

甘草酸二铵对腹膜透析大鼠腹膜纤维化及结缔组织生长因子的影响

王志锋,王琳琳,冯季,杨文,王俊丽,贾倩,郝秀轻,刘圣君

[摘要] **目的:**探讨甘草酸二铵对腹膜透析的腹膜纤维化大鼠腹膜结缔组织生长因子(CTGF)的影响。**方法:**将 50 只 SD 大鼠随机分成空白对照组、0.9% 氯化钠注射液组、模型组、己酮可可碱治疗组、甘草酸二铵治疗组,各 10 只,建立大鼠腹膜透析模型,己酮可可碱治疗组同时给予己酮可可碱,甘草酸二铵治疗组同时给予甘草酸二铵进行干预,连续 28 d,于第 30 天行 4 h 腹膜平衡实验测定腹膜功能,并留取壁层腹膜,观察病理形态,测量腹膜厚度,检测腹膜组织 CTGF 的表达。**结果:**光镜下,HE 染色可见空白对照组和 0.9% 氯化钠注射液组腹膜表面覆盖着一层扁平间皮细胞,模型组、己酮可可碱治疗组和甘草酸二铵治疗组显示腹膜间皮细胞变形成为柱状、圆形,间皮细胞可见部分脱落,基质增厚,发现大量成纤维样细胞及巨噬、单核细胞浸润,且有纤维素样物质沉积。Masson 染色显示有明显的胶原沉积,模型组比己酮可可碱治疗组和甘草酸二铵治疗组胶原沉积更明显。各组大鼠腹膜厚度为:模型组 > 己酮可可碱治疗组、甘草酸二铵治疗组 > 空白对照组、0.9% 氯化钠注射液组 ($P < 0.01$);各组腹膜超滤量和 D4/D0 为:空白对照组、0.9% 氯化钠注射液组 > 己酮可可碱治疗组、甘草酸二铵治疗组 > 模型组 ($P < 0.01$);各组腹膜 Durea/Purea 值和 CTGF 表达水平为:模型组 > 己酮可可碱治疗组、甘草酸二铵治疗组 > 空白对照组、0.9% 氯化钠注射液组 ($P < 0.01$)。**结论:**4.25% 腹膜透析液会使大鼠腹膜纤维化,甘草酸二铵可以减轻腹膜纤维化及腹膜功能恶化。

[关键词] 腹膜后纤维化;结缔组织生长因子;甘草酸二铵

[中图分类号] R 572.2

[文献标志码] A

DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.05.004

Effect of diammonium glycyrrhizinate on peritoneal connective tissue growth factor in retroperitoneal fibrosis rats treated with peritoneal dialysis

WEI Zhi-feng, WANG Lin-lin, FENG Ji, YANG Wen, WANG Jun-li, JIA Qian, HAO Xiu-qing, LIU Sheng-jun

(Department of Nephrology, The First Hospital Affiliated of Hebei North College, Zhangjiakou Hebei 075000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of diammonium glycyrrhizinate on peritoneal connective tissue growth factor(CTGF) in retroperitoneal fibrosis rats treated with peritoneal dialysis. **Methods:** Fifty male SD rats were randomly divided into the control group, NS group, model group, pentoxifylline group and diammonium glycyrrhizinate group(10 rats each group). The peritoneal dialysis model of rats was established. The pentoxifylline group and diammonium glycyrrhizinate group were treated with pentoxifylline and diammonium glycyrrhizinate for 28 days, respectively. On the 30th day, the 4 h peritoneal equilibration test was adopted to determine the rats' peritoneum function, the partial peritoneum tissue of rats was collected to observe the pathological morphology and thickness, and the expression of CTGF in peritoneal tissue was detected. **Results:** The HE staining showed that a layer of flattened cells covered the peritoneum surface were found in control group and NS group, and the column and round cells, abstraction, matrix thickening, a large number of fibroblast-like cells, monocytes and macrophages infiltration, and fibrinoid material deposition in peritoneal mesothelial cells were found in model group, pentoxifylline group and diammonium glycyrrhizinate group. Masson staining showed that the apparent collagen deposition was found, which in model group was more than that in pentoxifylline and diammonium glycyrrhizinate group. The peritoneum thickness in model group, pentoxifylline treatment group, diammonium glycyrrhizinate treatment group, control group and NS group gradually decreased ($P < 0.01$). The peritoneal ultrafiltration and D4/D0 in control group and NS group pentoxifylline group, diammonium glycyrrhizinate group and model group gradually decreased ($P < 0.01$). The value of Durea/Purea and CTGF level of peritoneum in model group, pentoxifylline group, diammonium glycyrrhizinate group, control group and NS group gradually decreased ($P < 0.01$). **Conclusions:** The 4.25% peritoneal dialysis solution can lead to peritoneal fibrosis in rats, and the diammonium glycyrrhizinate can alleviate peritoneal the peritoneal fibrosis and function.

