

腹膜透析液通过上调葡萄糖转运体促进腹膜纤维化

洪梦琪¹, 聂振禹², 陈争跃², 余雄伟², 包蓓艳²

1. 宁波大学医学院, 浙江 宁波 315211

2. 宁波市泌尿肾病医院肾内科, 浙江 宁波 315192

[摘要] **目的:**研究葡萄糖转运体1(GLUT1)和钠—葡萄糖转运体1(SGLT1)在腹膜纤维化过程中的作用。**方法:**体内实验中,取36只SD雄性大鼠随机分为六组:正常对照组、手术对照组、腹膜透析组(PD组)、腹膜透析+根皮素组(PD+T组)、腹膜透析+根皮苷组(PD+Z组)、腹膜透析+根皮素+根皮苷组(PD+T+Z组),每组6只。采用5/6肾脏切除法制作尿毒症模型,腹膜透析采用浓度为2.5%的透析液。停止透析24h后行腹膜平衡试验评估大鼠腹膜转运功能;HE染色观察壁层腹膜形态;免疫组织化学法检测网膜组织GLUT1、SGLT1、TGF- β 1和结缔组织生长因子(CTGF)的表达。体外实验中,体外培养人腹膜微血管内皮细胞(HPEC)并分为五组:正常对照组、腹膜透析组(PD组)、腹膜透析+根皮素组(PD+T组)、腹膜透析+根皮苷组(PD+Z组)、腹膜透析+根皮素+根皮苷组(PD+T+Z组)。采用实时定量PCR和蛋白质印迹法检测网膜组织及微血管内皮细胞内GLUT1、SGLT1、TGF- β 1、CTGF mRNA及蛋白表达。**结果:**与手术对照组比较,PD组大鼠的腹膜增厚,超滤量增加,GLUT1、SGLT1、TGF- β 1、CTGF mRNA及蛋白均表达上升(均 $P < 0.05$);在使用葡萄糖拮抗剂根皮苷、根皮素后,大鼠腹膜增厚程度减轻,GLUT1、SGLT1、TGF- β 1、CTGF mRNA及蛋白表达均下降(均 $P < 0.05$);相关性分析显示,大鼠腹膜GLUT1、SGLT1表达与TGF- β 1、CTGF表达均呈正相关(均 $P < 0.05$)。2.5%腹膜透析液可以上调人腹膜微血管内皮细胞GLUT1、SGLT1、TGF- β 1、CTGF mRNA及蛋白的表达(均 $P < 0.05$);使用葡萄糖拮抗剂后,人腹膜微血管内皮细胞GLUT1、SGLT1、TGF- β 1、CTGF mRNA及蛋白表达均下降(均 $P < 0.05$);相关性分析显示,人腹膜微血管内皮细胞GLUT1、SGLT1表达与TGF- β 1、CTGF表达均呈正相关(均 $P < 0.05$)。**结论:**高糖腹膜透析液可通过上调GLUT1、SGLT1的表达促进腹膜纤维化。



[关键词] 腹膜透析;透析液;单糖转运蛋白质类;钠—葡萄糖转运体1;纤维化/病理生理学;内皮,血管/细胞学;腹膜/血液供给;疾病模型,动物

[中图分类号] R692; R363; R459.5 **[文献标志码]** A

收稿日期:2016-09-30 接受日期:2016-11-20

基金项目:浙江省自然科学基金(Y13H050021)

第一作者:洪梦琪(1991—),女,硕士研究生,主要从事腹膜透析治疗的研究;E-mail: 364289549@qq.com;http://orcid.org/0000-0002-8672-3474

通讯作者:包蓓艳(1965—),女,硕士,主任医师,主要从事慢性肾病、腹膜透析治疗的研究;E-mail: baobeiyan2007@sina.com;http://orcid.org/0000-0002-1419-7292

High glucose dialysate enhances peritoneal fibrosis through upregulating glucose transporters GLUT1 and SGLT1

HONG Mengqi¹, NIE Zhenyu², CHEN Zhengyue², YU Xiongwei², BAO Beiyang²
(1. School of Medicine, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Division of Nephrology, Ningbo Urology and Nephrology Hospital, School of Medicine, Ningbo University, Ningbo 315192, China)

Corresponding author: BAO Beiyang, E-mail: baobeiyang2007@sina.com, <http://orcid.org/0000-0002-1419-7292>

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the role of glucose transporter 1 (GLUT1) and sodium-glucose cotransporter 1 (SGLT1) in high glucose dialysate-induced peritoneal fibrosis. **Methods:** Thirty six male SD rats were randomly divided into 6 groups (6 in each): normal control group, sham operation group, peritoneal dialysis group (PD group), PD + phloretin group (PD + T group), PD + phlorizin group (PD + Z group), PD + phloretin + phlorizin group (PD + T + Z group). Rat model of uraemia was established using 5/6 nephrectomy, and 2.5% dextrose peritoneal dialysis solution was used in peritoneal dialysis. Peritoneal equilibration test was performed 24 h after dialysis to evaluate transport function of peritoneum in rats; HE staining was used to observe the morphology of peritoneal tissue; and immunohistochemistry was used to detect the expression of GLUT1, SGLT1, TGF- β 1 and connective tissue growth factor (CTGF) in peritoneum. Human peritoneal microvascular endothelial cells (HPECs) were divided into 5 groups: normal control group, peritoneal dialysis group (PD group), PD + phloretin group (PD + T group), PD + phloretin group (PD + Z group), and PD + phloretin + phloretin group (PD + T + Z group). Real time PCR and Western blotting were used to detect mRNA and protein expressions of GLUT1, SGLT1, TGF- β 1, CTGF in peritoneal membrane and HPECs. **Results:** *In vivo*, compared with sham operation group, rats in PD group had thickened peritoneum, higher ultrafiltration volume, and the mRNA and protein expressions of GLUT1, SGLT1, CTGF, TGF- β 1 were significantly increased (all $P < 0.05$); compared with PD group, thickened peritoneum was attenuated, and the mRNA and protein expressions of GLUT1, SGLT1, CTGF, TGF- β 1 were significantly decreased in PD + T, PD + Z and PD + T + Z groups (all $P < 0.05$). Pearson's correlation analysis showed that the expressions of GLUT1, SGLT1 in peritoneum were positively correlated with the expressions of TGF- β 1 and CTGF (all $P < 0.05$). *In vitro*, the mRNA and protein expressions of GLUT1, SGLT1, TGF- β 1, CTGF were significantly increased in HPECs of peritoneal dialysis group (all $P < 0.05$), and those in PD + T, PD + Z, and PD + T + Z groups were decreased (all $P < 0.05$). Pearson's correlation analysis showed that the expressions of GLUT1, SGLT1 in HPECs were positively correlated with the expressions of TGF- β 1 and CTGF (all $P < 0.05$). **Conclusion:** High glucose peritoneal dialysis fluid may promote peritoneal fibrosis by upregulating the expressions of GLUT1 and SGLT1.

