

# 丹参酮 IIA 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

陶娜娜, 蒋春明, 张苗\*, 孙琤

(南京大学医学院附属鼓楼医院, 江苏 南京 210008)

**摘要:**目的 了解丹参酮 IIA 对腹腔注射 4.25% 腹膜透析液(PDS)大鼠腹膜组织学变化以及结缔组织生长因子(CTGF)表达的影响。方法 50 只 SD 雄性大鼠随机分为 5 组:对照组,每日腹腔注射生理盐水 20 mL;PDS 组,每日腹腔注射 4.25% PDS 20 mL;丹参酮低、中、高浓度组,每日分别腹腔注射含丹参酮 IIA 浓度为 50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L 的 4.25% PDS 20 mL。于实验第 30 天,取壁层腹膜行光镜检查,并用免疫组织化学的方法检测壁层腹膜 CTGF 的表达情况。结果 HE、Masson 染色显示,在 PDS 干预下,腹膜显著增厚,胶原沉积显著增多( $P < 0.01$ )。与 PDS 组比较,丹参酮组腹膜明显变薄,胶原沉积明显减少( $P < 0.01$ )。在 PDS 干预下腹膜 CTGF 表达较对照组显著增加( $P < 0.01$ ),丹参酮组 CTGF 表达与 PDS 组比较有显著下降( $P < 0.01$ )。结论 丹参酮 IIA 具有抑制葡萄糖 PDS 导致的实验大鼠腹膜纤维化及 CTGF 表达增加的作用。

**关键词:**丹参酮 IIA;腹膜纤维化;CTGF;腹膜透析

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1672-0482(2011)04-0361-05

## Tanshinone IIA's Effect on the Histological Changes of Peritoneum and CTGF Expression in Rat Induced by PDS

TAO Na-na, JIANG Chun-ming, ZHANG Miao\*, SUN Zheng

(The Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China)

**ABSTRACT:OBJECTIVE** To investigate the effects of tanshinone IIA on the alterations in morphology and the expression of connective tissue growth factor (CTGF) of peritoneal membranes in model rats of peritoneal dialysis. **METHODS** 50 male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into five groups ( $n=10$  in each group). Intraperitoneal injection of 0.9% saline, standard lactate-buffered 4.25% glucose-based PDS, and standard lactate-buffered 4.25% glucose-based PDS with various concentrations of tanshinone IIA (50, 100, 200 mg/L) were performed for rats in each group once daily with an instillation volume of 20 mL per injection for 30 days. Afterwards, histological analyses, including hematoxylin and eosin (HE) staining and Masson staining, were carried out in parietal peritoneum. Immunohistochemistry was used to analyze the expression of CTGF. **RESULTS** As compared with control group, chronic high-glucose-based PDS exposure resulted in increased submesothelial compact zone thickness and accumulation of submesothelial matrix, as well as enhanced expression of CTGF in parietal peritoneum ( $P < 0.01$ ). The peritoneal changes induced by PDS were significantly ameliorated by tanshinone IIA ( $P < 0.01$ ). **CONCLUSION** Long-term exposure to high glucose-based PDS results in damages in peritoneal membranes and promotes the fibrosing process. Tanshinone IIA may be helpful to slow the PDS-induced deterioration of peritoneal membrane.

**KEY WORDS:** tanshinone IIA; peritoneal fibrosis; CTGF; peritoneal dialysis

众多研究表明,临床广泛使用的腹膜透析液(peritoneal dialysis solutions, PDS)具有明显的生物不相容性,长期使用后会致腹膜纤维化发生,这已经成为影响腹膜透析(peritoneal dialy-

sis, PD)远期疗效的主要原因之一。结缔组织生长因子(Connective tissue growth factor, CTGF)可以促进纤维母细胞的分化、迁移和粘附,并促进其合成细胞外基质,是纤维化形成过程启动的重

收稿日期:2010-12-28;修稿日期:2011-03-11

基金项目:南京市医学科技发展重点项目(ZKX08026)