[收稿日期] 2016-05-30

[基金项目] 河北省医学科学研究重点课题计划项目(20170781)

[作者单位] 河北北方学院附属第一医院 肾内科, 河北 张家口 075000

[作者简介] 王志锋(1979-),男,硕士,主治医师。

[Key words] retroperitoneal fibrosis; connective tissue growth factor; diammonium glycyrrhizinate

腹膜透析是治疗终末期肾脏疾病的有效方法之一。研究^[1]表明,持续性非卧床腹膜透析与血液透

析同样有效,甚至有一些独特的优越性,随着腹膜透析置管技术及透析液的改进、透析装置的完善、腹腔感染率的下降,腹膜纤维化导致的腹膜功能衰竭已成为腹膜透析病人放弃治疗的重要原因之一。甘草酸能通过抑制前列腺素 E2 的合成及抑制磷脂酶 A2 的活性,直接作用于细胞膜以发挥类糖皮质激素的作用,可抗纤维化^[2]。本研究通过探讨甘草酸二铵对腹膜透析大鼠腹膜纤维化的影响,并检测腹膜厚度及腹膜组织中结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)的蛋白表达,观察甘草酸二铵能否减轻腹膜透析大鼠腹膜纤维化,为临床提供依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 选择 6~8 周健康雄性 SD 大鼠 50 只,体质量 150~200 g(由河北北方学院动物室提供)。适应性饲养,正常饮食 4 d 后制备动物模型。大鼠的饮食及饮水在整个实验过程中不受限制。

1.2 药品及试剂 4.25% 腹膜透析液(PDF)购于广州百特医疗用品有限公司;已酮可可碱购于武汉特生物制药股份有限公司;甘草酸二铵购于石家庄制药集团华盛制药有限公司;脂多糖(LPS)购于上海研生生化试剂有限公司;兔抗大鼠 CTGF 多克隆抗体购于武汉博士德生物工程有限公司;超敏 SP 免疫组织化学试剂盒及浓缩型 DAB 显色剂购于福州迈新生物技术开发有限公司。

1.3 分组与给药 SD 大鼠 50 只,随机分为 5 组:空白对照组、0.9% 氯化钠注射液组、模型组、已酮可可碱治疗组、甘草酸二铵治疗组,各 10 只。空白对照组:不进行任何处理;0.9% 氯化钠注射液组:0.9% 氯化钠注射液 20 mL 每天腹腔内注射;模型组:4.25% PDF 20 mL 每天腹腔内注射,并于第 1、3、5、8、10、12、16、19、23、26 天腹腔注射 LPS(0.6 mg/kg);已酮可可碱治疗组:4.25% PDF 20 mL 每天腹腔内注射并于第 1、3、5、8、10、12、16、19、23、26 天腹腔注射 LPS(0.6 mg/kg) + 已酮可可碱(6 mg/kg);甘草酸二铵治疗组:4.25% PDF 20 mL 每日腹腔内注射并于第 1、3、5、8、10、12、16、19、23、26 天腹腔注射 LPS(0.6 mg/kg) + 甘草酸二铵(10 mg/kg)。