[**Key words**] Peritoneal dialysis; Dialysis solutions; Monosaccharide transport proteins; Sodium-glucose transporter 1; Fibrosis/physiopathology; Endothelium, vascular/cytology; Peritoneum/blood; Disease models, animal

腹膜透析是终末期肾病患者行肾脏替代治疗时的一种有效的治疗选择^[1]。腹膜作为一种生物半透膜,其结构和功能的稳定是患者进行长期腹膜透析治疗的关键。长期接触非生理性高糖透析液导致腹膜纤维化,使腹膜对小分子物质转运功能减退甚至超滤衰竭,迫使患者退出腹膜透析治疗^[2]。

葡萄糖转运蛋白属于细胞膜载体蛋白家族,负责葡萄糖等物质的跨细胞运输,其中最重要的是葡萄糖转运体 1 (glucose transporter 1, GLUT1) 和钠—葡萄糖转运体 1 (sodium-glucose cotransporter 1, SGLT1)。葡萄糖转运蛋白的异常增多或者代谢紊乱,会导致细胞对葡萄糖的摄取以及利用的失衡^[3-4]。细胞对葡萄糖的吸收摄取途径有两种:一是载体介导的易化扩散;二是继发性主动转运,通过钠泵的存在,促进葡萄糖逆浓度梯度转运^[5-6]。其中易化扩散转运的主要载体是 GLUT1,而继发性主动转运主要依靠 SGLT1。有研究显示,高糖能引起内皮细胞中 GLUT1、SGLT1 表达量升高,但具体机制仍不清楚^[7-8]。

TGF- β 1、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是目前较为明确的促纤维化因子,在腹膜纤维化形成中扮演了重要角色。近年研究发现,CTGF 是 TGF- β 1 发挥生物学效应的下游因子,这两种细胞因子可以评估纤维化的程度^[9]。目前,GLUT1 与 SGLT1 在各器官纤维化中的作用引起研究人员的关注^[10]。本研究为明确 GLUT1、SGLT1 对腹膜纤维化的影响,拟通过体内及体外实验,探究 GLUT1、SGLT1 对腹膜形态和功能及 TGF- β 1、CTGF mRNA 和蛋白表达的影响,为延缓腹膜纤维化进程提供新的研究思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料、仪器和试剂

人腹膜微血管内皮细胞(human peritoneal microvascular endothelial cells, HPEC)购自广州吉妮欧生物科技有限公司,无酚红 RPMI-1640 培养基购自美国 HyClone 公司,0.25% EDTA-胰蛋白酶、FBS 购自美国 Gibco 公司,2.5% 和 4.25% 腹膜透析液购自广州百特医疗用品有限公司,根皮素(GLUT1 拮抗剂)、根皮苷(SGLT1 拮抗剂)原粉购自美国 Sigma 公司,DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,GoTaq™ 两步法 RT-

qPCR 系统、GoScript™ 逆转录酶系统、GoTaq® qPCR Master Mix 购自美国 Promega 公司,TRIzol 试剂购自美国 Ambion 公司,兔抗人 GLUT1 抗体、兔抗人 SGLT1 抗体、兔抗人 TGF- β 1 抗体、兔抗人 CTGF 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,荧光标记的羊抗兔二抗购自美国 LI-COR Biosciences 公司,BCA 法蛋白定量试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司。

1.2 动物模型制备和分组

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 36 只,体质量为 280 ~ 300 g,饲养室温保持在(20 ± 3) °C。实验前适应性喂养一周,随机分为六组:正常对照组、手术对照组、腹膜透析组(PD 组)、腹膜透析 + 根皮素组(PD + T 组)、腹膜透析 + 根皮苷组(PD + Z 组)、腹膜透析 + 根皮素 + 根皮苷组(PD + T + Z 组),每组 6 只。其中,手术对照组行双侧肾包膜剥除术;PD 组用 2.5% 腹膜透析液进行透析治疗 1 个月(10 mL/次,2 次/d);PD + T 组在 PD 组处理的基础上,加用根皮素 20 mg · kg⁻¹ · d⁻¹;PD + Z 组在 PD 组处理的基础上,加用根皮苷 20 mg · kg⁻¹ · d⁻¹;PD + T + Z 组在 PD 组处理的基础上,加用根皮素和根皮苷各 20 mg · kg⁻¹ · d⁻¹。除正常对照组和手术对照组外,其余各组大鼠均采用 5/6 肾脏切除法制作尿毒症大鼠模型,再行后腹膜插管制作尿毒症腹膜透析大鼠模型。24 只大鼠在动物造模中全部存活,且均愈合良好,血肌酐值均超过正常对照组和手术对照组 2 ~ 3 倍,造模成功^[11]。后行腹膜置管术,均无管腔堵塞,伤口愈合良好,均未出现化脓性感染,腹膜透析进行顺利。所有大鼠腹膜透出液中白细胞计数未超出正常值上限(< 1000/mm³),可排除腹膜炎对本研究结果的影响。

