELISA method at the different time (24h, 48h, 72h), and observed the changes of PMCs under the microscope. **Results** Compared with the groups of A, C and D, the PMCs in the control group and B group were small, round, spindle, irregular or intensive. The expression of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta_1$  in the A group was lightly higher than that of the control group, but the level in the C group was significantly higher than that of the control group ( $P<0.05$ ). As compared with the A group, The level of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta_1$  expressed in the B group were decreased ( $P>0.05$ ), but the lever in the D group was significantly lower than that of the C group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Matrine might be helpful to resist the overexpression of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta_1$  induced by high glucose, and then protect the PMCs.

**[Key words]** glucose; matrine; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; transforming growth factor- $\beta_1$ ; peritoneal mesothelial cells

腹膜透析(peritoneal dialysis, PD)由于自身生物相容性好,中分子物质清除效率高等优点,成为目前终末期肾脏疾病的首选透析方式。但是反复发作腹膜炎症可使有效腹膜透析面积减少,从而导致腹膜对溶质的清除及水分的超滤功能减退甚至功能衰竭,是部分 PD 患者改行血液透析治疗的主要原因之一<sup>[1]</sup>。实验表明,腹膜长期处于高渗微环境,可最终破坏腹膜的整体结构性,葡萄糖及其与机体产生的炎变产物是致 PD 相关性腹膜超滤衰竭重要原因之一<sup>[2-3]</sup>。如何从病理生理学机制方面深入探究腹膜超滤衰竭的发病机理,成为近年来医学研究的重要课题内容。

现有研究证实人腹膜间皮细胞(peritoneal mesothelial cells, PMCs)具有多重重要的生理功能,如分泌、吸收、修复、支持等。在腹膜发生炎变时,PMCs 自身分泌的炎性因子和细胞因子,又影响到腹膜自身的修复<sup>[4-5]</sup>。本研究旨在探讨高糖致

大鼠 PMCs 分泌肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 及苦参碱的抗纤维化作用,为临床防治腹膜纤维化,延缓病人的生命,有着极其重要的现实意义。

1 材料与方法

**1.1 材料** 选取健康 BALB/c 大鼠 35 只,雌雄兼用,体重 100~120 g,同等条件下饲养,鼠龄 6~8 周,由贵阳医学院动物实验中心提供。

**1.2 主要试剂** 胎牛血清(FCS),DMEM-F12 BMSC 培养基,胰蛋白酶液,卵母细胞裂解液,DAB 显色剂(编号 AR1022),抗体稀释液(编号 AR1016),Hanks 平衡盐溶液,多聚赖氨酸,枸橼酸盐缓冲液,以上均购自郑州益康生物工程有限公司;TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒(上海恒远生物科技有限公司,编号:AR2053);TGF- $\beta_1$  ELISA 试剂盒(上海恒远生物科技有限公司,编号:AR2095);即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒(上海

恒远生物科技有限公司,编号:SA1020);兔抗人细胞角蛋白 18 抗体、抗人波形蛋白(上海联硕生物科技有限公司);兔抗人第Ⅷ因子相关抗原抗体(上海联硕生物科技有限公司);2.5%、4.25%腹膜透析液 2 L(广州百特公司);苦参碱注射液,每支 150 mg (10 mL),山西振东泰盛制药有限公司,批号 H20059335。

