

Cybulski 等^[11]和 Bock 等^[12]研究发现 CHK2 基因突变与肿瘤的大小及淋巴结转移数目没有相关性,但 CHK2 基因突变的乳腺癌患者雌、孕激素受体阳性率高,雌激素阳性风险是无突变者的 4 倍。Schmidt 等^[13]的研究发现 CHK2 基因突变与肿瘤的病理类型无关。有研究认为 CHK2 基因突变会导致 CHK2 激酶的丧失^[14]。目前尚没有关于 CHK2 蛋白表达与乳腺癌临床病理学特征的相关性的报道,本研究将 CHK2、pCHK2 蛋白表达阳性率与肿瘤的病理类型、大小、淋巴结转移数目、TNM 分期、ER、PR、Her-2 等临床病理特征的相关性进行统计学分析,差异没有统计学意义($P>0.05$)。马全富等^[15]对子宫内膜癌的研究也没有检测到 CHK2 蛋白表达与肿瘤临床病理特征的关系。

综上所述,DNA 损伤修复通路与细胞的凋亡、癌变有着密切的关系,CHK2 蛋白作为细胞周期的重要检测点机制,其基因突变、缺陷或过表达都可能导致 DNA 损伤无法修复或细胞的恶性增殖。进一步的深入探讨 CHK2 的生物学功能及 DNA 损伤修复通路在乳腺癌发生、发展中的作用,将为乳腺癌新的临床治疗策略提供一定的理论基础。

参考文献

- 1 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. CA Cancer J Clin,2013,63(1): 11-30
- 2 Stolz A, Ertych N, Bastians H. Tumor suppressor CHK2: regulator of DNA damage response and mediator of chromosomal stability[J]. Clin Cancer Res,2011,17(3): 401-405
- 3 Narod SA, Lynch HT. CHEK2 mutation and hereditary breast cancer[J]. J Clin Oncol,2007,25(1): 6-7
- 4 Hollestelle A, Wasielewski M, Martens JW, et al. Discovering moderate-risk breast cancer susceptibility genes[J]. Curr Opin Genet Dev,2010,20(3): 268-276
- 5 Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ. Linkage of ATM to cell cycle reg-

- ulation by the Chk2 protein kinase[J]. Science,1998,282(5395): 1893-1897
- 6 Carlessi L, Buscemi G, Fontanella E, et al. A protein phosphatase feedback mechanism regulates the basal phosphorylation of Chk2 kinase in the absence of DNA damage[J]. Biochim Biophys Acta, 2010,1803(10): 1213-1223
- 7 Oka K, Tanaka T, Enoki T, et al. DNA damage signaling is activated during cancer progression in human colorectal carcinoma[J]. Cancer Biol Ther, 2010,9(3): 246-252
- 8 Yoon AJ, Shen J, Santella RM, et al. Activated checkpoint kinase 2 expression and risk for oral squamous cell carcinoma[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,2007,16(12): 2768-2772
- 9 裴小娟,杨清绪,刘少杰,等.细胞周期调节因子 ATM、Chk2 和 p53 在乳腺浸润性导管癌中的表达及其临床病理意义[J].中华病理学杂志,2012,41(7): 479-480
- 10 Bartkova J, Guldberg P, Gronbaek K, et al. Aberrations of the Chk2 tumour suppressor in advanced urinary bladder cancer[J]. Oncogene, 2004,23(52): 8545-8551
- 11 Cybulski C, Gorski B, Huzarski T, et al. CHEK2-positive breast cancers in young Polish women[J]. Clin Cancer Res,2006,12(16): 4832-4835
- 12 De Bock GH, Schutte M, Krol-Warmerdam EM, et al. Tumour characteristics and prognosis of breast cancer patients carrying the germline CHEK2 *1100delC variant[J]. J Med Genet, 2004,41(10): 731-735
- 13 Schmidt MK, Tollenaar RA, de Kemp SR, et al. Breast cancer survival and tumor characteristics in premenopausal women carrying the CHEK2 *1100delC germline mutation[J]. J Clin Oncol,2007,25(1): 64-69
- 14 Guo X, Ward MD, Tiedebohl JB, et al. Interdependent phosphorylation within the kinase domain T-loop regulates CHK2 activity[J]. J Biol Chem,2010,285(43): 33348-33357
- 15 马全富,黄晓园,高庆蕾,等. Chk1/2 和 Plk1 蛋白在子宫内膜癌中的表达[J]. 肿瘤防治研究, 2008,35(6): 424-426

