

肾康注射液对腹膜透析液诱导的大鼠腹膜组织形态及 TNF- α , TGF- β_1 的影响

董莉¹, 程世平^{2*}, 查艳², 袁静², 沈燕², 林鑫²

(1. 贵阳医学院 贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004; 2. 贵州省人民医院, 贵阳 550004)

[摘要] 目的:研究肾康注射液(Shenkang injection, SKI)对腹膜透析液(peritoneal dialysis solution, PDS)诱导的大鼠腹膜组织形态及肿瘤坏死因子- α (TNF- α),转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)影响。方法:50只SD大鼠,随机分为正常组,4.25%PDS组和SKI低、中、高剂量组;除正常组不注射PDS外,其余4组分别ip 4.25%PDS,低、中、高剂量的SKI+4.25%PDS。于注射8周后,水合氯醛麻醉各组大鼠,同时沿腹白线剪开腹壁,量取腹腔内的透出液,ELISA法测定透出液中TNF- α 的含量。取壁层腹膜组织,观察腹膜组织形态改变,并用免疫组化法检测TGF- β_1 的表达。结果:与正常组比较,PDS组大鼠透出液中TNF- α 含量和壁层腹膜间皮细胞的TGF- β_1 表达显著升高($P < 0.01$),且腹膜间皮细胞重度肿胀变性、脱落,间皮下基质明显增生,并可见大量血管增生及炎细胞浸润。与PDS组比较,SKI中、高剂量组的TNF- α 含量显著降低($P < 0.01$),SKI各剂量组壁层腹膜间皮细胞TGF- β_1 的表达明显减少($P < 0.05$),且腹膜结构改变减轻、炎症细胞浸润和基质增生减少。结论:腹膜透析液中加入SKI具有改善PDS诱导腹膜纤维化,其作用机制可能与抑制TNF- α ,TGF- β_1 的增加有关。

[关键词] 肾康注射液;腹膜纤维化;肿瘤坏死因子- α ;转化生长因子- β_1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)18-0130-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015180130

Effect of SKI on Peritoneal Morphology Changes Induced by Peritoneal Dialysis Solution and TNF- α and TGF- β_1 in Peritoneal Dialysis Rats DONG Li¹, CHENG Shi-ping^{2*}, ZHA Yan², YUAN Jing², SHEN Yan², LIN Xin² (1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guiyang Medical College, Guizhou 550004, China; 2. Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Shenkang injection (SKI) on the morphology changes induced by peritoneal dialysis solution (PDS) as well as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) in peritoneal dialysis rats. **Method:** Fifty SD rats were randomly divided into normal group, 4.25% PDS group, 4.25% SKI low, middle and high dose groups. Except for the normal group, all of the remaining four groups were intraperitoneally injected with low, middle and high doses of SKI + 4.25% PDS. At the 8th week after the injection, rats were anesthetized with chloral hydrate, and the peritoneal solution was gathered. The level of TNF- α was detected by ELISA method. The visceral peritoneum tissues of rats were stained with hematoxylin-eosin (HE) to observe the changes of peritoneal morphology. Immunohistochemistry were used to analyze the expression of TGF- β_1 . **Result:** Compared with the normal group, rats in the PDS group showed significantly higher TNF- α and expressions of TGF- β_1 ($P < 0.01$), swelon and deciduous peritoneal mesothelial cells, thickened sub-mesothelial matrix, and severe vascular proliferation and inflammatory cell infiltration. Compared with the PDS group, SKI middle and high dose groups showed decrease in TNF- α content ($P < 0.01$). all SKI groups showed great reliefs in the structure changes of the peritoneum, decrease in the inflammatory cell infiltration and expression of TGF- β_1 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** SKI may be helpful in ameliorating the peritoneal fibrosis induced by PDS, which may be correlated with inhibiting increases in TNF- α and TNF- β_1 .

