文章编号:1000-5404(2013)15-1633-04

短篇论著

川芎嗪对高糖致大鼠腹膜间皮细胞 MCP-1 与 NF-κB p65 表达的影响

甘 平,翟小江 (550004 贵阳,贵阳医学院附属医院肾内科)

[摘要] **目的** 观察川芎嗪对高糖致大鼠腹膜间皮细胞 MCP-1 与 NF-κB p65 表达的影响,探讨其在持续性不卧床腹膜透析(continuous ambulatory peritoneal dialysis,CAPD)时腹膜慢性炎症发病机制中的可能作用。**方法** 60 只健康雄性 SD 大鼠按随机数字表法分成 3 组:对照组($n=20$):腹腔每天注射生理盐水 25 mL;模型组($n=20$,HGC 组):腹腔每天注射 4.25% 葡萄糖腹透液 25 mL + 每周 1 次腹腔注射红霉素 6.25 万单位;治疗组($n=20$,HGM 组):腹腔每天注射 4.25% 葡萄糖腹透液 25 mL + 2% 川芎嗪溶液(40 mg/L) + 每周 1 次腹腔注射红霉素 6.25 万单位。8 周后分别处死各组大鼠,取腹膜组织以 SABC 免疫组织化学法检测壁腹膜间皮细胞 MCP-1、NF-κB p65 的表达,并行腹膜组织 HE 及 Masson 染色病理学检查。**结果** 与对照组比较,HGC 组和 HGM 组腹膜间皮细胞 MCP-1[(109.69 ± 5.33),(122.46 ± 5.00)与 NF-κB p65 (104.83 ± 2.31),(116.44 ± 5.55)表达上调($P<0.05$)],且 HGC 组显著高于 HGM 组($P<0.05$)。大鼠腹膜间皮细胞 MCP-1 与 NF-κB p65 表达水平成正相关($r=0.81$,$P<0.05$)。HE 染色后光镜下 HGC 组和 HGM 组可见腹膜间皮细胞由扁平变为圆形、柱形,间皮细胞肥大脱落,间皮下结缔组织明显增厚,可见血管生成以及纤维素样物质沉积,还可见成纤维细胞及单核巨噬细胞浸润,HGC 组表现尤为明显。**结论** 川芎嗪可能拮抗高糖引起的腹膜间皮细胞 MCP-1 与 NF-κB p65 表达,从而减轻腹膜慢性炎症,延缓腹膜纤维化的发生。

[关键词] 川芎嗪;高糖;腹膜间皮细胞;MCP-1;NF-κB p65
[中图法分类号] R282.71; R572.2; R589.1 [文献标志码] A

持续性不卧床腹膜透析(continuous ambulatory peritoneal dialysis,CAPD)是终末期肾病患者肾脏替代治疗的手段之一,与血液透析(Hemodialysis,HD)相比,其具有不需要特殊设备,不依赖透析中心,操作简便,对血流动力学影响小,残肾功能保护较好等优势,近年来受到较多学者的关注和重视。而腹膜纤维化所致超滤功能衰竭是影响患者长期有效透析的重要因素[1]。目前研究表明腹膜透析时腹膜炎的反复发生和腹透液的生物不相容性是导致腹膜纤维化的主要因素,其病理改变主要表现为腹膜壁层单核巨噬细胞浸润和腹膜细胞外基质的沉积。川芎嗪是中药川芎的有效成分,研究证实川芎嗪有提高腹膜透析净超滤量,增加透析充分性,细胞保护及抗炎作用[2]。本实验观察川芎嗪对高糖致大鼠腹膜间皮细胞 MCP-1 与 NF-κB p65 表达的影响,探讨其在腹膜慢性炎症发病机制中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 主要药物与试剂

4.25% 葡萄糖透析液(美国百特公司),注射用乳糖酸红霉素(湖南中南科伦药业有限公司),盐酸川芎嗪注射液(常州制药厂)。兔抗鼠 MCP-1 抗体,兔抗鼠 NF-κB p65 抗体,即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒,5% BSA 封闭液,DAB 显色试剂盒,红细胞裂解液。

