

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

國科會專題研究計畫成果報告撰寫格式說明

Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC89-2314-B-002-518

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：嚴崇仁 臺灣大學醫學院內科

共同主持人：蔡敦仁 臺灣大學醫學院內科

一、中文摘要

腹膜纖維化是接受連續性可攜式腹膜透析(簡稱 CAPD)的尿毒病人最嚴重的併發症之一。腹膜纖維化的特徵是：腹膜表面細胞增生伴隨細胞外間質蛋白，特別是膠原蛋白的累積。在 CAPD 時，腹膜持續地暴露在非常高濃度的葡萄糖中，此種狀態可能會導致膠原蛋白堆積甚至造成腹膜纖維化。

本實驗室過去曾發現許多臨床使用藥物會影響人類腹膜表面細胞(簡稱 HPMC)的行為。為了評估這些藥物是否有預防腹膜纖維化之能力，在本計畫中，吾人篩檢數種藥物是否會在高葡萄糖狀況下影響 HPMC 之膠原蛋白基因表現與蛋白合成。細胞增生之測量採 methyltetrazolium 試驗法評估，膠原蛋白之基因表現利用膠原蛋白 $\alpha 1(I)$ 與 (III) 之探針進行 northern blot 來分析，膠原蛋白合成則採 H^3 -proline incorporation assay 來測定。在高葡萄糖狀態下，pentoxifylline、dipyridamole 與 diltiazem 可抑制 HPMC 增生也可抑減少膠原蛋白基因之表現。這些藥物可能具有預防或延緩 CAPD 病人發生腹膜纖維化的潛力，其確切之作用機轉有待未來進一步之研究。

關鍵詞：人類腹膜表面細胞，腹膜纖維化，腹膜透析

Abstract

Peritoneal fibrosis is one of the most serious complications for uremic patients treated with continuous peritoneal dialysis (CAPD). Peritoneal mesothelial cell proliferation with extracellular matrix (mainly collagen) accumulation is a hallmark of peritoneal fibrosis. During CAPD, the peritoneum is continuously exposed to a dialysate with very high concentration of glucose, which may lead to accumulation of collagen and contribute to peritoneal fibrosis.

Our laboratory has shown that several clinically available drugs can modulate the behavior of human peritoneal mesothelial cells (HPMCs). To assess whether these agents may be of use in the prevention of peritoneal fibrosis, we investigated the effects of various drugs on collagen gene expression and protein synthesis of HPMC in high glucose state. Cell proliferation was measured by methyltetrazolium assay. Expression of collagen $\alpha 1(I)$ and (III) mRNAs was determined by northern blotting. Collagen synthesis was assessed by H^3 -proline incorporation assay. Pentoxifylline, dipyridamole, and diltiazem were found to be able to inhibit HPMC proliferation and decrease collagen gene expression in high glucose state. These agents may possess a potential to prevent or retard the progression of peritoneal fibrosis in CAPD patients. Their mechanism of

actions deserved further in-depth studies.

Keywords: Human Peritoneal Mesothelial Cell, Peritoneal Fibrosis, Peritoneal dialysis

二、緣由與目的

連續可攜式腹膜透析是國內尿毒病患常用的一種透析方式，腹膜纖維化(peritoneal fibrosis)是這種治療最嚴重的併發症之一。最近研究發現腹膜表面細胞增生以及細胞外間質蛋白，尤其是膠原蛋白的增加，可能會造成腹膜纖維化[1]。腹膜纖維化會使腹膜喪失透析的功能，如何預防腹膜纖維化便成為腹膜透析的重要研究課題。在腹膜透析時，人類腹膜表面細胞(human peritoneal mesothelial cell, 簡稱 HPMC)必須長期浸泡在含有高葡萄糖的透析液中，高葡萄糖是否會影響 HPMC 的行為，特別是膠原蛋白的產量便值得深究。以往研究顯示高葡萄糖在許多細胞(例如：腎臟細胞、腎小管細胞、內皮細胞、纖維母細胞等)皆會促進膠原蛋白的合成或減緩膠原蛋白的分解[2~5]，最後造成細胞外膠原蛋白的累積。TGF- β 在此過程中扮演了關鍵性的角色[6]，抗 TGF- β 抗體可減輕高葡萄糖誘發的間質蛋白增生[7]；此外，第二型血管張力素與前列腺素也可能有部分角色[3,8]。在 HPMC，這方面的研究仍相當有限。有一研究發現高葡萄糖溶液或病人用過的透析液會刺激 HPMC 分泌 TGF- β 1[9]；另一臨床研究也顯示：在時常發生腹膜炎的腹膜透析病人若有持續性 TGF- β 1 基因表現可能容易發生腹膜纖維化[10]，由此可見高葡萄糖對 HPMC 的影響不容輕忽。臨床上，腹膜透析病人常為了治療需要使用許多藥物，本實驗室以往發現許多藥物可能會影響 HPMC 的行為[11-14]，倘若某些藥物與高葡萄糖狀態對膠原蛋白的生成有加成作用，便容易使腹膜纖維化加速進行；反之，若藥物可抑制高葡萄糖誘發之膠原蛋白增生，就可能有保護腹膜的功效。所以本計畫擬篩檢數種藥物是否影響高葡萄糖狀態下 HPMC 分泌膠原蛋白之能力。初步篩檢若發現一些可抑