(收稿日期:2013-03-28)

(修回日期:2013-06-13)

白藜芦醇对腹膜透析液作用下人腹膜间皮细胞线粒体活性氧产生的影响

伍 军 何 敏 邓行江 何文飞 程 兵

摘 要 目的 白藜芦醇对腹膜透析液作用下人腹膜间皮细胞线粒体活性氧产生的影响。**方法** 体外培养人腹膜间皮细

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81200555);广东省自然科学基金资助项目(S2011040002796);广东省中医药局建设中医药强省科研课题(20122042)

作者单位:512026 韶关,汕头大学医学院附属粤北医院肾内科

通讯作者:伍军,副主任医师,电子信箱:doctorwujun@163.com

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。实验分组: 阴性对照组 (培养基)、阳性对照组 (加入 Rotenone, 细胞线粒体呼吸链酶复合体 I 抑制剂)、实验组 (1.5% 葡萄糖腹膜透析液)、干预组 (白藜芦醇 + 1.5% 葡萄糖腹膜透析液)。流式细胞仪检测总线粒体、呼吸性线粒体、产活性氧线粒体。**结果** 与阴性对照组比较, 实验组总线粒体、产活性氧线粒体增加, 差异具有统计学意义。与实验组比较, 干预组总线粒体、产活性氧线粒体减少, 差异具有统计学意义。**结论** 白藜芦醇可降低含葡萄糖腹膜透析液作用人腹膜间皮细胞后活性氧的产生。

关键词 白藜芦醇 人腹膜间皮细胞 活性氧

Effect of Resveratrol of Reactive Oxygen Species in Human Peritoneal Mesothelial Cells Exposed to Glucose - based Peritoneal Dialysis. Wu

Jun, He Min, Deng Xingjiang, He Wenfei, Cheng Bing. Department of Nephrology, The Affiliated Yuebei Hospital of Shantou University Medical College, Guangdong 512026, China

Abstract Objective To explore the effect of resveratrol of reactive oxygen species in human peritoneal mesothelial cells exposed to glucose - based peritoneal dialysis. **Methods** Cells (SV40 immortalized human peritoneal mesothelial cell line) were grown in type I collagen - coated dishes in DMEM/F12 containing 10% FCS. All experiments on immortalized mesothelial cells were performed from passages 5 to 10. Cell viability was assessed using MTT. Cells were divided into 4 groups: negative control (medium), positive control (Rotenone), 1.5% glucose - based peritoneal dialysis, resveratrol plus 1.5% glucose - based peritoneal dialysis. Flow cytometric was used to analyze the Mitotracker deep red, Mitotracker green and MitoSOX. **Results** Compared to the negative control, Mitotracker green and MitoSOX were significantly increased in the cells exposed to 1.5% glucose - based peritoneal dialysis. In addition, Mitotracker green and MitoSOX were significantly decreased in the cells exposed to resveratrol plus 1.5% glucose - based peritoneal dialysis compared to the cells exposed to 1.5% glucose - based peritoneal dialysis only. **Conclusion** Resveratrol can reduce the reactive oxygen species in human peritoneal mesothelial cells exposed to glucose - based peritoneal dialysis.

