

肾疏宁方对腹膜纤维化大鼠腹膜组织 细胞外基质积聚的影响

杨洪涛¹ 尚懿纯² 曹式丽¹ 窦一田¹ 黄 勇²

摘要 目的 观察中药肾疏宁方对腹膜纤维化大鼠腹膜功能、腹膜组织细胞外基质(extracellular matrix, ECM)积聚、转化生长因子 β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF- β_1) 及基质金属蛋白酶抑制剂-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1) 表达的影响。**方法** 采用腹膜透析液加红霉素注射法诱发 SD 大鼠腹膜透析腹膜纤维化模型, 依体重随机分为 4 组, 1.50% 腹膜透析液模型组(B 组)、1.5% 腹膜透析液加肾疏宁方干预组(C 组)、4.25% 腹膜透析液模型组(D 组) 及 4.25% 腹膜透析液加肾疏宁方干预组(E 组), 每组各 15 只, 另设空白对照组(A 组, 15 只)。C 组及 E 组予肾疏宁方[43.93 g/(kg·d)]灌胃, A、B、D 组予等量生理盐水灌胃。检测腹腔液葡萄糖浓度, 计算超滤量(ultra filtration volume, UF) 及葡萄糖转运量(mass transfer of glucose, MTG)。观察腹膜病理形态学改变, 分析腹膜胶原纤维分布、纤维母细胞计数、I 型胶原(collagen I, Col I) 及 TGF- β_1 、TIMP-1 表达。**结果** 治疗第 6 周末, C 组及 E 组腹膜透析腹膜纤维化大鼠 UF 分别为(-3.3 ± 14.2) mL、(-2.0 ± 10.7) mL, MTG 分别为(18.1 ± 0.8) mmol/kg、(16.1 ± 1.2) mmol/kg, 腹膜胶原纤维分布分别为($4\ 721.3\% \pm 541.0\%$)、($6\ 502.7\% \pm 877.4\%$), 纤维母细胞分别为(0.087 ± 0.010) 个/mm²、(0.131 ± 0.042) 个/mm², Col I 分别为($187.5\% \pm 36.9\%$)、($289.7\% \pm 95.6\%$), TIMP-1 分别为($2.57\% \pm 0.94\%$)、($3.63\% \pm 0.29\%$), TGF- β_1 分别为(104.0 ± 20.7) ng/L、(108.2 ± 17.5) ng/L, 与同浓度透析液组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 肾疏宁方可能通过抑制 TGF- β_1 、TIMP-1 表达, 阻抑 ECM 过度积聚, 进而延缓腹膜透析大鼠腹膜纤维化进展。

关键词 腹膜纤维化; 肾疏宁方; 细胞外基质; 转化生长因子- β_1 ; 基质金属蛋白酶抑制剂-1

Effect of Shenshuning Recipe on the Extracellular Matrix Accumulation of the Peritoneal Fibrosis Rats YANG Hong-tao¹, SHANG Yi-chun², CAO Shi-li¹, DOU Yi-tian¹, and HUANG Yong² ¹ Department of Nephrology, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin (300193), China; ² Graduate School, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin (300193), China

ABSTRACT Objective To observe the effect of Shenshuning Recipe (SR) on the peritoneal function, accumulation of extracellular matrix (ECM), and the expression of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in the peritoneal fibrosis rats. **Methods** The peritoneal fibrosis correlating peritoneal dialysis SD rat model was induced by injecting erythromycin and peritoneal dialysate. They were randomly divided into 4 groups according to body weight, i.e., the 1.50% peritoneal dialysate group (Group B), the 1.50% peritoneal dialysate + SR group (Group C), the 4.25% peritoneal dialysate group (Group D), and the 4.25% peritoneal dialysate + SR group (Group E), 15 in each group. Besides, another 15 rats was taken as the blank control group ($n = 15$, Group A). SR at the daily dose of 43.93 g/kg was given to rats in Group C and E by gastrogavage, while equal volume of normal saline was given to rats in other groups by gastrogavage. The changes of glucose in the peritoneal fluid were detected. The ultra filtration volume (UF) and mass transfer of glucose (MTG) were calculated. The pathomorphological changes of the peritoneum were observed. The distribution of collagen fiber, fibro-

基金项目:天津市自然科学基金资助项目(No. 10JCYBJC12100)

作者单位:1. 天津中医药大学第一附属医院肾内科(天津 300193); 2. 天津中医药大学研究生院(天津 300193)

通讯作者:杨洪涛, Tel: 022-27432457, E-mail: tjcmht@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2013.12.1683

blast count, collagen I (Col I), expressions of TIMP-1 and TGF- β_1 were determined. Results At the end of the 6th week, statistical difference was shown in UF [(-3.3 ± 14.2) mL] and [(-2.0 ± 10.7) mL], MTG [(18.1 ± 0.8) mmol/kg] and [(16.1 ± 1.2) mmol/kg], collagen fiber [(4 721.3 ± 541.0)%] and [(6 502.7 ± 877.4)%], fibroblast [(0.087 ± 0.010)/mm²] and [(0.131 ± 0.042)/mm²], Col I [(187.5 ± 36.9)%] and [(289.7 ± 95.6)%], TIMP-1 [(2.57 ± 0.94)%] and [(3.63 ± 0.29)%], and TGF- β_1 [(104.0 ± 20.7) ng/L] and [(108.2 ± 17.5) ng/L] between Group C and Group E, when compared with the peritoneal dialysate group at the same concentration ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion SR could postpone the development of peritoneal fibrosis in peritoneal dialysis SD rats possibly through inhibiting expressions of TGF- β_1 and TIMP-1, and hindering the over-accumulation of ECM.