1.2 实验动物及分组

健康雄性 SD 大鼠 60 只[动物批号:SCXK(渝)2007-0005],10 周龄,体质量 200 ~ 250 g。按随机数字表法分成 3 组:对照组($n=20$):每只大鼠每天腹腔注射生理盐水 25 mL;模型组($n=20$,HGC 组):每只大鼠每天腹腔注射 4.25% 葡萄糖腹透液 25 mL + 每周 1 次腹腔注射红霉素 6.25 万单位;治疗组($n=20$,HGM 组):每只大鼠每天腹腔注射 4.25% 葡萄糖腹透液 25 mL + 2% 川芎嗪溶液(40 mg/L) + 每周 1 次腹腔注射红霉素 6.25 万单位[3]。常规饲养 SD 大鼠,实验周期为 8 周。

1.3 标本取材

于实验最后 1 d 给予 4.25% 腹透液 25 mL 灌入腹腔后保留 4 h,断头法处死所有大鼠,吸取腹腔液,混匀用于白细胞计数;避开穿刺部位,留取壁腹膜组织约 10 mm × 5 mm × 3 mm 大小,固定于 10% 甲醛 12 h 以上。红细胞裂解液裂解红细胞,血细胞计数法即改良 Neubauer 计数板计数腹腔液体白细胞数目,超过 3 000/mL 的大鼠为并发感染,退出实验。

1.4 HE 染色与免疫组织化学染色及结果判定

取石蜡包埋的壁腹膜组织,作 5 μm 切片,常规方法 HE 染

[基金项目] 贵阳医学院科研基金(K2007-72)
[通信作者] 甘 平,E-mail:gp79172@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130619.1557.018.html (2013-06-19)

色,光镜下观察病理改变。石蜡切片常规脱蜡至水,微波抗原修复,5% BSA 封闭。滴加 MCP-1 一抗,稀释至 1∶200,4 ℃冰箱孵育过夜。滴加 NF-κBp 65 一抗,稀释至 1∶50,4 ℃冰箱孵育过夜。PBS 冲洗 3 次各 2 min;滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG,37 ℃孵育 20 min。PBS 洗 3 次各 2 min;滴加试剂 SABC,37 ℃孵育 20 min。PBS 洗 3 次各 5 min。使用 DAB 显色试剂盒,室温下显色,镜下控制反应时间,蒸馏水洗涤。苏木精轻度复染,蒸馏水洗涤;脱水、透明、封片,显微镜观察。经 DAB 显色,阳性信号为黄色或棕黄色,信号越强,颜色越深。以不含一抗的 PBS 液作阴性对照。应用 Biomias 图像分析软件进行检测。每张切片随机采集 5 个视野计算其平均灰度值,信号越强,灰度值越小。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件,组间比较采用单因素方差分析,两指标间的相关性采用 Spearson 等级相关法。

2 结果

8 周后,60 只大鼠无死亡,各组大鼠均出现不同程度的活动减少,反应迟钝。检测腹腔液未发现大鼠发生感染。

2.1 各组大鼠壁腹膜组织病理改变

HE 染色显示,光镜下对照组腹膜覆盖着一层间皮细胞,细胞核呈扁平的不规则形状,为蓝紫色,细胞质较少,粉红染色,其下为纤维结缔组织,细胞数较少,无明显损伤或损伤轻微,腹膜结构完整。HGC 组和 HGM 组可见腹膜间皮细胞变为圆形、柱形,间皮细胞肥大脱落,间皮下结缔组织明显增厚,可见血管生成以及纤维素样物质沉积,还可见成纤维细胞及单核巨噬细胞浸润,HGC 组表现尤为明显。见图 1。