1.3 腹膜平衡试验评估大鼠腹膜转运功能

大鼠停止透析 24 h 后行腹膜平衡试验。通过腹膜透析导管向大鼠腹腔注射 4.25% 腹膜透析液 20 mL,120 min 后处死大鼠并取血,收集大鼠腹腔内液体,计算超滤量。经下腔静脉采血,取网膜组织保存于 -80 °C 冰箱待检。测定初始腹膜透析液葡萄糖浓度(D0)、透出液葡萄糖浓度(D1)、透出液肌酐水平(D-cr)、血清肌酐水平(P-cr),并计算 D-cr/P-cr 和 D1/D0。

1.4 组织学检查测量大鼠腹膜厚度

取大鼠腹部壁层腹膜,用 4% 多聚甲醛溶液

固定 24 h 后梯度乙醇脱水,二甲苯透明、浸蜡及石蜡包埋,3 μm 切片行 HE 染色,每张切片盲法随机测量 10 个高倍镜视野,将肌肉至腹膜垂直距离(含皮下纤维)的平均值作为腹膜组织厚度。

1.5 免疫组织化学检测大鼠网膜组织 GLUT1、SGLT1、TGF- β 1 和 CTGF 蛋白

取网膜组织 3 μm 切片后行 GLUT1、SGLT1、TGF- β 1 和 CTGF 免疫组织化学染色,按 ABC 试剂盒说明书操作。石蜡切片常规二甲苯及梯度乙醇脱蜡脱水,微波热处理修复抗原,一抗均稀释 100 倍,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜,阴性对照组以 PBS(酸碱度 7.4)代替一抗,DAB 显色,苏木素复染核,中性树脂封片,显微镜下观察,染色阳性者呈棕黄色。

1.6 人腹膜微血管内皮细胞的培养及分组

将人腹膜微血管内皮细胞株接种在 1% 明胶包被的 25 cm^2 培养瓶中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳的培养箱中培养,24 ~ 36 h 后第一次换液,以后每 2 ~ 3 d 换液一次。当细胞生长融合至 80% ~ 90% 时,用 0.25% EDTA-胰蛋白酶消化,以 1:3 传代培养,取第 3、4 代用于实验。

将细胞分成五组:正常对照组、腹膜透析组(PD 组)、腹膜透析 + 根皮素组(PD + T 组)、腹膜透析 + 根皮苷组(PD + Z 组)和腹膜透析 + 根皮素 + 根皮苷组(PD + T + Z 组),均用含葡萄糖的无酚红 RPMI-1640 培养基培养。然后,PD 组用 2.5% 的腹膜透析液培养;PD + T 组、PD + Z 组、PD + T + Z 组分别用含根皮素或(和)根皮苷的 2.5% 的腹膜透析液培养。根据预实验结果,将实验时间定为 48 h,所用根皮素和根皮苷的浓度分别为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,实验重复三次。

1.7 实时定量 PCR 检测网膜组织及微血管内皮细胞内 GLUT1、SGLT1、TGF- β 1 和 CTGF mRNA 表达

用 TRIzol 试剂抽提网膜组织总 RNA;当细胞生长融合至 90% ~ 95% 时,按上述分组要求同步培养细胞 48 h,采用 TRIzol 一步法抽提细胞总 RNA。GoScript 逆转录酶系统试剂盒合成 cDNA,产物用 GoTaq 两步法 RT-qPCR 系统试剂盒进行 PCR 扩增。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,共 40 个循环,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析结果数据。引物序列见表 1。

表 1 实时定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for qPCR

基 因	引物序列 (5'-3')
GLUT1	正向:CGGGCCAAGACTGTGCTAAA
	反向:TGACGATACCGGAGCCAATG
SGLT1	正向:CCTCTTCGCCATTTCCTTCATC
	反向:ATGCACATCCGGAATGGGT
CTGF	正向:ACGGCGAGGTATGAAGAAGAACA
	反向:TGGGGCTACAGGCAGGTCAGTC
TGF- β 1	正向:CCAACTATTGCTTCAGCTCCA
	反向:GTGTCCAGGCTCCAAATGT
β -actin	正向:CTCCATCCTGGCCTCGCTGT
	反向:GCTGTACCTTCACCGTTCC-

1.8 蛋白质印迹法检测网膜组织及微血管内皮细胞内 GLUT1、SGLT1、TGF- β 1 和 CTGF 蛋白表达

提取各组网膜组织及细胞蛋白用 BCA 法测定蛋白浓度,配置 5% 的浓缩胶和 12% 的分离胶,取 50 μg 变性蛋白进行 SDS-PAGE,并用 0.22 μm 的硝酸纤维素滤膜进行蛋白质转膜,考马斯亮蓝染胶、丽春红 S 染液染膜以观察蛋白质是否转移完全。用含 5% 牛血清白蛋白的封闭液封闭,一抗(1:500)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,随后荧光标记的羊抗兔二抗(1:10 000)室温避光孵育 1 h,ECL 发光显影试剂反应,采用蛋白质印迹自动成像仪扫描并获得显影图像。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件包进行统计学分析。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,多个样本之间两两比较采用 LSD- t 检验,相关性分析用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠腹膜转运功能比较

与手术对照组比较,PD 组腹膜超滤量、D1/D0 减少,D-cr/P-cr 增加(均 $P < 0.05$);与 PD 组比较,PD + T 组、PD + Z 组和 PD + T + Z 组腹膜超滤量和 D1/D0 增加,D-cr/P-cr 减少(均 $P < 0.05$);而 PD + T 组、PD + Z 组、PD + T + Z 组间超滤量、D1/D0 和 D-cr/P-cr 差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表 2。提示抑制 GLUT1、SGLT1 的表达可以延缓腹膜对葡萄糖的吸收,维持腹膜透析液渗透梯度,增加腹膜超滤量,提高腹膜透析效能。