Key words Resveratrol; Human peritoneal mesothelial cells; Reactive oxygen species

腹膜透析因其具有良好的残肾保护及早期生存率优势而成为终末期肾病患者的重要替代治疗方法, 其使用人群在发展中国家特别是在中国迅速增长^[1,2]。尽管新型腹膜透析液不断涌现, 但是基于葡萄糖的传统透析液仍然是绝大多数腹透患者的首选。含糖腹透液长期作用下, 腹膜间皮细胞可产生活性氧 (ROS)、分泌炎症因子, 从而启动新生血管形成及腹膜组织纤维化, 最终导致超滤衰竭, 患者不得不放弃腹膜透析^[3,4]。因此, 减少腹膜间皮细胞活性氧及炎症因子分泌有助于延缓新生血管形成以及最终腹膜纤维化的到来。

线粒体是真核动物细胞进行生物氧化和能量转换的主要场所, 细胞生命活动所需能量的 80% 是由线粒体提供的, 虽然线粒体的氧化磷酸化是一个比糖酵解更为高效的产能过程, 但这个过程会伴随着大量 ROS 的产生, 线粒体是细胞内 ROS 的主要来源。过量的 ROS 会引起细胞损伤, 释放促炎症、凋亡因子, 引起细胞功能障碍。大量研究证据表明, 白藜芦醇是一种存在于葡萄和红酒中的多酚类化合物在机体对抗神经退行性变、心血管疾病、癌症、糖尿病及肥胖相关性疾病等方面具有重要作用^[5,6]。白藜芦醇之所以具有广泛的生物学效应部分与其抗氧化功能: 包括提高过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、醌氧化还原酶活

性有关, 更为重要的是, 白藜芦醇可通过激活特异的细胞内信号转导系统发挥保护细胞及防御功能。磷酸腺苷 (AMP) 激活的蛋白激酶 (AMPK) 是一种在细胞内行使能量代谢调节的蛋白激酶, 在维持细胞能量供求平衡方面起到关键作用, 当细胞应对各种病理应激时 (氧化应激、内质网应激、缺氧、渗透性应激), AMPK 激活, 细胞活力增强、应对各种病理应激能力增强。本研究拟初步探讨白藜芦醇对腹膜透析液作用下人腹膜间皮细胞线粒体活性氧产生的影响。

对象与方法

1. 材料、试剂、仪器: (1) 研究对象: 人腹膜间皮细胞株 (HMrSV5) 购自 ATCC。(2) 主要试剂: DMEM/F12 干粉培养基购自 Gibco 公司; 不同浓度葡萄糖腹透液 (1.5% Dextrose, 2.5% Dextrose, 4.25% Dextrose) 购自广州百特医疗用品有限公司; Rotenone (细胞线粒体呼吸链酶复合体 I 抑制剂)、白藜芦醇购自 Sigma 公司; 线粒体特异标志物 Mitotracker deep red (代表呼吸性线粒体)、Mitotracker green (代表总线粒体)、MitoSOX (代表产活性氧线粒体) 购自 Invitrogen 公司。(3) 主要仪器: 细胞培养箱 (Forma Scientific, 美国), 光学显微镜 (CH20BIMF200, Olympus, 日本), 连续光谱光密度读板仪 (Molecular Devices Spectramax plus 384, 美国), 流式细胞仪 FACS (Beckman Coulter, 美国)。