KEYWORDS peritoneal fibrosis; Shenshuning Recipe; extracellular matrix; transforming growth factor- β_1 ; tissue inhibitor of metalloproteinase-1

腹膜透析(peritoneal dialysis, PD)是终末期肾功能衰竭(end-stage renal failure, ESRF)的主要治疗手段之一。但由于腹膜透析液中的高糖、低 pH 值等介导腹膜纤维化(peritoneal fibrosis, PF)而最终导致的腹膜超滤衰竭已成为患者退出 PD 的重要原因^[1]。临床观察表明中药肾疏宁方在抗纤维化具有积极作用^[2]。而目前认为 PF 病变进程中,腹膜组织基质过度沉积是 PF 的特征之一^[3]。研究显示转化生长因子 β_1 (transforming growth factor beta₁, TGF- β_1)作为一种多功能的细胞因子,高浓度葡萄糖透析液通过其活化刺激腹膜间皮细胞转分化^[4]于 PF 进程中发挥关键性作用^[5]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)及其抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)系统是重要的基质降解调控系统,而 TIMP-1 表达失衡参与了 PF 进程^[6]。因此,本研究以 PF 大鼠模型为研究对象,探讨肾疏宁方对腹膜透析 PF 大鼠 TGF- β_1 及 TIMP-1 表达的影响,观察肾疏宁方干预 PF 进展的效果及其可能机制,以期寻找可有效阻抑 PF 进展的中医药干预途径。

材料与方法

1 动物 2 月龄雄性 SD 大鼠 75 只,中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心提供,体重(180 ± 20)g, SPF/ VAF 级,合格证号 SCXK(津)2005-0001。于天津中医药大学第一附属医院动物实验中心适应性饲养 1 周:12 h 光照、室温 24 ℃、45% 相对湿度,普通饲料喂养,自由进水。

2 药物、试剂及仪器 肾疏宁方主要由柴胡 15 g 黄芩 10 g 生黄芪 30 g 山茱萸 12 g 扁蓄 15 g 白花蛇舌草 30 g 丹参 30 g 益母草 30 g 鬼箭羽 30 g 组成,饮片由天津中医学院第一附属医院

提供;煎剂由天津中医学院药厂加工,水煎浓缩至每毫升煎液含生药 3.53 g/mL,装入瓶中密封,4 ℃ 冰箱保存待用。药物采购及加工均由天津中医药大学药厂协助完成,经天津市药品检验所核定。1.50% 腹膜透析液、4.25% 腹膜透析液购自 Baxter 医疗有限公司,批号:G1209303, G1105234。乳糖酸红霉素:0.25 g/瓶,江西赣南海欣药业股份有限公司提供,批号:11061912;I 型胶原抗体(Abcam ab-6586)、TIMP-1 抗体(Stanta sc-5538);SP-9001 免疫组化染色试剂盒(天津灏洋 SP-9001);TGF- β_1 ELISA 试剂盒均购自天津市灏洋生物科技有限公司。HMIAS-2000 高清晰度彩色病理图像分析系统。

3 造模、分组及干预方法 取 75 只健康雄性 SD 大鼠,依体重分层,随机分为对照组(15 只)和造模组(60 只)。参考卓莉等^[7] PF 造模方法。A 组(正常对照组):无任何处理,腹腔注射生理盐水[100 mL/(kg·d)],连续 6 周;B 组:腹腔注射 1.50% 腹膜透析液[100 mL/(kg·d)],并于造模第 7、14、21、28 天加入红霉素 6.25 万 IU,连续 6 周。C 组:腹腔注射 1.5% 腹膜透析液[100 mL/(kg·d)],并于造模第 7、14、21、28 天加入红霉素 6.25 万 IU,同时予灌服肾疏宁方,连续 6 周;D 组:腹腔注射 4.25% 腹膜透析液[100 mL/(kg·d)],并于造模第 7、14、21、28 天加入红霉素 6.25 万 IU,连续 6 周;E 组:腹腔注射 4.25% 腹膜透析液[100 mL/(kg·d)],并于造模第 7、14、21、28 天加入红霉素 6.25 万 IU,同时予灌服肾疏宁方,连续 6 周。自造模开始,C 组和 E 组,予灌服肾疏宁方,灌胃剂量按 43.93 g/(kg·d)灌胃^[8]。其余各组予等量生理盐水,共灌服 6 周。实验全程给予普通饲料喂养,自由进水。造模成功率 90%。实验过程中因腹腔注射刺激大血管死亡、灌胃误入呼吸道及不明原因死亡共 6 只,其中 B 组 1 只, C 组 1 只, D 组 2 只, E 组 2 只。

