

## 高糖对人腹膜间皮细胞的增殖和损伤及分泌细胞因子的影响

刘映红<sup>1</sup>, 刘伏友<sup>1,\*</sup>, 张浩<sup>2</sup>, 彭佑铭<sup>1</sup>, 袁芳<sup>1</sup>, 刘虹<sup>1</sup>, 成梅初<sup>1</sup>, 卓莉<sup>1</sup>

(1. 中南大学湘雅二医院肾内科, 长沙 410011; 2. 湘雅三医院肾内科, 长沙 410013)

**[摘要]** 目的:探讨高糖介导腹膜纤维化的可能机制。方法:原代培养的第3代人腹膜间皮细胞(HPMCs)分为不同时间(24, 48 h)的对照组( $F_{12}$ )和高糖组( $F_{12} + 4\%$ 葡萄糖)。用MTT法测定细胞增殖, 乳酸脱氢酶(LDH)法观察细胞损伤程度, 采用酶联免疫法(ELISA)测定纤维连接蛋白(FN)、转化生长因子 $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )和结缔组织生长因子(CTGF)蛋白水平以及采用RT-PCR测定FN, TGF- $\beta_1$ 和纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)mRNA表达。结果:①高糖明显抑制细胞增殖, 24 h和48 h高糖组与同一时间点对照组比较, MTT吸光度值均明显下降( $P < 0.001$ 或 $P < 0.01$ ); ②高糖明显导致细胞损伤, 24 h和48 h高糖组与同一时间点对照组比较, 培养液中LDH含量均明显增加(均 $P < 0.001$ ); ③高糖培养24, 48 h均使FN, CTGF和TGF- $\beta_1$ 蛋白表达增加( $P < 0.05$ 或 $P < 0.001$ ); ④高糖使FN, TGF- $\beta_1$ 和PAI-1 mRNA表达均上调。结论:高糖能够抑制HPMCs增殖, 损伤HPMCs, 并刺激HPMCs分泌更多的TGF- $\beta_1$ , CTGF, FN和PAI-1, 从而使HPMCs细胞外基质生成增多、降解减少, 最终导致腹膜纤维化的形成。

**[关键词]** 高糖; 腹膜间皮细胞; 增殖; 损伤; 细胞因子

**[中图分类号]** R692.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2006)04-0575-05

## Effects of high glucose on the cell proliferation, damage and cytokine in human peritoneal mesothelial cells

LIU Ying-hong<sup>1</sup>, LIU Fu-you<sup>1,\*</sup>, ZHANG Hao<sup>2</sup>, PENG You-ming<sup>1</sup>,  
YUAN Fang<sup>1</sup>, LIU Hong<sup>1</sup>, CHEN Mei-chu<sup>1</sup>, ZHUO Li<sup>1</sup>

(1. Department of Nephrology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011;

2. Department of Nephrology, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

**Abstract:** **Objective** To determine the mechanism of peritoneal fibrosis of peritoneal mesothelial cells by high glucose. **Methods** The third passage human peritoneal mesothelial cells (HPMCs) from primary culture were divided into a control group ( $F_{12}$ ) and high glucose groups ( $F_{12} + 4\%$  glucose) in different times (24, 48 h). The cell proliferation was assayed by the method of MTT (methylthiazole tetrazolium). The cell damage was measured by LDH (lactate dehydrogenase). The protein expression of fibronectin (FN), transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) and connective tissue growth factor (CTGF) were detected by ELISA. The mRNA expression of FN, TGF- $\beta_1$  and PAI-1 were detected by RT-PCR. **Results** High glucose suppressed the cell proliferation. The result of MTT showed that compared with the control group, the value of OD of high glucose groups at 24 or 48 h decreased significantly ( $P < 0.001$  or 0.01); The cell damage was enhanced in high glucose groups, at 24 or 48 h compared with the control group at the same time (all  $P < 0.001$ ). The protein expressions of TGF- $\beta_1$ , CTGF and FN in supernate fluid of cell culture were significantly enhanced when high glucose stimulated the HPMCs in the high glucose groups at 24 or 48 h compared with the control group at the same time ( $P < 0.05$  or 0.001). The expressions of FN, TGF- $\beta_1$  and PAI-1 mRNA were upregulated in 24 h high glucose group compared with that of 24 h control group. **Conclusion** High glucose can suppress the HPMC proliferation and damage HPMCs. Increase of TGF- $\beta_1$ , CTGF, FN and PAI-1 of HPMCs stimulated by high glucose can promote the syn-

thesis and decreased degradation of extracellular matrix, which might be related with the mechanism of peritoneal fibrosis of peritoneal mesothelial cells by high glucose.

