

黄芪抗腹膜纤维化模型大鼠间皮细胞紧密连接损伤的研究

舒静*, 张小鹿, 徐震宇, 王怡

(上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院肾内科, 上海 200437)

[摘要] **目的:**研究添加黄芪的腹透液对腹膜纤维化大鼠的干预作用,观察黄芪对大鼠腹膜功能和腹膜间皮细胞超微结构的影响。**方法:**SD 大鼠应用含 0.75% 腺嘌呤饲料喂养建立慢性肾衰竭模型,随机分为对照组、模型组和黄芪组。模型组应用高糖乳酸盐腹透液和脂多糖 ip 建立腹膜透析相关性腹膜纤维化动物模型,黄芪组应用黄芪注射液($1, 2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)干预治疗。4 周后采用生化仪检测腹膜超滤功能和腹膜清除率,放射免疫法检测透明质酸(HA)含量;光镜观察腹膜纤维化程度和腹膜间皮细胞结构,透射电镜观察腹膜结构和间皮细胞紧密连接;免疫荧光定量 PCR 方法检测大鼠封闭蛋白-1(ZO-1)和层粘连蛋白(LN)基因的表达。**结果:**模型组与对照组相比,腹透液超滤量、尿素氮清除率明显降低($P < 0.05$),HA 分泌量明显增加($P < 0.01$),光镜和电镜表现为腹膜间皮细胞脱落,间皮下基质明显增厚,炎性细胞浸润,纤维素有物质沉积,相邻间皮细胞间紧密连接消失;RT-PCR 检测也显示 LN 表达明显增加,ZO-1 表达明显减少($P < 0.05$)。黄芪组与模型组比较,腹透液超滤量、尿素氮清除率明显增加($P < 0.05$),光镜和电镜也显示间皮细胞结构基本完整,紧密连接损伤较轻;而 HA 分泌量无明显差异,对 LN 和 ZO-1 表达也无明显影响。**结论:**高糖透析液和炎症因子是导致腹膜纤维化的主要因素,可破坏细胞间的紧密连接,抑制 ZO-1 蛋白的表达。黄芪对于腹膜间皮细胞的结构和功能具有一定的保护作用,但对 ZO-1 表达的影响不显著。

[关键词] 腹膜纤维化;紧密连接;大鼠封闭蛋白-1;黄芪

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0196-04

Effect of Astragalus on Peritoneal Fibrosis in Rats with Injury of Tight Junctions

SHU Jing*, ZHANG Xiao-lu, XU Zhen-yu, WANG Yi

(Yueyang Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the influence of Chinese herb Astragalus on peritoneal structure and function during the peritoneal dialysis especially on tight junction(TJ). **Method:** Ninety-six chronic renal failure (CRF) SD rats were divided into 4 groups: control group (NS), model group(4.25% peritoneal dialysis solution (PDS) and LPS), low Astragalus group ($1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip) and high Astragalus group($2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip). A 2-hour peritoneal equilibration test was performed after 4 weeks. Peritoneal clearance ratio, total protein, and net ultrafiltration volume were determined. Peritoneal membrane histology was evaluated by light microscopy and transmission electron microscopy. Immuno-histochemical staining and reverse transcript-polymerase chain reaction (RT-PCR) techniques were used to investigate zonula occluden-1(ZO-1) and laminin (LN) expression. **Result:** Ultrafiltration volume and BUN clearance rate were remarkably reduced in model group ($P < 0.05$), and the expression of HA concentration was increased ($P < 0.05$). In model group, peritoneal membrane histology showed mesothelial cells detached from peritoneal membrane and matrix accumulation by light microscopy, and destruction of TJ was also showed by transmission electron microscopy. While Astragalus groups showed less injury in the

[收稿日期] 2011-06-27

[基金项目] 上海市教委科研项目(07CZ028)

[通讯作者] *舒静,博士,副主任医师,硕士生导师,从事中西医结合肾病临床和研究, E-mail: drshujing@gmail.com

peritoneal mesothelial cell. Immuno-histochemical staining showed the expression of ZO-1 was lower and the LN was higher in model group, as well as Astragalus group. And the RT-PCR showed the same levels. **Conclusion:** The treatment of Astragalus can improve the function of peritoneal dialysis by protection of peritoneal tissues including peritoneal mesothelial cell and tight junction. However, it doesn't play a significant role in the expression of ZO-1.

