

氟伐他汀在大鼠腹膜透析模型中对腹膜的保护作用

黄玉晗,刘佳*,刘思,武侠,徐亚光,赵秀芬,钱军,邢昌赢

(南京医科大学第一附属医院肾内科,江苏南京 210029)

[摘要] 目的:探讨氟伐他汀(fluvastatin, Flu)对腹膜透析(peritoneal dialysis, PD)大鼠腹膜组织形态影响的初步研究。方法:通过SD雄性大鼠(体重180~200 g)腹腔注射4.25%浓度的葡萄糖腹透液的方式模拟腹膜透析。随机分为5组:①正常对照组;②4.25%腹透液组;③单纯Flu组;④生理盐水组;⑤Flu干预的4.25%腹透液组。4周后留取各组大鼠壁层腹膜组织,光镜观察各组大鼠壁层腹膜形态学的变化,同时采用RT-PCR法测定各组大鼠腹膜转化生长因子- β 1(transforming growth factor, TGF- β 1)及纤维连接蛋白(fibronectin, FN)mRNA的表达。结果:光镜下HE染色显示4.25%腹透液组大鼠腹膜较正常对照组显著增厚,Flu干预组的壁层腹膜厚度薄于未干预组,生理盐水组和单纯Flu组大鼠腹膜的形态较正常对照组未见明显改变。4.25%腹透液组大鼠腹膜TGF- β 1及FN mRNA的表达量均高于正常对照组(均 $P < 0.05$),Flu干预组两者mRNA的表达量均明显低于未干预组(均 $P < 0.05$),生理盐水组和单纯Flu组大鼠腹膜两者的mRNA表达量较正常组无明显统计学意义。结论:长期使用高糖腹透液会改变腹膜的结构,氟伐他汀在一定程度上对腹膜有保护作用,但具体机制仍需进一步研究。

[关键词] 腹膜透析;氟伐他汀;高糖腹透液;转化生长因子 β 1;纤维连接蛋白

[中图分类号] R572.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)05-603-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20140513

Protective effect of fluvastatin in peritoneal dialysis rats model

Huang Yuhan, Liu Jia*, Liu Si, Wu Xia, Xu Yaguang, Zhao Xiufen, Qian Jun, Xing Changying

(Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To preliminarily investigate whether fluvastatin has a therapeutic role on the peritoneum in a rat model of peritoneal dialysis. **Methods:** A rat model of peritoneal dialysis was induced by a daily intraperitoneal infusion of 4.25% peritoneal dialysate. Thirty SD rats were randomly divided into five groups: normal control group ($n = 6$), 4.25% peritoneal dialysate group ($n = 6$), saline group ($n = 6$), Flu group ($n = 6$), 4.25% peritoneal dialysate combined with Flu group ($n = 6$). Rats were sacrificed 4 weeks after the first treatment and the peritoneal tissues were gathered for further analysis. A portion of peritoneal tissues were used for histological examination. The expressions of TGF- β 1 and FN of each group were examined by RT-PCR. **Results:** HE stain showed that compared with normal control group, the peritoneal tissue thickness of 4.25% peritoneal dialysate group and 4.25% peritoneal dialysate combined with Flu group increased significantly. Compared with 4.25% peritoneal dialysate group, the peritoneal tissue thickness of 4.25% peritoneal dialysate combined with Flu group decreased obviously. There was no obvious statistical significance among saline group, Flu group and normal control group. RT-PCR showed that compared with normal control group, the expressions of TGF- β 1 and FN in 4.25% peritoneal dialysate group increased apparently. The expressions of TGF- β 1 and FN in 4.25% peritoneal dialysate combined with Flu group were significantly lower than 4.25% peritoneal dialysate group ($P < 0.05$). There was no obvious statistical significance among saline group, Flu group and normal control group. **Conclusion:** Long-term treatment with high-glucose peritoneal dialysate could change the structure of peritoneum. Fluvastatin could be used for protecting peritoneum, however, the specific mechanism need to be further studied.