4 检测指标及方法

4.1 腹膜功能学指标 各组大鼠于造模第 6 周末行腹膜功能试验。10% 水合氯醛麻醉大鼠,腹腔注射 4.25% 透析液 25 mL,4 h 抽取腹腔液体量,再次麻醉大鼠,打开腹腔,将已消毒并称重的干纱布置入以吸取未抽净的腹腔液体,后再称取纱布质量。同时分别留取腹透液标本并离心(1 500 r/min,5 min),全自动生化分析仪测定实验动物葡萄糖浓度,并计算每只大鼠的超滤量(ultra filtration volume,UF)及葡萄糖转运量(mass transfer of glucose,MTG)。具体计算公式如下:UF=(纱布吸水后的质量-纱布的质量)×1 L/g+引流量-腹腔注射量;MTG(mmol/kg)=(透析液初始葡萄糖浓度×注入透析液体积)-(透析末葡萄糖浓度×终末透析液出量)。

4.2 病理形态学观察 于造模第 6 周末脊椎脱臼法处死大鼠,距大鼠腹腔切开部位右侧约 3 cm 处取上腹部壁层腹膜留取壁层腹膜标本(沿腹中线两侧上、中避开穿刺部位取材)置 4% 多聚甲醛中固定 6 h,PBS 洗涤后过夜,次日常规石蜡包埋切片 2 μm,行 Masson 染色,观察腹膜形态改变、胶原纤维分布及纤维母细胞计数。胶原纤维分布具体步骤如下^[9]:每张切片于 100 倍镜下选取 5 个不重叠视野,以蓝色为阳性信号,每个视野分 5 处测量,采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统对所采图像进行分析,测量其阳性信号强度的平均积分光密度(Integrated OD total,IOD),取平均值作为标本所检测指标的半定量测量值;纤维母细胞计数^[10]:每张切片于 400 倍镜下选取 5 个不重叠视野,每个视野分 5 处计数纤维母细胞数,取平均值作为腹膜纤维母细胞计数值。

4.3 I 型胶原(collagen I,Col I)及 TIMP-1 检测 免疫组化 SP 法检测腹膜组织细胞外基质(extracellular matrix,ECM)成分 Col I 及 TIMP-1 表达。于标本切片中随机选取上、下、左、右、中各 2 个视野,于 400 倍镜下采集 Col I 着色图像,采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统对所采图像进行分析,测量其阳性信号强度的 IOD,取平均值作为标本所测 Col I 的半定量测量值;于 400 倍镜下采集腹膜组织 TIMP-1 着色图像,采用 HMIAS-2000 病理图像分析系统,测量反应物信号总面积、面积比,取平均值作为标本所测 TIMP-1 的半定量测量值。

4.4 血清 TGF-β₁ 含量检测 采用 ELISA 法。标准品的稀释与加样:酶标包被板上设标准孔 10 孔,于 1、2 孔中分别加标准品 100 μL,而后于 1、2 孔中加标准品稀释液 50 μL,混匀;然后从 1、2 孔中各取

100 μL 分别加到 3、4 孔,再在 3、4 孔分别加标准品稀释液 50 μL,混匀;然后于 3、4 孔先各取 50 μL,混匀;混匀后从 5、6 孔各取 50 μL,分别加到 7、8 孔中,再从 7、8 孔分别加标准品稀释液 50 μL,混匀;再从 7、8 孔分别取 50 μL,加到 9、10 孔,再从 9、10 孔分别加标准品稀释液 50 μL,混匀后从 9、10 孔中各取 50 μL 弃掉(稀释后各孔加样量均为 50 μL,浓度分别为 120、80、40、20、10 ng/L。加样:分别设置空白孔(空白对照孔不加样品及酶标试剂,其余各步骤操作相同)、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μL,然后再加待测样品 10 μL(样品最终稀释度为 5 倍)。加样将样品加于酶标板孔底部,尽量不触及孔壁,轻晃混匀。温育:用封板膜封板后置 37 °C 温育 30 min。配液:将 30 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30 倍稀释备用。洗涤:揭去封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置 30 s 后弃去,如此重复 5 次,拍干。温育,步骤同前;洗涤,步骤同前;显色:每孔先加入显色剂 A 50 μL,空白孔除外。终止:每孔加终止液 50 μL,终止反应(此时蓝色转为黄色)。测定:以空白孔调零,450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(OD 值)。测定应在终止液后 15 min 内进行。

5 统计学方法 应用 SPSS 11.5 统计软件,各组实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用 *t* 检验,组间比较采用单因素方差分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组干预后 UF 及 MTG 比较(表 1) 干预后 B、C、D、E 组呈现负超滤,与 A 组比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05),但应用肾疏宁方干预组其超滤情况及 MTG 明显优于同浓度透析液组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