作者简介:陶娜娜(1985-),女,江苏淮安人,南京医科大学2003级本硕连读研究生。\*通信作者:zmslp@medmail.com.cn

要细胞因子<sup>[1]</sup>。许多实验研究证明,中药丹参酮 II A (tanshinone IIA)可以拮抗多种因素对细胞造成的损伤作用,减轻纤维化<sup>[2-3]</sup>。我们通过观察丹参酮 IIA 对葡萄糖 PDS 干预下的大鼠腹膜组织学变化以及 CTGF 表达的影响,探讨丹参酮 IIA 是否具有抑制 CTGF 的表达从而发挥抗腹膜纤维化作用。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SD 大鼠 50 只,雄性,清洁级,体质量 180~220 g,周龄 6~8 周(南京市鼓楼医院动物实验中心提供),于清洁级动物笼内适应性喂养 1 周后,进入正式实验,给予清洁级大鼠饲料及自由饮水。随机分为 5 组,每组 10 只。对照组,每日用生理盐水腹腔注射 20 mL;PDS 组,每日用 4.25% 的 PDS 腹腔注射 20 mL;丹参酮低、中、高浓度组,每日分别用含丹参酮 IIA 质量浓度为 50、100、200 mg/L 的 4.25% 的 PDS 腹腔注射 20 mL。于实验第 30 天,氯胺酮(每 kg 体质量 3 mL)肌肉注射麻醉后,打开腹腔,取壁层腹膜组织,置于 10% 中性缓冲甲醛中,断颈处死大鼠。

### 1.2 试剂

4.5% Baxter PDS 为广州百特医疗用品公司产品,丹参酮 IIA 磺酸钠注射液为江苏科菲平医药有限公司产品,规格 10 mg/支。兔抗大鼠 CTGF 多克隆抗体购于美国 LifeSpan 公司(LS-C48913),二步法免疫组化检测试剂(PV-6001)购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 方法

#### 2.1.1 腹膜组织学观察

取石蜡包埋的壁层腹膜组织,作 2  $\mu\text{m}$  切片,60  $^{\circ}\text{C}$  烘干融蜡,然后以二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,并充分蒸馏水漂洗,常规方法 HE、Masson 染色后,光镜下观察病理改变。壁层腹膜厚度测量,选用 HE 染色切片,200 倍光学显微镜下观察,每张切片随机选取 5 个视野,每个视野分 5 处测量,取其平均值作为腹膜厚度值。壁层腹膜 Masson 染色切片,200 倍光学显微镜下观察胶原纤维分布,以蓝绿色为阳性信号,每张切片随机选取 5 个

视野摄片,经 Image-Pro Plus 5.0 图像分析系统(美国 Media Cybernetics 公司)采集图像,分析其阳性信号强度的平均积分光密度(integrated OD total, IOD),取平均值。

#### 2.1.2 CTGF 的表达

用免疫组织化学方法测定。取石蜡包埋的壁层腹膜组织,作 2  $\mu\text{m}$  切片。石蜡切片经二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,并充分蒸馏水漂洗后置于 1 mmol/L 的 EDTA(pH=8.0)缓冲液中电磁炉加高压锅方法高温高压热修复 2 min。PBS 缓冲液漂洗后滴加 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  阻断内源性过氧化物酶,孵育 10 min, PBS 缓冲液中漂洗 3 min  $\times$  3 次,吸干后滴加 100  $\mu\text{L}$  兔抗大鼠 CTGF 多克隆抗体(1:1500),4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱孵育过夜, PBS 缓冲液漂洗 3 min  $\times$  3 次,再滴加 100  $\mu\text{L}$  二步法免疫组化检测试剂,室温下孵育 30 min,再次 PBS 缓冲液漂洗 3 min  $\times$  3 次。DAB 显色,光镜下控制,蒸馏水漂洗,复染及封片。阴性对照用 PBS 缓冲液代替一抗。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,每张切片随机选取五个视野摄片,经 Image-Pro Plus 5.0 图像分析系统分析其阳性信号强度的 IOD 值,取平均值。

#### 2.1.3 统计学处理

结果用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间差异比较采用 SPSS13.0 软件进行方差分析检验。

## 2.2 结果

### 2.2.1 大鼠腹膜组织学变化的比较

HE 染色显示对照组大鼠腹膜较薄,间皮细胞完好,间皮下基底膜薄,并与结缔组织相连,间皮下胶原纤维无明显沉积。PDS 组大鼠腹膜明显增厚,间皮细胞脱落,腹膜间皮下基质明显增多,胶原纤维大量沉积。丹参酮组大鼠腹膜也有增厚,间皮细胞也有脱落,间皮下基质增多,胶原纤维沉积,程度比 PDS 组略轻(见图 1)。各组壁层腹膜致密层厚度比较见表 1,其中 PDS 组腹膜增厚程度最明显( $P < 0.01$ );丹参酮低浓度组与丹参酮中、高浓度组相比,具有显著差异( $P < 0.01$ );丹参酮高浓度组与丹参酮中浓度组相比,具有显著差异( $P < 0.01$ )。

