

不同浓度葡萄糖对大鼠腹膜间皮细胞表达 p21WAF1 的影响

杨琼琼, 李志坚, 叶任高, 陈永雄, 许韩师, 孔庆瑜, 余学清

(中山医科大学附属第一医院肾内科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】观察不同浓度的葡萄糖对大鼠腹膜间皮细胞 p21WAF1 表达的影响。【方法】大鼠腹膜间皮细胞在含糖 13.8 g/L 和 38.6 g/L 的无血清培养基培养 24 h 后, 用流式细胞仪分析细胞周期分布, 用 RT-PCR 法测定 p21WAF1 的表达水平。【结果】经含糖 13.8 g/L 和 38.6 g/L 培养基培养 24 h 后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 38.6 g/L 组明显。高浓度葡萄糖刺激 p21WAF1 mRNA 表达, 38.6 g/L 组表达明显增高 ($P < 0.05$); 无血清常规培养基组和甘露醇组几乎无表达。【结论】高糖可刺激间皮细胞 p21WAF1 的表达, 且可能与高糖作用下细胞肥大及 G₁ 期阻滞有关。

关键词: 腹膜间皮细胞; 葡萄糖; 细胞周期; 细胞周期蛋白; 腹膜透析

中图分类号: R 692.5; R 329.24; R 342.23; Q 253 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)03-0196-03

Effect of Different Concentrated Glucose on the p21WAF1 Expression in Rat Peritoneal Mesothelial Cells

YANG Qiong-qiong, LI Zhi-jian, YE Ren-gao, CHEN Yong-xiong, XU Han-shi, KONG Qing-yu, YU Xue-qing

(Department of Nephology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To investigate the effect of different concentrated glucose on the p21WAF1 expression in rat peritoneal mesothelial cells. 【Methods】Rat peritoneal mesothelial cells were cultured with serum-free DMEM medium containing different glucose concentrations (13.8 g/L and 38.6 g/L) for 24 hours. The cell cycle distribution was then investigated by flow cytometry. The expression of p21WAF1 was detected by RT-PCR. 【Results】In the presence of 13.8 g/L and 38.6 g/L glucose concentrations, most of the cells became hypertrophic, and were arrested in G₁ phase of cell cycle, which were obvious in the 38.6 g/L. High glucose stimulated expression of p21WAF1 mRNA, which was significantly higher in the 3.86% ($P < 0.05$). p21WAF1 mRNA expressions were absent in serum-free normal glucose concentration groups and the D-mannitol groups. 【Conclusion】High glucose stimulated expression of p21WAF1, which might be related to the hypertrophy and arrest in the G₁ phase of mesothelial cells by high glucose.

Key words: peritoneal mesothelial cells; glucose; cell cycle; cell cycle protein; peritoneal dialysis

腹膜纤维化而致的腹膜功能衰竭是腹膜透析发展长期受限的主要原因。目前使用的腹膜透析液是以高浓度葡萄糖为渗透剂的非生理性液体。已有研究发现^[1,2]高糖可使间皮细胞肥大、再生修

复障碍,使早期腹膜间皮细胞层受损或缺失,腹膜对感染和纤维化的防御功能受损,最终导致腹膜纤维化和腹膜功能丧失。细胞周期调控蛋白 p21WAF1 是近年分离得到的一种细胞周期抑制蛋

收稿日期: 1999-12-10

基金项目: 卫生部临床重点攻关项目基金资助(9704028)

作者简介: 杨琼琼(1971-), 女, 福建龙岩人, 在职博士生, 讲师。

白,其过度表达与细胞肥大和复制停滞有关^[3-5]。是否高糖作用下腹膜间皮细胞的肥大与 p21WAF1 表达有关,至今国内外尚未有报道。我们用半定量 RT-PCR 法,观察不同浓度葡萄糖对体外培养的大鼠腹膜间皮细胞 p21WAF1 表达的影响,从细胞周期角度探讨早期腹膜纤维化的分子机制。