1.4 标本收集 实验进行 30 d 后行 4 h 腹膜平衡实验(PET),所有大鼠腹腔注射 4.25% PDF 25 mL,4 h 后,10% 水合氯醛麻醉大鼠,留取 0、4 h PDF 及血液标本,注射 4 h 后沿着腹白线处剪开腹膜,用纱布吸干腹腔内残余液体后称体质量。距大鼠腹腔切

开部位右侧约 3 cm 处取上腹部壁层腹膜,经下腔静脉采血留取血液标本。避开注射部位取左上腹壁壁层腹膜组织面积约 5 mm × 2 mm × 2 mm,利用 4% 多聚甲醛固定液固定 4 h,常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,进行石蜡包埋。所有组织除用于病理标本外,均 -80 °C 低温保存备用。

1.5 标本处理

1.5.1 HE 染色 切取的石蜡切片厚度为 2 μm,常规脱蜡,苏木精染色,盐酸乙醇分化,伊红染色,梯度乙醇脱水,中性树脂封片。

1.5.2 Masson 染色 常规脱蜡,苏木精染色,盐酸乙醇分化,依次用春红酸性品红液、磷钼酸及亮绿液染色,中性树脂封片。光镜观察病理改变。测量壁层腹膜厚度,选用 Masson 染色切片,每张切片至少含有 4 块壁层腹膜组织,每块组织均测量 10 个高倍视野,其平均数值作为腹膜厚度的值。

1.5.3 血液标本 用 5 000 r/min 的速度离心 10 min,PDF 标本用 1 500 r/min 的速度离心 5 min,留取 PDF 液上清液、血清和血浆。超滤量 = (最后出水量 - 25) mL,采用终点法测定 PDF 尿素浓度(Durea)、血浆尿素浓度(Purea)、初始 PDF 葡萄糖浓度(D0)、4 h PDF 葡萄糖浓度(D4)。PET 测定指标包括:超滤量、Durea/Purea、D4/D0。采用全自动血液分析仪检测透析液的白细胞数量,同时进行白细胞计数及分类,超过 1 000/m³ 的大鼠,为发生腹膜炎,退出本次实验。

1.5.4 病理组织 石蜡切片常规脱蜡脱水;以 3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶,热修复抗原,滴加 5% BSA 封闭液,室温 20 min 封闭;滴加适当稀释的一抗(CTGF 1:400、α-SMA 1:200),4 °C 过夜,PBS 冲洗;滴加生物素化二抗,37 °C 孵育 20 min,PBS 冲洗 2 min;DAB 显色,镜下控制反应时间,蒸馏水洗涤;苏木精复染 2 min;梯度乙醇脱水,二甲苯透明,树脂封片。阴性对照组以 0.5 mol/L PBS 代替一抗,结果为阴性。所有组织切片于同一批染色以保持可比性。每张切片至少随机选择 10 个不同视野进行图像采集。使用 Image. Pro Plus 6.0 图像分析系统对结果进行分析。阳性细胞内的染色量化为综合面积和灰度值,得出积分光密度值(IOD),IOD 值越大,说明抗原的表达水平越高,图像分析亦于同一批进行。脏层腹膜组织 CTGF 的表达检测采用常规免疫组织化学法进行检测。

1.6 统计学方法 采用单因素方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 腹膜组织学改变 光镜下,HE 染色可见空白对照组和 0.9% 氯化钠注射液组腹膜表面覆盖着一层扁平间皮细胞,模型组、己酮可可碱治疗组和甘草酸二铵治疗组显示腹膜间皮细胞变形成为柱状、圆形,间皮细胞可见部分脱落,基质增厚,发现大量成纤维样细胞及巨噬、单核细胞浸润,且有纤维素样物质沉积。上述现象在模型组表现最明显。Masson 染色显示有明显的胶原沉积,模型组比己酮可可碱治疗组和甘草酸二铵治疗组胶原沉积更明显(见图 1)。