1.3 主要仪器 HW-08C 型超级微量恒温器(上海旦鼎国际贸易有限公司);倒置显微镜和光学显微镜(上海蔡康光学仪器有限公司);无菌操作台(苏州江东精密仪器有限公司);流式细胞仪(Beckman Coulter 公司);凝胶成像分析仪(UVI,英国);DNM-9602A 酶标仪(上海圣科仪器设备有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 PMCs 分离和体外培养 每次取大鼠 1 只,直接心脏注射 2 mL 左右 10%水合氯醛后处死,将大鼠置于工作台上,圆针固定四肢,先后用 0.22%聚维酮碘液、75%的乙醇充分消毒胸腹部皮肤,用镊子提起中线腹部皮肤,持剪刀自下向上剪开皮肤及皮下组织,暴露腹腔,用小眼科剪小心剔除壁层腹膜组织。将获取的腹膜组织剪成 2~4 mm<sup>2</sup> 的小块,置于 Hanks 混悬液中,自然沉淀后,再将组织块放入含 150 mL/L NBS 的 DMEM-F12 BMSC 培养基中,随后移入培养瓶内,置于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱内慢慢培养。最初 3 d 内每天需更换培养液 1 次,培养 4 d 后每周更换培养液 2 次。约 15~18 d 组织块边缘新增殖的细胞逐渐铺开直至完全融合时,用免疫组化方法对细胞进行抗原抗体检测,鉴定为 PMCs 后,进一步行细胞因子测定<sup>[6]</sup>。

1.4.2 分组及 TNF-α 和 TGF-β<sub>1</sub> 的测定 细胞完全融合后,

以每毫升 10<sup>5</sup> 个接种于 96 孔培养板,待细胞铺满培养板,在不含血清的 DMEM-F12 BMSC 培养基中分别加入 2.5%、4.25%葡萄糖腹透液和苦参碱溶液,依据药物浓度分设 5 组,每组分为 15 个复孔,每孔各加 650 μL:2.5%葡萄糖组(*n* = 15, A);低糖苦参碱组(2.5%葡萄糖,*n* = 15, B);4.25%葡萄糖组(*n* = 15, C);高糖苦参碱组(4.25%葡萄糖,*n* = 15, D);对照组(*n* = 15, E, 仅加不含血清的 DMEM-F12 BMSC 培养基)。用药前抽吸苦参碱 100 mg 分别与 2.5%、4.25%透析液 2 L 配成浓度为 5.0%的溶液。分别于培养后第 24、48、72 小时收集培养上清液,采用 ELISA 法测定上清液中 TNF-α 和 TGF-β<sub>1</sub> 的浓度,具体操作步骤按试剂盒上说明书进行。

1.5 统计学处理 使用 SPSS11.5 统计学软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间差异性比较采用单因素方差分析和 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PMCs 的培养和鉴定 培养的腹膜组织 48~72 h 后,细胞逐渐从组织块边缘长出并增殖铺开,在光镜下细胞边界清晰,大小一致,欠规则排列。卵圆形细胞在瓶底贴壁生长,呈克隆样增殖,约 18 d 铺满培养瓶底部,倒置显微镜下见细胞呈多边形,有的边缘呈现齿轮状与周围细胞镶嵌排列,呈典型上皮细胞样形态。且抗人角蛋白、抗人波形蛋白染色阳性,抗Ⅷ因子相关抗原单克隆抗体阴性。

2.2 光镜下各组大鼠 PMCs 表现 18 d 后在普通光镜下,可见 E 组和 B 组腹膜间皮细胞小,呈卵圆形或圆形,生长较为密集;A 组、C 组及 D 组可见腹膜间皮细胞大,呈梭形或多边形,分布较为稀疏。上述现象在 C 组表现更为显著,见图 1。

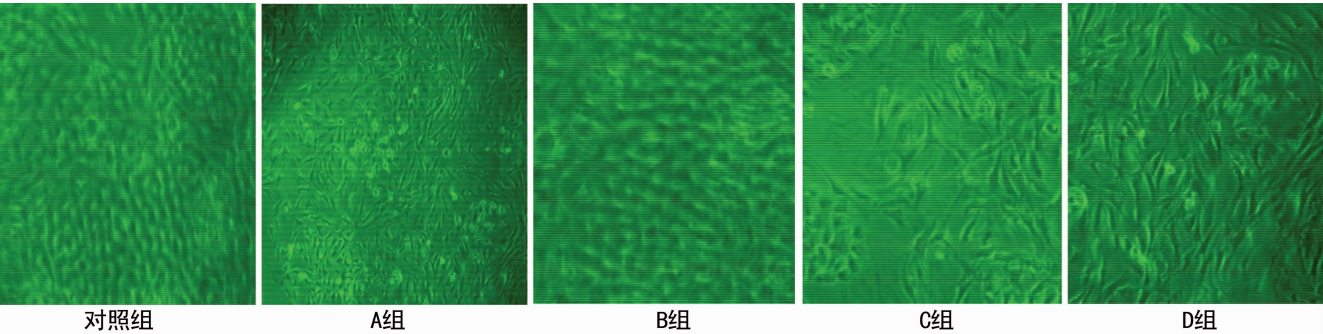


图 1 各组大鼠腹膜间皮细胞 18 d 光镜下形态学表现(×400)