[Key words] Shenkang injection; peritoneal fibrosis; tumor necrosis factor- α ; transforming growth factor- β_1

[收稿日期] 20141213(003)

[基金项目] 贵州省科学技术基金项目(黔科合J字[2011]2252号)

[第一作者] 董莉, 硕士, 讲师, 从事中药药理学及安全性评价研究, Tel:15180859866, E-mail:108405755@qq.com

[通讯作者] *程世平, 硕士, 主任医师, 教授, 从事腹膜透析、肾小管-间质疾病的研究, Tel:13985046677, E-mail:ypc47200025@163.com

腹膜透析(peritoneal dialysis, PD)技术在临床应用十分广泛,已成为终末期肾病替代治疗的手段之一。但是随 PD 治疗时间的延长,可出现腹膜结构改变,引起腹膜纤维化和腹膜功能下降,使患者退出 PD^[1-2]。因此,为了延长患者存活期,预防和延缓腹膜纤维化是保证长期腹膜透析患者透析成功的关键,也是摆在临床工作者面前的一大难题。近年来,中药在预防腹膜透析中腹膜纤维化的作用已成为越来越多的关注。

肾康注射液(Shenkang injection, SKI)是由大黄、黄芪、丹参、红花组成的中药复方注射剂,其具有多重药理作用:大黄影响机体蛋白质代谢,可增加氮代谢产物的排泄,抑制蛋白质分解,促进尿素氮的再利用,还能抑制肾小管细胞的高代谢状态,延缓肾衰进展^[3-4];黄芪可通过提高血浆白蛋白水平、调节脂质代谢、促进水钠排泄、改善高凝状态、减轻肾损伤、保护肾功能等作用^[5];丹参可抑制肾脏成纤维细胞增殖并促进其凋亡,促进机体代谢,改善肾脏微循环,达到改善肾间质纤维化的作用^[4];红花主要功效为活血化瘀,具有抗凝作用,保护心肌及稳定血管内皮细胞,调节细胞内外的钙离子^[6];SKI 具有降逆泄浊、益气活血、通腑利湿的功效,具有显著降尿蛋白排泄,改善肾功能的作用,能显著抑制转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)的表达,从而可减轻肾小管间质纤维化,延缓慢性肾功能衰竭进展,调节细胞免疫功能和扩张血管的作用,临床主要用于治疗慢性肾功能衰竭^[7]。根据 SKI 的上述作用,可以推测,在腹膜透析液中加入肾康注射液可以起到延长腹膜间皮细胞的生命、抑制间皮细胞 TGF- β_1 的分泌、提高腹腔巨噬细胞功能、改善局部微循环,从而阻止/延缓腹膜纤维化和防止腹膜感染的发生,达到阻止/延缓腹膜功能衰竭的目的。而目前关于 SKI 在腹膜透析中的应用尚无相关报道。

前期研究表明,将 SKI 加入到腹膜透析液(peritoneal dialysis solution, PDS)中,具有改善 PDS 诱导的腹膜透析功能减退、抑制氧化应激的作用^[8]。为进一步探讨该药对腹膜纤维化的阻抑作用及其机制,本研究通过将 SKI 加入到 PDS 中,观察其对腹膜透析液诱导的大鼠腹膜形态及肿瘤坏死因子 α (TNF- α),TGF- β_1 的影响,为今后的临床应用提供依据。

1 材料

1.1 动物 健康 SD 大鼠 50 只,雌雄各半,体重 180~220 g。均由贵阳医学院动物中心提供,动物

合格证号 SCXK(黔)2012-001,饲料为实验大鼠全价颗粒饲料。

1.2 药物及试剂 SKI(西安世纪肾康药业有限公司,批号 201104041),TNF- α ELISA 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号 EK0526),兔抗大鼠 TGF- β_1 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号 1714116),SABC 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号 06L13BJ),DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号 SA1206),低钙腹膜透析液(乳酸盐-G 4.25%,4.25% PDS,广州百特医疗用品有限公司,批号 G1011215)。

1.3 仪器 680 型酶标仪(美国伯乐生命医学产品有限公司),Allegra 64R 型台式冷冻离心机(美国贝克曼公司),BI-2000 型医学图像分析系统(成都泰盟软件有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组与给药 大鼠随机分为正常组(生理盐水),PDS 组(4.25%,PDS),SKI 高、中、低剂量组(5.4,2.7,1.35 g·kg⁻¹),每组各 10 只。动物适应环境 1 周,除正常组外,其余大鼠给予 ip 4.25% PDS(4.25 g·kg⁻¹),药物治疗组给予腹腔注射 4.25% PDS + SKI,每天 1 次,连续 8 周。

