

· 研究报告 ·

腹膜转运与防御机制的研究

阳 晓, 叶任高, 汪 涛, 郭群英, 郑智华, 刘思明, 杨琼琼, 陆才生, 彭文兴, 余学清
(中山大学附属第一医院肾内科//教育部重点实验室, 广东 广州 510080)

摘 要: 持续性不卧床腹膜透析 (CAPD) 是治疗终末期肾病的主要方法之一。超滤失败和反复腹腔感染患者退出腹膜透析的主要原因。在卫生部临床学科重点项目等支持下, 叶任高教授领导的课题组对腹膜转运及防御机制进行了深入研究, 研究结果在国际上首次揭示: ①正常大鼠腹膜表面覆盖着一层膜样结构, 主要成分有表面蛋白 A、磷脂、透明质酸等, 该层在腹膜溶质转运中有重要的屏障作用。②透明质酸合成酶 (HAS)-2 是人腹膜间皮细胞合成 HA 的关键酶, 高分子质量 HA 可以防止长期使用含葡萄糖透析液所引起的腹膜超滤下降; 而高浓度葡萄糖及炎症介质显著增加与炎症反应相关的 HAS-3 的表达。③增加腹腔透析液容量并不加重腹膜功能的损害。而高腹腔残余液体量则降低净超滤, 从而损害葡萄糖透析液的透析效能。④腹膜间皮细胞可功能性表达 CD40, CD40 与 CD40L 相互作用, 参与了腹腔局部防御。本成果发表论著 36 篇, 其中国际杂志 12 篇; SCI 收录 7 篇; 被 SCI 引用共 57 篇次。获得国际奖项 4 项及全国优秀博士学位论文奖 1 项。

关键词: 腹膜透析; 腹膜形态; 腹腔容量; 腹膜转运; 腹腔防御; 透明质酸; CD40

中图分类号: R692.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)01-0003-07

The Mechanism of Peritoneal Transport and Defense

YANG Xiao, YE Ren-gao, WANG Tao, GUO Qun-ying, ZHENG Zhi-hua,
LIU Si-ming, YANG Qiong-qiong, LU Cai-sheng, PENG Wen-xing, YU Xue-qing
(Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University//
The Key Renal Laboratory of The Ministry of Education, Guangzhou 510080, China)

Abstract: Continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) has been used more frequently as treatment for end-stage renal disease. However, ultrafiltration failure and repeat peritoneal infection are the main reasons for the dropout of CAPD patients. Supported by the Key Project Foundation of the Ministry of Public Health, the group led by Professor YE Ren-gao investigated the mechanism of peritoneal transport and defense. The results demonstrate the first time that ① a pseudo-membrane layer, which consists of at least phospholipids and glycosaminoglycan, covers normal peritoneal surface and may be an important barrier to peritoneal transport. ② Hyaluronan synthase-2 (HAS-2) plays a leading role in HPMCs in high molecular weight hyaluronan synthesis which preserves peritoneal membrane transport properties; Hypertonic glucose and inflammatory mediators increase both HAS-3 expression and the synthesis of low molecular weight hyaluronan which play an important role in peritoneal inflammation. ③ Chronic use of high dialysate fill volume does not further alter the membrane transport properties; High peritoneal residual volume may decrease net ultrafiltration and may compromise the efficiency of dialysis with a glucose solution. ④ Mesothelial cells functionally express CD40. The interaction of CD40 on MC and CD40L+ cells in peritoneal cavity may play an important

收稿日期: 2003-11-17

基金项目: 卫生部临床学科重点科研基金资助项目(97040228); "211工程"基金资助项目(中山医科大学 98151)

作者简介: 阳 晓(1961-), 女, 湖南株洲人, 博士, 研究员, 主持国家自然科学基金 2 项及省部级课题 4 项, 获省级科技奖 4 项, 发表科研论文 60 余篇, 主编与参编学术专著 9 部, 主要从事肾小球疾病的防治研究; 叶任高, 教授, 课题负责人. E-mail: yangxiao_999@yahoo.com.cn

role in the local defense against infection in the peritoneal cavity. These results provide the data clarifying the mechanism of peritoneal transport and defense. The group has published 36 research papers among which 7 papers were collected by SCI and were cited by SCI for 57 times. 4 prizes were awarded by ISPD and 1 prize by the ministry of education.