制膠原蛋白生成之藥物，未來可進一步深入探討其作用機轉。不同作用機轉之藥物未來或可像愛滋病之雞尾酒療法一樣，產生加成作用，更有效防止腹膜纖維化的進行。

三、研究方法

(一)人類腹膜表面細胞培養：

HPMC 從開刀病人的大網膜以 Trypsin 切取，並利用免疫螢光染色鑑定證實之。此技術本實驗室已成熟並有論文發表[11-14]。

(二)篩檢藥物：

包括一些抗血小板藥物、乙型阻斷劑與鈣離子阻斷劑，像 pentoxifylline、dipyridamole、propranolol、atenolol、nifedipine、verapamil 與 diltiazem 等。

(三)細胞增生測量：

使用 MTT 測量法[19]，此法利用活細胞之粒腺體能將 MTT 代謝成藍色的 formazan。本實驗室過去發現每 well HPMC 數目在 4,000-128,000 之間時，細胞數目與 OD 成一線性關係 ($n=5 \times 5$, $r=0.99$)[14]。

(四)膠原蛋白合成：

膠原蛋白之合成以 [3 H] proline incorporation 之方法行之[20]，詳細步驟過去本實驗室已發表[13]。

(五)膠原蛋白基因表現：

利用 northern blot analysis，利用非放射線的方法以 collagen α 1(I) and (III) 兩種 probes 來 hybridization。詳細方法本實驗室已發表[13]。

四、結果與討論

在高葡萄糖狀態下 pentoxifylline (0.03-0.3mg/ml)、dipyridamole(1.5-15 μ g/ml) 與 diltiazem(50-200 μ g/ml) 可抑制 HPMC 膠原蛋白基因之表現，抑制程度強弱依不同人之細胞而有差異，至於其他藥物之效果則較不顯著。吾人也用 MTT 與 LDH 之方

法來評估細胞增生與細胞膜完整性，以了解抑制膠原蛋白基因表現之藥物劑量是否對細胞造成毒性或殺死細胞。結果顯示這些藥物會抑制細胞生長速度但不會造成細胞毒性。

五、計劃成果自評

本實驗篩檢某些 CAPD 病人常用之藥物，初步發現某些藥物可於高糖狀況下抑制膠原蛋白基因之表現與蛋白合成，這些藥物可能具有預防或延緩 CAPD 病人發生腹膜纖維化的潛力，但這些藥物之作用機轉仍有待未來進一步之研究，以確定其作用是否基於相同或不同之機轉，另一方面也使論文較為一流國際雜誌所接受。此外，本實驗僅於細胞培養模式中進行，相同的結果是否能見於生物體內也有待動物實驗之印證。