**Key words:** high glucose; peritoneal mesothelial cells; proliferation; damage; cytokines

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2006,31(4):0575-05]

持续不卧床腹膜透析(CAPD)是终末期肾衰患者主要替代治疗之一。腹膜透析患者5年生存率与血液透析患者相似,但10年生存率却明显低于血液透析患者<sup>[1]</sup>。主要原因是长期腹膜透析导致腹膜纤维化,使腹膜超滤功能丧失<sup>[2]</sup>。引起腹膜纤维化的原因有高糖、高渗、酸性腹透液、葡萄糖降解产物(GDP)、终末期糖基化产物(AGE)等<sup>[2,3]</sup>。而葡萄糖是一种廉价的有效的渗透剂,已被长期使用。但是国内外研究已发现,高糖腹透液能引起腹膜间皮细胞(peritoneal mesothelial cells, PMCs)损伤,最后导致腹膜纤维化,腹膜超滤功能丧失<sup>[2,3]</sup>。葡萄糖引起腹膜纤维化具体机制至今尚未阐明。1991年从人脐静脉内皮细胞基质中发现可刺激成纤维细胞增殖和分泌胶原的生长因子结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF),它与组织器官的纤维化关系密切。本研究拟探讨高糖是否通过刺激人腹膜间皮细胞(HPMCs)分泌TGF- $\beta_1$ , CTGF, FN和PAI-1来促进腹膜纤维化以及对细胞增殖和损伤的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 小鼠抗人结缔组织生长因子(CTGF)单克隆抗体购自美国R&D公司;转化生长因子 $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )ELISA试剂盒购自晶美生物工程有限公司;Trizol试剂、 $F_{12}$ 培养基和胎牛血清(FCS)购自Gibco公司;D-葡萄糖购自Sigma公司;逆转录试剂盒购自Promega公司;纤维连接蛋白(FN)试剂盒购自上海太阳生物技术公司;免疫组织化学试剂购自福州迈新公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 HPMCs的分离、培养与鉴定** 采取人网膜作为腹膜间皮细胞来源,网膜分别取自3名择期腹部手术且腹膜组织正常患者。按文献方法培养人HPMCs<sup>[4]</sup>,当细胞生长融合成单层,用0.125%胰酶-0.01% EDTA消化传代,第3代用于实验。传代细胞经倒置显微镜、透射电镜及扫描电镜鉴定间皮细胞特征,免疫组织化学示抗细胞角蛋白、抗波形蛋白抗体染色阳性,抗VIII因子抗体和抗白细胞CD45抗体染色阴性。

**1.2.2 MTT法测定HPMCs增殖** 用 $1 \times 10^5$ /

mL的细胞悬液接种96孔板,每孔0.1 mL。置5%  $CO_2$ 培养箱培养至细胞融合,加入含0.1% FCS(体积分数)的 $F_{12}$ 同步24 h,使大多数细胞进入静止期。然后分成2组:正常对照组( $F_{12}$ );葡萄糖组( $F_{12} + 4\%$  D-葡萄糖);每组设6个平行孔。分别培养20,44 h后,弃培养液,再每孔加入5 g/L MTT 20  $\mu$ L,振荡后继续孵育4 h,弃上清加入DMSO(二甲基亚砷)100  $\mu$ L,振荡5 min后,用DG3200A型酶联免疫检测仪检测波长570 nm处各孔吸光度(OD值)。

### 1.2.3 测定培养液中乳酸脱氢酶(LDH)含量

用 $1 \times 10^5$ /mL的细胞悬液接种24孔板,每孔0.4 mL。置5%  $CO_2$ 培养箱培养至细胞融合,加入含0.1% FCS- $F_{12}$ 同步化24 h,使大多数细胞进入静止期。分组同增殖实验,每组设6个平行孔。分别培养24,48 h后,收集各组培养液,立即用全自动生化分析仪7170A(日本)测定LDH水平,以反映细胞损伤情况。