Key words: peritoneal dialysis; peritoneal morphology; peritoneal volume ; peritoneal transport; peritoneal defense; hyaluronan ; CD40

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci):2004, 25(1):3-9]

腹膜透析是治疗终末期肾脏病的主要方法之一。超滤失败和反复腹腔感染是患者退出腹膜透析的主要原因。叶任高教授领导的课题组于 1979 年在国内率先开展腹膜透析研究,有关腹膜透析临床研究结果曾获得 1982 年卫生部科技成果乙等奖和 1993 年国家科技进步三等奖。在此基础上,近 10 年来课题组又对腹膜转运及防御机制进行了深入研究,该研究得到卫生部临床学科重点项目(No97040228)、中山医科大学“211”工程基金(No98151)等的资助。研究结果在 *Kidney Int*, *Perit Dial Int*, *Adv Perit Dial* 和解剖学报,中华肾脏病杂志等国内外著名专业杂志发表,并获得国际腹膜透析学会的多项奖励。本成果主要研究内容和创新点如下。

1 腹膜表面超微结构的研究

腹膜转运功能是腹膜透析的基础,但至今对腹膜转运的组织结构基础了解很少。我们假设:腹膜表面存在一层与肺泡表面层相似的物质,它在腹膜转运尤其是水转运中起很重要的作用。然而至今未见该表面液体层存在的形态学依据。本研究利用电镜技术观察了腹膜表面液体层的存在并探讨该层的组成成分。我们分别以不同固定液固定正常大鼠腹膜组织,电镜下观察腹膜表面微结构的变化。结果发现不同固定方法所观察到的结果不同:用 25 g/L 戊二醛加 20 g/L 多聚甲醛固定组中可见腹膜间皮细胞表面的微绒毛,未见表面液体层。用 25 g/L 戊二醛加 5 g/L 氯化十六烷基吡啶固定组腹膜表面可见一层不连续的无定形结构。此层结构在 20 g/L O_3O_4 固定组和 30 g/L 鞣酸固定组中保存较好,厚度达到 10 μm 。30 mL/L 鞣酸组表面液体层及间皮细胞中可见许多类板层小体。我们的研究证实:正常大鼠腹膜表面覆盖着一层膜样结构,其主要成分有表面蛋白 A(surface protein A,

SP-A)、磷脂、透明质酸等,该层在腹膜溶质转运中有重要的屏障作用^[1-3]。

长期腹膜透析的患者,由于腹透液的冲刷,可能使得腹膜表面层的重要成分如磷脂和透明质酸流失,腹膜表面层破坏,导致超滤下降。因此我们进一步研究了腹膜转运增加与腹膜表面层的关系。我们在建立了慢性腹膜透析高通透性大鼠模型的基础上^[4-6],观察了高糖及腹腔震动对腹膜通透性的影响及其与腹膜表面层的关系。我们发现:高糖及腹腔振动均可使腹腔液体排出量显著降低,腹膜液体吸收率和小分子转运率也显著增加。电镜显示腹膜表面层也几乎完全消失。研究提示高糖及腹腔振动均可显著增加腹膜通透性,腹膜通透性的增加与腹膜表面层的破坏有关^[5,7,8]。同时我们也发现动物实验中最常使用的麻醉药戊巴比妥腹腔内注射引起腹膜通透性增高,其机制与腹膜表面层的破坏有关。因此我们建议动物实验中慎用戊巴比妥腹腔注射,尤其是那些与腹膜有直接关系的实验^[9]。

上述研究在国际上首次揭示腹膜表面液体层的存在,为腹膜透析腹膜转运机制的阐明提供了形态学依据。

2 透明质酸及其在腹膜转运中的作用

透明质酸(HA)是构成腹膜表面层的主要成分之一,是由双糖单位 N-乙酰葡糖胺和葡醛酸重复连接构成的多糖。人腹膜间皮细胞(HPMCs)被认为是腹腔 HA 的主要来源。人腹膜间皮细胞新合成的 HA 在细胞外形成细胞外基质(胞衣样结构(HCC)并有保护细胞的作用。现已证实哺乳动物有 3 种透明质酸合成酶基因 HAS-1、HAS-2、HAS-3。为确定 3 种 HAS 中哪一种是 HPMC 的 HA 合成及 HCC 形成的关键酶。我们以半定量 RT-PCR 法检测 HPMC 的 3 种 HAS mRNA 水平表达情况,并设计了针对关键酶的反义寡核苷酸序列,以明确该酶在 HA 合成和

HCC 形成中的作用。研究结果显示:反义寡核苷酸序列转染后 8 h 和 24 h, HAS-2mRNA 表达分别下降 58% 和 89%; 转染后 48 h HASmRNA 表达已部分恢复至正常表达的 25% 水平。相应地,转染后 24 h 以微粒排除法观察人腹膜间皮细胞细胞外基质(胞衣样结构面积与细胞体面积比值,亦明显减少至几乎完全消失。作为对照的正义序列和逆转序列则无此作用。研究结果提示 HAS-2 是培养的正常人腹膜间皮细胞合成透明质酸以及细胞外基质(胞衣样结构形成的关键酶^[10]。