[Key words] peritoneal dialysis; fluvastatin; high-glucose peritoneal dialysate; transforming growth factor- β 1; fibronectin

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(05): 603-606]

[基金项目] 国家自然科学基金(81170660);江苏省科技厅基础研究计划(自然科学基金)(BK2011849);江苏省卫生厅科研基金资助(H200317)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jiajj3@sina.com

目前腹膜透析 (PD) 已经成为终末期肾脏病 (ESRD) 的主要替代治疗之一。随着腹膜透析时间的延长,腹膜结构不断发生变化,主要包括:新生血管的形成、腹膜厚度的改变及纤维化的发生^[1-2]。现用的腹膜透析液多为非生物相容性的,葡萄糖透析液就为其中最常用的一种,长期应用高浓度葡萄糖腹透液是导致腹膜结构改变、超滤功能降低乃至腹透失败的最重要原因之一^[3]。氟伐他汀作为降血脂药物广泛应用于临床,但近年来多项研究表明他汀类还具有其他非依赖降血脂的作用,例如抗炎、抗氧化和免疫调节等^[4]。目前关于氟伐他汀对腹膜透析大鼠腹膜组织影响的研究少有文献报道,本实验就氟伐他汀的这一作用做初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

SD 雄性大鼠 30 只,体重 180~200g(南京医科大学动物实验中心提供)。大鼠按随机法分为 5 组,每组 6 只:①空白对照组;②4.25%腹透液组:每日按 100 ml/kg 腹腔注射 4.25%腹透液;③生理盐水组:每日按 100 ml/kg 腹腔注射生理盐水;④氟伐他汀组:每日按 10 mg/kg 灌入氟伐他汀;⑤4.25%腹透液联合氟伐他汀组:每日按 100 ml/kg 腹腔注射 4.25%腹透液,同时按 10 mg/kg 灌入氟伐他汀。4 周

后,取各组大鼠腹膜,观察腹膜组织的形态学改变,并测定组织 mRNA 的表达情况。

4.25%葡萄糖腹膜透析液(Baxter 公司,美国),氟伐他汀粉剂(北京诺华制药有限公司馈赠),TGF-β1、FN 及 GAPDH 引物均由上海捷瑞生物工程有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 腹膜组织形态学观察

苏木素-伊红(HE)染色:取壁层腹膜,10%福尔马林液中固定 24 h,常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。4 μm 的石蜡切片常规 HE 染色,中性树脂封片,显微镜下观察。每组取 3 个样本,每个样本做 3 张切片。

1.2.2 RT-PCR 检测腹膜组织 TGF-β1 及 FN 的 mRNA 表达

按 Trizol 试剂盒(TaKaRa 公司,日本)提供的方法提取大鼠腹膜组织总 RNA,取 1 μl 总 RNA 按反转录试剂盒(TaKaRa 公司,日本)操作说明合成 cDNA。取 1 μl cDNA 模板进行 PCR 扩增,该反应体系为 25 μl。GAPDH 作为内参(表 1)。PCR 产物于 2.5%琼脂糖凝胶中电泳(含 0.5 μg/ml 溴化乙锭),紫外灯下观察结果,图象分析软件进行 PCR 条带灰度扫描,以 GAPDH 为内参,数值以两者吸光度比值表示,同一实验重复 3 次。

表 1 表 1 TGF-β1、FN 及 GAPDH 引物序列及产物大小
Table 1 PCR primer sequences and conditions of amplification

基因	引物序列(5'→3')	产物大小(bp)	退火温度(℃)
TGF-β1	上游 GTTCTCAATACGTCAGACA	314	59
	下游 CCATTGATTCCACGTGGAGT		
FN	上游 GCAGCCACAGTGGAGTATGT	255	54
	下游 TTCTT CATTGGTCCGGTCTT		
GAPDH	上游 AGGTCGGAGTCAACGGATTG	311	60
	下游 GTGATGGCATGGACTGTGCT		