[**Key words**] peritoneal fibrosis; tight junction; ZO-1; Astragalus

腹膜纤维化超滤衰竭是临床尿毒症患者退出腹膜透析的主要原因之一,腹膜间皮细胞在腹膜物质转运过程中起着重要的作用。紧密连接(tight junction, TJ)是相邻上皮细胞质膜内蛋白质分子在上皮细胞顶端互相粘连并排列成条索状所形成的网状封闭系统,具有连接和封闭细胞间隙、控制细胞间隙通透性的作用,并在很大程度上决定了细胞间的选择性旁通透能力。封闭蛋白1(zonula occluden-1, ZO-1)作为紧密连接相关蛋白,起着信号转导和介导内皮细胞收缩的机械运动的作用。因此紧密连接的破坏、ZO-1表达的变化可能和腹膜纤维化超滤衰竭存在着一定的联系。本研究观察了腹膜透析液和黄芪对腹膜纤维化模型大鼠紧密连接和ZO-1表达的影响,以探讨长期腹膜透析后导致水和物质转运功能下降的可能机制和黄芪的保护作用。

1 材料

1.1 动物 正常清洁级SD雄性大鼠96只,体重(200±30)g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,许可证号SCXK(沪)2007-0005。

1.2 药品及试剂 黄芪注射液(上海福达制药有限公司,批号080507,含黄芪生药20g/支;4.25%乳酸盐腹透液(广州百特医疗用品有限公司,批号6AB9896),腺嘌呤(上海源聚生物科技有限公司,批号00795788),脂多糖(美国Sigma公司,批号L-2880),兔抗鼠ZO-1试剂(美国USBiological公司),RT-PCR荧光探针和荧光反应试剂(上海达为生物科技有限公司),透明质酸(HA)放免试剂盒(北京普尔伟业公司)。

1.3 仪器 显微镜(日本Olympus公司),TECNAI12透射型电子显微镜(荷兰Philips公司),荧光定量PCR检测仪(美国IBM公司)。

2 方法

2.1 造模、分组和给药 大鼠喂食含0.75%腺嘌呤饲料,10周后尾血检测肾功能,确定慢性肾衰竭模型大鼠制备成功后,随机分组。模型组用4.25%腹膜透析液按照100 mL·kg⁻¹ ip 1次/d,脂多糖稀释为0.6 mg·(100 mL)⁻¹,第8,10,12,22,24,26天按照0.6 mg·kg⁻¹剂量ip 1次/d,以继续制作腹膜

纤维化模型;黄芪低、高剂量组在腹膜透析的同时,在透析液中加入5,10 mL·L⁻¹黄芪注射液(相当于1,2 g·kg⁻¹),仍按100 mL·kg⁻¹ ip,1次/d;对照组用生理盐水ip。每次注射液体均腹腔内保留。

2.2 观测指标和检验方法 腹膜透析28d后,先采用腹膜平衡试验计算超滤量,并留取腹腔引流液和血液标本送检,然后进行杀检,留取壁层腹膜和脏层腹膜组织做相关指标检测。

2.2.1 血液和腹膜透析液的留取和检测 各组大鼠ip 4.25%腹透液30 mL,保留1个透析周期(2h)后,以2%戊巴比妥麻醉,用16G医用注射器针头穿刺大鼠左下腹引流,以计量管计量,送检BUN,蛋白,HA含量。留取引流液,计算超滤量和腹膜清除率,同时断尾取血或下腔静脉穿刺取血3 mL作生化检测。