2. 实验方法: (1) 不同浓度葡萄糖腹膜透析液对 HMrSV5 细胞活力的影响: 按照笔者以前报道的方法^[7]进行 HMrSV5

细胞株的体外培养、传代,将细胞按 1×10^4 个/毫升($200\mu\text{l}$)接种于 96 孔培养板,同步化培养 24h。按上述分组方法加入不同浓度葡萄糖腹透液分别作用细胞 24、48、72h,无细胞接种孔为空白对照,培养基作用组为阴性对照^[7]。作用时间结束,加入 $20\mu\text{l}$ MTT(5mg/ml)于 37°C , 5% CO_2 培养 4h,吸弃培养孔液体,加入 DMSO(二甲基亚砜 $150 \sim 200\mu\text{l}$)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 490nm 处测量各孔的吸光值,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) $\times 100\%$ 。(2)白藜芦醇对腹膜透析液作用下 HMrSV5 细胞线粒体活性氧产生的影响:根据上述细胞活力实验结果,选择 1.5% 腹膜透析液作用细胞 24h。根据预实验结果,选择白藜芦醇作用浓度为 $50\mu\text{mol/L}$ 。实验分为 4 组:阴性对照组(培养基组)、阳性对照组(加入 Rotenone)、实验组(1.5% 腹透液)、干预组(白藜芦醇 + 1.5% 腹透液)。作用时间结束后,分别加入呼吸性线粒体(Mitotracker deep red) (50nmol/L)、总线粒体(Mitotracker green) (50nmol/L)、多活性氧线粒体(MitoSOX) ($2.5\mu\text{mol/L}$) 标记 30min, PBS 缓冲液清洗细胞,重新悬浮细胞后 FACS 上机分析。

3. 统计学方法:全部数据采用 SPSS 15.0 统计软件分析。计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,根据方差齐性检验结果,组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同浓度葡萄糖腹透液对人腹膜间皮细胞活力的影响:24h 时 1.5% 、 2.5% 、 4.25% 组细胞存活率分别为 $98.4\% \pm 3.9\%$ 、 $99.4\% \pm 7.3\%$ 、 $72.0\% \pm 16.2\%$,与对照组比较, 4.25% 组细胞存活率下降($P < 0.01$)。48h 时 1.5% 、 2.5% 、 4.25% 组细胞存活率分别为 $94.4\% \pm 11.4\%$ 、 $92.7\% \pm 9.2\%$ 、 $71.2\% \pm 7.0\%$,与对照组比较, 4.25% 组细胞存活率下降($P < 0.01$)。72h 时 1.5% 、 2.5% 、 4.25% 组细胞存活率分别为 $73.4\% \pm 3.9\%$ 、 $79.3\% \pm 9.4\%$ 、 $60.5\% \pm 5.4\%$,与对照组比较 1.5% 、 2.5% 、 4.25% 组细胞存活率均下降,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 1)。

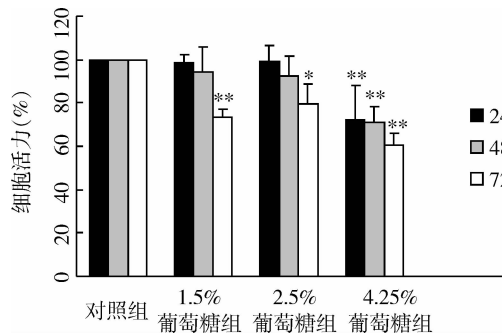


图 1 不同浓度葡萄糖腹透液对腹膜间皮细胞活力的影响
与对照组同时点比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2. 白藜芦醇对含糖腹透液作用 HMrSV5 细胞线粒体活性氧产生的影响:流式细胞仪分析结果显示, 1.5% 腹透液作用 HMrSV5 细胞,与阴性对照比较,总线粒体、产活性氧线粒体增加,差异具有统计学意义。提前加入白藜芦醇作用后, 1.5% 腹透液作用 HMrSV5 细胞后总线粒体、产活性氧线粒体减少,差异有统计学意义,详见图 2、图 3。阳性对照组表示加入细胞线粒体呼吸链酶复合体 I 抑制剂,总线粒体、产活性氧线粒体明显增加(与阴性对照组比较)。