表 1 各组干预后 UF 及 MTG 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	浓度	UF (mL)	MTG (mmol/kg)
A	15	—	5.7 ± 1.2	18.6 ± 0.5
B	14	1.50% 腹膜透析液	-17.1 ± 4.9*	17.9 ± 1.0*
C	14	1.50% 腹膜透析液 + 肾疏宁	-3.3 ± 14.2 [△]	18.1 ± 0.8 [△]
D	13	4.25% 腹膜透析液	-13.8 ± 12.0*	14.0 ± 1.6*
E	13	4.25% 腹膜透析液 + 肾疏宁	-2.0 ± 10.7 [▲]	16.1 ± 1.2 [▲]

注:与 A 组比较,**P* < 0.05;与 B 组比较,[△]*P* < 0.05;与 D 组比较,[▲]*P* < 0.05。

2 各组腹膜胶原纤维分布比较(表 2,图 1) B、C、D、E 组腹膜胶原纤维均较 A 组增加,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。C 组腹膜纤维增幅最小;D 组腹膜增幅最大,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。

表 2 各组大鼠腹膜胶原纤维分布比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	浓度	胶原纤维分布(%)
A	15	—	2 079.5 ± 332.2
B	14	1.50% 腹膜透析液	6 276.0 ± 491.9*
C	14	1.50% 腹膜透析液 + 肾疏宁	4 721.3 ± 541.0 [△]
D	13	4.25% 腹膜透析液	9 502.6 ± 347.1* ^{△▲}
E	13	4.25% 腹膜透析液 + 肾疏宁	6 502.7 ± 877.4 ^{▲○}

注:与 A 组比较,* $P < 0.05$;与 B 组比较,[△] $P < 0.05$;与 C 组比较,[▲] $P < 0.05$;与 D 组比较,[○] $P < 0.05$

表 3 各组大鼠腹膜纤维母细胞计数比较 (个/mm², $\bar{x} \pm s$)

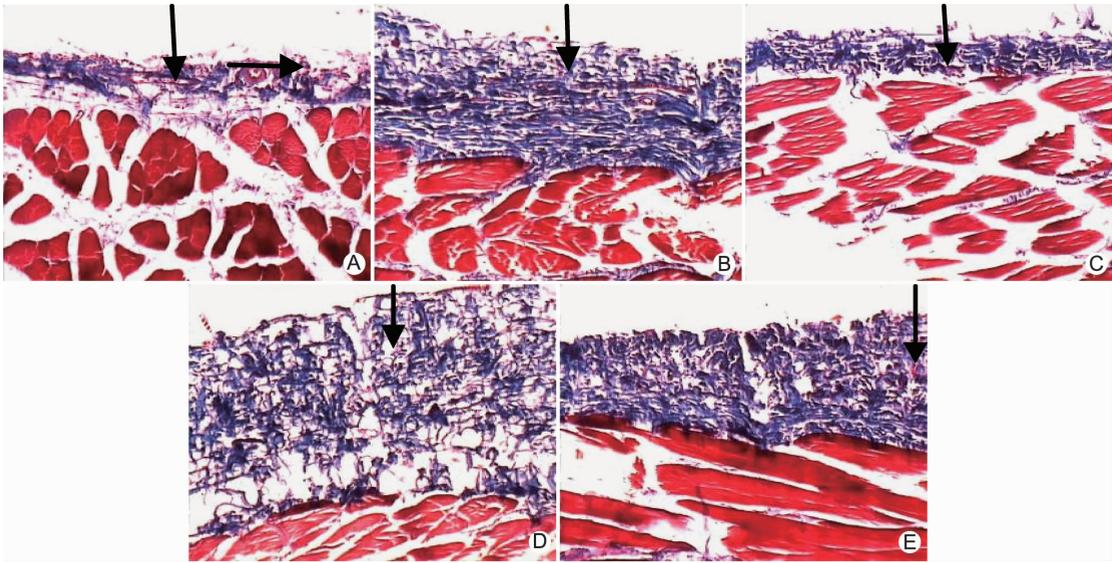
组别	n	浓度	纤维母细胞计数(个/mm ²)
A	15	—	0.051 ± 0.013
B	14	1.50% 腹膜透析液	0.122 ± 0.011* ^{△▲}
C	14	1.50% 腹膜透析液 + 肾疏宁	0.087 ± 0.010
D	13	4.25% 腹膜透析液	0.183 ± 0.090* [△]
E	13	4.25% 腹膜透析液 + 肾疏宁	0.131 ± 0.042* ^{△▲}

注:与 A 组比较,* $P < 0.05$;与 C 组比较,[△] $P < 0.05$;与 D 组比较,[▲] $P < 0.05$

3 各组大鼠腹膜纤维母细胞计数比较(表 3,图 2) B、D、E 组纤维母细胞计数均较 A 组增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。其中 C 组增幅最小,与 B、D、E 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);D 组增