超滤量 = 引流液总量 - 灌入液总量

清除率 = D/P × V/T

D:腹腔引流液物质含量 P:静脉血中物质含量

V:腹腔引流液总量 T:透析周期时间

2.2.2 腹膜组织标本的留取、保存 大鼠沿腹白线剪开腹壁,取壁层腹膜组织分别置于10%福尔马林固定液、2.5%戊二醛固定液中4℃冰箱保存、液氮保存后转于-70℃冰箱冻存。

2.2.3 腹膜组织检查 取20 mm × 10 mm腹膜标本,常规制片,HE染色,光镜下观察。

2.2.4 腹膜组织电镜检查 取5 mm × 5 mm腹膜标本,2.5%戊二醛和1%锇酸双固定,梯度乙醇脱水,环氧树脂618包埋,超薄切片,醋酸铀和枸橼酸铅双重染色,透射电子显微镜观察。

2.2.5 荧光定量PCR法检测腹膜组织ZO-1和层粘连蛋白(LN)基因表达 细胞总RNA的抽提:标本用Trizol预冷、清洗匀浆后加入氯仿,振荡离心,再加入异丙醇2次离心,洗涤、烘干。经紫外分光光度仪测定各总RNA的吸光度(A₂₆₀),并将所有样本稀释成相同浓度后-20℃冰箱保存待用。

逆转录cDNA:试剂盒复融,将5×逆转录buffer, dNTPs, MMLV, ZO-1上游引物:5'-CCGAGGGCCCACTAAAGG-3', ZO-1下游引物:5'-

GCTGTTGAAGTCACAGGAGACAA-3'。LN 上游引物: 5'-GCTACTGAGTGGGTTGGAGC-3', LN 下游引物: 5'-CTGCAGGTCGACGATTCTTT-3', 10 000 r · min⁻¹, 数秒。将经过稀释后的 RNA 样本进行 RT, 反应体系总体积 20 μL; 反应条件: 37 °C, 1 h。95 °C, 5 min。灭活 MMLV。

RT-PCR 反应: 将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增, 扩增条件: 50 °C 2 min; 95 °C 5 min; 95 °C 15 s; 60 °C 45 s; 40 个循环。

仪器检测后, 数据采用仪器自带软件分析 (ABI Prism 7000 SDS Software)。结果以 CT 值表示, CT 值越高表示 RNA 表达量越少。

2.3 统计方法 应用 SPSS 13.0 统计软件包进行

表 1 黄芪对腹透超滤量、腹膜清除率和 HA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g · kg ⁻¹	n	超滤量 /mL	尿素氮清除率 /mL · min ⁻¹	蛋白漏出量 /g · mL ⁻¹	HA /ng · mL ⁻¹
对照	-	14	14.14 ± 2.98 ²⁾	0.063 ± 0.016 ¹⁾	2.25 ± 0.66	614.69 ± 248.45 ²⁾
模型	-	12	6.67 ± 3.20	0.039 ± 0.019	1.72 ± 0.86	1888.93 ± 571.48
黄芪	1	13	12.23 ± 3.00 ²⁾	0.058 ± 0.015 ¹⁾	2.31 ± 0.78	1 989.87 ± 692.56
	2	12	11.67 ± 3.45 ¹⁾	0.060 ± 0.019 ¹⁾	2.28 ± 0.87	1 847.21 ± 636.58

注: 与模型组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01 (表 2 同)。

3.2 腹膜组织结构观察

3.2.1 光镜检查 对照组腹膜间皮细胞细胞排列紧致、整齐; 模型组出现不同程度腹膜层增厚、腹膜间皮细胞脱落、间皮下基质明显增厚、结缔组织松

数据统计处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用方差分析。方差齐采用 LSD 法, 方差不齐采用 Tamhane 法。相关性分析, 正态采用皮尔逊法, 非正态采用斯皮尔曼法。P < 0.05 为有显著性差异。