2.2 大鼠腹膜纤维化模型的建立 参考周伟东、项协隆等^[9-10]的方法,制作腹透管并予大鼠植入腹透管。传统腹透管将头皮针自针头后约 2 cm 处剪掉,在管前端 3 cm 处侧壁用 7 号针头打 8 个侧孔,作为透析管取输液器前端约 1 cm,残端用乙醇灯烤热后用止血钳夹紧使两端粘合,成为活塞,用于封堵透析管外口,灭菌后备用,大鼠取仰卧位固定,腹部备皮,常规消毒铺巾,在上腹部作一长 1 cm 切口,切开肌肉层达腹膜,在腹膜上开 0.6 cm 小口,用 4 号线作一荷包带线,将透析管一端放在膀胱直肠窝,扎紧开口和腹透管,缝合肌层,腹透管外端在隧道针引导下由背部皮肤穿出,缝合切口,隧道口缝合并固定腹透管,接一次性无菌输液接头。通过腹透管注射药物时,先固定大鼠,然后用碘酊消毒,再用 75% 乙醇脱碘,用连接有一次性使用静脉输液针的一次性使用无菌注射器抽取腹透液及上述药物后经肝素帽注入大鼠腹腔。

2.3 ELISA 法测定 TNF- α 的含量 大鼠停止透析,每只大鼠腹腔注射水合氯醛麻醉,沿腹白线剪开腹壁,量取腹腔内的透出液,1 500 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液,按试剂盒说明进行操作,根据各孔吸光度

A 值及标准曲线计算 TNF- α 含量。

2.4 腹膜组织学检查 同时,取壁层腹膜组织,用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。3 μm 的石蜡切片,常规脱蜡至水,HE染色,梯度乙醇脱水,中性树脂封片,显微镜下观察腹膜的形态变化。

2.5 免疫组化法检测腹膜组织 TGF- β_1 的表达 3 μm 的石蜡切片,常规脱蜡至水,0.01 mol·L⁻¹ 枸橼酸钠缓冲溶液(pH 6.0)在电炉煮沸5 min,3% H₂O₂ 室温孵育10 min 灭活内源性过氧化物酶,PBS溶液洗3 min×3次,滴加适当稀释(1:200)的 TGF- β_1 抗体,4℃过夜,PBS冲洗,然后加入二抗于37℃孵育30 min,PBS冲洗,再加入链霉素-生物素-辣根过氧化物酶复合物工作液于37℃孵育15 min,PBS冲洗,DAB显色剂显色,显微镜下控制显色时间,经过复染、脱水及透明,最后封片。每张切片在400倍光学显微镜下观察显色结果,棕褐色颗粒为阳性信号,每张切片随机选取5个视野摄片,经BI-2000医学图像分析系统分析其阳性信号的积分吸光度IA值,取平均值。

2.6 统计学分析 采用SPSS 13.0版软件进行分析,数据处理采用单因素方差分析检验,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠透出液中 TNF- α 含量的影响 与正常组比较,PDS组大鼠透出液中 TNF- α 含量显著升高($P < 0.01$);与PDS组比较,SKI低、中、高各剂量组的 TNF- α 含量均有所下降;其中高、中剂量组的 TNF- α 含量显著增加($P < 0.05, P < 0.01$)。见表1。