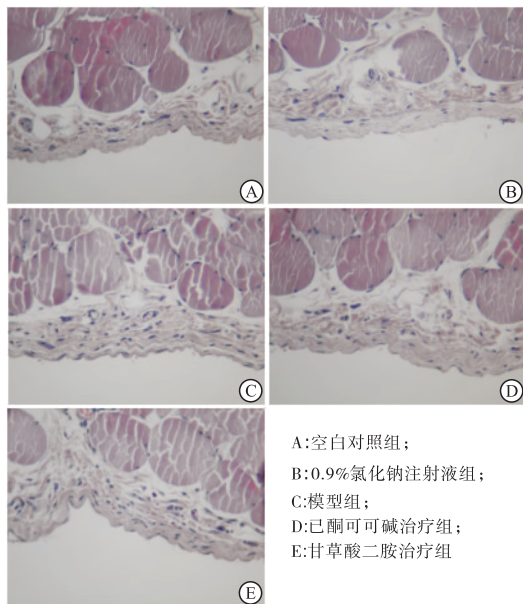


图1 各组大鼠腹膜HE染色

2.2 各组腹膜功能及脏层腹膜组织 CTGF 表达水平比较 各组大鼠腹膜厚度为:模型组 > 己酮可可碱治疗组、甘草酸二铵治疗组 > 空白对照组、0.9% 氯化钠注射液组 ($P < 0.01$); 各组腹膜超滤量和 D4/D0 为:空白对照组、0.9% 氯化钠注射液组 > 己

酮可可碱治疗组、甘草酸二铵治疗组 > 模型组 ($P < 0.01$); 各组腹膜 Durea/Purea 值和 CTGF 表达水平为:模型组 > 己酮可可碱治疗组、甘草酸二铵治疗组 > 空白对照组、0.9% 氯化钠注射液组 ($P < 0.01$) (见表 1)。

3 讨论

腹膜透析是终末期肾脏疾病病人肾脏替代治疗的有效方法之一,具有设备简单,操作易掌握,对中分子物质的清除更为有效,投资费用低,可在基层医疗单位使用,对残余肾功能的保持比血液透析好,对机体内环境影响小等优点^[3],近年来已被许多尿毒症病人所采用。但随着透析时间延长,腹膜纤维化成为腹膜透析病人目前面临的巨大挑战,是导致腹膜透析病人退出的主要原因之一^[4]。CTGF 是新发现的一种纤维化细胞因子,属于即刻早期基因 CCN 家族成员,在人体多个组织器官中广泛存在,它的过度表达与某些增生性或纤维化疾病密切相关,如硬皮病、肝硬化、肺纤维化、肾纤维化等。CTGF 的生物学效应主要体现在以下几个方面:(1)促进细胞增殖;(2)介导细胞黏附;(3)促进细胞凋亡;(4)促进血管形成。研究^[5-7]显示,CTGF 是一个新的促血管形成因子,可在组织血管形成的多个环节发挥作用。CTGF 作为一个促纤维化因子,参与了腹膜纤维化发生的过程^[8]。大量研究^[9-11]证明 CTGF 是 TGF- β 1 的下游靶基因,CTGF 可直接刺激细胞合成纤维连接蛋白、胶原纤维等细胞外基质成分,最终促进纤维化发生。可见,CTGF 将是今后抗组织纤维化治疗研究的一个比较理想的作用靶点。

已有研究^[12-13]证实,己酮可可碱具有抗纤维化作用,能改善腹膜纤维化大鼠的腹膜透析效果。本研究以己酮可可碱为对照药物,观察甘草酸二铵在腹膜纤维化中治疗的作用。本研究结果显示,HE