2.2 免疫组化染色观察各组大鼠壁腹膜组织中 MCP-1 和 NF-κB p65 阳性表达

2.2.1 MCP-1 MCP-1 免疫组化阳性表达多分布于巨噬细胞细胞质,对照组有少量表达。与对照组比较,HGC 组和 HGM 组腹膜间皮细胞 MCP-1 阳性表达明显上调($P<0.05$),且 HGC 组显著高于 HGM 组($P<0.05$),3 组间 MCP-1 平均灰度值比较差异有统计学意义($P<0.05$,表 1)。

表 1 各组大鼠壁腹膜组织中 MCP-1、NF-κB p65 阳性表达

(平均灰度值,$\bar{x} \pm s$)

组别	例数	MCP-1	NF-κB p65
对照组	20	134.33 ± 5.58	129.80 ± 8.74
HGC 组	20	109.69 ± 5.33[a]	104.83 ± 2.31[a]
HGM 组	20	122.46 ± 5.00[ab]	116.44 ± 5.55[ab]

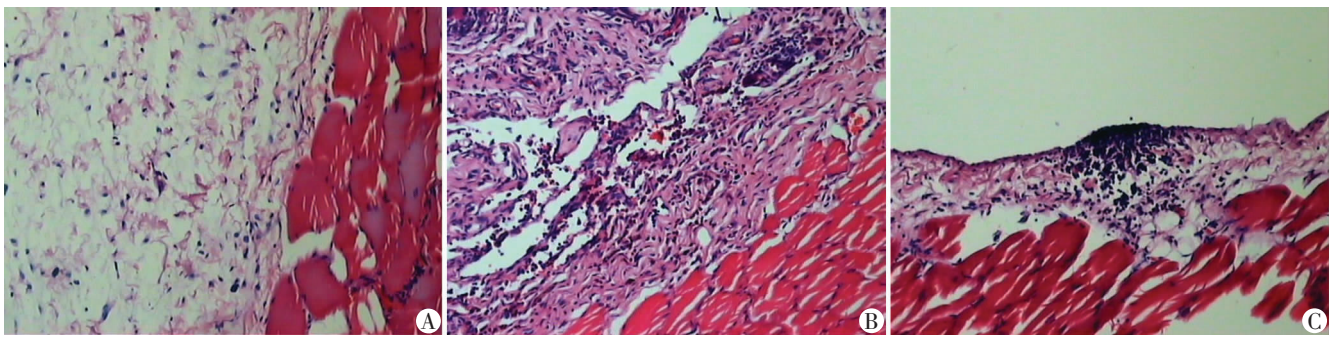
a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 HGC 组比较

2.2.2 NF-κB p65 对照组腹膜组织内可见 NF-κB p65 阳性表达多分布于巨噬细胞、中性粒细胞、间皮细胞和血管内皮细胞,细胞质呈弱阳性表达。HGC 组阳性表达主要以细胞核为主,HGM 组阳性表达主要分布于细胞质和细胞核。与对照组比较,HGC 组和 HGM 组腹膜间皮细胞 NF-κB p65 阳性表达明显上调,且 HGC 组显著高于 HGM 组,3 组间 NF-κB p65 平均灰度值比较差异有统计学意义($P<0.05$,表 1)。

2.2.3 壁腹膜组织 MCP-1 与 NF-κB p65 表达的相关性 HGC 组及 HGM 组壁腹膜组织 MCP-1 的表达与 NF-κB p65 的表达均呈明显正相关(分别为 $r=0.81$,$P<0.05$ 及 $r=0.87$,$P<0.05$)。

3 讨论

腹膜透析是治疗终末期肾衰竭的主要方法之一,腹膜结构和功能的稳定是 CAPD 治疗的基础,而腹膜纤维化是 CAPD 患者常见的并发症,其所导致的腹膜结构改变和功能丧失,最终超滤失败,透析效能降低是大多数 CAPD 患者退出腹膜透析的主要原因之一[1,4-5]。随着腹透技术和材料的进步,居住环境的改善,因腹腔感染所致的腹膜硬化明显下降,而非感染因素所致者相对增加。商业的葡萄糖腹膜透析液是高渗、高糖、低 pH 值的,造成了透析液的生物不相容性,进而导致腹膜表层间皮细胞损伤,并抑制损伤后的再修复,最终致腹膜间皮细胞剥脱。间皮细胞缺失后,其留下的空间被胶原结缔组织填充最终形成纤维化改变,