### 1.2.4 酶联免疫测定FN, TGF- $\beta_1$ 和CTGF水平

细胞培养、分组及收集上清液方法同1.2.3,上清液置-20  $^{\circ}C$ 保存,采用酶联免疫(ELISA)按试剂盒内实验步骤检测FN和TGF- $\beta_1$ 蛋白水平。

CTGF测定步骤:包被液( $Na_2CO_3$  1.6 g +  $NaHCO_3$  2.9 g +  $NaN_3$  0.2 g,加水至1 000 mL)20 mL加抗CTGF抗体40  $\mu$ L(1:500稀释),形成一抗,将一抗加到96孔板内,每孔0.1 mL,4  $^{\circ}C$ 孵育24 h。用洗涤液( $NaCl$  8.5 g +  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  2.9 g +  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  0.3 g + 吐温-20 0.05 mL,加水至1 000 mL)洗涤4次,加1%牛血清清蛋白封板液(小牛血清10 mL + 牛血清清蛋白1 g + 洗涤液90 mL)室温孵育2 h,以除去非特异性抗体,洗涤4次,每孔加待测标本100  $\mu$ L,37  $^{\circ}C$ 孵育150 min。洗涤4次,加羊抗兔IgG(1:500)二抗,每孔100  $\mu$ L,37  $^{\circ}C$ 孵育60 min,洗涤4次,拍干,加底物、显色、终止,在酶标仪波长450 nm处测各孔吸光度(OD值)。

**1.2.5 逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)检测FN, PAI-1及TGF- $\beta$ , mRNA的表达** 消化第2代HPMCs,消化后用含15% FCS的 $F_{12}$ 培养液重悬细胞,细胞密度 $1 \times 10^5$ /mL,接种到6孔板,每孔1

mL,置 37 ℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养至细胞融合,用含 0.1% FCS 的 F<sub>12</sub> 同步 24 h,待进入静止期后分为对照组和 4% 葡萄糖组,每组设 2 复孔,继续培养 24 和 48 h。

去除 6 孔板上内清液,用 PBS 洗涤 1 次,每孔加入 Trizol 试剂 1 mL,提取总 RNA,紫外分光光度计比色测定 260/280 波长处 OD 值在 1.7~2.0 之间,1.2% 琼脂糖凝胶电泳可见 3 条 RNA 带,提示总 RNA 无污染及降解。

取总 RNA 2 μg 进行逆转录合成 cDNA,按逆转录试剂盒操作手册进行操作,样品 -20 ℃ 保存。

PCR 扩增 FN,PAI-1 和 TGF-β<sub>1</sub>,以 β-actin 作为内参照,引物序列见表 1。PCR 反应条件:预变性条件除 PAI-1 为 94 ℃ 1 min,其余均为 95 ℃ 3 min;变性条件除 PAI-1 为 95 ℃ 40 s 外,其余均为 94 ℃ 30 s;退火条件 FN 为 56 ℃ 40 s,PAI-1 为 55.5 ℃ 40 s,TGF-β<sub>1</sub> 和 β-actin 均为 60 ℃ 40 s;所有引物均延伸 72 ℃ 1 min;除 PAI-1 为 28 个循环,其余为 30 个循环;循环结束后再延伸 72 ℃ 10 min。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳,DOC1000 图像分析仪进行灰度扫描,以目的基因/β-actin 相对灰度值表示目的基因的相对表达量。

表 1 引物序列

引物	序 列	片段长度
FN	5'-TGGACCTTCTACCAGTCCGAC-3' 5'-TGTCTTCCCATCATCGTAACAC-3'	451 bp
PAI-1	5'-GAGCTTTTGTGTGCCCTGG-3' 5'-CCTGAGATACCGGTGACACAGA-3'	531 bp
TGF-β <sub>1</sub>	5'-GGCAGTGGCTTGAGCCGTGGA-3' 5'-TGTTGGACAGCTGCTCCACCT-3'	510 bp
β-actin <sup>a</sup>	5'-CCTCGCCTTTGCCGATCC-3' 5'-GGATCTTCATGACGTAGTCACTC-3'	626 bp

