

本文引用:徐亚沛,孙晓芳,朱方涛,等. 肾康注射液在大鼠腹膜透析模型中对腹膜的保护作用[J]. 新乡医学院学报,2017,34(2):110-112. DOI:10.7683/xyxyxb.2017.02.008.

【基础研究】

肾康注射液在大鼠腹膜透析模型中对腹膜的保护作用

徐亚沛¹, 孙晓芳², 朱方涛³, 任 蕾⁴, 邹 燕¹, 崔东锋¹, 吴宪鸣¹

(1. 郑州市第三人民医院肾内科, 河南 郑州 450000; 2. 河南省人民医院检验科, 河南 郑州 450000; 3. 郑州市第七人民医院心脏外科, 河南 郑州 450000; 4. 郑州大学第一附属医院内分泌科, 河南 郑州 450000)

摘要: **目的** 研究肾康注射液(SKI)对腹膜透析大鼠腹膜组织形态的影响,探讨其对腹膜保护的作用机制。**方法** 将45只健康Sprague-Dawley雄性大鼠随机分为对照组、模型组和SKI治疗组,每组15只。对照组大鼠给予腹腔注射生理盐水,模型组大鼠给予腹腔注射透析液建模,SKI治疗组大鼠在与模型组同样方法建模后腹腔注射肾康注射液治疗。3组大鼠均在腹腔注射后第8周进行超滤量测定,苏木精-伊红(HE)染色后观察3组大鼠壁层腹膜形态学变化,采用实时定量荧光聚合酶链式反应(RT-PCR)法测定3组大鼠腹膜转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)及纤维连接蛋白(FN)mRNA的表达。**结果** 模型组大鼠腹膜较对照组显著增厚,SKI治疗组大鼠壁层腹膜较模型组损伤较轻。与对照组比较,模型组大鼠腹膜超滤量显著下降($P < 0.05$),腹膜TGF- β_1 mRNA和FN mRNA表达量均显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,SKI治疗组大鼠腹膜超滤量升高($P < 0.05$),腹膜TGF- β_1 mRNA和FN mRNA表达量均显著下降($P < 0.05$)。**结论** 肾康注射液能够在一定程度上改善腹膜纤维化大鼠的腹膜功能,其机制可能是通过抑制腹膜组织中TGF- β_1 表达,减少FN积聚,从而减轻腹膜纤维化。

关键词: 肾康注射液;腹膜透析;转化生长因子- β_1 ;纤维连接蛋白

中图分类号: R459.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2017)02-0110-03

Protective effect of Shenkang injection on peritoneum in peritoneal dialysis rats

XU Ya-pei¹, SUN Xiao-fang², ZHU Fang-tao³, REN Lei⁴, ZOU Yan¹, CUI Dong-feng¹, WU Xian-ming¹

(1. Department of Nephrology, the Third People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450000, Henan Province, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450000, Henan Province, China; 3. Department of Cardiovascular Surgery, the Seventh People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450000, Henan Province, China; 4. Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Shenkang injection (SKI) on the morphous of peritoneum in peritoneal dialysis rats and explore the potential protection mechanism of SKI on peritoneum. **Methods** Forty-five health male Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group, model group and SKI treatment group, with 15 rats in each group. The rats in control group were given normal saline by intra-peritoneal injection; the rats in model group were given peritoneal dialysis fluid by intra-peritoneal injection to establish peritoneal fibrotic model; the rats in SKI treatment was given SKI by intra-peritoneal injection after establishing the peritoneal fibrotic model. After eight weeks, ultrafiltration volume of all rats was detected to assess the function of peritoneal. Hematoxylin-eosin (HE) staining method was used to identify the morphology of visceral peritoneum tissue. The expressions of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and fibronectin (FN) mRNA in peritoneum of rats were examined by real time polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Compared with control group, the thickness of peritoneal tissue of rats in model group increased significantly. Compared with model group, the thickness of peritoneal tissue of rats in SKI treatment group decreased obviously. The ultrafiltration volume of peritoneal of rats in model group was significantly lower than that in control group ($P < 0.05$), but the expressions of TGF- β_1 and FN mRNA were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). The ultrafiltration volume of peritoneal of rats in SKI treatment group was significantly higher than that in model group ($P < 0.05$), but the expressions of TGF- β_1 and FN mRNA were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** SKI can improve the peritoneal function of rats with peritoneal fibrosis through inhibiting the expression of TGF- β_1 and decreasing the deposition of PN.