表2 各组腹膜超滤量、D-cr/P-cr 和 D1/D0 比较

Table 2 Ultrafiltration of peritoneum, D-cr/P-cr and D1/D0 in each group

组别	n	超滤量(mL)	($\bar{x} \pm s$)	
			D-cr/P-cr	D1/D0
正常对照组	6	22.63 ± 4.11	0.24 ± 0.05	0.69 ± 0.09
手术对照组	6	23.67 ± 1.53	0.20 ± 0.04	0.68 ± 0.02
PD组	6	16.00 ± 6.24*	0.47 ± 0.11*	0.20 ± 0.05*
PD+T组	6	22.33 ± 2.08#	0.24 ± 0.06#	0.45 ± 0.05#
PD+Z组	6	21.75 ± 1.71#	0.20 ± 0.05#	0.45 ± 0.06#
PD+T+Z组	6	22.50 ± 0.71#	0.27 ± 0.06#	0.49 ± 0.10#

PD组:腹膜透析组; PD+T组:腹膜透析+根皮素组;PD+Z组:腹膜透析+根皮苷组;PD+T+Z组:腹膜透析+根皮素+根皮苷组;D-cr/P-cr:透出液肌酐/血清肌酐;D1/D0:腹透液葡萄糖浓度/透出液葡萄糖浓度。与手术对照组比较,* $P < 0.05$;与PD组比较,# $P < 0.05$ 。

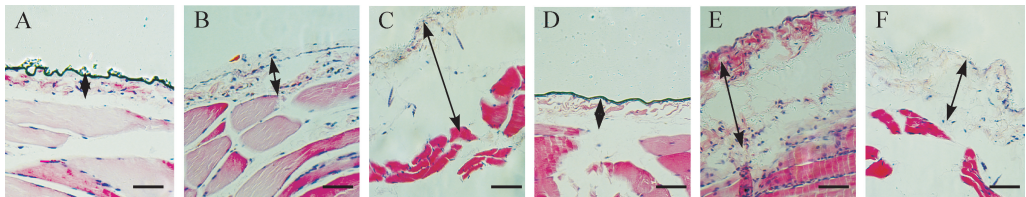
2.2 各组大鼠腹膜厚度比较

各组腹膜HE染色结果见图1。与正常对照

组[(182 ± 28) μm]比较,手术对照组[(220 ± 78) μm]腹膜组织厚度差异无统计学意义($P > 0.05$);与手术对照组比较,PD组[(995 ± 100) μm]腹膜组织厚度增加(均 $P < 0.05$);与PD组比较,PD+T组[(282 ± 90) μm]、PD+Z组[(419 ± 42) μm]和PD+T+Z组[(283 ± 49) μm]大鼠腹膜组织增厚程度减轻(均 $P < 0.05$);PD+T组、PD+Z组、PD+T+Z三组之间腹膜组织厚度差异无统计学意义($P > 0.05$)。提示腹膜透析液可以增加大鼠的腹膜厚度,而抑制GLUT1、SGLT1的表达可以减轻大鼠在腹膜透析过程中腹膜增厚的程度。

2.3 各组大鼠腹膜 GLUT1 和 SGLT1 的 mRNA 及蛋白表达比较

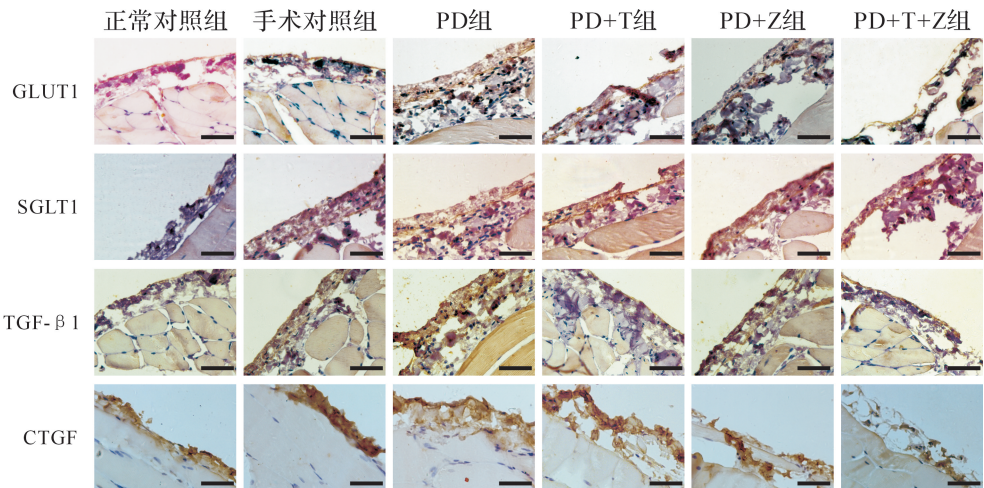
GLUT1、SGLT1 的 mRNA 和蛋白在各组均有表达(图2、3)。与正常对照组比较,手术对照组 GLUT1、SGLT1 mRNA 和蛋白表达差异无统计学



A: 正常对照组; B: 手术对照组; C: 腹膜透析组; D: 腹膜透析+根皮素组; E: 腹膜透析+根皮苷组; F: 腹膜透析+根皮素+根皮苷组。箭头长度表示腹膜厚度。标尺=50 μm。

图1 各组大鼠腹膜组织横切面(HE染色)

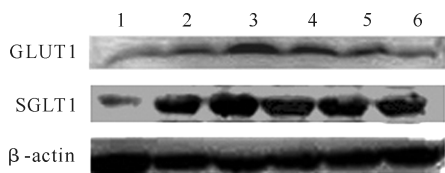
Figure 1 HE staining shows peritoneal thickness of rats in each group