1.3 统计学处理 实验数据  $\bar{x} \pm s$  表示。应用统计软件包 SPSS11.0 进行单因素方差分析。

2 结 果

2.1 MTT 测定 HPMCs 增殖 测定 MTT 实验吸光度值反映各组细胞数目。对照组 MTT 结果显示,随培养时间延长各组细胞吸光度明显增加,培养 48 h 时 MTT 吸光度值是 24 h 的 1.65 倍 ( $P <$

0.001),表示 HPMCs 数目增加呈时间依赖性。高糖明显抑制 HPMCs 的增殖,培养 24 h 对照组 MTT 吸光度值是高糖组的 1.46 倍 ( $P < 0.001$ ),培养 48 h 对照组 MTT 吸光度值是高糖组的 1.17 倍 ( $P < 0.01$ ) (表 2)。

2.2 培养液中 LDH 含量 用培养液中 LDH 含量反映细胞受损情况。培养 24,48 h 后,高糖组 LDH 含量均明显高于相应对照组 ( $P < 0.001$ ),表明高糖可明显损伤 HPMCs。但对照组 24 h 与 48 h 之间比较 LDH 含量无明显的差异 ( $P > 0.05$ ) (表 2)。

表 2 高糖对 HPMCs 细胞增殖和细胞损伤的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	MTT(OD570)		LDH(U)	
	24 h	48 h	24 h	48 h
对照组	0.43 ± 0.03	0.71 ± 0.02**	23.58 ± 3.03	21.27 ± 3.50
高糖组	0.30 ± 0.07 <sup>△△</sup>	0.61 ± 0.06 <sup>△</sup>	51.27 ± 8.33 <sup>△△</sup>	42.33 ± 6.50 <sup>△△</sup>

与 24 h 的对照组比较, \*\*  $P < 0.001$ ; 与同一时间点对照组比较,  $\Delta P < 0.01, \Delta\Delta P < 0.001$

2.3 培养液中 FN, CTGF 及 TGF-β<sub>1</sub> 蛋白水平

随着培养时间的延长,培养液中 FN 和 CTGF 蛋白质含量明显增加,对照组和高糖组 48 h 时 FN 和 CTGF 含量与 24 h 时比较明显增加 ( $P < 0.001$ );高浓度葡萄糖作用 HPMCs 后其上清液中 FN 和 CTGF 蛋白质含量也发生明显改变,24 h 高糖组与同时间点对照组比较,2 种蛋白质的含量均增加 ( $P < 0.05$ );48 h 高糖组与同时间点对照组比较,2 种蛋白质的含量明显增加 ( $P < 0.001$ , 表 3)。

培养液中 TGF-β<sub>1</sub> 蛋白的含量不随培养时间的延长而改变,24 h 对照组和高糖组与 48 h 时比较,均无明显变化 ( $P > 0.05$ ),高浓度葡萄糖作用 HPMCs 24,48 h 后其上清液中 TGF-β<sub>1</sub> 蛋白质含量明显增加 ( $P < 0.05, P < 0.001$ ; 表 3)。

2.4 FN, PAI-1 和 TGF-β<sub>1</sub> 的 mRNA 表达 高浓度葡萄糖作用 HPMCs 24 h 后, FN, PAI-1 和 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 的相对表达量与对照组比较,分别上调 11%, 13% 和 67% (图 1, 2)。

表 3 培养液中 FN, CTGF 和 TGF-β<sub>1</sub> 蛋白质浓度水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

	FN (ng/mL)		CTGF (OD <sub>450</sub> )		TGF-β <sub>1</sub> (pg/mL)	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
对照组	79.61 ± 7.04	158.00 ± 13.44**	0.31 ± 0.03	0.66 ± 0.12**	127.46 ± 11.10	113.52 ± 10.99
高糖组	96.32 ± 8.72 <sup>△</sup>	204.11 ± 21.00 <sup>△△</sup>	0.447 ± 0.07 <sup>△</sup>	0.90 ± 0.15 <sup>△△</sup>	150.55 ± 14.98 <sup>△</sup>	153.48 ± 14.25 <sup>△△</sup>