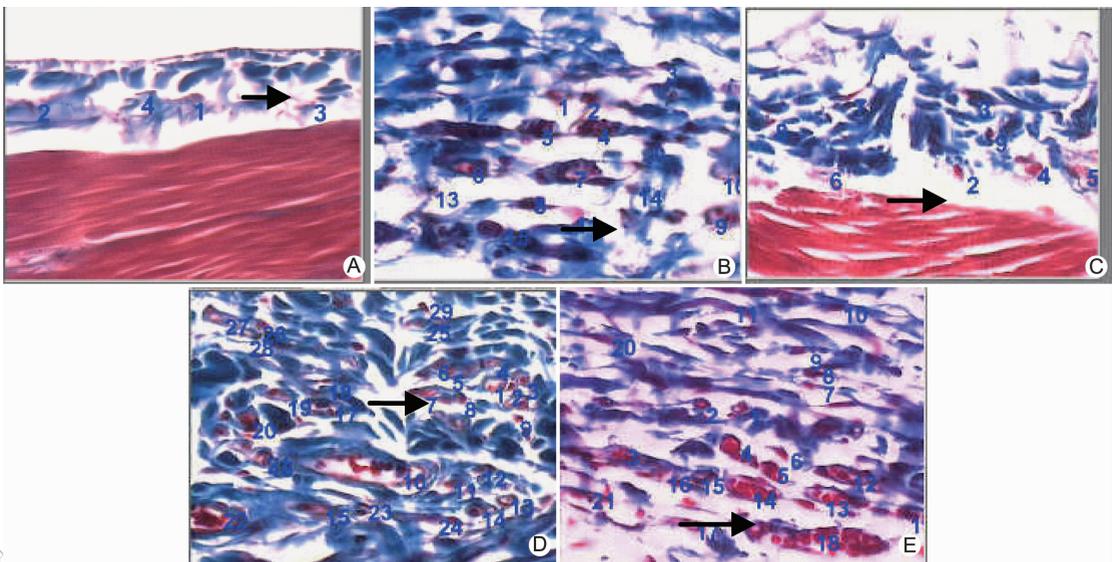
幅最大,与 B、C、E 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);B、E 组间纤维母细胞计数近似($P > 0.05$)。

4 各组壁层腹膜组织 Col I、TIMP-1 及 TGF- β_1 比较(图 3,表 4) A 组未见棕黄色阳性物质表达。



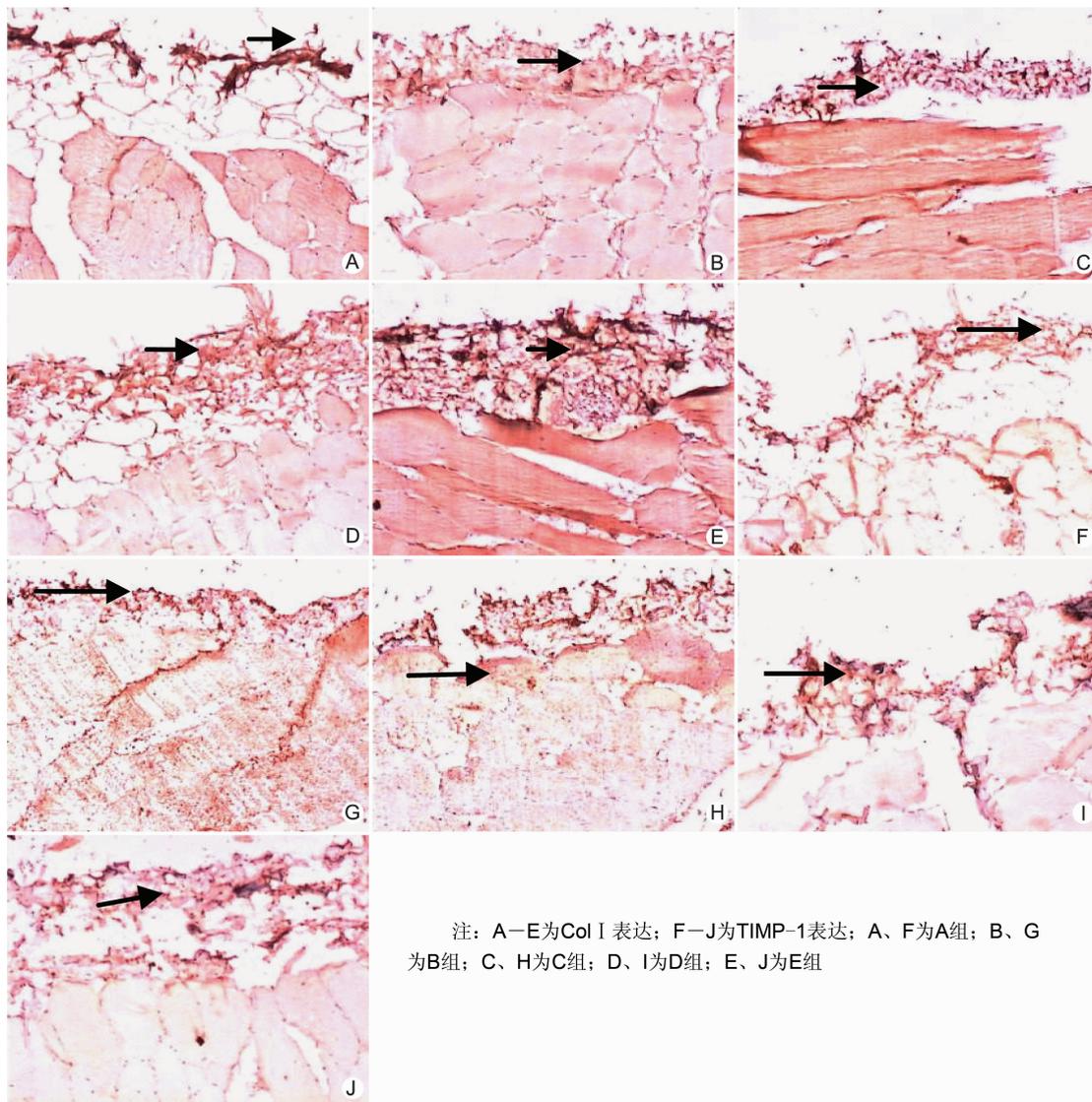
注:A、B、C、D、E 分别为 A、B、C、D、E 组;箭头指示为胶原纤维;下图同