葡萄糖是目前腹膜透析液中广泛使用的渗透压制剂。我们比较了不同渗透剂对腹膜间皮细胞 HAS 的调节作用及对 HA 合成的影响。结果发现:高糖组、低糖组、缩合葡萄糖组 HAS-2mRNA 的表达均高于对照组;高糖组 HAS-3mRNA 的表达亦显著增加;低糖组、缩合葡萄糖组、甘露醇组 HAS-3mRNA 表达与对照组相比差异无显著性。各实验组细胞胞衣样结构面积与细胞体面积的比值无显著差异。各实验组细胞培养上清液 HA 的浓度均显著高于对照组;高糖组 HA 浓度显著高于低糖组、缩合葡萄糖组、甘露醇组。研究结果说明:高浓度葡萄糖显著增加与炎症反应相关的 HAS-3mRNA 的表达,而缩合葡萄糖对 HAS-3mRNA 无影响,提示缩合葡萄糖可能在腹膜组织生物相容性方面优于高浓度葡萄糖^[11]。

CAPD 患者透出液 HA 浓度随透析时间延长而增加,CAPD 并发腹膜炎患者腹腔透出液 HA 水平尤其高。我们在上述研究基础上,进一步探讨炎症介质对 HPMCs 透明质酸合成酶 HAS-2、HAS-3 调节作用及对 HA 合成的影响。结果发现:炎症因子(LPS、TNF- α 、IL-1 β)可上调 HPMCs HAS-2mRNA、HAS-3mRNA 的表达和促进透明质酸的合成。由于其主要增强 HAS-3mRNA 的表达,提示炎症状态时有大量小分子透明质酸的合成。说明炎症介质可以通过调节 HAS 的表达,调节所合成的 HA 的分子大小,参与炎症反应。我们的研究提示:作为细胞外基质,小分子 HA 是炎症反应的重要介质。腹膜炎时,HPMCs 可以在巨噬细胞产生的前炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 及细菌壁 LPS 作用下产生大量小分子 HA,后者通过其在巨噬细胞表面受体 CD44 诱导巨噬细胞产生一系列炎症因子,由此促进吞噬、血管发生,对炎症起调节作用;而大分子的 HA 虽也可与 CD44 结合,但对其无激活作用,相反有稳

定作用。因而作为稳定生理状态 HPMCs 细胞外基质对腹膜有保护作用^[12]。

作为细胞外基质,HA 生物学功能与其相对分子质量大小密切相关。HPMCs 所产生内源性 HA 的质和量对维持正常腹膜功能十分重要。而 HAS-2 是正常 HPMCs 合成 HA 的关键酶。我们分离培养的 HPMCs,分别加入高分子透明质酸组($M_r = 1\ 600 \times 10^3$, 0.1 g/L, HHA 组);低分子透明质酸组($M_r = 280 \times 10^3$, 0.1 g/L, LHA 组),以了解外源性不同相对分子质量透明质酸对 HPMCs 透明质酸合成酶(HAS)的调节作用及对 HA 合成的影响。结果提示 LHA 和 HHA 均促进 HPMCs HAS-2mRNA 表达,LHA 对与炎症反应相关的 HAS-3mRNA 表达也有增强作用,而 HHA 则没有这一作用。因此,从选择腹膜保护剂的角度分析,我们倾向于选择更具生物相容性的 HMW-HA^[13]。

透明质酸生物化学性质,呈相对分子质量和质量浓度依赖性。我们研究不同相对分子质量、不同质量浓度透明质酸对腹膜液体的动力学影响,结果提示:①透明质酸加入透析液后,能降低腹膜液体的重吸收,增加净超滤;显示相对分子质量和溶液质量浓度的依赖性。②高相对分子质量透明质酸也能通过降低组织液压传导降低跨毛细血管超滤率(Q_a);③透析液中较高浓度的透明质酸可能通过降低组织液压传导和增加液体粘度导致腹膜液体吸收进一步显著降低。④加入高质量浓度 HA 于透析液中降低组织液压传导而不减少跨毛细血管超滤。为了探讨高分子质量透明质酸在腹膜转运中的作用,我们进一步对大鼠慢性腹膜透析模型长期使用透明质酸($M_r = 1\ 600 \times 10^3$, 0.1 g/L)后,腹膜功能的变化进行了观察。研究结果表明:与高糖组比较,透明质酸组的腹腔液体吸收率显著减少,腹腔内液体容积显著增高;淋巴液体吸收率差异无显著性。结论提示在大鼠慢性腹膜透析模型中多次重复使用高分子质量透明质酸,可以防止由于长期使用以葡萄糖为渗透压制剂的腹膜透析液所引起的腹腔吸收率增加,增加超滤量,保护腹膜功能^[14-16]。