表 1 各组腹膜功能指标及脏层腹膜组织 CTGF 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	厚度/ μm	超滤量/mL	Durea/Purea	D4/D0	IOD/ μm
空白对照组	10	7.0 \pm 2.0	4.6 \pm 2.3	0.52 \pm 0.07	0.56 \pm 0.05	65.36 \pm 10.25
0.9% 氯化钠注射液组	10	7.8 \pm 2.4	4.7 \pm 2.3	0.53 \pm 0.06	0.57 \pm 0.05	62.47 \pm 10.19
模型组	10	34.7 \pm 3.8 **	-6.4 \pm 2.2 **	0.88 \pm 0.11 **	0.39 \pm 0.04 **	472.70 \pm 76.40 **
己酮可可碱治疗组	10	24.8 \pm 3.4 ** $\Delta\Delta$	-2.7 \pm 2.0 ** $\Delta\Delta$	0.67 \pm 0.09 ** $\Delta\Delta$	0.48 \pm 0.02 ** $\Delta\Delta$	302.82 \pm 52.46 ** $\Delta\Delta$
甘草酸二铵治疗组	10	25.4 \pm 2.8 ** $\Delta\Delta$	-2.6 \pm 2.0 ** $\Delta\Delta$	0.66 \pm 0.09 ** $\Delta\Delta$	0.45 \pm 0.03 ** $\Delta\Delta$	316.63 \pm 53.07 ** $\Delta\Delta$
F	—	168.04	51.83	28.76	36.39	135.50
P	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MS _{组内}	—	8.72	4.68	0.01	0.002	2322.87

q 检验:与空白对照组、0.9% 氯化钠注射液组比较 ** $P < 0.01$;与模型组比较 $\Delta\Delta P < 0.01$

染色可见空白对照组和0.9%氯化钠注射液组腹膜覆盖一层扁平间皮细胞,模型组、己酮可可碱治疗组和甘草酸二铵治疗组腹膜间皮细胞变为柱状,间皮细胞部分脱落,基质增厚,血管增生,可见大量成纤维样细胞及巨噬、单核细胞浸润,并且有纤维素样物质沉积。这种现象在模型组表现最为明显。Masson染色显示有明显的胶原沉积,模型组比己酮可可碱治疗组和甘草酸二铵治疗组改变更明显。模型组、己酮可可碱治疗组、甘草酸二铵治疗组与空白对照组、0.9%氯化钠注射液组比较,腹膜厚度均明显增加($P < 0.01$),而已酮可可碱治疗组、甘草酸二铵治疗组腹膜厚度均明显小于模型组($P < 0.01$)。模型组与己酮可可碱治疗组、甘草酸二铵治疗组相比,超滤量及D4/D0均明显减少($P < 0.01$),而已酮可可碱治疗组与甘草酸二铵治疗组比较超滤量相近,模型组与己酮可可碱治疗组、甘草酸二铵治疗组相比,Durea/Purea明显增加($P < 0.01$),己酮可可碱治疗组与甘草酸二铵治疗组比较Durea/Purea相近。脏层腹膜组织CTGF在空白对照组、0.9%氯化钠注射液组腹膜中仅有微量表达,而在模型组CTGF的表达明显增高,己酮可可碱治疗组、甘草酸二铵治疗组CTGF的表达水平低于模型组,己酮可可碱治疗组与甘草酸二铵治疗组比较,CTGF的表达水平相近。可见,甘草酸二铵和己酮可可碱对腹膜透析大鼠腹膜纤维化的干预有相似的保护作用。

综上所述,甘草酸二铵可增加腹膜透析超滤量,可有效地减轻腹膜透析大鼠腹膜纤维化,但其作用机制有待于进一步实验研究。

[参 考 文 献]