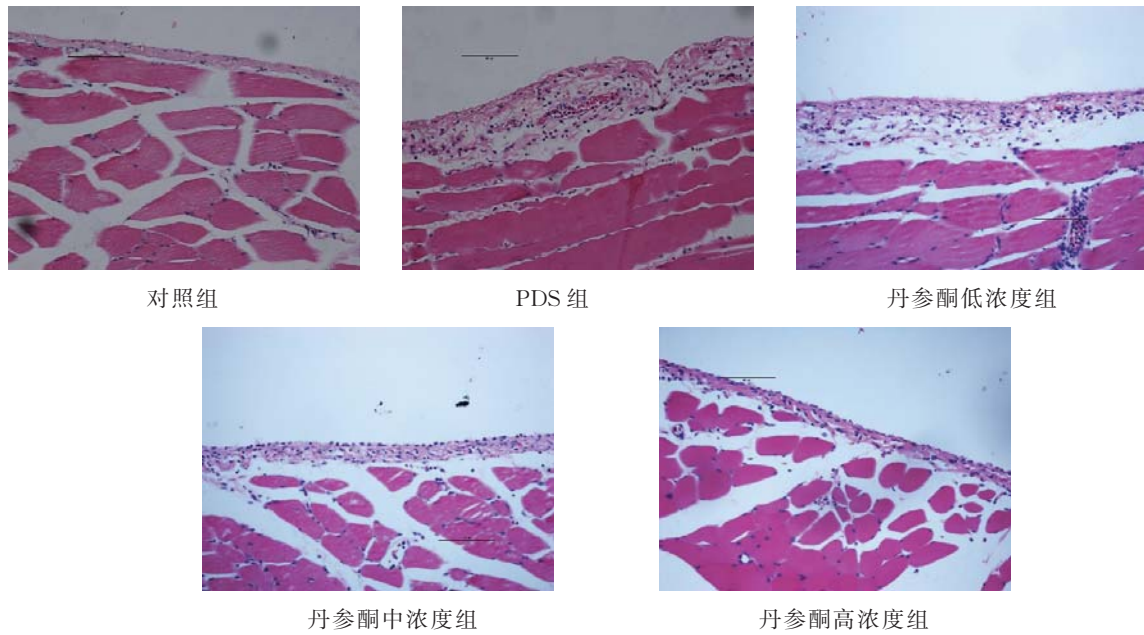


图 1 各组大鼠壁层腹膜组织学观察(HE 染色, ×200)

表 1 各组壁层腹膜致密层厚度比较(HE 染色)

组别	n	腹膜致密层厚度/ $\mu\text{m}$
对照组	10	13.98 $\pm$ 3.135**
PDS 组	10	71.86 $\pm$ 15.17
丹参酮(50 mg/mL)	10	41.47 $\pm$ 3.111**
丹参酮(100 mg/mL)	10	37.66 $\pm$ 2.790##
丹参酮(150 mg/mL)	10	24.97 $\pm$ 3.207 $\Delta\Delta$ ##

注:与 PDS 组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与丹参酮低浓度组比较, #  $P < 0.01$ ; 与丹参酮中浓度组比较,  $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

Masson 染色显示 PDS 组胶原纤维的阳性染色主要分布在腹膜间皮下间质, 较对照组阳性染色明显增多(见图 2)。胶原纤维分布的半定量分析结果见表 2。PDS 组壁层腹膜胶原纤维含量显著高于其他 4 组( $P < 0.01$ )。与丹参酮低浓度组相比, 丹参酮中、高浓度组壁层腹膜胶原纤维含量明显下降( $P < 0.05$ )。丹参酮高浓度组较丹参酮中浓度组胶原纤维含量明显下降( $P < 0.05$ )。