本研究首次在国际上揭示腹膜间皮细胞调控透明质酸合成的机制及不同相对分子质量透明质酸在腹膜透析腹膜转运及腹腔防御中的作用,为阐明透明质酸的临床意义及应用提供了依据。

3 腹腔内液体容量及腹腔残余液体量对腹膜转运功能的影响

透析不充分是腹膜透析患者退出率高的主要原因之一。增加透析液容量可增加小分子毒素的清除,但透析液容量增加引起的腹内压升高可能引起腹腔内液体的重吸收率增加,导致超滤功能下降。虽然急性动物实验表明,透析液容量增加在引起腹腔内液体重吸收率增高的同时,超滤量也增加,但在慢性腹膜透析中,其结果如何仍不明确,因此,我们探讨了不同透析液容量对慢性透析大鼠腹膜转运功能的影响。研究发现:与对照组相比,低容量组和高容量组大鼠的腹腔内液体重吸收率和淋巴重吸收率均明显增加,超滤量明显减少,溶质转运增加;但低容量组和高容量组腹腔液体积量、腹腔内液体重吸收率及溶质转运均无显著性差异,唯高容量组淋巴重吸收率高于低容量组;低容量组和高容量组腹膜组织均呈慢性透析改变。研究结果提示:增加透析液容量除增加淋巴重吸收率外,并不加重腹膜功能的损害,相反,葡萄糖吸收趋于减慢,渗透压维持较好,而且超滤量也趋于增加^[17]。

腹腔残余液体量 (PRV) 的变化是一种常见的临床现象。高 PRV 已被用于 CAPD 和自主腹膜透析以减少干腹时间及获得较好的透析效果。然而,PRV 对腹膜转运的影响尚不清楚。本研究中,我们探讨了 PRV 对腹膜转运特性的影响。研究结果显示:与对照组比较,PRV 组净超滤显著减少,较低的净超滤与较高的 PRV 相关。其原因是:①由于较低的渗透梯度导致 Q_v 显著降低;②增加腹腔内静水压导致腹腔液体重吸收率 (KE) 显著增加。虽然高 PRV 组透析液与血浆浓度比值较高,但小分子溶质(糖、尿素、钠和钾)和总蛋白弥散溶质转运系数 (the diffusive mass transport coefficient) 无显著差异。与对照组比较,PRV 组钠的清除显著减少。研究结果提示高 PRV 可能通过减少 Q_v , 增加 KE 而降低净超滤。高 PRV 也可降低溶质弥散系数和腹膜小分子溶质清除率,特别是钠的清除率。因此,高 PRV 损害葡萄糖透析液的透析效能^[18]。

本研究首次在国际上揭示增加腹腔内透析液容量及腹腔残余液体量对腹膜转运功能的影响,为临床腹膜透析方案的制定提供了依据。

4 CD40 在腹腔局部防御机制中的作用

有证据表明,腹透液可通过免疫和非免疫机制刺激腹膜间皮细胞,产生许多炎症介质和细胞因子,从而影响间皮细胞的生物学功能。共同刺激信号 CD40-CD40 配体 (CD40L) 是免疫细胞间重要的信号转导途径。CD40-CD40L 相互作用不仅在调节体液免疫中发挥作用,而且在调节细胞免疫和炎症中亦起着重要作用。然而腹膜透析过程中 CD40 信号是否参与腹腔局部防御机制,尚无文献报道。我们运用流式细胞仪观察 CAPD 患者急性腹膜炎时腹透液中巨噬细胞 CD40L 表达,并与 CAPD 非腹膜炎患者比较。结果发现急性腹膜炎发生时,透出液中表达 CD40L 阳性的巨噬细胞数及 CD40L 表达水平均显著增加。急性腹膜炎缓解后,患者透出液中表达 CD40L 阳性巨噬细胞数及巨噬细胞表达 CD40L 水平均较发作期显著降低。提示 CAPD 相关性腹膜炎发生时 CD40 信号参与了腹腔抗感染免疫,巨噬细胞高表达 CD40L 对于限制腹膜炎的发生发展具有积极意义^[19,20]。