微血管内皮细胞呈棕黄色系 GLUT1、SGLT1、TGF-β1、CTGF 染色。PD组:腹膜透析组; PD+T组:腹膜透析+根皮素组;PD+Z组:腹膜透析+根皮苷组;PD+T+Z组:腹膜透析+根皮素+根皮苷组;GLUT1:葡萄糖转运体1;SGLT1:钠-葡萄糖转运体1;CTGF:结缔组织生长因子。标尺=50 μm。

图2 免疫组织化学法检测各组大鼠网膜组织中 GLUT1、SGLT1、TGF-β1 和 CTGF 蛋白表达

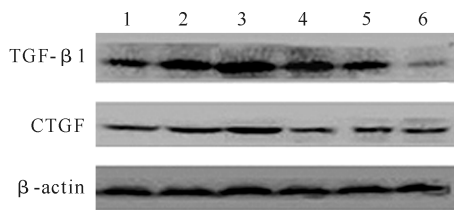
Figure 2 Immunohistochemistry determines the expression of GLUT1, SGLT1, TGF-β1 and CTGF in rats



1:正常对照组;2:手术对照组;3:腹膜透析组;4:腹膜透析+根皮素组;5:腹膜透析+根皮苷组;6:腹膜透析+根皮素+根皮苷组;GLUT1:葡萄糖转运体1;SGLT1:钠-葡萄糖转运体1.

图3 大鼠腹膜 GLUT1 和 SGLT1 蛋白表达的电泳图

Figure 3 Electropherogram for protein expression of peritoneal GLUT1 and SGLT1



1:正常对照组;2:手术对照组;3:腹膜透析组;4:腹膜透析+根皮素组;5:腹膜透析+根皮苷组;6:腹膜透析+根皮素+根皮苷组;CTGF:结缔组织生长因子.

图4 各组大鼠腹膜 TGF-β1 和 CTGF 蛋白表达的电泳图

Figure 4 Electropherogram for protein expression of peritoneal TGF-β1 and CTGF

意义(均 $P > 0.05$);与手术对照组比较,PD 组 GLUT1、SGLT1 mRNA 和蛋白表达水平均升高(均 $P < 0.05$);与 PD 组比较,PD + T 组、PD + Z 组、PD + T + Z 组 GLUT1、SGLT1 mRNA 和蛋白表达水平均降低(均 $P < 0.05$);但 PD + T 组、PD + Z 组、PD + T + Z 三组之间 GLUT1、SGLT1 mRNA 和蛋白表达水平差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表3。提示腹膜透析液能上调大鼠腹膜 GLUT1 和 SGLT1 mRNA 和蛋白的表达。

表3 各组腹膜 GLUT1 和 SGLT1 mRNA 及蛋白表达比较
Table 3 mRNA and protein expressions of peritoneal GLUT1 and SGLT1 in each group

组别	(n=6, $\bar{x} \pm s$)			
	mRNA		蛋白	
	GLUT1	SGLT1	GLUT1	SGLT1
正常对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	0.59 ± 0.13	0.48 ± 0.11
手术对照组	1.61 ± 0.49	1.16 ± 0.57	1.00 ± 0.13	0.45 ± 0.07
PD 组	6.00 ± 0.70*	4.93 ± 0.74*	2.02 ± 0.11*	1.53 ± 0.11*
PD + T 组	2.03 ± 1.00#	1.33 ± 0.18#	1.03 ± 1.00#	0.89 ± 0.12#
PD + Z 组	3.00 ± 0.61#	1.56 ± 0.23#	0.56 ± 0.23#	1.06 ± 0.09#
PD + T + Z 组	1.98 ± 0.48#	1.42 ± 0.56#	0.25 ± 0.07#	0.90 ± 0.14#

PD 组:腹膜透析组;PD + T 组:腹膜透析 + 根皮素组;PD + Z 组:腹膜透析 + 根皮苷组;PD + T + Z 组:腹膜透析 + 根皮素 + 根皮苷组;GLUT1:葡萄糖转运体1;SGLT1:钠-葡萄糖转运体1.与手术对照组比较,* $P < 0.05$;与 PD 组比较,# $P < 0.05$.

2.4 各组大鼠腹膜 TGF-β1 和 CTGF 的 mRNA 及蛋白表达比较

TGF-β1 和 CTGF 的 mRNA 及蛋白在各组均有表达(图2、4)。与正常对照组比较,手术对照组 TGF-β1、CTGF mRNA 和蛋白表达差异无统计学意义(均 $P > 0.05$);与手术对照组比较,PD 组 TGF-β1、CTGF mRNA 及蛋白表达均增多(均 $P <$

0.05);与 PD 组比较,PD + T 组、PD + Z 组、PD + T + Z 组 TGF-β1、CTGF mRNA 及蛋白表达均减少(均 $P < 0.05$);PD + T 组、PD + Z 组、PD + T + Z 组之间 TGF-β1、CTGF mRNA 及蛋白表达差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表4。提示腹膜透析液可上调 TGF-β1 和 CTGF 的表达,而抑制 GLUT1 和 SGLT1 可下调 TGF-β1 和 CTGF 的表达。

表4 各组腹膜 TGF-β1、CTGF mRNA 及蛋白表达比较
Table 4 mRNA and protein expressions of peritoneal TGF-β1 and CTGF in each group

组别	(n=6, $\bar{x} \pm s$)			
	mRNA		蛋白	
	TGF-β1	CTGF	TGF-β1	CTGF
正常对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	0.39 ± 0.01	0.57 ± 0.10
手术对照组	1.54 ± 0.67	1.65 ± 0.29	0.41 ± 0.12	0.46 ± 0.08
PD 组	5.38 ± 0.61*	5.97 ± 0.71*	1.22 ± 0.23*	1.01 ± 0.11*
PD + T 组	2.18 ± 1.36#	1.10 ± 0.80#	0.32 ± 0.10#	0.44 ± 0.09#
PD + Z 组	2.87 ± 1.45#	2.10 ± 0.66#	0.45 ± 0.23#	0.51 ± 0.16#
PD + T + Z 组	2.23 ± 0.72#	2.28 ± 0.52#	0.21 ± 0.09#	0.30 ± 0.08#

PD 组:腹膜透析组;PD + T 组:腹膜透析 + 根皮素组;PD + Z 组:腹膜透析 + 根皮苷组;PD + T + Z 组:腹膜透析 + 根皮素 + 根皮苷组;CTGF:结缔组织生长因子.与手术对照组比较,* $P < 0.05$;与 PD 组比较,# $P < 0.05$.