1.3 统计学方法

应用 SPSS18.0 统计软件统计学处理,所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,各组间两两比较采用 LSD-t 法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠腹膜组织变化

HE 染色结果示,4.25%腹透液组腹膜组织显著增厚,而氟伐他汀干预组腹膜的厚度较未干预组明显变薄,生理盐水组与单纯氟伐他汀组较正常对照

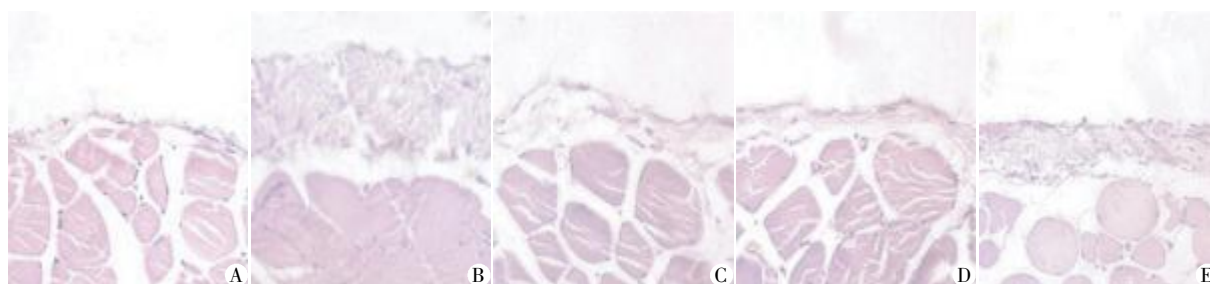
组无明显变化(图 1)。

2.2 各组大鼠腹膜 TGF-β1 及 FN mRNA 的表达

4.25%腹透液组的 TGF-β1 及 FN mRNA 表达量较正常对照组增加显著(均 $P < 0.05$);然而在氟伐他汀的干预下,TGF-β1 及 FN mRNA 表达量均有所减少(均 $P < 0.05$);生理盐水组和单纯氟伐他汀组较正常对照组两者的表达量未见明显改变(均 $P > 0.05$,图 2、3)。

3 讨论

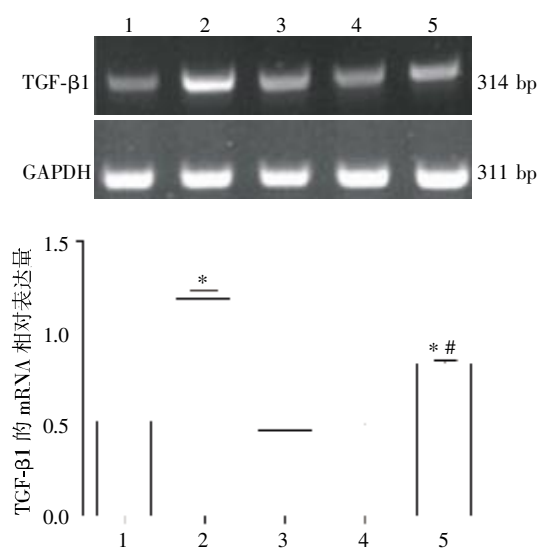
腹膜透析是终末期肾脏病的重要替代治疗。因



A: 正常对照组; B: 4.25%腹透液组; C: 生理盐水组; D: 单纯 Flu 组; E: Flu 干预的 4.25%腹透液组。

图 1 各组大鼠腹膜 HE 染色($\times 200$)

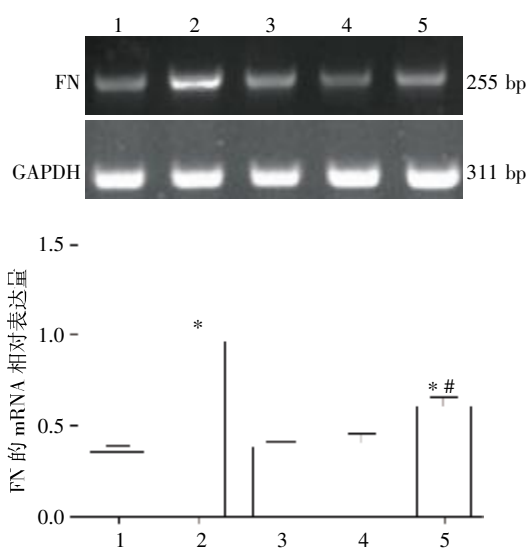
Figure 1 HE stain of rats peritoneal($\times 200$)