1 材料和方法

1.1 大鼠腹膜间皮细胞的分离、培养与鉴定

大鼠腹膜间皮细胞按 Hjelle 等^[6]建立的方法培养。融合后间皮细胞呈铺路石样,传代后用抗大鼠 Cytokeritin、抗大鼠 Vimentin 和抗 VIII 因子相关抗原的单克隆抗体(美国 Dako 公司)做免疫组化(用 SP 试剂盒,北京中山公司)鉴定细胞,结果抗 cytokeritin 和抗 vimentin 抗原阳性,抗 VIII 因子相关抗原阴性。

1.2 间皮细胞在不同浓度葡萄糖作用下的形态

将融合后的大鼠腹膜间皮细胞消化后用含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM-F12 培养基制成细胞悬液接种于 6 孔培养板中,细胞密度为 10^7 /孔,培养至亚融合后加入无血清培养基,同步化培养 24 h 后分别加入含不同浓度的葡萄糖,(13.8, 38.6 g/L)的培养基培养 24 h 后在倒置显微镜下观察细胞形态。每个浓度组设一个与葡萄糖组相同渗透压的甘露醇(浓度为 13.8, 38.6 g/L)为对照组,另设无血清 DMEM-F12 培养基(含生理浓度的葡萄糖)为空白对照组。

1.3 流式细胞仪分析不同浓度葡萄糖作用间皮细胞的周期分布

10^7 腹膜间皮细胞在不同条件培养基培养 24 h (条件同上述)后用 1.25 g/L 胰蛋白酶轻消化, PBS 洗后用 700 mL/L 乙醇 4 °C 固定过夜。次日用 PBS 洗脱乙醇,制成单细胞悬液。PI 染色后用流式细胞仪(美国 Coulter 公司)分析,并以相对细胞数为 Y 轴,相对的 DNA 量为 X 轴作一曲线。细胞周期 G₁ 期的细胞数百分比从图中通过电脑分析得出。

1.4 间皮细胞 RNA 提取

10^7 腹膜间皮细胞在不同条件培养基培养 24 h (条件同上述)后,用胰酶消化细胞并收集于无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中。用 RN_{easy} Mini Kit 一步法试剂盒(美国基因公司)提取细胞总 RNA。用紫外分

光光度计测定总 RNA 的纯度和浓度,重复 3 次。样品 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 比值在 1.8~2.0 之间。

1.5 RT-PCR 法检测 p21WAF1 mRNA 表达

逆转录:采用 THERMOSCRIPT™ 逆转录试剂盒(美国 Gibco 公司)。取 1 μg 总 RNA 加入 1 μL oligo dT 引物,65 °C 变性 5 min,依次加入 10 mol/L dNTP 2 μL、0.1 M DTT 1 μL、40 U/μL RN_{ase} OUT 1 μL、5× cDNA 合成缓冲液 4 μL 和 ThermoScript 反转录酶(15 U/μL) 1 μL,总反应体积 20 μL。50 °C 孵育 50 min,85 °C 孵育 5 min 后终止反应。最后加入 1 μL RN_{ase} H 37 °C 孵育 20 min。

半定量 PCR:取反转录后所得的 cDNA 模板 2 μL,分别加入 10× PCR 缓冲液 5 μL、2.5 mmol/L dNTP 混合物 5 μL、10 μmol/L 上游及下游引物各 1 μL 和 Taq DNA 聚合酶 2 μL(美国 Promega 公司),总反应体积为 50 μL。PCR 反应所需的变性、退火和延伸温度为 94 °C、61 °C、72 °C,反应时间 45 s、45 s、1 min,共循环 30 次。取 15 μL 反应液在 20 g/L 琼脂糖凝胶(含 0.2 μg/mL EB)电泳后在紫外灯下用凝胶成像系统成像及分析,三磷酸甘油脱氢酶(GAPDH)为内参照,计算每一样本的 p21WAF1/GAPDH PCR 扩增产物的相对比值。以血管紧张素 II 刺激 24 h 后的肾小管上皮细胞为阳性对照^[7]。