- [1] KYUDEN Y, ITO T, MASAKI T, *et al.* Tgf-beta1 induced by high glucose is controlled by angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin II receptor blocker on cultured human peritoneal mesothelial cells[J]. *Perit Dial Int*, 2005, 25(5):483.
- [2] 卢志强,张艳军,崔广智,等. 心肌缺血模型的制作方法研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(8):1053.
- [3] 王磊,彭仁秀,杨静,等. 复方缬苜滴丸对犬急性心肌梗死的保护作用[J]. *中草药*, 2004, 35(3):304.
- [4] 吴海婴. CK、CKMB、LDH、AST检测在急性心肌梗死诊断中的价值[J]. *心血管病防治知识(学术版)*, 2015(3):56.
- [5] SALIM A, TEIXEIRA P, LEY EJ, *et al.* Serum ethanol levels: predictor of survival after severe traumatic brain injury [J]. *Trauma*, 2009, 67(4):697.
- [6] AMANI M, JEDDI S, AHMADIASL N, *et al.* Effect of HEMADO on level of CK-MB and LDH enzymes after ischemia/reperfusion

- [7] 茆玲,冯彩云,刘学燕. 甘草酸制剂治疗病毒性肝炎疗效观察[J]. *湖北中医药大学学报*, 2016, 18(1):67.
- [8] 王海燕. 肾脏病学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2008:2049.
- [9] 杨晓,于洁,聂祥智. 参芍注射液对腹膜纤维化大鼠腹膜组织转化生长因子 $\beta 1$ 表达的影响[J]. *中华肾脏病杂志*, 2010, 26(2):128.
- [10] RASTALDI MP, FERRARIO F, GIARDINO L, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies[J]. *Kidney Int*, 2002, 62(1):137.
- [11] WANO M, PLIETH D, DANOFF TM, *et al.* Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2002, 10(3):341.
- [12] YANG J, LIU Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis [J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(4):1465.
- [13] QI W, CHEN X, POLHILL T S, *et al.* TGF- β induces IL-8 and MCP-1 through a connective tissue growth factor-independent pathway [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, 290(3):F703.
- [14] COLWELL AS, PHAN TT, KONG W, *et al.* Hypertrophic scar fibroblasts have increased connective tissue growth factor expression after transforming growth factor- β stimulation [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2005, 116(5):1387.
- [15] HIROKAZU O, TOMOHIRO K, TATSUYA K, *et al.* Connective Tissue growth factor expressed in tubular epithelium plays a pivotal role in renal fibrogenesis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(1):133.
- [16] 王宇晖,童孟立,王臣大. 金雀异黄素抑制糖基化终末产物对人腹膜间皮细胞CTGF、FN合成和表达的影响[J]. *浙江医学*, 2012, 34(7):515.
- [17] LIN SL, CHEN RH, CHEN YM, *et al.* Pentoxifylline attenuates tubulointerstitial fibrosis by blocking smad3/4-activated transcription and profibrogenic effects connective tissue growth factor [J]. *Am Soc Nephrol*, 2005, 16(9):2702.
- [18] 龚燕梅,曾红兵,李鹏飞,等. 己酮可可碱对腹膜功能的影响及其机制研究[J]. *医药导报*, 2008, 27(11):1298.

(本文编辑 刘畅)

(上接第572页)

- [9] 魏林,李培杰. 乙醇对家兔心脏骤停后综合征脑保护的实验研究[D]. 兰州:兰州大学, 2013.
- [10] YU Y, JIA XJ, ZONG QF, *et al.* Remote ischemic postconditioning protects the heart by upregulating ALDH2 expression levels through the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 4(15):536.
- [11] 刘玉江. 不同浓度乙醇对家兔血压的影响[J]. *微量元素与健康研究*, 2011, 28(5):10.
- [12] 卢继承. 乙醇对家兔循环系统各项指标的影响[J]. *泰山学院学报*, 2016, 38(3):103.

(本文编辑 姚仁斌)