与同组 24 h 比较, \*\*  $P < 0.001$ ; 与同一时间点对照组比较,  $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.001$

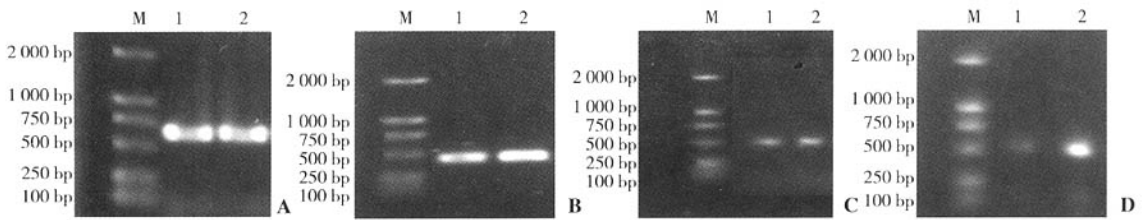


图1 培养24 h后FN,PAI-1和TGF- $\beta_1$ 的PCR产物电泳图 A: $\beta$ -actin; B:FN; C:PAI-1;D:TGF- $\beta_1$  1:对照组;2:高糖组;M:DL2000 marker  
Fig.1 PCR products of  $\beta$ -actin (A), FN (B), PAI-1 (C) and TGF- $\beta_1$  after 24 h (D) by agarose gel electrophoresis 1:Control group; 2:High glucose group; M:DL2000 marker

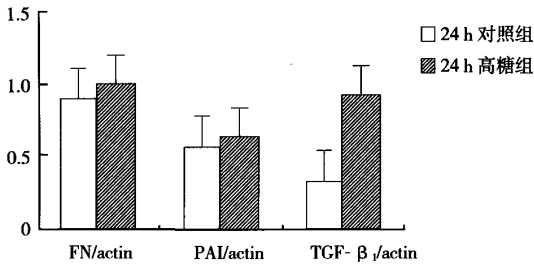


图2 培养24 h对照组和高糖组FN,PAI-1和TGF- $\beta_1$ 的mRNA相对表达量的比较  
Fig.2 Relative expression of mRNA of FN, PAI-1 and TGF- $\beta_1$  in control group and high glucose group after 24 h culture

### 3 讨论

CAPD是终末期肾衰患者替代治疗的主要方法之一,高糖作为廉价渗透剂被广泛使用,研究高糖对HPMCs的影响具有重要意义。

本研究采用MTT法测定高糖对HPMCs增殖的效应,结果显示高糖明显抑制HPMCs的增殖;培养48h后高糖抑制HPMCs增殖程度不如24h组,可能与培养液中葡萄糖被细胞吸收,浓度降低有关。这间接反映了高糖抑制细胞增殖作用与葡萄糖浓度有关,与文献报道结果一致<sup>[5]</sup>。高糖对HPMCs增殖抑制的作用机制仍不十分清楚,可能与高浓度葡萄糖改变细胞周期有关<sup>[6]</sup>。

LDH是一种与葡萄糖代谢有关的酵素,它广泛存在于身体各器官组织,细胞受到伤害或死亡都会释放出LDH。正常培养条件下,细胞在培养液中释放少量的LDH,随着细胞对培养环境的适应,LDH有下降的趋势。但是高糖作用HPMCs后,培养液中LDH明显增加,且在HPMCs接触葡萄糖早期更明显。随着葡萄糖吸收和细胞对生长环境的适应,LDH在48h葡萄糖组与24h高糖组比有下降的趋势,可见高糖可明显损伤HPMCs。