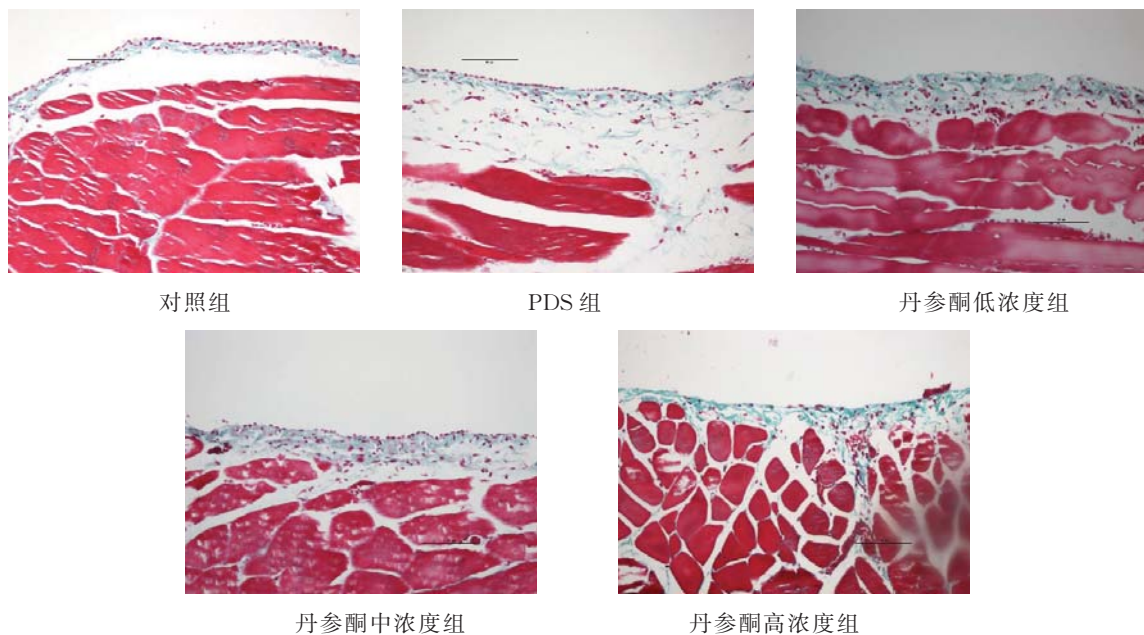


图 2 各组大鼠壁层腹膜组织学观察(Masson 染色, ×200)

### 2.2.2 大鼠壁层腹膜组织 CTGF 的表达

免疫组织化学法检测显示 CTGF 的阳性染色(棕褐色)主要分布在腹膜间皮细胞胞浆(见图 3)。CTGF 表达半定量分析结果见表 3。与 PDS 组比较, 对照组 CTGF 表达量显著减少( $P <$

0.01), 丹参酮组明显减少( $P < 0.01$ )。丹参酮中、高浓度组较丹参酮低浓度组 CTGF 表达量明显减少( $P < 0.01$ ), 丹参酮高浓度组较中浓度组 CTGF 表达量明显下降( $P < 0.05$ )。

表 2 各组大鼠壁层腹膜胶原纤维分布的半定量分析(Masson 染色)

组别	n	IOD 值
对照组	10	1 983±699**
PDS 组	10	14 636±4 250
丹参酮(50 mg/mL)	10	8 219±633**
丹参酮(100 mg/mL)	10	6 026±559**#
丹参酮(150 mg/mL)	10	4 048±406 $\Delta$ **#

注:与 PDS 组比较,\*  $P<0.01$ ;与丹参酮低浓度组比较,#  $P<0.05$ ,##  $P<0.01$ ;与丹参酮中浓度组比较, $\Delta P<0.05$ 。

表 3 各组壁层腹膜 CTGF 分布的半定量分析

组别	n	IOD 值
对照组	10	1 376±444**
PDS 组	10	23 533±4 988
丹参酮(50 mg/mL)	10	11 046±2 404**
丹参酮(100 mg/mL)	10	6 661±1 041 $\Delta$ **#
丹参酮(150 mg/mL)	10	2 994±550 $\Delta$ **#

注:与 PDS 组比较,\*\*  $P<0.01$ ;与丹参酮低浓度组比较,#  $P<0.01$ ;与丹参酮中浓度组比较, $\Delta P<0.05$ 。