Key words: Shenkang injection; peritoneal dialysis; transforming growth factor- β_1 ; fibronectin

腹膜透析技术是目前临床终末期肾病的主要替代治疗手段之一,在临床应用日益广泛。目前,较常使用的腹膜透析液多为葡萄糖透析液,长期应用这

种高糖、低酸碱度的透析液会导致腹膜结构和功能改变,产生腹膜纤维化,出现新生血管、超滤功能降低等^[1-2],最终导致腹膜透析失败,影响患者寿命。研究显示,腹膜间皮细胞合成和分泌的转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)是形成腹膜纤维化的关键调控因子,纤维连接蛋白(fibronectin, FN)是细胞外基质的主要成分^[1]。因此,

为了延长患者存活期,有效预防和延缓长期腹膜透析患者腹膜纤维化的发生、发展显得至关重要。近年来,中药在预防和保护肾脏疾病方面的作用已受到越来越多的关注。肾康注射液(Shenkang injection,SKI)作为一种中药复方注射剂,具有减轻肾小管间质纤维化、调节细胞免疫功能、扩张血管等作用,主要应用于慢性肾衰竭患者的治疗。近年研究表明,SKI具有改善腹膜透析液诱导的腹膜透析功能减退、抑制氧化应激的作用^[3]。为进一步探讨SKI对大鼠腹膜透析模型中腹膜的保护作用及其机制,本研究将SKI用于腹膜透析液中,观察其对腹膜透析液诱导的大鼠腹膜组织形态、TGF-β₁和FN的影响,为今后临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性成年 Sprague-Dawley 大鼠 45 只,8 周龄,体质量 250 ~ 300 g (由河南省实验动物中心提供)。

1.2 试剂与仪器 42.5 g · L⁻¹葡萄糖腹膜透析液(广州百特医疗用品有限公司),SKI(西安世纪肾康药业有限公司,国药准字 201104041),TGF-β₁、FN 及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)引物(上海生工生物有限公司),ABI7500 荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.3 方法

1.3.1 动物分组与给药 将 45 只大鼠随机分为对照组、模型组和 SKI 治疗组,每组 15 只。对照组大鼠每日按 100 mL · kg⁻¹腹腔注射生理盐水;模型组大鼠每日按 100 mL · kg⁻¹腹腔注射 42.5 g · L⁻¹葡萄糖腹膜透析液;SKI 治疗组大鼠每日按 100 mL · kg⁻¹腹腔注射 42.5 g · L⁻¹葡萄糖腹膜透析液,同时按 10 mL · kg⁻¹腹腔注射 SKI。3 组大鼠连续腹腔注射 8 周。

1.3.2 腹膜超滤功能测定 3 组大鼠腹腔注射 8 周后,用 20 g · L⁻¹戊巴比妥钠(3 mL · kg⁻¹)麻醉,于大鼠腹部正中线做长约 6 cm 纵切口,缓慢插入一支细导管后缝合切口,避免引流液外渗,低位引流腹膜透析液,量取引流液 S₁;后打开腹腔,用吸管吸干腹腔内残余液体 S₂。超滤量(mL) = S₁ + S₂。

1.3.3 腹膜组织形态学观察 3 组大鼠腹腔注射 8 周后,切开皮肤和皮下组织,充分暴露腹膜前壁正中线并切开,快速取大鼠腹中线两侧的壁层腹膜组织,用体积分数 10% 甲醛溶液固定 24 h,常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋后制备 3 μm 切片,常规脱蜡至水,苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色,梯度乙醇脱水,中性树脂封片,显微镜下观察腹膜组织形态。