长期CAPD成功与否与腹膜的结构与功能的维持有密切关系,腹膜纤维化将导致腹膜结构发生改变,腹膜超滤功能丧失,迫使腹膜透析患者不

得不退出CAPD。TGF- $\beta_1$ 是目前公认致纤维化因子,参与细胞生长、凋亡、分化及细胞外基质合成。多项研究认为TGF- $\beta_1$ 在腹膜纤维化形成过程起非常重要的作用。本实验室曾使用TGF- $\beta_1$ 刺激HPMCs后,发现碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)mRNA表达上调,同时FN和PAI-1 mRNA和蛋白表达均上调<sup>[7]</sup>。此作用可能通过丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)信号通路。MAPK是胞浆中信号转导酶,它包括有细胞外信号调节激素(ERK)、C-Jun氨基端激酶(JNK)及P38,本研究室曾使用TGF- $\beta_1$ 刺激被ERK阻断剂PD98059和P38阻断剂SD203580预处理过的HPMCs,发现细胞外基质蛋白产生减少<sup>[8]</sup>;此外TGF- $\beta_1$ 刺激HPMCs细胞外基质增多还可能通过SMAD通路<sup>[9]</sup>。为此本室刘伏友等<sup>[10]</sup>使用pcDU6载体质粒介导的TGF- $\beta_1$ 短发夹RNA(shRNA)作用HPMCs,发现此载体能够明显抑制被高糖(4.25% D-葡萄糖)和细菌脂多糖(LPS)共同刺激的HPMCs细胞外基质的增多。本次实验通过RT-PCR和ELISA测定TGF- $\beta_1$  mRNA和蛋白质的水平,发现正常培养条件下,HPMCs能够分泌少量TGF- $\beta_1$ ,高糖能够使其分泌进一步增加。由于TGF- $\beta_1$ 具有多种生物学效应,完全抑制TGF- $\beta_1$ 分泌将导致动物死亡,故笔者研究其下游因子,从其下游因子着手进行预防腹膜透析相关性腹膜纤维化治疗。

CTGF是TGF- $\beta_1$ 的下游介质。CTGF是分子量为36~38 kD,富含半胱氨酸、由349个氨基酸组成的多肽,是即刻早期反应基因中高度保守的CCN家族成员之一,它具有促进有丝分裂、细胞趋化和黏附促进细胞增殖和增加细胞外基质合成等作用。CTGF过度表达可以导致一些与纤维化有关疾病如硬皮病、肝纤维化、肺纤维化和肾脏纤维化等。糖尿病肾病患者肾组织内CTGF表达增加<sup>[11]</sup>,肾纤维化、肾小球硬化和小管间质纤维化组织内CTGF也明显增加<sup>[12,13]</sup>。多种因素如TGF- $\beta_1$ 、活性氧(ROS)、高糖等均可诱导CTGF的表达。体

外研究证实高糖能诱导人系膜细胞 CTGF 表达<sup>[14]</sup>; TGF- $\beta_1$  能使 HPMCs 的 CTGF 表达上调<sup>[15]</sup>; 但是高糖对 HPMCs 的 CTGF 影响国内未见类似的文献报道。

本研究通过 ELISA 观察 CTGF 蛋白表达水平, 可见在常规培养条件下 HPMCs 能分泌少量 CTGF, 并随培养时间的延长而逐渐增加; 在高糖作用下, HPMCs 分泌 CTGF 更加明显, 并呈时间依赖性, 培养时间越长, 分泌 CTGF 越多。同时本实验室发现高糖刺激 HPMCs 后, TGF- $\beta_1$  mRNA 和蛋白表达明显增加, 其增加基本与 CTGF 蛋白水平增加平行, 此外细胞外基质蛋白 FN 的 mRNA 和蛋白表达上调。高糖可能通过诱导 TGF- $\beta_1$  表达, 使 CTGF 增加, 其可能机制是启动了 CTGF 上一个特殊的 TGF- $\beta_1$  反应元件<sup>[16]</sup>。FN 增加与 CTGF 增加平行, 说明高糖通过 TGF- $\beta_1$  引起 CTGF 增加同时, 细胞外基质合成也增加, 这与文献报道相符<sup>[15,17]</sup>。

PAI-1 主要作用是抑制细胞外基质的降解。本研究显示高糖组 PAI-1 mRNA 表达水平与对照组比较均明显增加, 这可能是因为高糖在诱导 HPMCs 分泌 TGF- $\beta_1$  和 CTGF 增加的同时诱导了 PAI-1 基因转录与表达, PAI-1 增加使细胞外基质降解减少, 进一步加剧了细胞外基质积聚。