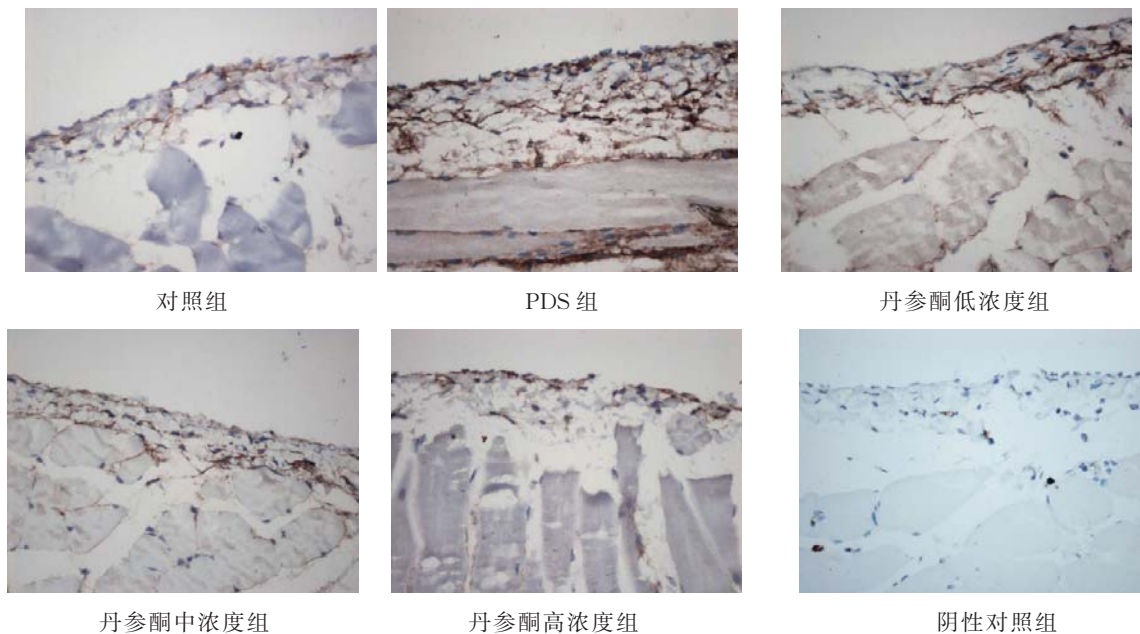


图 3 各组大鼠壁层腹膜 CTGF 观察( $\times 400$ )

### 3 讨论

临床广泛使用的 PDS 具有明显的生物不相容性,长期使用后会致腹膜间皮细胞脱落,大量细胞外基质堆积<sup>[4]</sup>。在本研究中,对照组大鼠腹膜间皮细胞完好,间皮下基底膜薄,并与结缔组织相连,间皮下胶原纤维无明显沉积;而 PDS 组大鼠腹膜明显增厚,间皮细胞脱落,腹膜间皮下基质明显增多,有胶原纤维大量沉积( $P<0.01$ )。证明了传统葡萄糖 PDS 导致腹膜纤维化。

CTGF 是 Bradham 等<sup>[5]</sup>于 1991 年首次在人的脐静脉内皮细胞条件培养基中发现的细胞因子,属于即刻早期基因家族成员之一,由成纤维细胞、平滑肌细胞和内皮细胞合成分泌。在正常的腹膜间皮细胞中,CTGF 表达量很少,而高浓度的葡萄糖可以刺激腹膜间皮细胞分泌更多的 CTGF<sup>[6]</sup>。我们的研究显示高浓度的 PDS 可以明显上调大鼠腹膜间皮细胞 CTGF 的表达。CTGF

作为一个促纤维化因子,参与了腹膜纤维化发生的病理生理过程。如 Zarrinkalam 等<sup>[7]</sup>发现腹膜炎患者腹膜间皮细胞 CTGF mRNA 表达量显著升高。Thaler 等<sup>[8]</sup>发现,腹膜粘连的大鼠 CTGF 表达较正常对照组显著增加,其表达与腹膜纤维化程度密切相关。Liu 等<sup>[9]</sup>研究发现,将逆转录病毒介导的 CTGF-shRNA 转染至人腹膜间皮细胞株后,能显著抑制 TGF- $\beta_1$  诱导的细胞内 CTGF 及细胞外基质的表达,进一步证明了 CTGF 在腹膜纤维化中的重要作用。

CTGF 主要通过以下机制导致纤维化:①促进细胞增殖、胶原合成:CTGF 通过升高细胞周期素 A 水平促进细胞有丝分裂,从而显著增加成纤维细胞中 I 型胶原、整合素  $\alpha_5$  和纤连蛋白基因的转录而引起纤维化<sup>[10]</sup>;②介导细胞粘附:CTGF 可与细胞外基质结合而作为基质相关信号蛋白与肝素结合,促进细胞粘附;③调节细胞外基质基因