图 1 各组病理形态学结果 (Masson, ×100)



注:图中数字为计数纤维母细胞数

图 2 各组大鼠腹膜纤维母细胞计数 (Masson, ×400)



注：A—E为Col I 表达；F—J为TIMP-1 表达；A、F为A组；B、G为B组；C、H为C组；D、I为D组；E、J为E组

图3 各组壁层腹膜组织 Col I、TIMP-1 表达 (免疫组化染色, ×100)

表4 各组壁层腹膜组织 Col I、TIMP-1 及 TGF-β₁ 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	浓度	Col I (%)	TIMP-1 (%)	TGF-β ₁ (ng/L)
A	15	—	121.6 ± 28.9	1.31 ± 0.24	69.8 ± 16.4
B	14	1.50% 腹膜透析液	307.3 ± 51.3 * ^{△△}	3.26 ± 0.47 * ^{△△}	115.9 ± 14.2 * ^{△△}
C	14	1.50% 腹膜透析液 + 肾疏宁	187.5 ± 36.9	2.57 ± 0.94	104.0 ± 20.7
D	13	4.25% 腹膜透析液	417.2 ± 75.3 * [△]	5.42 ± 0.23 [△]	231.5 ± 19.7 [△]
E	13	4.25% 腹膜透析液 + 肾疏宁	289.7 ± 95.6 ^{△△}	3.63 ± 0.29 * ^{△△}	108.2 ± 17.5 ^{△△}

注：与 A 组比较, * $P < 0.05$; 与 C 组比较, [△] $P < 0.05$; 与 D 组较, ^{△△} $P < 0.05$

B、D、E 组均可见棕黄色阳性物质表达,与 A 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。其中,D 组呈强阳性表达,与其他组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。B、E 组 TIMP-1、B 组 TGF-β₁ 表达均较 A 组增加($P < 0.05$)。C 组增长幅度最小,D 组则最大,与其他组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);伴随透析液浓度提高,单纯腹膜透析液组较干预组 TIMP-1、TGF-β₁ 表达量显著提高($P < 0.05$)。

讨 论

PF 是导致腹膜超滤衰竭的重要原因。病理学研究认为,PF 具有腹膜间皮细胞脱落,细胞间隙增宽,胶原纤维表达增加、排列紊乱等形态特点^[11]。特别是以 Col I 等为代表的胶原物质是 ECM 中表达最为丰富的结构蛋白,其过量表达显著加速纤维化进展。同时,当腹膜受损后,可吸引纤维母细胞聚集。纤维母细胞

不仅可分泌前炎症细胞因子,亦可分泌胶原成分参与构成 ECM 及纤维溶解抑制因子,从而加速纤维化^[12]。因此,干预 Col I 的过度积聚是现阶段 PF 研究还待解决的关键性问题之一。相关基础研究表明, MMPs 及其抑制剂 TIMPs 是重要的 ECM 降解调控系统。目前,已知 MMPs 可降解除多糖外的各种 ECM 成分。而 Col I 的降解受 MMP-1 及其特异性抑制剂 TIMP-1 的调控^[13]。当腹膜处于高糖条件下时,引起 Col I 降解酶系 MMP-1/TIMP-1 的表达失衡^[14],使腹膜间皮细胞 TIMP-1 表达上调^[15],从而增加 Col I 的表达。而以往研究表明,糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)作为重要毒素滞留于尿毒症患者体液中。而当尿毒症患者腹膜透析时,大量葡萄糖经腹膜吸收,产生葡萄糖降解产物及活性碳族加速腹膜 AGEs 形成,使其在血循环和组织中加速积累。大量积聚蓄积的 AGEs 可上调促进 ECM 积聚与组织硬化最为关键的细胞因子——TGF- β_1 ,在其刺激下,腹膜间皮细胞变长并加强基质蛋白的分泌及基质蛋白受体合成;活化成纤维细胞,促进胶原纤维沉积,加重 PF 与粘连;上调腹膜间皮细胞纤维蛋白溶酶原活化物抑制物 PAI-1 表达,抑制 ECM 降解;诱导并长期保持间皮细胞间叶转分化从而加剧 PF^[16,17];而 TGF- β_1 表达的上调又可促进 TIMP-1,继而刺激腹膜的血管生成。上述研究内容说明 TGF- β_1 及 TIMP-1 表达失衡导致 ECM 成分 Col I 表达增多,继而引起腹膜结构和功能改变。