3 结果

3.1 腹膜功能的检测 造模 4 周后, 与对照组相比, 模型组腹膜超滤量、尿素氮清除率明显减少; 与模型组相比, 黄芪低、高剂量组腹膜超滤量、尿素氮清除率明显升高 (P < 0.01, P < 0.05)。各组腹膜蛋白漏出量无统计学差异。模型组 HA 分泌量与对照组相比明显增多 (P < 0.01), 黄芪组与模型组相比未见明显改善。见表 1。

散, 大量成纤维样细胞及单核、巨噬细胞浸润, 且有纤维素样物质沉积; 黄芪组腹膜组织腹膜层增厚仍有, 部分腹膜间皮细胞排列不整齐并有脱落, 但是间皮下基质轻度增厚, 细胞浸润情况不显著。见图 1。

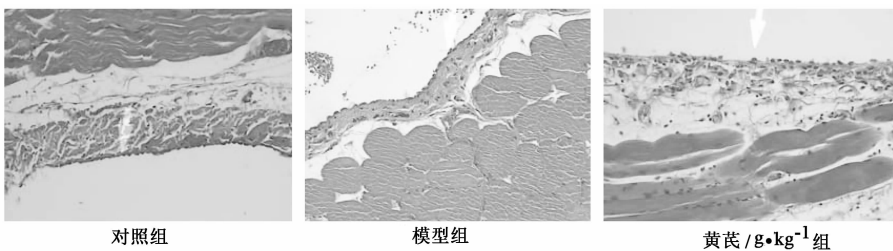


图 1 黄芪对模型大鼠腹膜组织病变的影响 (HE, ×200)

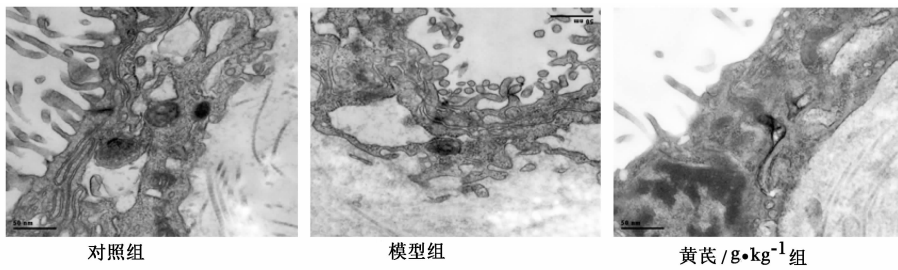
3.2.2 电镜检查 对照组腹膜间皮细胞结构完整, 细胞游离面微绒毛分布均匀, 相邻间皮细胞间近游离面处紧密连接完整; 模型组间皮细胞胞质疏松, 细胞表面不连续, 微绒毛减少甚至消失, 细胞核异染色质边集、凝固, 相邻间皮细胞间紧密连接模糊甚至消失。黄芪组腹膜间皮细胞结构破坏程度和紧密损伤程度明显减轻, 见图 2。

3.3 腹膜间皮细胞 ZO-1 和 LN 基因表达 造模 4 周后, 模型组与对照组相比较, ZO-1 的基因表达明

显减少, LN 的基因表达明显增加 (P < 0.05); 黄芪组与模型组相比, ZO-1 和 LN 的基因表达虽有所改善, 但无统计学差异, 见表 2。

4 讨论

长期应用商用含糖乳酸盐葡萄糖腹膜透析液进行腹膜透析会引起腹膜纤维化, 从而导致腹膜结构和功能的丧失, 这是临床尿毒症患者退出腹膜透析的主要原因之一^[1]。本研究联合 2 个经典动物模型制备方法^[2-3], 完成了 CRF 腹膜纤维化动物模型制

图2 黄芪对模型大鼠腹膜组织病变的影响(透射电镜 $\times 26\ 500$)表2 黄芪对ZO-1, LN基因在大鼠腹膜中表达的影响($\bar{x} \pm s$) CT