1.3.4 腹膜组织中 TGF-β₁ 和 FN mRNA 表达水平检测 实时定量荧光聚合酶链式反应(real time polymerase chain reaction,RT-PCR)测腹膜组织中 TGF-β₁ 和 FN mRNA 的表达,GAPDH 为内参基因。每个样品重复 3 次,以保证实验的准确性,并设不加模板 cDNA 的阴性对照。目的基因 TGF-β₁ 引物:上游序列为 5'-GTTCTTCAATACGTCAGACA-3',下游序列为 5'-CCATTGATTCCACGTGGAGT-3',目的基因 FN 引物:上游序列为 5'-GCAGCCCACAGTGGAG-TATGT-3',下游序列为 5'-TTCTTCATTGGTCCG-GTCTT-3',RT-PCR 反应结束后,用图像分析软件进行 RT-PCR 条带灰度扫描,以 GAPDH(引物上游序列为 5'-AGGTCGGAGTCAACGGATTG-3',下游序列为 5'-GTGATGGCATGGACTGTGGT-3')为内参对照,数值以二者吸光度比值表示,对目的基因的表达量进行评估。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著差数(least significant difference,LSD)法,P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组大鼠腹膜组织形态学观察 对照组大鼠腹膜组织结构基本正常;模型组大鼠腹膜表面间皮细胞重度肿胀变性,部分间皮细胞出现区域性坏死,可见大量成纤维细胞、血管增生以及炎症细胞浸润明显增多;SKI 治疗组大鼠腹膜组织病理性改变均轻于模型组,腹膜组织结构基本完整,局部间皮细胞轻度增生、肿胀,间皮下基质略有增多,炎症细胞浸润程度远小于模型组(图 1)。



A:对照组;B:模型组;C:SKI 治疗组。
图 1 3 组大鼠腹膜 HE 染色(×200)
Fig.1 HE staining of peritoneal tissues of rats in three groups(×200)

2.2 3 组大鼠腹膜超滤功能比较 模型组和 SKI 治疗组大鼠腹膜超滤量分别为 (0.52 ± 0.33)、(5.71 ± 0.61) mL, 较对照组的 (8.13 ± 0.28) mL 显著下降 ($P < 0.05$); SKI 治疗组大鼠腹膜超滤量显著高于模型组 ($P < 0.05$)。

2.3 3 组大鼠腹膜组织中 TGF- β_1 mRNA 和 FN mRNA 表达比较 结果见表 1。与对照组比较, 模型组和 SKI 治疗组大鼠腹膜组织中 TGF- β_1 mRNA 和 FN mRNA 表达量均显著增高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, SKI 治疗组大鼠腹膜组织中 TGF- β_1 mRNA 和 FN mRNA 表达量显著下降 ($P < 0.05$)。

表 1 3 组大鼠腹膜组织中 TGF- β_1 mRNA 和 FN mRNA 表达
Tab.1 Expressions of TGF- β_1 mRNA and FN mRNA in peritoneal tissue of rats in three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TGF- β_1 mRNA	FN mRNA
对照组	15	0.73 ± 0.31	1.21 ± 0.28
模型组	15	43.21 ± 1.71^a	35.52 ± 0.33^a
SKI 治疗组	15	11.32 ± 0.76^{ab}	9.81 ± 0.61^{ab}

注: 与对照组比较^a $P < 0.05$; 与模型组比较^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

腹膜透析是目前临床终末期肾脏疾病的重要替代疗法之一, 因其具有良好的临床疗效, 且能够较好地保护残余肾功能而受到越来越多的关注。对于老年或合并糖尿病的患者等, 腹膜透析疗效显著优于血液透析。然而, 临床实践证明, 导致腹膜透析失败的原因有腹膜纤维化所致超滤衰竭^[4]、腹膜炎的反复发生^[5]、全身微炎症状态所致心脑血管事件^[6]等, 其中最主要的是腹膜纤维化所致的超滤衰竭。由于传统腹膜透析液内葡萄糖浓度是人体内正常浓度的 14~40 倍, 腹膜透析时患者腹膜间皮细胞直接长时间暴露在这种高糖非生理性腹膜透析液中, 是造成腹膜结构和功能损伤的重要原因^[7-9]。