2.3 TNF-α 的分泌及苦参碱的抑制作用 PMCs 分泌 TNF-α, A 组培养上清液中 TNF-α 水平较对照组无明显增加(*t* = 1.778, *P* = 0.182);而在 C 组,培养上清液中 TNF-α 水平较对照组增加明显,差异有统计学意义(*t* = 3.835, *P* = 0.025)。PMCs 分泌 TNF-α 水平 B 组较 A 组减少,但差异无统计学意义(*t* = 1.785, *P* = 0.235);D 组较 C 组下降明显,差异有统计学意义(*t* = 3.753, *P* = 0.018),见表 1。

表 1 不同时间各组 TNF-α 的分泌情况( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	4.08±1.31	5.35±1.02	5.42±1.21
A 组	7.53±1.26	8.56±1.59	8.68±1.53
B 组	6.46±1.38	7.02±1.23	7.35±1.30
C 组	10.65±2.34 <sup>a</sup>	14.38±2.54 <sup>a</sup>	14.85±2.63 <sup>a</sup>
D 组	6.86±1.43 <sup>b</sup>	7.59±1.38 <sup>b</sup>	7.69±1.35 <sup>b</sup>

2.4 TGF-β<sub>1</sub> 的分泌及苦参碱的抑制作用 PMCs 分泌 TGF-β<sub>1</sub>, A 组,培养上清液中 TGF-β<sub>1</sub> 浓度较对照组略有增加(*t* = 1.788, *P* = 0.236);而在 C 组,培养上清液中 TGF-β<sub>1</sub> 浓度较对照组明显增加,差异有统计学意义(*t* = 3.958, *P* = 0.024)。PMCs 分泌 TGF-β<sub>1</sub> 水平 B 组较 A 组减少,但差异无统计学意义(*t* = 1.864, *P* = 0.357);D 组较 C 组下降明显,差异有统计学意义(*t* = 4.123, *P* = 0.032),见表 2。

表 2 不同时间各组 TGF-β<sub>1</sub> 的分泌情况( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	245±43	268±52	283±64
A 组	368±52	397±68	402±74
B 组	264±45	276±53	281±58
C 组	545±56 <sup>a</sup>	594±72 <sup>a</sup>	635±83 <sup>a</sup>
D 组	271±43 <sup>b</sup>	286±50 <sup>b</sup>	297±57 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>: *P* < 0.05, 与对照组比较; <sup>b</sup>: *P* < 0.05, 与 C 组比较。

3 讨 论

腹膜超滤功能衰竭是 PD 患者结束治疗的常见原因。各

<sup>a</sup>: *P* < 0.05, 与对照组比较; <sup>b</sup>: *P* < 0.05, 与 C 组比较。

种腹膜纤维化进程中都会伴随着炎症反应,包括 PMCs 的凋亡及炎性细胞因子的释放,成纤维细胞增殖,细胞外基质成分过多聚集并异常修复,间充质细胞转化等腹膜超微结构的病理变化<sup>[7-9]</sup>。本文以大鼠 PMCs 为研究对象,通过高糖刺激 PMCs 分泌 TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta_1$ ,苦参碱的抑制作用,研究其在腹膜纤维化机制中的可能作用。