引物设计和合成

p21WAF1(310 bp)^[8]

上游引物 AGTATGCCGTCGTCTGTTCG

下游引物 GAGTGCAAGACAGCGACAAG

GAPDH (230 bp)

上游引物 ACCACAGTCCATGAAATCAC

下游引物 AGGTTTCTCCAGCGGCATC

1.6 统计学处理

全部数据采用 SPSS6.0 医用统计软件进行处理,结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组之间差异以 F 检验和 Q 检验作统计学处理。

2 结果

2.1 不同浓度葡萄糖对大鼠腹膜间皮细胞形态的影响

在倒置显微镜下可观察到大鼠腹膜间皮细胞在含葡萄糖 38.6 g/L 和 13.6 g/L 组的培养条件出

现两种明显的形态学改变:一是细胞肥大,核仁明显,呈“牛眼”征;二是可见许多细胞的胞核增多,细胞分裂停止。以上改变在 38.6 g/L 组中更为明显(见图 1)。在甘露醇组仅有轻度细胞肥大,但未见类似高糖组的多核细胞的改变。

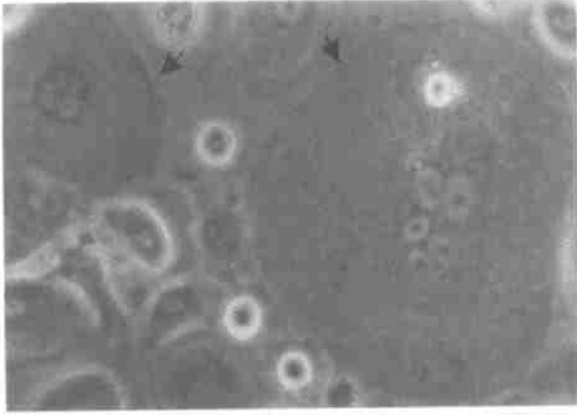


图 1 在含糖 38.6 g/L 培养基培养 24 h 后大鼠腹膜间皮细胞的形态改变

Fig. 1 The morphology of rat mesothelial cells cultured in the 38.6 g/L glucose medium for 24 h (HM 10×40)

2.2 不同浓度葡萄糖对大鼠腹膜间皮细胞细胞周期数的影响

用流式细胞仪分析细胞周期 G_1 期分布比例发现,在无血清的常规培养基(空白对照组)培养 24 h 的间皮细胞 G_1 期细胞比例为 $62.7\% \pm 3.4\%$,而在含糖 13.8 g/L 和 38.6 g/L 组 G_1 期细胞比例明显增高,为 $73.1\% \pm 3.5\%$ 和 $81.5\% \pm 2.3\%$,其中含葡萄糖 38.6 g/L 组显著高于空白对照组 ($P < 0.05$)。含甘露醇 13.8 g/L 和 38.6 g/L 组 G_1 期细胞比例为 $64.6\% \pm 5.5\%$ 和 $68.5\% \pm 7.3\%$,与空白对照组之间无显著差异。

2.3 不同浓度葡萄糖对大鼠腹膜间皮细胞 p21WAF1 基因表达的影响

图 2 可见在无血清常规培养基培养下,静止期的间皮细胞几乎无 p21WAF1 mRNA 的表达,但在含糖 13.8 g/L 和 38.6 g/L 组可见 p21WAF1 表达,其中 38.6 g/L 组 (p21WAF1/GAPDH PCR 扩增产物的相对比值为 0.50 ± 0.07) 显著高于 13.8 g/L 组 (0.36 ± 0.04), $P < 0.05$,含甘露醇组几乎无 p21WAF1 mRNA 的表达。