2.5 大鼠腹膜 GLUT1、SGLT1 表达与 TGF-β1、CTGF 表达的相关性分析

Pearson 相关性分析结果显示:大鼠腹膜中 GLUT1 的 mRNA 及蛋白表达量与 TGF-β1、CTGF 的表达量呈正相关($r = 0.7732、0.8104、0.8193、0.8805$,均 $P < 0.05$);SGLT1 的 mRNA 及蛋白表达量与 TGF-β1、CTGF 的表达量呈正相关($r = 0.7780、0.7893、0.8062、0.8931$,均 $P < 0.05$)。

提示大鼠腹膜 GLUT1、SGLT1 表达与 TGF-β1、CTGF 表达具有相关性。

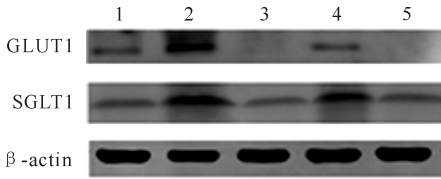
2.6 各组微血管内皮细胞 GLUT1、SGLT1 的 mRNA 及蛋白表达比较

与正常对照组比较, PD 组 GLUT1、SGLT1 mRNA 和蛋白表达增多(均 $P < 0.05$); 与 PD 组比较, PD + Z 组、PD + T 组和 PD + T + Z 组 GLUT1、SGLT1 mRNA 及蛋白表达减少(均 $P < 0.05$); 但 PD + Z 组、PD + T 组和 PD + T + Z 组之间 GLUT1、SGLT1 mRNA 及蛋白表达差异无统计学意义(均 $P > 0.05$), 见图 5、表 5。提示腹膜透析可以上调人腹膜微血管内皮细胞 GLUT1、SGLT1 mRNA 及蛋白的表达。

2.7 各组微血管内皮细胞 TGF-β1、CTGF 的 mRNA 及蛋白表达比较

与正常对照组比较, PD 组 TGF-β1、CTGF

mRNA 和蛋白表达增多(均 $P < 0.05$); 与 PD 组比较, PD + T 组、PD + Z 组和 PD + T + Z 组 TGF-β1、CTGF mRNA 及蛋白表达减少(均 $P < 0.05$); 但 PD + T 组、PD + Z 组和 PD + T + Z 组之间 TGF-β1、CTGF mRNA 及蛋白表达差异无统计学意义(均 $P > 0.05$), 见图 6、表 6。提示腹膜透析液可以上调人腹膜微血管内皮细胞中 TGF-β1、CTGF 的表达, 而抑制 GLUT1、SGLT1 可以下调 TGF-β1、CTGF 的表达。



1: 正常对照组; 2: 腹膜透析组; 3: 腹膜透析 + 根皮素组; 4: 腹膜透析 + 根皮苷组; 5: 腹膜透析 + 根皮素 + 根皮苷组; GLUT1: 葡萄糖转运体 1; SGLT1: 钠-葡萄糖转运体 1。

图 5 人腹膜内皮细胞 GLUT1、SGLT1 蛋白表达电泳图

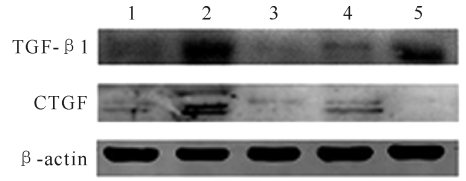
Figure 5 Electropherogram for protein expression of GLUT1 and SGLT1 in HPECs

表 5 各组微血管内皮细胞 GLUT1 和 SGLT1 mRNA 和蛋白表达水平比较

Table 5 mRNA and protein expressions of GLUT1 and SGLT1 in HPECs

组别	mRNA		蛋白	
	GLUT1	SGLT1	GLUT1	SGLT1
正常对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	0.46 ± 0.04	0.73 ± 0.06
PD 组	6.79 ± 1.01*	14.41 ± 0.53*	0.82 ± 0.08*	1.39 ± 0.13*
PD + T 组	1.38 ± 0.21#	1.92 ± 0.28#	0.35 ± 0.03#	0.67 ± 0.05#
PD + Z 组	1.76 ± 0.10#	1.16 ± 0.05#	0.43 ± 0.03#	0.69 ± 0.05#
PD + T + Z 组	1.54 ± 0.09#	0.49 ± 0.00#	0.26 ± 0.02#	0.61 ± 0.04#

PD 组: 腹膜透析组; PD + T 组: 腹膜透析 + 根皮素组; PD + Z 组: 腹膜透析 + 根皮苷组; PD + T + Z 组: 腹膜透析 + 根皮素 + 根皮苷组; GLUT1: 葡萄糖转运体 1; SGLT1: 钠-葡萄糖转运体 1. 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与 PD 组比较, # $P < 0.05$ 。



1: 正常对照组; 2: 腹膜透析 + 腹膜透析组; 3: 腹膜透析 + 根皮素组; 4: 腹膜透析 + 根皮苷组; 5: 腹膜透析 + 根皮素 + 根皮苷组; CTGF: 结缔组织生长因子。