肾疏宁方系经天津中医药大学第一附属医院肾脏科多年临床实践研究,筛选组合而成的具疗效优势的中药复方,药物应用柴胡、黄芩枢利少阳,通利三焦;生黄芪、益母草、山萸肉益气养阴,滋补肝肾。以丹参、鬼箭羽、白花蛇舌草等清热活血利湿解毒。药理学研究证实:柴胡、黄芩联合使用,可通过下调 TGF- β_1 的表达来减少 ECM 的合成、促进其分解,最终达到抗纤维化的作用^[18]。黄芪可抑制腹膜间皮细胞紧密连接,维持其结构完整性,并调控间皮细胞间充质转分化及抑制 TGF- β_1 的诱导作用^[19]。山萸肉多糖使 p16 表达水平下降,恢复 CDK4 催化的转录抑制因子 Rb 蛋白的磷酸化,从而释放与 Rb 蛋白结合的转录活化因子 E2F1^[20],对抗 TGF- β_1 。益母草等养阴药物具有改善局部血流,增强纤溶活性,阻抑免疫反应,抗纤维化等综合作用^[21]。丹参能够调控腹膜组织 TGF- β_1 表达水平^[22];抑制成纤维细胞增殖和迁移^[23],拮抗腹膜间皮细胞衰老凋亡,减轻腹膜间皮层结构损伤,减少 ECM 积聚,维持组织结构

完整^[24,25]。白花蛇舌草、鬼箭羽可有效延缓组织器官纤维化进程^[26]。

本实验结果显示,经肾疏宁方干预后,大鼠腹膜组织病理改变进程显著延缓,胶原纤维分布及纤维母细胞数量明显低于各同浓度单纯透析液组。免疫组化检测表明各中药组 Col I 表达量与同浓度单纯腹膜透析大鼠显著下降,其中 1.50% 腹膜透析液加肾疏宁方组改善最为显著,提示肾疏宁方可抑制模型大鼠 ECM 成分表达,进而延缓 ECM 过度积聚。同时,肾疏宁方可有效抑制 TGF- β_1 及 TIMP-1 的高表达。上述实验结果提示,肾疏宁方可能通过干预 TGF- β_1 从而下调 TIMP-1 异常表达以达到抑制 Col I 表达,延缓 PF 大鼠腹膜相关功能学指标及病理形态学改变的目的。尽管本实验初步证实肾疏宁可干预 PF 大鼠病变进程,但结合实验过程及指标检测结果,本实验仍存在缺陷及未明确的干预机制有待进一步探索与完善。对于本实验的模型制备,尽管自上世纪 90 年代首次出现有关制备腹膜透析 PF 动物模型报道^[27],但迄今为止,尚无一种造模方法能够得到研究领域的广泛认可。尽管本实验造模方法参考了新近报道的制备模式,但仍未能有效模拟人类腹膜透析治疗的真实过程,仍有待改进。此外,近年来,由于“以具有极性的上皮细胞转换成具有活动能力、能够在细胞基质间自由移动的间充质细胞为特征”的上皮细胞间充质细胞转分化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)与脏器纤维化的密切联系,EMT 理论日益受到医学领域关注。特别是腹膜间皮细胞 EMT 现象的发现,有理由认为 EMT 系 PF 的起始环节与可逆阶段^[28]。同期相关研究亦证实 TGF- β 系包括腹膜间皮细胞在内的上皮细胞出现 EMT 进而纤维化的重要因素^[29],而 α -平滑肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)与细胞骨架重构则是 EMT 动态演变过程的重要组成部分^[30]。本实验研究结果已证实肾疏宁可有效干预 PF 进展,同时显著下调 TGF- β_1 表达。

参 考 文 献

- [1] Tomino Y. Mechanisms and interventions in peritoneal fibrosis [J]. Clin Exp Nephrol, 2012, 16 (1): 109 - 114.
- [2] 黄怀鹏,牛联改,陈志强,等. 肾疏宁治疗系膜增生性肾炎 30 例临床研究[J]. 山东中医杂志, 2002, 21 (4): 217 - 219.
- [3] 施敏,陈红,钟爱民,等. 长期腹膜透析对尿毒症大鼠腹膜结构的影响[J]. 山东医药, 2010, 50(29): 10 - 12.
- [4] 窦献蕊,余学清,李晓艳. TGF- β_1 及其信号蛋白在大鼠