表1 肾康注射液对腹膜透析液诱导的大鼠 TNF- α 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

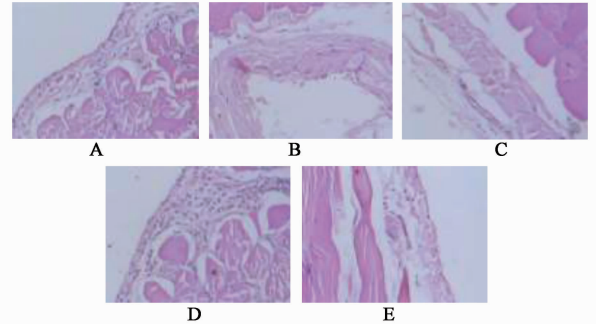
Table 1 Effects of SKI on TNF- α levels of rats induced by peritoneal dialysate ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹
正常	-	20.18 ± 4.31
PDS	-	76.42 ± 20.59 ¹⁾
SKI	1.35	66.88 ± 21.70
	2.7	57.55 ± 19.64 ²⁾
	5.4	48.27 ± 25.06 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与PDS组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表2同)。

3.2 对大鼠腹膜病理形态学的影响 正常组大鼠腹膜组织结构完整,表面被覆一层完整扁平腹膜间

皮细胞,间皮下基底膜薄,间皮下基质纤维无明显沉积,偶见间皮下基质炎细胞、成纤维细胞及血管。PDS组腹膜表面间皮细胞重度肿胀变性,部分间皮细胞坏死脱落,间皮下基质纤维明显增生,并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。与PDS组比较,SKI高、中、低剂量组大鼠腹膜组织尚完整,表面被覆的间皮细胞基本完整,局部间皮细胞轻度增生、肿胀及坏死脱落,间皮下基质略有增多,炎细胞浸润程度远小于模型组。见图1。



A. 正常组;B. PDS组;C. SKI 1.35 g·kg⁻¹组;D. SKI 2.7 g·kg⁻¹组;E. SKI 5.4 g·kg⁻¹组(图2同)

图1 肾康注射液对腹膜透析液诱导的大鼠壁层腹膜组织病理学的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effects of SKI on parietal peritoneal histopathology of rats induced by peritoneal dialysate(HE, ×200)

3.3 对大鼠壁层腹膜 TGF- β_1 表达的影响 免疫组化法检测显示,TGF- β_1 的阳性染色(棕褐色)主要分布在腹膜间皮细胞胞浆。正常组壁层腹膜中仅微弱表达于间皮细胞,与正常组比较,PDS组可见腹膜间皮细胞、浸润的炎症细胞及血管内皮细胞大量表达($P < 0.01$)。与PDS组比较,SKI高、中、低剂量组 TGF- β_1 的表达明显减少($P < 0.05$)。见图2,表2。

表2 肾康注射液对腹膜透析液诱导的大鼠壁层腹膜 TGF- β_1 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of SKI on TGF- β_1 parietal peritoneum of rats induced by peritoneal dialysate ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TGF- β_1 /IA
正常	-	674.30 ± 234.45
PDS	-	5 492.37 ± 761.52 ¹⁾
SKI	1.35	3 266.61 ± 556.97 ²⁾
	2.7	2 741.30 ± 644.29 ²⁾
	5.4	2 016.82 ± 471.84 ³⁾

4 讨论

PD因其操作简便、对血流动力学影响小、残余

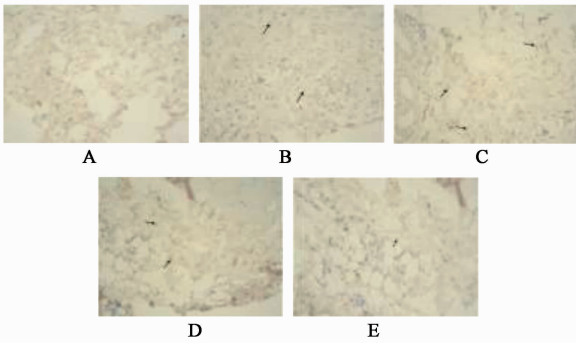


图 2 肾康注射液对腹膜透析液诱导的大鼠壁层腹膜 TGF- β_1 的影响(免疫组化, $\times 400$)

Fig. 2 Effects of SKI on TGF- β_1 parietal peritoneum of rats induced by peritoneal dialysate(IHC, $\times 400$)