图 6 人腹膜内皮细胞 TGF-β1、CTGF 蛋白表达电泳图

Figure 6 Electropherogram for protein expression of TGF-β1 and CTGF in HPECs

表 6 人腹膜内皮细胞 TGF-β1、CTGF mRNA 及蛋白表达比较

Table 6 mRNA and protein expressions of TGF-β1 and CTGF in HPECs

组别	mRNA		蛋白	
	TGF-β1	CTGF	TGF-β1	CTGF
正常对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	0.68 ± 0.06	0.31 ± 0.03
PD 组	8.77 ± 0.16*	3.66 ± 0.25*	1.12 ± 0.09*	0.70 ± 0.07*
PD + T 组	2.78 ± 0.61#	1.40 ± 0.12#	0.42 ± 0.03#	0.29 ± 0.02#
PD + Z 组	0.06 ± 0.00#	0.41 ± 0.01#	0.39 ± 0.03#	0.40 ± 0.03#
PD + T + Z 组	0.93 ± 0.08#	1.19 ± 0.54#	0.07 ± 0.00#	0.18 ± 0.01#

PD 组: 腹膜透析组; PD + T 组: 腹膜透析 + 根皮素组; PD + Z 组: 腹膜透析 + 根皮苷组; PD + T + Z 组: 腹膜透析 + 根皮素 + 根皮苷组; CTGF: 结缔组织生长因子. 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与 PD 组比较, # $P < 0.05$ 。

2.8 各组微血管内皮细胞 GLUT1、SGLT1 表达与 TGF-β1、CTGF 表达的相关性

Pearson 相关性分析结果显示: 人腹膜微血管内皮细胞中 GLUT1 的 mRNA 及蛋白表达量与 TGF-β1、CTGF 的表达量呈正相关 ($r = 0.8467$ 、 0.8015 、 0.8795 、 0.9513 , 均 $P < 0.05$); SGLT1 的

mRNA 及蛋白表达量与 TGF- β 1、CTGF 的表达量呈正相关($r = 0.9439, 0.8913, 0.6653, 0.7742$, 均 $P < 0.05$)。提示人腹膜微血管内皮细胞 GLUT1、SGLT1 表达与 TGF- β 1、CTGF 表达具有相关性。

3 讨论

GLUT1 是已知的分布最广泛的转运体,在多种哺乳动物的胚胎和成体细胞中都有表达,一般与其它组织特异性表达的葡萄糖转运体亚型一起承担细胞的葡萄糖转运。GLUT1 负责各种组织与血液间葡萄糖的转运。因此 GLUT1 在脑、眼、外周神经组织和胎盘的內皮及上皮样屏障细胞中的表达量较高。在高糖环境下, GLUT1 的数目及活性都会受到影响而发生改变。已有研究显示,高糖环境下视网膜血管内皮细胞的 GLUT1 表达上调^[12]。

SGLT1 是一种高亲和力和低效能的转运蛋白,目前研究显示其主要在空肠黏膜上皮细胞刷状缘表达,在肾脏等组织中也有少量表达。肠道 SGLT1 主要负责膳食葡萄糖的吸收,肾近端小管 S3 节段的 SGLT1 则负责肾小球过滤中剩余葡萄糖的重吸收。有研究显示,糖尿病患者肾脏 SGLT1 表达增加,葡萄糖的吸收随之增加,但是具体的机制还不明确^[13]。

本研究中,我们通过免疫组织化学实验证实了 GLUT1 与 SGLT1 在腹膜中表达。从腹膜平衡实验中观察到,使用 GLUT1 拮抗剂和 SGLT1 拮抗剂后,大鼠的腹膜透析超滤量增加, D1/D0 增加, D-cr/P-cr 减少,提示抑制 GLUT1、SGLT1 的表达可以延缓腹膜对葡萄糖的吸收和小分子物质的转运,进而维持腹膜透析液的渗透压梯度。

本研究发现,应用高糖透析液后大鼠腹膜 GLUT1、SGLT1 的表达增加,使用两种拮抗剂后其表达下降。进一步在体外实验中发现,人腹膜血管内皮细胞在 2.5% 腹膜透析液的作用下, GLUT1、SGLT1 的表达增加,而在使用葡萄糖转运体拮抗剂后,其表达减少,可能由于高糖腹膜透析液刺激了 GLUT1、SGLT1 的过度表达,进而使人腹膜微血管内皮细胞葡萄糖摄入量增加而致。而葡萄糖转运体拮抗剂可以阻断高糖进入细胞内^[14-15],减少腹膜内皮细胞的细胞外基质产物的合成和积聚,从而延缓腹膜纤维化进程。

TGF- β 1 是多种组织器官重要的促纤维化因

子,它可以增加腹膜细胞外基质的合成,减少细胞外基质的降解,并对单核/巨噬细胞具有趋化作用。大量研究发现, TGF- β 1 在各种组织器官纤维化形成中主要通过其信号蛋白 Smad2/3 的活化发挥作用^[16]。近年来,有研究证实 TGF- β 1 在腹膜纤维化过程中也具有重要作用^[17-18]。在腹膜炎模型大鼠腹腔局部不仅有大量炎症细胞浸润并高表达 TGF- β 1,腹膜间皮细胞也高表达 TGF- β 1^[19-20],提示抑制 TGF- β 1 及受体调控信号蛋白的活性,可能为防治腹膜纤维化提供新的靶点。本研究体内实验发现,抑制 GLUT1、SGLT1 表达可以下调以上两个纤维化因子的表达,说明高糖腹膜透析液会增加腹膜上葡萄糖转运蛋白的表达,进一步导致腹膜纤维化。体外实验进一步发现,2.5% 腹膜透析液环境下,腹膜微血管内皮细胞 TGF- β 1、CTGF 呈高表达,说明腹膜微血管内皮细胞参与了腹膜纤维化的发生和发展。在使用葡萄糖转运体拮抗剂后,人腹膜血管内皮细胞 TGF- β 1、CTGF 的表达量下降,并且 GLUT1、SGLT1 与 TGF- β 1、CTGF 具有明显的相关性。由此我们推测,下调 GLUT1、SGLT1 的表达,可以抑制腹膜对葡萄糖的吸收,减轻腹膜的慢性炎症,延缓腹膜纤维化进程,其机制可能是通过调控 TGF- β 1、CTGF 的表达来实现的。