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	n	ZO-1	LN
对照	-	14	24.29 \pm 0.48 ¹⁾	27.72 \pm 0.90 ¹⁾
模型	-	12	26.09 \pm 0.63	25.45 \pm 0.61
黄芪	1	13	25.29 \pm 0.96	26.03 \pm 0.92
	2	12	25.32 \pm 0.67	25.93 \pm 1.16

备。病理学检测发现模型组腹膜组织出现不同程度的腹膜纤维化现象;在腹膜功能的检测中,模型组腹透液超滤量、尿素氮清除率与对照组比较明显减少,HA和LN与对照组比较明显增加。表明高糖和炎症因子可导致腹膜纤维化,严重损害腹膜结构和功能,降低液体超滤和小分子物质的清除能力,也使作为细胞受损标志的HA分泌和细胞纤维化程度的标志LN分泌明显增加。

TJ作为相邻上皮细胞间最重要的连接方式,除了单纯连接上皮细胞,增强上皮细胞的黏附能力之外,更具有封闭细胞间隙、控制细胞间隙通透性的作用^[4,6]。ZO-1作为紧密连接相关蛋白,对于紧密连接的形起着装配平台作用,同时又作为细胞骨架的桥梁,起着信号转导和介导内皮细胞收缩的机械运动的作用^[6]。既往研究发现,腹透液中高浓度葡萄糖及加热后产生的葡萄糖降解产物可引起人腹膜间皮细胞内的ZO-1表达减少,使细胞间连接松懈^[7]。本研究结果发现,腹膜纤维化模型大鼠腹膜组织TJ结构模糊甚至消失,PCR结果显示ZO-1表达明显减少($P < 0.05$),提示腹膜间皮细胞破坏、腹膜渗透压梯度的维持障碍可能与TJ的结构、ZO-1表达量或结构的变化存在着一定联系。

黄芪应用于腹膜透析液中的临床和实验研究已经广泛报道。本研究资料显示,在腹膜功能检测中,添加黄芪的透析组超滤量、尿素氮清除率明显升高,和对照组比较已无明显差异;光镜、电镜显示黄芪组间皮细胞结构和细胞间紧密连接损伤较透析组轻,

RT-PCR显示黄芪组LN表达较模型组有一定程度减少。提示黄芪注射液可部分拮抗腹透液对腹膜结构和功能的负面影响,其可能的作用机制是维持腹膜间皮细胞数目和功能的稳定、延缓腹膜间皮细胞纤维化进程。而黄芪组ZO-1的表达有一定程度的提升,但和模型组比较无统计学差异。故黄芪对紧密连接的作用尚无法确定。由此推测,在腹膜纤维化的发生机制中,ZO-1结构的改变可能比其表达量的改变更为重要。

[参考文献]

- [1] 卓莉,李军,李岩,等.葡萄糖透析液与腹膜纤维化[J].国外医学:泌尿系统分册,2003,23(6):724.
- [2] 卓莉,刘伏友,彭佑铭,等.一种新型腹膜纤维化大鼠模型的构建[J].中华肾脏病杂志,2005,21(8):495.
- [3] 杜卉莲,傅晓晴.慢性肾衰动物的模型制备及临床应用[J].中医研究,2005,12(12):53.
- [4] González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, et al. Tight junction proteins [J]. Prog Biophys Mol Biol, 2003, 81(1):1.
- [5] Raschperger E, Engstrom U, Pettersson R F, et al. CLMP, a novel member of the CTX family and a new component of epithelial tight junctions [J]. J Biol Chem, 2004, 279:796.
- [6] Neunlist M, Toumi F, Oreschkova T, et al. Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003, 285: 1028.
- [7] Gonzalez-Mariscal L, Namorado M C, Martin D, et al. Tight junction proteins ZO-1, ZO-2 and Occludin along isolated renal tubules [J]. Kidney Int, 2000, 57(6):2386.

[责任编辑 何伟]