TNF- $\alpha$  作为一种重要的炎症因子,在腹膜纤维化过程中发挥着重要的作用。叶玲等<sup>[9]</sup>研究证实,在 TNF- $\alpha$  的作用下,PMCs 表达白细胞介素 8、单核细胞趋化肽 1 明显活跃,同时间皮细胞也能合成细胞间黏附分子和血管细胞黏附分子,有利于炎性细胞黏附并进入腹腔。本文利用体外培养的大鼠 PMCs,经不同浓度的葡萄糖液刺激,发现经一定时间作用后,PMCs 确实能分泌 TNF- $\alpha$ ,从分子水平上证实 PMCs 对高糖刺激可产生应答反应。这与黄振华等<sup>[10]</sup>的研究一致。尽管在高糖刺激下 PMCs 仅能分泌较低水平的 TNF- $\alpha$ ,但由于它是前炎性介质,能够影响整个炎症反应的各个阶段,可能是导致腹膜纤维化的发生机制之一。

TGF- $\beta_1$  已被公认为调节细胞生长和分化的中枢介质,参与组织纤维化的整个进程。TGF- $\beta_1$  一方面直接刺激细胞外基质成分如胶原 I、Ⅲ、V,纤维连接蛋白、蛋白多糖等的形成,同时也具有抑制细胞外基质降解酶的作用,从而造成细胞外基质成分过多蓄积<sup>[11]</sup>。目前已构建的人 TGF- $\beta_1$  反义 RNA 真核表达载体,发现其在防治腹膜纤维化进程中起着重要的作用;另一方面,通过调节基质受体-整合素的表达,促进细胞与基质黏附;此外,TGF- $\beta_1$  也可通过自分泌作用诱导其本身的表达,从而放大其生物活性<sup>[12-13]</sup>。本研究显示,在高糖的作用下,PMCs 能分泌较多的 TGF- $\beta_1$ ,且随着时间的延长进一步表达上调。以往的研究显示,TGF- $\beta_1$  一旦存在,可诱发其自身转录,通过信号通路 TGF- $\beta_1$ /Smad2/3 调节相关基因的表达,进而促使细胞外基质的生成,促进纤维化的发生<sup>[14]</sup>。因此,本实验 PMCs 在高糖刺激下产生 TGF- $\beta_1$  的过程,除了 PMCs 的自分泌外,可能还与 TGF- $\beta_1$  诱导其自身转录有关。

苦参碱具有多重药理作用和功效,如抗肝脏纤维化、防止肾小球硬化、抗肿瘤、和心血管保护等方面作用<sup>[15]</sup>。以往的研究主要集中在其对抗肾纤维化作用方面,而对腹膜纤维化抑制作用则报道较少。姜燕等<sup>[16]</sup>将 150 只 Wistar 大鼠通过尾部静脉注射阿霉素(2 mg/kg)建立肾纤维化大鼠模型,随机分为 5 组:对照组、模型组、苯那普利组、低剂量苦参碱组(50 mg/kg)和高剂量苦参碱组(100 mg/kg),每日对应药物灌胃,分 6 批先后处死各组大鼠,结果表明:相对于模型组,苯那普利组、低剂量以及高剂量苦参碱组肾脏病理改变轻微,组织内核因子- $\kappa$ B 蛋白的表达水平较低,而抑制性  $\kappa$ B 蛋白的表达水平反而增高;苯那普利组和高剂量苦参碱组各观察指标均优于低剂量苦参碱组。证明苦参碱可抑制肾纤维化的发生从而起到保护肾组织的作用。本实验通过细胞形态学观察和免疫组织化学分析,均证实所培养细胞为 PMCs<sup>[6]</sup>。A、C 组与 B、D 组相比,大鼠腹膜间皮细胞体积增大,形状呈梭形、分布较稀疏,尤其是在 C 组更为明显,说明 A、C 组细胞在体外培养过程中受到抑制,且与葡萄糖浓度有关。而加入苦参碱后细胞生长受到的抑制作用减轻,且 PMCs 分泌的 TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta_1$  明显减少,其机理可能是通过苦参碱拮抗 PMCs 分泌 TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta_1$  的表达进而间接保护 PMCs,也可能是通过终止其他炎性介质的转录,减少细胞外基质的蓄积,进而限制炎症反应的进一步发展。路娜等<sup>[17]</sup>发现苦参碱能够抑制高糖诱导的大鼠肾小管上皮间充质转化,其机制通过抑制 TGF- $\beta_1$ /Smads 信号通路致纤维