综上所述,腹膜透析液可以上调腹膜 GLUT1、SGLT1、TGF- β 1 和 CTGF 的表达,通过下调 GLUT1 和 SGLT1 的表达可以改善腹膜功能,增加超滤量,延缓腹膜纤维化进程。本研究结果为尿毒症腹膜透析患者腹膜纤维化的防治提供了新的靶点。

参考文献

- [1] PENG Y M, SHU Z J, XIAO L, et al. A new non-uremic rat model of long-term peritoneal dialysis[J]. *Physiol Res*, 2011, 60(1):157-164.
- [2] XIN X, LI X H, WU J Z, et al. Pentamethylquercetin ameliorates fibrosis in diabetic Goto-Kakizaki rat kidneys and mesangial cells with suppression of TGF- β /Smads signaling[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 713(1-3):6-15.
- [3] WU N, ZHENG B, SHAYWITZ A, et al. AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1[J]. *Mol Cell*, 2013, 49(6):1167-1175.
- [4] ALLEN A, MESSIER C. Plastic changes in the

- astrocyte GLUT1 glucose transporter and beta-tubulin microtubule protein following voluntary exercise in mice[J]. **Behav Brain Res**, 2013, 240:95-102.
- [5] ZHAO F Q, KEATING A F. Functional properties and genomics of glucose transporters [J]. **Curr Genomics**, 2007, 8(2):113-128.
- [6] FISCHBARG J, VERA J C. Multifunctional transporter models: lessons from the transport of water, sugars, and ring compounds by GLUTs [J]. **Am J Physiol**, 1995, 268(5 Pt 1):C1077-C1089.
- [7] NISHIZAKI T, MATSUOKA T. Low glucose enhances Na⁺/glucose transport in bovine brain artery endothelial cells [J]. **Stroke**, 1998, 29(4):844-849.
- [8] MANN G E, YUDILEVICH D L, SOBREVIA L. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells [J]. **Physiol Rev**, 2003, 83(1):183-252.
- [9] ONISHI A, MORISHITA Y, MUTO S, et al. The mechanism of peritoneal fibrosis in peritoneal dialysis [J]. **J Nephrol Therapeutic**, 2011, S3:002.
- [10] RIEG T, MASUDA T, GERASIMOVA M, et al. Increase in SGLT1-mediated transport explains renal glucose reabsorption during genetic and pharmacological SGLT2 inhibition in euglycemia[J]. **Am J Physiol Renal Physiol**, 2014, 306(2):F188-F193.
- [11] 聂振禹,陈争跃,包蓓艳,等.一种改良的尿毒症腹膜透析大鼠模型[J]. **中国病理生理杂志**, 2013, 29(11):2109-2112.
NIE Zhenyu, CHEN Zhenyue, BAO Beiyuan, et al. An improved uremic rat model of peritoneal dialysis [J]. **Chinese Journal of Pathophysiology**, 2013, 29(11):2109-2112. (in Chinese)
- [12] SANCHEZ R A, SANABRIA H, DE LOS SANTOS C, et al. Incretins and selective renal sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors in hypertension and coronary heart disease [J]. **World J Diabetes**, 2015, 6(11):1186-1197.
- [13] 尚海峰,刘学政,李 轶,等.葡萄糖转运蛋白-1在不同血糖浓度糖尿病大鼠视网膜血管内皮细胞中的表达[J]. **华北煤炭医学院学报**, 2007, 9(6):763-765.
SHANG Haifeng, LIU Xuezheng, LI Yi, et al. Expression of glucose transporter 1 protein in retinal vascular endothelial cells of diabetic rats with different blood glucose concentration [J]. **Journal of North China Coal Medical College**, 2007, 9(6):763-765. (in Chinese)
- [14] SABINO-SILVA R, FREITAS H S, LAMERS M L, et al. Na⁺-glucose cotransporter SGLT1 protein in salivary glands: potential involvement in the diabetes-induced decrease in salivary flow [J]. **J Membr Biol**, 2009, 228(2):63-69.
- [15] KAWANISHI K, HONDA K, TSUKADA M, et al. Neutral solution low in glucose degradation products is associated with less peritoneal fibrosis and vascular sclerosis in patients receiving peritoneal dialysis [J]. **Perit Dial Int**, 2013, 33(3):242-251.
- [16] KIHM L P, MÜLLER-KREBS S, KLEIN J, et al. Benfotiamine protects against peritoneal and kidney damage in peritoneal dialysis [J]. **J Am Soc Nephrol**, 2011, 22(5):914-926.
- [17] WANG X, NIE J, JIA Z, et al. Impaired TGF-beta signalling enhances peritoneal inflammation induced by *E. coli* in rats [J]. **Nephrol Dial Transplant**, 2010, 25(2):399-412.
- [18] 孙 晶,张 虹,于克洲,等.肾素血管紧张素系统抑制剂对长期腹膜透析患者腹膜纤维化和残余肾功能的作用[J]. **中国血液净化**, 2010, 9(3):152-155.
SUN Jing, ZHANG Hong, YU Kezhou, et al. Effect of rennin-angiotensin system (RAS) inhibitors on peritoneal fibrosis and residual renal function in peritoneal dialysis patients [J]. **Chinese Journal of Blood Purification**, 2010, 9(3):152-155. (in Chinese)
- [19] XIN X, LI X H, WU J Z, et al. Pentamethylquercetin ameliorates fibrosis in diabetic Goto-Kakizaki rat kidneys and mesangial cells with suppression of TGF-β/Smads signaling [J]. **Eur J Pharmacol**, 2013, 713(1-3):6-15.
- [20] NISHIOKA Y, MIYAZAKI M, ABE K, et al. Regeneration of peritoneal mesothelium in a rat model of peritoneal fibrosis [J]. **Ren Fail**, 2008, 30(1):97-105.