1: 正常对照组; 2: 4.25%腹透液组; 3: 生理盐水组; 4: 单纯 Flu 组; 5: Flu 干预的 4.25%腹透液组。与正常对照组比较, $*P < 0.05$; 与 4.25%腹透液组比较, $\#P < 0.05$ ($n = 3$)。

图 2 各组大鼠腹膜 TGF- $\beta 1$ 的表达(RT-PCR)

Figure 3 Expression of FN mRNA in rats peritoneal(RT-PCR)



1: 正常对照组; 2: 4.25%腹透液组; 3: 生理盐水组; 4: 单纯 Flu 组; 5: Flu 干预的 4.25%腹透液组。与正常对照组比较, $*P < 0.05$; 与 4.25%腹透液组比较, $\#P < 0.05$ ($n = 3$)。

图 3 各组大鼠腹膜 FN 的表达(RT-PCR)

Figure 3 Expression of FN mRNA in rats peritoneal(RT-PCR)

其具有较好的保护残余肾功能,越来越受到重视。腹膜纤维化是导致长期腹膜透析失败的重要原因之一^[5]。非生物相容性的高糖透析液在腹膜结构和功能的损伤中起着重要的作用^[6]。腹膜纤维化的发生直接影响腹膜透析患者的疗效,最终发生超滤衰竭。这是个急需解决的问题也是近年来的热点课题。

大量研究证明:低 pH 值、高渗透压、乳酸盐缓冲液、葡萄糖及其降解物(GDP)、碳酸氢盐等均能损伤并诱导^[2,7]HPMCs 凋亡、加速腹膜纤维化、降低腹膜防御功能,最终形成腹膜纤维化及硬化性腹膜炎,导致腹膜超滤功能丧失。其中高浓度葡萄糖对 HPMC 损伤毒性作用最明显。高糖腹透液对腹膜损伤的过程有多种信号通路共同参与,如 PKC、MAPK、ROS 等^[8]。有实验表明,高糖可使腹膜间皮细

胞密度减低,细胞通透性下降,还可造成间皮下基质重构,细胞外基质(ECM)的积聚,酶活性增强,从而促进腹膜纤维化发展^[9-10]。

氟伐他汀是一种完全人工合成的 HMG-CoA 还原酶抑制剂,其结构的侧链部分与 HMG-CoA 的结构相似,可竞争性抑制 HMG-CoA 还原酶的作用,阻止 HMG-CoA 转化为甲羟戊酸,最终通过 P21ras 蛋白的细胞内信号转导而影响细胞内 DNA 的合成,进而抑制成纤维细胞、血管平滑肌细胞和内皮细胞等多种细胞的增殖^[11-12]。实验室前期已证实了氟伐他汀可以抑制人腹膜间皮细胞 FN 及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达^[13-14]。