肾功能保护较好等优点,被广泛应用于临床^[11]。但长期使用,会导致腹膜间皮细胞脱落,大量细胞外基质堆积^[12]。此外,非生理性腹透液 PDS,特别是腹透液中的高浓度葡萄糖的长期应用,也是导致腹膜结构改变、超滤功能降低导致腹膜纤维化的原因^[13-14]。本研究中,正常组大鼠腹膜间皮细胞完好,间皮下基底膜薄,间皮下基质纤维无明显沉积;PDS 组大鼠腹膜间皮细胞重度肿胀变性、脱落,腹间皮下基质明显增生,并可见大量血管增生及炎细胞浸润。证明传统葡萄糖 PDS 具有的生物不相容性可以导致腹膜纤维化的发生。而在 PDS 中加入 SKI 干预治疗 8 周后,SKI 各剂量组壁层腹膜纤维化的程度较 PDS 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。

研究显示,TNF- α ,TGF- β_1 ,VEGF 等细胞因子与腹膜纤维化的形成与发展密切相关^[15]。TNF- α 能明显上调腹膜组织 TGF- β_1 的表达^[16]。本研究结果显示,腹腔注射 PDS 8 周后,大鼠透出液中 TNF- α 含量显著升高且 TGF- β_1 表达增加。SKI 高、中、低治疗组使大鼠透出液中 TNF- α 含量降低,同时使壁层腹膜间皮细胞的 TGF- β_1 表达明显减少($P < 0.05$)。

综上所述,本研究结果表明,SKI 具有抑制 PDS 诱导的大鼠腹膜纤维化的作用,其机制可能与抑制腹膜间皮细胞 TGF- β_1 和 TNF- α 的过度表达和分泌有关。

[参考文献]

[1] Nakamoto H, Kawaguchi Y, Suzuki H. Is technique survival on peritoneal dialysis better in Japan[J]. Perit

Dial Int, 2006,26(2):1136-1139.

[2] 朱志永,凌光辉,刘伏法,等.腹膜透析超滤衰竭研究进展[J].中国血液净化,2011,10(2):97-99.

[3] 陈志强.应用大黄治疗慢性肾衰的体会[J].河南中医,2004,24(1):74-76.

[4] 范军.肾康注射液治疗慢性肾功能衰竭临床疗效观察[J].医学信息,2011,24(2):636-638.

[5] 彭卫华,曲强.黄芪治疗肾脏疾病的现代药理研究[J].中国中西医结合肾病杂志,2001,2(10):614-616.

[6] 李宝军,刘志强.红花药理分析及临床应用研究[J].亚太传统医药,2014,10(15):44-47.

[7] 蓝天座,闵亚丽,朱春玲,等.肾康注射液对单侧输尿管梗阻大鼠模型肾间质转化生长因子 TGF- β_1 和骨形成蛋白-7 表达的影响[J].药物研究,2008,17(10):20-23.

[8] 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.

[9] 周伟东,魏连波,张志锋,等.自制腹透管尿毒症大鼠腹膜透析模型的建立[J].第四军医大学学报,2008,29(8):749-751.

[10] 项协隆.罗格列酮对大鼠腹膜透析相关性腹膜纤维化的影响[D].福州:福建医科大学福总临床医学院,2010.

[11] Lo W K. Peritoneal dialysis utilization and outcome: what are we facing[J]. Perit Dial Int,2007,27(2):42-44.

[12] Izumotani T, Ishimura E, Yamamoto T, et al. Correlation between peritoneal mesothelial cell cytology and peritoneal histopathology with respect to prognosis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis[J]. Nephron,2001,89(1):43-49.

[13] Kaneko K, Hamada C, Tomino Y. Peritoneal fibrosis intervention[J]. Perit Dial Int, 2007, 27(2):82-87.

[14] Diaz Buxo J A, Gotloib L. Agents that modulate peritoneal membrane structure and function[J]. Perit Dial Int, 2007,27(1):16-30.

[15] 杜飞,张克飞,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 TGF- β_1 的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(24):4437-4439.

[16] Margetts P J, Kolb M, Yu L, et al. Inflammatory cytokines, angiogenesis, and fibrosis in the rat peritoneum[J]. Am J Pathol, 2002, 160(6):2285-2294.

[责任编辑 周冰冰]