腹膜间皮细胞是腹膜表面的主要细胞层,在腹腔局部防御中发挥重要作用。细胞间黏附分子 (ICAM-1) 是炎症过程中的一种关键性黏附分子。目前尚不知间皮细胞是否通过表达 CD40 及影响 ICAM-1 参与腹腔炎症反应。我们从 CAPD 患者的透出液中分离、培养腹膜间皮细胞,分别用 IFN- γ 、TNF- α 、IL-1、LPS 刺激,通过流式细胞仪 (FACS) 检测分析腹膜间皮细胞 CD40、CD40L 及 ICAM-1 的表达,以探讨人腹膜间皮细胞 CD40 的表达及其调节因素。结果显示腹膜间皮细胞结构性表达少量的 CD40; IFN- γ 可显著增加腹膜间皮细胞表面 CD40 蛋白的表达,而 TNF- α 、IL-1、LPS 对腹膜间皮细胞表面 CD40 蛋白的表达无显著影响。未见间皮细胞表达 CD40L。IFN- γ 、TNF- α 、IL-1、LPS 对间皮细胞 ICAM-1 表达均有显著增强作用。IFN- γ 增强 ICAM-1 表达作用显著高于 TNF- α 、IL-1、LPS,间皮细胞 CD40 表达强度与 ICAM-1 呈显著正相关。结果提示人腹膜间皮细胞可功能性表达 CD40^[21]。

为进一步证明这一结果,我们对大鼠腹膜间皮细胞 CD40 的表达、调节因素及其活化后与细胞间黏附分子 -1 (ICAM-1) 分泌的相关性进行了研究。

结果发现:间皮细胞结构性表达低水平的 CD40; IFN- γ 、IL-1 可显著增加间皮细胞表面 CD40 mRNA 及其蛋白的表达,而以 IFN- γ 增幅最大。TNF- α 对间皮细胞 CD40 mRNA 及其蛋白的表达无显著增加作用。用 IFN- γ 增加间皮细胞 CD40 表达的同时,加入 CD40 mAb 活化 CD40 受体可显著增强间皮细胞 ICAM-1 的表达。研究结果进一步提示腹膜间皮细胞功能性表达 CD40,其与腹腔中 CD40L + 细胞相互作用,可能在腹腔局部防御中发挥重要作用,其结果对于限制炎症发生和发展具有积极意义^[22]。

CAPD 有效性及长期治疗的成功依赖于腹膜作为透析器官的性能良好。然而 CAPD 过程中腹膜长期暴露于非生理性腹透液中,即使无腹膜炎发作史,亦可出现腹膜结构和功能的破坏,最终导致腹膜硬化,超滤功能丧失,透析治疗失败。为探讨 CAPD 过程中腹膜局部炎症发生机制,我们观察了腹膜透析液对大鼠腹膜间皮细胞 CD40 表达的影响及 CD40 活化后与细胞间黏附分子-1(ICAM-1)分泌的相关性,以揭示腹膜透析时腹腔局部炎症的发生机制。研究结果显示:用 $\varphi = 4.25\%$ 腹透液刺激后,间皮细胞 CD40 mRNA 及蛋白的表达显著高于对照组。用 $\varphi = 4.25\%$ 腹透液 + IFN- γ 刺激后,间皮细胞表面 CD40 mRNA 及蛋白的表达进一步增加,且明显高于单纯腹透液刺激组。活化 CD40 受体可显著增强间皮细胞 ICAM-1 的表达。结果提示:腹膜间皮细胞可表达 CD40, $\varphi = 4.25\%$ 透析液及 IFN- γ 均能显著增加腹膜间皮细胞 CD40 的表达。间皮细胞 CD40 的上调,可能是腹透过程中腹腔局部炎症启动、放大的重要机制之一^[20,23]。

本研究首次在国际上揭示 CD40 在人和大鼠腹膜间皮细胞的表达及其在腹腔局部防御中的作用,为阐明腹膜透析相关性腹膜炎的发生机制提供了依据。

5 其它相关研究

5.1 细胞周期调控抑制蛋白 p27 和 P21^{WAF1} 在大鼠腹膜间皮细胞肥大中的作用

许多临床和实验研究发现:腹膜长期暴露于含糖透析液中,间皮细胞会出现细胞肥大的现象。而肥大的间皮细胞可能是间皮细胞早期衰老的表现,并可能最终导致间皮细胞凋亡、腹膜间皮层缺失,

腹膜功能进行性丧失。但是目前有关间皮细胞肥大的机制仍未明。细胞周期抑制蛋白 P21^{WAF1} 和 p27 能广泛抑制 G₁ 期、S 期的 cyclin 与细胞周期激酶 (CDK) 结合,使 G₁ 期过度延长,调控细胞肥大。但是否腹膜间皮细胞肥大与 P21^{WAF1}、p27 有关,尚无文献报道。我们探讨了含糖腹膜透析液作用下慢性腹透大鼠模型及体外培养的腹膜间皮细胞的形态与 p27、P21^{WAF1} 表达的关系。我们发现:高糖作用 24 h 后大鼠腹膜间皮细胞大多出现细胞肥大和停滞于细胞周期的 G₁ 期,以含糖 3.86% 组明显。p21^{WAF1} 和 p27mRNA 和蛋白随着糖浓度表达增高。在和含糖组相同渗透压的甘露醇组和无血清常规培养基几乎无 p21^{WAF1} mRNA 和蛋白的表达。腹膜间皮细胞 p27 和 p21^{WAF1} 的表达上调与高糖诱导的间皮细胞的肥大呈显著的正相关。结果提示 p27 和 p21^{WAF1} 的表达上调可能是长期腹膜透析高糖诱导间皮细胞肥大的机制之一^[24-27]。