总之, 高糖能够抑制 HPMCs 的增殖, 影响细胞活力, 损伤细胞, 促使 TGF- $\beta_1$  与 CTGF 分泌增加, 使细胞外基质聚集, 增加 PAI-1 使细胞外基质蛋白降解减少, 从而促进腹膜透析相关性腹膜纤维化形成。CTGF 是 TGF- $\beta_1$  下游因子, 也许可以通过阻断 CTGF 的途径干预腹膜透析相关性腹膜纤维化形成, 为腹膜透析相关性腹膜纤维化的治疗提出新的靶点。

致谢 感谢医学遗传学国家重点实验室各位老师及湘雅二医院普外科老师们的帮助。

#### 参考文献:

- [1] US Renal Data System; Excerpts from the USRDS 2000 Annual Data Report; Atlas of end-stage renal disease in the United States [J]. *Am J Kidney Dis*, 2000, 36 (Suppl 2): s1-s238.
- [2] Davies SJ, Phillips L, Naish PF, et al. Peritoneal glucose exposure and changes in membrane solute transport with time on peritoneal dialysis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2001, 12 (5):1046-1051.
- [3] Devuyt O, Topley N, Williams JD. Morphological and functional changes in the dialysed peritoneal cavity: impact of more biocompatible solutions [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2002, 17 (Suppl 3):12-15.
- [4] 刘伏友, 段绍斌, 龙志高, 等. 人腹膜间皮细胞的培养及特征 [J]. *湖南医科大学学报*, 2001, 26 (4): 321-324.
- [5] 侯凡凡, 臧燕, 张训, 等. 高浓度葡萄糖对人腹膜间皮细胞生长和基质合成的影响 [J]. *中华内科杂志*, 1995, 34:326-329.
- [6] Shostak A, Wajsbrodt V, Gotloib L. High glucose accelerates the life cycle of the in vivo exposed mesothelium [J]. *Kidney Int*, 2000, 58 (5):2044-2052.
- [7] 刘映红, 袁芳, 肖平, 等. TGF- $\beta_1$  对人腹膜间皮细胞分泌细胞外基质和 bFGF 的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2002, 12 (14):10-13.
- [8] 樊敏, 段绍斌, 彭佑铭, 等. 丝裂素活化蛋白激酶信号通路在人腹膜纤维化的作用 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2003, 19 (5):292-296.
- [9] 张浩, 刘伏友, 刘映红, 等. TGF- $\beta_1$  刺激对人腹膜间皮细胞内 Smad 信号转导通路的影响 [J]. *中南大学学报 (医学版)*, 2004, 29 (2):142-147.
- [10] Liu F, Liu H, Peng Y, et al. Inhibition of TGF-beta expression in human peritoneal mesothelial cells by pcDU6 vector-mediated TGF-beta shRNA [J]. *Nephrology*, 2006, 11 (1):23-28.
- [11] Mason RM, Wahab NA. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14 (5): 1358-1373.
- [12] Ito Y, Aten J, Bende RJ, et al. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis [J]. *Kidney Int*, 1998, 53 (4):853-861.
- [13] Gupta S, Clarkson MR, Duggan J, et al. Connective tissue growth factor: potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis [J]. *Kidney Int*, 2000, 58 (4): 1389-1399.
- [14] Murphy M, Godson C, Cannon S, et al. Suppression subtractive hybridization identifies high glucose levels as a stimulus for expression of connective tissue growth factor and other genes in human mesangial cells [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274 (9): 5830-5834.
- [15] 张浩, 刘伏友, 刘映红, 等. 转化生长因子  $\beta_1$  对人腹膜间皮细胞结缔组织生长因子的影响 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2004, 20 (4):282-285.
- [16] Grotendorst GR, Okochi H, Hayashi N. A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene [J]. *Cell Growth Differ*, 1996, 7 (4):469-480.
- [17] Sakamoto N, Sugimura K, Kawashima H, et al. Influence of glucose and inflammatory cytokines on TGF-beta1 and CTGF mRNA expressions in human peritoneal mesothelial cells [J]. *Int J Mol Med*, 2005, 5 (6):907-911.