- 腹膜纤维化模型腹膜组织中的表达及可能作用[J]. 中华医学杂志, 2005, 37(85): 2613-2618.
- [5] Yu MA, Shin KS, Kim JH, et al. HGF and BMP-7 ameliorate high glucose-induced epithelial-to-mesenchymal transition of peritoneal mesothelium [J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(3): 567-581.
- [6] 尚懿纯, 杨洪涛, 曹式丽, 等. 肾疏宁抑制腹膜透析相关性腹膜纤维化的实验研究[J]. 河南中医, 2013, 33(5): 674-677.
- [7] 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): 495-497.
- [8] 张丽芬, 黄文政, 杨洪涛, 等. 肾疏宁调节肾小球硬化细胞因子网络平衡的研究[J]. 中成药, 2007, 29(8): 1133-1136.
- [9] 陶娜娜, 蒋春明, 张苗, 等. 丹参酮 II A 对腹膜透析液诱导的大鼠腹膜组织学变化及 CTGF 表达的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2011, 27(4): 361-365.
- [10] Günal AI, Celiker H, Akpolat N, et al. By reducing production of vascular endothelial growth factor oetrotide improves the peritoneal vascular alterations induced by hypertonic peritoneal dialysis solution [J]. Perit Dial Int, 2002, 22(3): 301-306.
- [11] 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.
- [12] 王立瑞, 黄海东, 蒋更如, 等. 虫草菌液对高糖作用下大鼠腹膜间皮细胞转化生长因子 β_1 和纤维连接蛋白表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2011, 12(6): 493-495.
- [13] 王悦, 何劲松, 辛伐他汀对高糖致人腹膜间皮细胞 I 型胶原、MMP-1 和 TIMP-1 分泌与表达的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2011, 32(6): 449-453.
- [14] Kushiyama T, Oda T, Yamada M, et al. Effects of liposome-encapsulated clodronate on chlorhexidine gluconate-induced peritoneal fibrosis in rats [J]. Nephrol Dial Transplant, 2011, 26(10): 3143-3154.
- [15] 林星辉, 钱家麒. 高糖对基质金属蛋白酶 2 及其抑制剂在人腹膜间皮细胞中表达的影响[J]. 中华肾病杂志, 2003, 19(3): 142-146.
- [16] Segura T, Schmokel H, Hubbell JA. RNA interference targeting hypoxia inducible factor 1 alpha reduces post-operative adhesions in rats [J]. J Surg Res, 2007, 141(2): 162-170.
- [17] Margetts PJ, Bonniand P, Lin L, et al. Transient over-expression of TGF-beta₁ induces epithelial mesenchymal transition in the rodent peritoneum [J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(2): 425-436.
- [18] 谢燕华, 于泳, 陈捷, 柴胡对肝硬化大鼠 α -肌动蛋白及转化生长因子 β_1 表达的影响[J]. 陕西中医, 2011, 3(10): 1423-1424.
- [19] 舒红, 王俭勤, 王雅, 等. 黄芪毛蕊异黄酮对转化生长因子 β_1 诱导内皮细胞转分化的影响[J]. 中华中医药杂志, 2010, 27(3): 753-755.
- [20] 欧芹, 王雅丽, 魏晓东, 等. 山茱萸多糖对 HDF 细胞 β -半乳糖苷酶及 p16 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(2): 325-327.
- [21] 李福民, 熊佩华, 符磊, 等. 活血养阴合剂对大鼠肾小管-间质损害所致慢性肾功能衰竭作用的实验研究[J]. 上海中医药杂志, 1998, 15(11): 42-44.
- [22] 王春梅, 李春玲, 郝丽荣, 等. 丹参对实验性大鼠腹膜纤维化病变的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2009, 10(10): 895-897.
- [23] 曹东维, 张苗, 蒋春明, 等. 丹参酮对高糖诱导的腹膜间皮细胞衰老进程的影响[J]. 东南大学学报(医学版), 2011, 30(6): 837-841.
- [24] 何伟明, 高坤, 周栋, 等. 丹参注射液对腹膜纤维化大鼠腹膜通透性的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2009, 10(12): 1050-1053.
- [25] 蔡鸿福, 侯连兵, 赖乐, 等. 丹参对粘连腹膜成纤维细胞增殖的影响[J]. 中药材, 2011, 34(4): 584-587.
- [26] 张威, 甄仲, 黄文政, 等. 鬼箭羽对 IgAN 肾小球硬化大鼠生化及病理形态学的影响[J]. 深圳中西医结合杂志, 2009, 19(1): 1-7.
- [27] Wieczorowska K, Khanna R, Moore HL, et al. Rat model of peritoneal fibrosis: preliminary observations [J]. Adv Perit Dial, 1995, 11(1): 48-51.
- [28] Aroerira LS, Aguilera A, Sánchez-Tomero JA, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patient's pathologic significance and potential therapeutic interventions [J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(7): 2004-2013.
- [29] Zavadil J, Böttinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions [J]. Oncogene, 2005, 24(37): 5764-5774.
- [30] 邹莎林, 凌光辉, 夏运成, 等. EMT 在腹膜纤维化中的作用及意义[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2009, 10(7): 645-648.