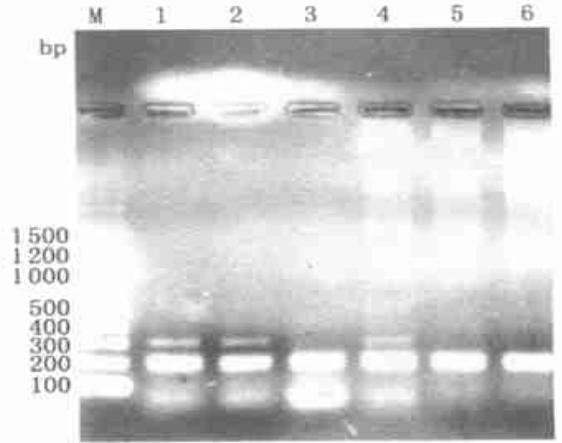


图 2 RT-PCR 法检测大鼠腹膜间皮细胞 p21WAF1 mRNA 的表达

Fig. 2 Measurement of the p21WAF1 mRNA expression in rat peritoneal mesothelial cells by RT-PCR

1: 13.8 g/L glucose 2: 38.6 g/L glucose 3: serum-free medium, 4: positive control 5: 13.8 g/L mannitol 6: 38.6 g/L mannitol A: p21WAF1 B: GAPDH

3 讨论

腹膜透析是治疗终末期肾脏病的主要替代疗法。腹膜结构和生理功能的稳定是腹膜透析能长期有效进行的关键。腹膜间皮细胞是构成腹膜的最重要的细胞群体,它在保持腹膜结构的完整性和功能的有效性中起重要作用。在长期腹透中腹膜间皮细胞可因持续暴露于高糖腹透液中出现细胞肥大、胞核增多、细胞分裂停滞等表现^[1,2]。我们的实验也发现同样现象。近期有学者提出间皮细胞上述改变可能与高糖对细胞周期的影响有关^[3]。在本实验中我们也发现高浓度葡萄糖促使间皮细胞停滞于细胞周期的 G_1 期,并随着葡萄糖浓度的增高而明显,而与渗透压的关系不大。但是高糖如何促使腹膜间皮细胞肥大并停滞于 G_1 期,目前机制未明。

目前认为细胞肥大可能是细胞受细胞内外信号刺激后进入 G_1 期时, DNA 合成被抑制同时蛋白质和 RNA 合成增加,细胞生长停滞于 G_1 期^[9]。细胞周期抑制蛋白 p21WAF1 是近年分离得到的一类细胞周期调控蛋白,它能广泛抑制 G_1 期和 S 期的周期素 (cyclin) 与细胞周期激酶 (CDK) 结合,使视网膜瘤蛋白 (Rb) 不能磷酸化,从而不能释放转录因子 E2F,使 G_1 期过度延长,细胞增殖抑制,细胞呈肥大

(下转第 208 页)

参考文献:

- [1] Rickinson A B, Kieff E. Epstein-Barr virus. In Field's Virology[M]. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. 2397.
- [2] Zheng N, Yuan F, Chen L F, *et al*. Effect of a B-lymphocyte and NPC derived EBV-LMP1 gene expression on *in vitro* growth and differentiation of human epithelial cells[J]. Int J Cancer, 1994, 57(5): 747.
- [3] Siu T C, Leung S F, Lo K W, *et al*. Specific latent membrane protein gene sequences in type 1 and type 2 Epstein-Barr virus from nasopharyngeal carcinoma in Hongkong[J]. Int J Cancer, 1998, 76(3): 399.
- [4] 陈元, 郭辉玉, 曹虹, 等. 鼻咽癌细胞株 SUNE1 中 EBV LMP1 基因克隆及部分序列分析[J]. 中华实验与临床病毒学杂志, 1999, 13(4): 217.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1995. 873~891.
- [6] Wang D. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells[J]. Cell, 1985, 43(4): 831.