5.2 腹膜间皮细胞葡萄糖载体在腹膜转运中的作用

长期腹膜透析后腹膜对葡萄糖的吸收及腹膜溶质转运特点常会发生改变,这可能与腹膜组织葡萄糖载体 (GluTs) 表达改变有关。我们分别观察了腹膜间皮细胞 GluTs 表达情况及不同浓度葡萄糖培养对腹膜间皮细胞 GluTs 表达的影响。结果显示体外培养的大鼠腹膜间皮细胞存在 GluT1 及 GluT2 mRNA 的阳性表达,未见到 GluT3 及 GluT4 mRNA 的阳性表达条带。用高糖培养基较用正常培养基培养,腹膜间皮细胞 GluT1 mRNA 的表达显著减少;而在相同培养条件下 GluT2mRNA 的表达量明显增加。研究结果提示:在接近生理性葡萄糖浓度下,腹膜间皮细胞高效表达 GluT1,但低表达 GluT2;但在高浓度葡萄糖的环境中, GluT1 表达明显下降而 GluT2 则出现高效表达。这种 GluTs 亚型表达模式的改变在腹膜透析葡萄糖吸收及长期透析后发生腹膜葡萄糖吸收增加,腹膜超滤失败的过程中可能起重要作用^[28]。

5.3 腹膜透析腹膜纤维化的机制

腹膜组织结构完整是 CAPD 患者维持超滤功能和溶质清除的基本条件,然而,大部分 CAPD 一年以上的患者,间皮细胞部分或全部丧失,间皮下组织增厚及纤维化,腹膜超滤功能减低。我们研究发现,高浓度葡萄糖透析液引起腹膜间皮细胞丧失,间皮下基质明显增厚,I 型胶原、FN 沉积明显增

多,腹膜通透性增高(如 D/Purea 增高),超滤量降低,这些结果也进一步提示了长期应用高糖腹透液可引起腹膜结构和功能改变^[29]。

转化生长因子- β (TGF- β 1)在调节损伤后组织修复和再造中起关键作用。为探讨腹膜间皮细胞在腹膜透析腹膜改变中的作用,我们研究了葡萄糖对腹膜间皮细胞 TGF- β 表达的影响。结果提示葡萄糖以剂量依赖方式刺激 TGF- β mRNA 的表达。高浓度葡萄糖刺激 TGF- β mRNA 显著表达。腹膜巨噬细胞是腹膜透析液中的主要细胞。我们还研究了腹膜透析患者透出液中腹膜巨噬细胞 TGF- β mRNA 表达。结果提示腹膜巨噬细胞 TGF- β mRNA 的表达显著增加。提示腹膜间皮细胞和巨噬细胞高表达 TGF- β 在腹膜透析患者腹膜纤维化中发挥重要作用^[30,31]。

5.4 腹膜透析对腹膜间皮细胞凋亡的影响

细胞凋亡与增殖的消长关系必然影响其组织细胞的功能。由于目前使用的腹膜透析液的生物不相容性,导致腹膜间皮细胞损伤。为此我们在腹膜透析模型和腹膜间皮细胞培养的基础上探讨了腹膜透析液及其成分对腹膜间皮细胞凋亡和增殖的影响及凋亡相关基因 *Fas*、*C-Myc*、*Bcl-2*、*Bax* 基因和蛋白的表达对腹膜间皮细胞凋亡的调控作用。我们发现:腹透液显著诱导腹膜间皮细胞凋亡,体内以高渗糖腹透液尤为显著,体外则高渗糖、低 pH 腹透液作用明显。不同浓度腹透液对增殖细胞核抗原(PCNA)影响则不同,透析液诱导的凋亡与腹透液浓度正相关,PCNA 表达则与腹透液负相关。研究提示腹膜间皮细胞凋亡与增殖的消长平衡对腹膜结构和功能的维持起了重要的调控作用,长期 CAPD 患者应尽可能避免长期过多使用高渗葡萄糖透析液^[32-34]。

5.5 腹膜透析对残肾功能影响的研究

慢性肾衰竭患者残肾功能的保护具有重要意义。为了确定早期开始腹膜透析是否有利于残肾功能的保护,我们探讨了腹膜透析对 5/6 肾切除大鼠肾小球硬化进程的影响。肾次全切除后 4 周,用腹膜透析治疗大鼠,结果显示:与对照组比较,腹膜透析组肾小球硬化指数显著降低。提示腹膜透析可以延缓慢性肾衰竭进程,早期开始腹膜透析有利于尿毒症患者残肾功能的保护^[35,36]。