本次研究首先通过往大鼠腹腔注射高糖腹透液来模拟腹膜透析,随着腹透的进行,光镜下发现大鼠

腹膜组织明显增厚,其 TGF- β 1、FN mRNA 表达量也是明显增加的(均 $P < 0.05$),同时发现氟伐他汀干预下在一定程度上改善腹膜透析大鼠腹膜的厚度,并且由于氟伐他汀的干预,大鼠腹膜的 TGF- β 1、FN 表达量较未干预组显著降低(均 $P < 0.05$)。本文推测氟伐他汀对高糖腹透相关的腹膜纤维化的保护作用可能是通过对某种信号通路的抑制来实现的。TGF- β 1 是 TGF- β 超家族中的一员,是一种具有多种功能的细胞与细胞之间的信号传递蛋白,对多种靶基因的表达有调节作用,影响细胞外基质合成及细胞增殖等,在致纤维化的信号通路中发挥着重要作用,其中 TGF- β /Smads 信号转导通路是介导腹膜上皮细胞间充质转分化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的主要途径^[15],本文推测氟伐他汀可能通过抑制 TGF- β /Smads 信号转导通路的作用来发挥对腹膜的保护作用。前期的细胞实验^[14]已明确了氟伐他汀可通过抑制 SGK1 的作用来降低 FN 的表达从而达到缓解腹膜纤维化的作用。

综上所述,氟伐他汀可在一定程度上改善腹膜透析大鼠腹膜的形态学改变,抑制腹膜透析模型中大鼠腹膜 TGF- β 1 及 FN 的表达,在一定程度上起到保护腹膜功能、延缓腹膜纤维化进展的作用,但其具体机制尚不明确仍需进一步实验研究。

[参考文献]

- [1] Loureiro J, Schilte M, Aguilera A, et al. BMP-7 blocks mesenchymal conversion of mesothelial cells and prevents peritoneal damage induced by dialysis fluid exposure[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25 (4): 1098-1108
- [2] 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
- [3] McDonald OG, Wu H, Timp W, et al. Genome-scale epigenetic Reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Nat struct mol boil*, 2011, 18(8): 867-876
- [4] Shibata T, Tamura M, Kabashima N, et al. Fluvastatin attenuates IGF-1 induced ERK1/2 activation and cell proliferation by mevalonic acid depletion in human mesangial cells[J]. *Life Sci*, 2009, 84(21-22): 725-731
- [5] Weinhandl ED, Foley RN, Gilbertson DT, et al. Propensity-matched mortality comparison of incident hemodialysis and peritoneal dialysis patients [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(3): 499-506
- [6] Kim YH, Ryu JM, Lee YJ, et al. Fibronectin synthesis by high glucose level mediated proliferation of mouse embryonic stem cells: Involvement of ANG II and TGF- β 1 [J]. *Cell Physiol*, 2010, 233(2): 397-407
- [7] Zhao ZZ, Cao Y, Liu ZS, et al. Effects of recombinant human endostatin on peritoneal angiogenesis in peritoneal dialysis rats[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2011, 16(6): 599-606
- [8] Xie JY, Chen N, Ren H, et al. Angiotensin II-mediated activation of fibrotic pathways through ERK1/2 in rat peritoneal mesothelial cells [J]. *Ren Fail*, 2010, 32(7): 871-879
- [9] Fernández-Perpén A, Pérez-Lozano ML, Bajo MA, 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
- [10] Wang X, Nie J, Jia Z, et al. Impaired TGF- β signalling enhances peritoneal inflammation induced by E. Coli in rats[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25(2): 399-412
- [11] Kondrikov D, Caldwell RB, Dong Z, et al. Reactive oxygen species-dependent RhoA activation mediates collagen synthesis in hyperoxic lung fibrosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50(11): 1689-1698
- [12] Jiong Z, Satoshi O, Yasuhiro T, et al. Statins directly suppress cytokine production in murine intraepithelial lymphocytes[J]. *Cytokine*, 2013, 61(2): 540-545
- [13] 刘艳春, 刘佳, 徐亚光, 等. 氟伐他汀对高糖腹透液诱导人腹膜间皮细胞纤维连接蛋白表达的影响[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2012, 32(7): 908-912
- [14] 武侠, 刘佳, 刘艳春, 等. 高糖腹透液对腹膜间皮细胞分泌 VEGF 的影响及氟伐他汀的干预作用[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 33(6): 754-758
- [15] Liu Q, Mao H, Nie J, et al. Transforming growth factor β 1 induces epithelial-mesenchymal transition by activating the JNK-Smad3 pathway in rat peritoneal mesothelial cells[J]. *Perit Dial Int*, 2008, 28(3): 88-95

[收稿日期] 2014-01-09