- [7] Kevin H, Susan F, Mary H, *et al*. A membrane protein encoded by Epstein-Barr virus in latent growth-transforming infection[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81(7): 7207.
- [8] Fahraeus R, Rymo L, Rhim J S, *et al*. Morphological transformation of human keratinocytes expressing the LMP gene of Epstein-Barr virus[J]. Nature, 1990, 345(6274): 447.
- [9] 吴荫棠, 汪慧民, 杨小平, 等. 鼻咽癌裸鼠移植瘤及其相应体外细胞株的建立与特性研究[J]. 癌症, 1995, 14(2): 83.
- [10] 陈宜芳, 郭辉玉, 汪慧民, 等. 鼻咽癌细胞系 SUNE1 中 EBV LMP1 基因对永生化人胚肾上皮细胞生长特性的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 1998, 20(5): 330.
- [11] Suet Y L, Siu T Y, Lap P C, *et al*. Prevalence of mutations and 30-bp deletion in the C-terminal region of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 oncogene in reactive lymphoid tissue and non-nasopharyngeal EBV-associated carcinomas in Hongkong Chinese[J]. Int J Cancer, 1997, 72(2): 225.

(编辑 张瑞敏)

(上接第 198 页)

状态。目前推测它是细胞周期 G₁/S 期转换过程的关键^[9]。已有许多研究表明 p21WAF1 的过度表达与细胞肥大、G₁ 期停滞有关^[3~5,9]。近期 Kuan CJ 等^[5]研究发现高浓度葡萄糖诱导系膜细胞肥大与 p21WAF1 表达水平增高有关。是否高糖作用下间皮细胞的肥大和 G₁ 期停滞也与细胞内 p21WAF1 表达增高有关, 目前国内外尚未见报道。我们用 RT-PCR 法检测不同浓度葡萄糖对 p21WAF1 mRNA 表达的影响, 发现空白对照组和甘露醇组几乎无 p21WAF1 mRNA 的表达, 而高浓度葡萄糖可刺激间皮细胞 p21WAF1 mRNA 的表达, 且随着含糖浓度增高而表达增高。这初步提示高糖可刺激间皮细胞表达 p21WAF1, 这一作用与葡萄糖的浓度有关, 而与葡萄糖产生的渗透压关系不大。本文研究结果初步提示高糖对间皮细胞增殖和形态学的改变可能与细胞周期的调控失衡有关。

参考文献:

- [1] Gotloib L, Wajsbrodt V, Shostak A, *et al*. Acute and long-term changes observed in imprints of mouse mesothelium exposed to glucose-enriched, lactated, buffered dialysis solutions[J]. Nephron, 1995, 70(2): 446.
- [2] Gotloib L, Shostak A, Wajsbist V, *et al*. High glucose induced a hypertrophic, senescent mesothelial cell phenotype af-

ter long *in vivo* exposure[J]. Nephron, 1999, 82(1): 164.

- [3] Shankland S J. Cell-cycle control and renal disease[J]. Kid Int, 1997, 52(2): 294.
- [4] Sheikh M S, Rochefort H, Gracia M, *et al*. Overexpression of p21WAF1/cip1 induces growth arrest, giant cell formation and apoptosis in human breast carcinoma cell lines[J]. Oncogene, 1995, 11(9): 1899.
- [5] Kuan C J, Al-Douahh M, Shankland S. The cyclin kinase inhibitor p21WAF1, cip1 is increased in experimental diabetic nephropathy: potential role in glomerular hypertrophy[J]. J Am Soc Nephrol, 1998, 9(3): 986.
- [6] Hjelle J H, Golinska B T, Waters D C, *et al*. Isolation and propagation *in vitro* of peritoneal mesothelial cells. Perit Dial Int, 1989, 9(2): 341.
- [7] Terada Y, Yanada T, Nakashima O, *et al*. Angiotensin II induced p21^{cip1} via JAK₂-STAT₁ pathway and caused hypertrophy in proximal tubular cells[J]. J Am Soc Nephrol, 1996, 7(10): 1776.
- [8] Sugiyama A, Nagaki M, Shidoji Y, *et al*. Regulator of cell cycle-related genes in rat hepatocytes by transforming growth factor β -1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 238(2): 539.
- [9] Shankland S J. Cell cycle regulatory proteins in glomerular disease[J]. Kid Int, 1999, 56(10): 1208.

(编辑 黄小延)