上述相关研究在国际上首次发现 P27 和 P21^{WAF1} 的表达上调与高糖诱导的间皮细胞肥大相

关;不同浓度葡萄糖可导致腹膜间皮细胞葡萄糖载体亚型表达模式改变;高渗糖、低 pH 腹透液影响腹膜间皮细胞凋亡与增殖;腹膜间皮细胞和巨噬细胞分泌 TGF- β 介导腹膜纤维化及早期腹膜透析有利于保护残肾功能。这些研究结果为阐明腹膜透析超滤失败的病理生理机制提供了依据。

本成果围绕腹膜转运及腹膜防御机制开展研究,主要创新点在于:①在国际上首次揭示腹膜表面液体层的存在及其作用;②首次在国际上揭示腹膜间皮细胞调控透明质酸合成的机制及不同分子量透明质酸在腹膜透析腹膜转运及腹膜防御中的作用;③首次在国际上揭示增加腹腔内透析液容量及腹腔残余液体量对腹膜转运功能的影响;④首次在国际上揭示 CD40 在人和大鼠腹膜间皮细胞的表达及其在腹腔局部防御中的作用;所创建的有关腹膜透析动物实验技术为开展腹膜透析基础研究提供了可靠手段。此外,我们还在国际上首次发现细胞周期调控抑制蛋白 P27 和 P21^{WAF1} 的表达上调与高糖诱导的间皮细胞肥大相关;不同浓度葡萄糖可导致腹膜间皮细胞葡萄糖载体亚型表达模式改变;高渗糖、低 pH 腹透液影响腹膜间皮细胞凋亡与增殖;腹膜间皮细胞和巨噬细胞分泌 TGF- β 介导腹膜纤维化及早期腹膜透析有助于保护残肾功能。本成果对于阐明腹膜转运及防御机制具有重要价值,对指导临床确定腹膜透析治疗方案、提高腹膜透析效率具有重要意义。

参考文献:

- [1] 郭群英,吴金浪,叶任高,等. 腹膜表面超微结构的观察[J]. 解剖学报, 2001, 32(2): 177-9.
- [2] Guo Q Y, Zhong J H, Ye R G, et al. Lipid extraction from peritoneal surface layer[J]. Perit Dial Int, 2000, 20(S1): S8.
- [3] Liu S M, Li X Y, Ye R G, et al. Glucose decreases SPA protein synthesis and mRNA expression in rat mesothelial cells[J]. Perit Dial Int, 2001, 20(S2): S135.
- [4] Peng W X, Guo Q Y, Liu S M, et al. Comparison of three chronic dialysis models[J]. Adv Perit Dial, 2000, 16: 51-4.
- [5] Liu S M, Li J, Wang Y, et al. Methods to improve the preservation of peritoneal tissues[J]. Adv Perit Dial, 2001, 17: 61-5.
- [6] 刘思明,叶任高,汪涛,等. 一种简单的慢性腹膜透析高通透性大鼠模型[J]. 中国病理生理杂志, 2001, 17(2): 186-9.