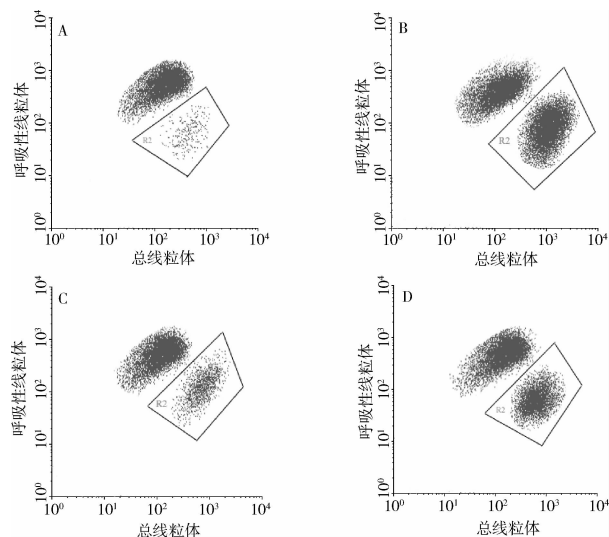


图 2 白藜芦醇对含糖腹透液作用 HMrSV5 细胞
总线粒体、呼吸性线粒体的影响

A. 阴性对照组; B. 阳性对照组; C. 干预组; D. 实验组

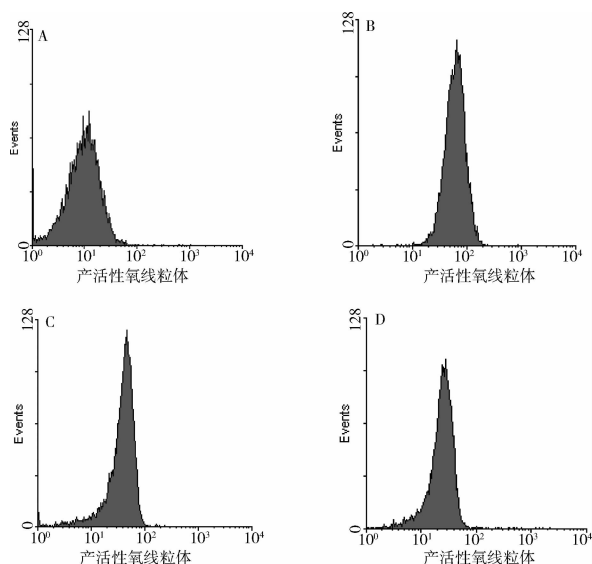


图 3 白藜芦醇对含糖腹透液作用 HMrSV5 细胞
产活性氧线粒体的影响

A. 阴性对照组; B. 阳性对照组; C. 干预组; D. 实验组

讨 论

持续不卧床腹膜透析(CAPD)是目前治疗终末期肾病(ESRD)的主要替代治疗方法之一,腹膜透析患者5年生存率与血液透析相似,而10年生存率却明显低于血液透析患者^[8]。基于葡萄糖的传统透析液仍然是绝大多数腹透患者的首选,尤其在发展中国家。研究证实,长期应用含葡萄糖腹膜透析液的患者普遍存在氧化应激状态,通过多种途径产生活性氧(ROS),ROS除了能直接发挥细胞毒性作用外,还能通过影响细胞内信号转导系统调控某些基因的表达,作为信号传递分子,ROS在腹膜透析腹腔局部炎症、免疫作用备受关注^[9~12]。

与现有其他研究^[11~14]比较,本研究再次证实,含葡萄糖腹膜透析液作用人腹膜间皮细胞可诱导ROS的生成。与以往的研究不同的是,本研究借助线粒体标记技术,利用流式细胞仪直接分析线粒体活性氧的产生,研究结果表明,含葡萄糖腹膜透析液作用人腹膜间皮细胞后总线粒体、产活性氧线粒体均表达增加。Carrión等^[11]研究发现,降脂药阿托伐他汀可降低高糖对大鼠腹膜间皮细胞活性氧的产生以及caspase-3、p38 MAPK活性。Zhang等^[12]研究发现,丹参素(一种酚性芳香酸类化合物)可降低高糖对人腹膜间皮细胞活性氧的产生以及纤维连接蛋白1、I型胶原蛋白、内皮素1、血红素加氧酶1的表达。Zhang等^[12]还选择锌元素进行研究,发现其同样可降低高糖对人腹膜间皮细胞活性氧的产生,其机制可能通过激活PI₃K/AKT、MAPK/ERK信号通路。