化效应有关。综上所述,苦参碱具有多重生物学效应,通过多种机制参与抗腹膜硬化进程,然而其确切病理生理学机制尚需进一步深入研究。

本实验证实苦参碱对高糖致大鼠 PMCs 分泌 TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta_1$  的确有一定的抑制作用,为中药防治腹膜纤维化提供了新的思路。

参考文献

[1] 段丽萍,董捷. 复发和重现性腹膜透析相关腹膜炎的临床特点及转归[J]. 中国血液净化,2015,14(2):65-69.

[2] 杨芦荟,杨林,钟文旗,等. 腹膜透析患者腹膜转运类型与营养状况的相关性研究[J]. 重庆医学,2013,42(35):4281-4283.

[3] Krediet RT,Struijk DG. Peritoneal changes in patients on long-term peritoneal dialysis[J]. Nat Rev Nephrol,2013,9(7):419-429.

[4] 郭春艳,刘虹. 腹膜透析腹膜结构和功能保护的新策略[J]. 中国血液净化,2014,13(2):113-118.

[5] 金珍木,李素蘋,朱小春. 腹膜透析相关性腹膜炎的临床特点分析[J]. 中华医院感染学杂志,2014,24(6):1435-1437.

[6] 马殊琛,严海东,庄守纲,等. 大鼠腹膜间皮细胞的分离培养方法[J]. 同济大学学报:医学版,2012,33(6):19-21.

[7] 易覓颢,陈国纯,刘伏友. 腹膜炎后腹膜透析超滤衰竭的机制研究进展[J]. 中国血液净化,2012,11(11):588-591.

[8] Diao JN,Sheng MX,Zhu XX,et al. The influence of Radix Astragali injection on dialysis efficiency and peritoneal structure of rat with high permeability of the peritoneal dialysis[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med,2011,27(1):58-62.

[9] 叶玲,祝胜郎,陈结慧,等. 大鼠腹膜间皮细胞中转化生长因子  $\beta_1$  对 TNF- $\alpha$  表达的影响[J]. 中国热带医学,2013,13(6):667-670.

[10] 黄振华,冯振伟,叶智明,等. 腹膜透析患者血清铁调素 25、肿瘤坏死因子  $\alpha$  水平和颈动脉粥样硬化的关系[J]. 中国动脉硬化杂志,2013,21(12):1093-1096.

[11] 管静,赵德晨. 氟伐他汀抑制高糖腹透液诱导人腹膜细胞 TGF- $\beta$  合成及细胞外基质产生的机制研究[J]. 临床和实验医学杂志,2013,12(20):1617-1619,1622.

[12] Chinashi H,Ito Y,Mizuno M,et al. TGF- $\beta_1$  promotes lymphangiogenesis during peritoneal fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol,2013,24(10):1627-1642.

[13] 张红利,郝丽荣. TGF- $\beta$ /Smad 信号通路在腹膜纤维化发生、防治中的作用[J]. 医学综述,2013,19(7):1173-1175.

[14] 李军,司维柯,赵宸,等. 苦参碱与氧化苦参碱影响荷瘤小鼠肿瘤生长及其免疫调节作用的研究[J]. 重庆医学,2011,40(27):2719-2721.

[15] 李屹,张雨楠,杨磊. 苦参碱药理作用研究进展[J]. 实用中医药杂志,2012,28(5):423-424.

[16] 姜燕,龚燕梅,曾红兵,等. 苦参碱对实验性大鼠腹膜纤维化的影响[J]. 中国医院药学杂志,2008,28(24):2110-2112.

[17] 路娜,王雅棣,姚波,等. 苦参碱对人胚肺成纤维细胞增殖和凋亡的干预作用[J]. 中医学报,2014,29(8):1168-1169.