的表达:CTGF 可通过转录因子 AP-2 调节基质金属蛋白酶(MMPs)和其抑制物(TIMPs)的平衡<sup>[11]</sup>;④促进新生血管的形成:CTGF 在体内、外均可剂量依赖性的促进血管内皮细胞的黏附、增殖和迁移,促血管生成<sup>[12-13]</sup>;⑤促进细胞表型转化:CTGF 可明显上调人肾脏近曲小管上皮细胞的 Tenascin-C 水平,诱导近曲小管上皮细胞分化为间充质细胞<sup>[14]</sup>。

丹参酮 II A 是中药丹参的提取物,具有明确的分子结构,在临床使用安全无明显副作用。研究已经证明,丹参酮 II A 可以减少血管损伤后细胞外基质胶原的生成<sup>[3]</sup>。本研究发现,在 PDS 中添加丹参酮 IIA 后,腹膜间皮细胞脱落程度,腹膜致密层厚度、间皮下基质的沉积均有明显改善。同时,免疫组化显示腹膜组织 CTGF 表达较 PDS 组有明显的下调,并且这种作用呈现一定的浓度依赖性。提示丹参酮 IIA 作为 PDS 添加剂可能具有抑制 CTGF 的表达,从而抑制腹膜间皮细胞损伤和腹膜致密层的增厚,具有潜在保护腹膜,延缓腹膜纤维化的作用,值得深入研究。

#### 参考文献:

- [1]Zarrinkalam KH, Stanley JM, Gray J, et al. Connective tissue growth factor and its regulation in the peritoneal cavity of peritoneal dialysis patients[J]. *Kidney Int*, 2003, 64(1):331 - 338.
- [2]丁红,王宗谦,马建飞,等. 丹参酮 IIA 磺酸钠对腹膜间皮细胞结缔组织生长因子表达的影响[J]. *医药导报*, 2009,28(11):1414 - 1416.
- [3]陈怀生,龙波,梁玉佳,等. 丹参酮 IIA 对兔髂动脉球囊损伤后胶原生成抑制的效应观察[J]. *中药材*, 2005,28(10):903 - 906.
- [4]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.
- [5]Bradham DM, Igarashi A, Potter RL. Connective tissue growth factor: a cystine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced im-

- mediate early gene product CEF-10[J]. *J Cell Biol*, 1991, 114:1285 - 1294.
- [6]Sakamoto N, Sugimura K, Kawashima H, et al. Influence of glucose and inflammatory cytokines on TGF-beta1 and CTGF mRNA expressions in human peritoneal mesothelial cells[J]. *Int J Mol Med*, 2005,15:907 - 911.
- [7]Zarrinkalam KH, Stanley JM, Gray J, et al. Connective tissue growth factor and its regulation in the peritoneal cavity of peritoneal dialysis patients[J]. *Kidney Int*, 2003,64(1):331 - 338.
- [8]Thaler K, Mack JA, Berho M, et al. Coincidence of connective tissue growth factor expression with fibrosis and angiogenesis in postoperative peritoneal adhesion formation[J]. *Eur Surg Res*, 2005,37(4):235 - 241.
- [9]Liu FY, Xiao L, Peng YM, et al. Inhibition effect of small interfering RNA of connective tissue growth factor on the expression of vascular endothelial growth factor and connective tissue growth factor in cultured human peritonealmesothelial cells[J]. *ChinMed J(Engl)*, 2007, 120(3):231 - 236.
- [10]Kothapalli D, Grotendorst GR. CTGF modulates cell progression in cAMP-arrested NRK fibroblasts[J]. *J Cell Physiol*, 2000,182:119 - 126.
- [11]Fan WH, Karnovsky MJ. Increased MMP-2 expression in CTGF over expression vascular smooth muscle cells[J]. *J Biol Chem*, 2002,277(12):9800 - 9805.
- [12]Babic AM, Chen CC, Lau LF. Fisp12/mouse Connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin Alpha vbeta 3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo[J]. *Mol Cell Biol*, 1999,19(4):2958 - 2966.
- [13]Kondo S, Kubota S, Shimo T, et al. Connective tissue growth factor increased by hypoxia may initiate Angiogenesis in collaboration with matrix metalloproteinases[J]. *Carcinogenesis*, 2002,23(5):769 - 776.
- [14]Frazier K, Williams S, Kothapalli D, et al. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor[J]. *Invest Dermatol*, 1996,107(3):404 - 411.

(编辑:李伟东 董宇)