六、參考文獻

- [1] Dobbie JW. Pathogenesis of peritoneal fibrosing syndrome (sclerosing peritonitis) in peritoneal fibrosis. *Perit Dial Int* 1992; 12:14-27.
- [2] Jones SC, Saunders HJ, Qi W, Pollock CA. Intermittent high glucose enhances cell growth and collagen synthesis in cultured human tubulointerstitial cells. *Diabetologia* 1999; 42: 1113-1119.
- [3] Sigh R, Alavi N, Singh AK, Leehey DJ. Role of angiotensin II in glucose-induced inhibition of mesangial matrix degradation. *Diabetes* 1999; 48:2066-2073.
- [4] Benazzoug Y, Borchiellini C, Labat-Robert J, Robert L, Kern P. Effect of high-glucose concentrations on the expression of collagens and fibronectin by fibroblasts in culture. *Exp Gerontol* 1998; 33:445-455.
- [5] Bakillah A, Grigorova-Borsos AM, Guillot R, Urios P, Sternberg M. Effect of an aldose reductase inhibitor on type IV collagen production by human endothelial cells cultured in high glucose. *Diabetologia* 1996; 39:641-648.
- [6] Sharma K, Ziyadeh FN. Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor-beta as a key mediator. *Diabetes* 1995; 44:1139-1146.
- [7] Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN. Neutolization of TGF-beta by anti-TGF-beta antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes* 1996; 45: 522-530.
- [8] Pricci F, Pugliese G, Mene P, Romeo G, Romano G, Galli G, Casini A, Rotella CM, DiMario U, Pugliese F. Regulatory role of eicosanoids in extracellular matrix overproduction induced by long-term exposure to high glucose in cultured rat mesangial cells. *Diabetologia* 1996; 39:1055-1062.
- [9] Kang DH, Hong YS, Lim HJ, Choi JH, Han DS, Yoon KI. High glucose solution and spent dialysate stimulate the synthesis of transforming growth factor-beta 1 of human peritoneal mesothelial cells: effect of cytokine costimulation. *Perit Dial Int* 1999; 19:221-230.
- [10] Lin CY, Chen WP, Yang LY, Chen A, Huang TP. Persistent transforming growth factor-beta 1 expression may predict peritoneal fibrosis in CAPD patients with frequent peritonitis occurrence. *Am J Nephrol* 1998; 18:513-519.
- [11] Yen CJ, Fang CC, Chen YM, Lin RH, Wu KD, Lee PH, Tsai TJ. Extracellular matrix proteins modulate human peritoneal mesothelial cell behavior. *Nephron* 1997; 75:188-195.
- [12] Yen CJ, Tsai TJ, Chen HS, Fang CC, Yang CC, Lee PH, Lin RH, Tsai KS, Hung KY, Yen TS. Effects of intraperitoneal antibiotics on human peritoneal mesothelial cell growth. *Nephron* 1996; 74:694-700.
- [13] Fang CC, Yen CJ, Chen YM, Ko FN, Tsai TJ, LeePH, Hsieh BS. Hydralazine

inhibits human peritoneal mesothelial cell proliferation and collagen synthesis. *Nephrol Dial Transpl* 1996; 11:2276-2281.

- [14] Tsai TJ, Yen CJ, Fang CC, Yang CC, Lee PH, Yen TS. Effect of intraperitoneally administered agents on human peritoneal mesothelial cell growth. *Nephron* 1995; 71: 23-28.
- [15] Caenazzo C, Garbisa S, Onisto M, Zampieri M, Baggio B, Gambaro G. Effect of glucose and heparin on mesangial alpha 1 (IV) COLL and MMP-2/TIMP-2 mRNA expression. *Nephrol Dial Transpl* 1997; 12:443-448.
- [16] Pierce JR Jr., Trostle DC, Warner JJ. Propranolol and retroperitoneal fibrosis. *Ann Int Med* 1981; 95:244.
- [17] Agarwal DK, Barthwal SP, Agarwal R, Tandon S, Agarwal Rl. Peritoneal fibrosis- an expression of atenolol toxicity. *J Assoc Phys India* 1994; 42:152.
- [18] Carozzi S, Nasini MG, Cantaluppi A, Salit M. Peritoneal dialysis solution calcium concentration regulates peritoneal fibroblast proliferation in CAPD. *ASAIO J* 1992; 38:M585-588.
- [19] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983; 65:55-63.
- [20] Chang CC, Wu YC, Chiu HC, Liu YL, Lu YC. Pentoxifylline inhibits the proliferation of human fibroblasts derived from normal, hypertrophic scar and keloid skin and their mitochondrial activity and collagen synthesis. *Eur J Dermatol* 1991; 1: 214-220.