本研究结果显示, 对照组大鼠腹膜间皮细胞完好, 组织结构基本正常; 模型组大鼠腹膜间皮细胞重度肿胀变性、脱落, 部分间皮细胞出现区域性坏死, 腹膜间皮下基质明显增生, 并可见大量血管增生及炎性细胞浸润。证明传统葡萄糖腹膜透析液具有的生物不相容性可以导致腹膜纤维化的发生。SKI 治疗组在腹膜透析液中加入 SKI 干预治疗 8 周后, 大鼠壁层腹膜纤维化的程度较模型组明显减轻, 表明 SKI 对腹膜透析液诱导的大鼠腹膜间皮细胞损伤具有一定的保护作用。

前期研究表明, TGF- β_1 、CA125、结缔组织生长因子、血管内皮生长因子等与腹膜纤维化的形成与发展密切相关^[10-11], 其中 TGF- β_1 主要功能是直接参与激活纤维组织增生, 是主要的致纤维化细胞因子。FN 是细胞外基质的主要成分, 它的合成与细胞外基质的生成密切相关。本研究结果显示, 模型组大鼠腹膜组织中 TGF- β_1 mRNA 和 FN mRNA 表达

较对照组明显增高, 且腹膜超滤量明显减少, 结合模型组大鼠腹膜基质明显增生, 说明 TGF- β_1 和 FN 在腹膜纤维化的形成过程中起重要作用, 可促进腹膜纤维化的发生和发展。

SKI 是一种中药复方注射剂, 具有多重药理作用, 主要具有降逆泄浊、益气活血等功效, 可显著降低尿蛋白排泄, 改善肾功能的作用。有研究报道, 将 SKI 加入到腹膜透析液中, 能够较好地改善腹膜透析液诱导的腹膜透析功能减退、抑制氧化应激的作用^[3]。本研究结果显示, SKI 干预治疗 8 周后大鼠腹膜组织中 TGF- β_1 mRNA 和 FN mRNA 表达量较模型组明显降低, 且腹膜超滤量也有较大改善, 滤过功能得到了一定的保护和提升, 也证明了 SKI 能较好地改善腹膜透析液诱导的腹膜透析功能减退。

综上所述, SKI 能够在一定程度上改善腹膜透析诱导大鼠的腹膜形态学改变, 推测其发生机制可能为 SKI 抑制大鼠腹膜组织中 TGF- β_1 表达, 抑制 FN 聚集, 从而起到保护腹膜功能, 延缓腹膜纤维化的发生、发展。

参考文献:

[1] LOUREIRO J, AGUILERA A, SELGAS R, et al. Blocking TGF- β_1 protects the peritoneal membrane from dialysate-induced damage [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(9): 1682-1695.

[2] MCDONALD O G, WU H, TIMP W, et al. Genome-scale epigenetic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Nat Struct Mol Boil*, 2011, 18(8): 867-874.

[3] 程世平, 查艳, 袁静, 等. 肾康注射液对大鼠腹膜透析功能及氧化应激的影响[J]. 贵阳医学院学报, 2013, 38(2): 138-140.

[4] WEINHANDL E D, FOLEY R N, GILBERTSON D T, et al. Pro-pensity-matched mortality comparison of incident hemodialysis and peritoneal dialysis patients [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(3): 499-506.

[5] 刘小荣. 预防腹膜透析相关性腹膜炎[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2015, 30(22): 1681-1683.

[6] 孙亦兵, 王莹, 温红梅. 不同残余肾功能对行腹膜透析尿毒症患者微炎症状态的影响[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31(5): 351-355.

[7] KIM Y H, RYU J M, LEE Y J, et al. Fibronectin synthesis by high glucose level mediated proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of ANG II and TGF-beta 1 [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 233(2): 397-407.

[8] FERNÁNDEZ-PERPÉN A, PÉREZ-LOZANO M L, BAJO M A, et al. Influence of bicarbonate/low-GDP peritoneal dialysis fluid (BicaVera) on *in vitro* and *ex vivo* epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells [J]. *Perit Dial Int*, 2012, 32(3): 292-304.

[9] 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.

[10] 杜飞, 张克非, 高原, 等. 灯盏花素对腹膜透析液诱导人腹膜间皮细胞转化生长因子 β_1 的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(24): 4437-4439.

[11] 郭林, 赵晓光, 贺小霞. 慢性肾功能不全腹膜透析患者透出液 CA125 检测的临床意义[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31(12): 1045-1047.

(本文编辑:徐刚珍 英文编辑:孟 月)