- [7] Wang T, Cheng H H, Liu S M, *et al.* Increased peritoneal membrane permeability is associated with abnormal peritoneal surface layer[J]. *Perit Dial Int*, 2001, 21 (Suppl 3): S345-8.
- [8] Liu S M, Peng W X, Cheng H H, *et al.* Peritoneal vibration(PV) increases peritoneal permeability and Damages the peritoneal surface layer[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2000 11: 212A.
- [9] 刘思明,叶任高,郭群英,等. 戊巴比妥腹腔内注射对腹膜转运功能的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2000,1(1):9-13.
- [10] 郭群英,叶任高,黄凌虹,等. 透明质酸合成酶-2 在人腹膜间皮细胞透明质酸合成及胞外基质形成中的作用[J]. *中华肾脏病杂志*, 2002,18(5):331-6.
- [11] 郭群英,叶任高,黄文生,等. 渗透压制剂对人腹膜间皮细胞透明质酸合成酶的调节作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2003,19(1):59-63.
- [12] 郭群英,叶任高,李晓燕,等. 炎症介质对人腹膜间皮细胞透明质酸合成酶 mRNA 表达和透明质酸合成的影响[J]. *中华肾脏病杂志*, 2003,19(1):34-7.
- [13] Wang T, Cheng H H, Heimburger O, *et al.* Hyaluronan decreases peritoneal fluid absorption: effect of molecular weight and concentration of hyaluronan[J]. *Kidney Int*, 1999, 55(2): 667-73.
- [14] Guo Q Y, Peng W X, Cheng H H, *et al.* Hualuronan preserves peritoneal membrane transport properties[J]. *Perit Dial Int*, 2001, 21(2): 136-42.
- [15] 郭群英,叶任高,黄文生,等. 不同分子量透明质酸对人腹膜间皮细胞透明质酸合成酶 mRNA 表达的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2002,3(6): 320-322, 331.
- [16] 郭群英,叶任高,汪 涛,等. 透明质酸在大鼠慢性腹膜透析模型中的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2001, 17(9):834-9.
- [17] 刘思明,叶任高,汪 涛,等. 腹腔内液体容量对腹膜转运功能的影响[J]. *中华肾脏病杂志*, 2001,17(3): 151-5.
- [18] Wang T, Cheng H H, Heimburger O, *et al.* High peritoneal residual volume decreases the efficiency of peritoneal dialysis[J]. *Kidney Int*, 1999, 55(5):2040-8.
- [19] Yang X, Ye R G, Kong Q Y, *et al.* CD40 Ligand expression on macrophages during peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients[J]. *Adv Perit Dial*, 2000, 16: 213-5.
- [20] 阳 晓,叶任高,孙玉玲,等. 巨噬细胞 CD40L 表达在 CAPD 腹膜炎中的临床意义 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2001,17(1):20-2.
- [21] 阳 晓,叶任高,杨琼琼,等. CD40 在人腹膜间皮细胞的表达[J]. *中国病理生理杂志*, 2001,17(5):448-50.
- [22] 阳 晓,叶任高,董秀清,等. CD40 在大鼠腹膜间皮细胞的表达及其功能研究 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2002, 18(5):346-50.
- [23] 阳 晓,叶任高,魏 毅,等. 腹透液增强腹膜间皮细胞 CD40 表达及其意义[J]. *中国病理生理杂志*, 2003,19 (3):340-4
- [24] 杨琼琼,叶任高,阳 晓,等. 细胞周期抑制蛋白 P27 在慢性腹膜透析大鼠腹膜间皮细胞肥大中的作用[J]. *中华肾脏病杂志*, 2001,17(6):384-7.
- [25] 杨琼琼,叶任高,许韩师,等. 高糖对大鼠腹膜间皮细胞中 P21WAF1 基因表达的影响 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2000,16(2):110-4.
- [26] 杨琼琼,叶任高,余学清,等. 细胞周期调控蛋白 P21WAF1 在腹膜间皮细胞肥大的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2000,16(9):788-91.
- [27] 杨琼琼,叶任高,李志坚,等. 不同浓度葡萄糖对大鼠腹膜间皮细胞表达 P21WAF1 的影响[J]. *中山医科大学学报*, 2000,21(3):196-8.
- [28] Lu C S, Ye R G, Yang Q Q, *et al.* Gene expression of glucose transporters and its regulation by glucose in mesothelial cells[J]. *Chin Med J*, 2001, 114(5): 477-80.
- [29] 阳 晓,叶任高,杨琼琼,等. 川芎嗪对大鼠腹膜透析模型腹膜形态和功能的影响[J]. *中国中西医结合急救医学杂志*, 2003,10(2):70-3.
- [30] Wang T, Chen Y G, Ye R G, *et al.* Effect of glucose on TGF-beta 1 expression in peritoneal mesothelial cells[J]. *Adv Perit Dial*, 1995, 11: 7-10.
- [31] Wang T, Chen Y G, Ye R G, *et al.* Enhanced expression of TGF-beta 1 by peritoneal macrophages in CAPD patients[J]. *Adv Perit Dial*, 1995, 11: 11-4.
- [32] Zheng Z H, Ye R G, Yu X Q, *et al.* Peritoneal dialysis solution disturb the balance of apoptosis and proliferation of peritoneal cells in chronic dialysis model[J]. *Adv Perit Dial*, 2001, 17: 53-7.
- [33] Zheng Z H, Ye R G, Bergstrom J, *et al.* Effect of dialysate composition on the apoptosis and proliferation of HPMC and protein expression of Fas and C-myc[J]. *Adv Perit Dial*, 2000, 16: 31-5.
- [34] 郑智华,叶任高,杨琼琼,等. 腹膜透析液对腹膜间皮细胞凋亡与增殖的影响 [J]. *中华肾脏病杂志*, 1999, 15(5): 278-80.
- [35] Wang T, Ye R G, Zhen Z H, *et al.* Influence of peritoneal dialysis on the progression of chronic renal failure [J]. *Adv Perit Dial*, 1995, 11: 139-41.
- [36] 郑智华,叶任高,余学清,等. 腹膜透析对 TGF- β 在肾小球硬化中表达的影响 [J]. *中华肾脏病杂志*, 1996, 12(5):262-4.

(编辑 张敏瑞)