本研究选择白藜芦醇,一种近年来被学者们广泛研究的多酚类化合物,初步证实其可减少含葡萄糖腹膜透析液作用下人腹膜间皮细胞后总线粒体、产活性氧线粒体的产生。我们推测可能与白藜芦醇激活AMPK信号通路、诱导细胞自噬,减少ROS的产生有关,进一步机制研究正在进行中。

参考文献

- 1 Li PK, Chow KM. Peritoneal dialysis – first policy made successful; perspectives and actions[J]. Am J Kidney Dis, 2013, [Epub ahead of print]

- 2 伍军,阳晓,余学清. 腹膜透析与血液透析:哪种透析治疗方式具有更好的生存率? [J]. 中华肾脏病杂志, 2008, 24(12):931 – 933
- 3 Kim YL. Update on mechanisms of ultrafiltration failure[J]. Perit Dial Int, 2009, 29(Suppl 2):S123 – 127
- 4 Yung S, Chan TM. Intrinsic cells; mesothelial cells – central players in regulating inflammation and resolution[J]. Perit Dial Int, 2009, 29(Suppl 2):S21 – 27
- 5 Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence[J]. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5(6):493 – 506
- 6 Nakata R, Takahashi S, Inoue H. Recent advances in the study on resveratrol[J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(3):273 – 279
- 7 Wu J, Yang X, Zhang YF, et al. Glucose – based peritoneal dialysis fluids downregulates TLR and triggers hyporesponsiveness to pathogen – associated molecular patterns in human peritoneal mesothelial cells [J]. Clin Vaccine Immunol, 2010, 17(5):757 – 763
- 8 Collins AJ, Foley RN, Chavers B, et al. United States Renal Data System 2011 Annual Data Report: Atlas of chronic kidney disease & end – stage renal disease in the United States[J]. Am J Kidney Dis, 2012, 59(Suppl 1):A7, e1 – 420
- 9 Huh JY, Seo EY, Lee HB, et al. Glucose – based peritoneal dialysis solution suppresses adiponectin synthesis through oxidative stress in an experimental model of peritoneal dialysis[J]. Perit Dial Int, 2012, 32(1):20 – 28
- 10 Zhu X, Ling G, Xiao L, et al. Role of mitochondrial respiratory chain complex III in high glucose peritoneal dialysate – induced hyperpermeability of HPMCs[J]. Ren Fail, 2010, 32(9):1103 – 1108
- 11 Carrión B, Pérez – Martínez FC, Monteagudo S, et al. Atorvastatin reduces high glucose toxicity in rat peritoneal mesothelial cells[J]. Perit Dial Int, 2011, 31(3):325 – 331
- 12 Zhang H, Wang JW, Xu Y, et al. Effect of β – (3,4 – dihydroxyphenyl)lactic acid on oxidative stress stimulated by high glucose levels in human peritoneal mesothelial cells[J]. J Int Med Res, 2012, 40(3):943 – 953
- 13 Zhang X, Liang D, Guo B, et al. Zinc inhibits high glucose – induced apoptosis in peritoneal mesothelial cells[J]. Biol Trace Elem Res, 2012, 150(1 – 3):424 – 432
- 14 Zhang X, Wang J, Fan Y, et al. Zinc supplementation attenuates high glucose – induced epithelial – to – mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells[J]. Biol Trace Elem Res, 2012, 150(1 – 3):229 – 235

(收稿日期:2013 – 06 – 16)

(修回日期:2013 – 06 – 28)

欢迎订阅

欢迎赐稿