A:对照组;B:HGC 组;C:HGM 组

图 1 光镜下观察各组大鼠壁腹膜组织病理学变化 (HE ×400)

导致腹膜功能衰竭[6],而腹膜间皮细胞的改变是导致上述病理改变的始动环节[7]。腹膜透析伴发的腹膜纤维化,是当前导致患者腹膜功能衰竭而退出治疗的最主要原因[8]。

川芎嗪为川芎的主要有效成分之一。药理实验证实,川芎嗪能抗血小板凝聚、抗炎、抗纤维化、抗氧自由基,并有钙离子拮抗等作用[9],并可用于缺血再灌注损伤的保护[10]。无感染的长期CAPD患者,由于非生物相容性腹透液的应用,腹腔巨噬细胞和间皮细胞等可产生多种细胞因子和生长因子,腹膜处于慢性持续性炎症状态,伴腹膜结构进行性破坏[11]。董秀清等[12]报道适当剂量的川芎嗪能对抗常规腹膜透析液引起的间皮细胞抑制和损伤,但随着剂量的加大(160 mg/L)其抑制作用减低乃至消失。因此,在长程CAPD过程中,加入适当剂量的川芎嗪可能有助于减轻透析液引起的慢性炎症反应,从而防止或延缓腹膜纤维化的发生、发展。研究[13]报道,川芎嗪能对抗IFN-γ及高糖透析液引起的间皮细胞CD40高表达。CD40、CD40L相互作用在调节炎症和免疫中起着重要作用。二者过度活化,可加重炎症反应,诱发纤维化,导致机体结构和功能的破坏。川芎嗪对腹膜间皮细胞具有一定的保护作用,能减轻高糖透析液引起的腹膜间皮细胞损伤[14]。钙拮抗剂能抑制成纤维细胞胶原基因的表达,川芎嗪具有钙离子拮抗作用,且呈浓度依赖性阻滞效应,防止细胞内"钙超负荷"[15]。

MCP-1是特异性的单核/巨噬细胞趋化因子,在器官进行性纤维化中起重要作用。当机体有炎症存在时,MCP-1的表达迅速增加,并通过与受体CCR2的结合,来启动炎性细胞的迁移和活化[16]。腹膜的主要细胞群除了腹膜固有单核/巨噬细胞外,腹膜成纤维细胞和PMC均可分泌MCP-1[17]。本实验证实:PMC可少量表达MCP-1,这种基础表达可能参与了腹膜的修复和防御,当MCP-1表达持续增加时,单核/巨噬细胞在腹膜的长期浸润对腹膜损伤发挥了重要作用,MCP-1诱导单核细胞在腹膜内聚集可刺激细胞增殖和参与一些原因造成的腹膜功能退化。NF-κB是参与基因转录的蛋白质分子,广泛存在于机体各种组织细胞中。NF-κB能够调节多种参与炎症反应的细胞因子、黏附分子和蛋白酶类的基因转录过程,与炎症的发生密切相关[18]。典型的NF-κB是p50和p65的异源二聚体,也是其活性的主要形式[19]。当细胞受到外界因素刺激时,细胞质内NF-κB与抑制蛋白(IκBs)分离并活化,进入细胞核内与DNA结合启动基因转录,调节包括细胞因子和炎症介质的众多蛋白质表达,如MCP-1,从而参与调节组织细胞的生理、病理反应[20]。本研究发现:高浓度葡萄糖腹膜透析液灌入大鼠腹腔后,引起PMC中NF-κB p65的高表达,导致其所介导的各种炎症因子的释放,腹膜损伤加重。光镜下可见壁腹膜有纤维组织积聚,间皮细胞肥大、脱落,间质炎性细胞浸润以及血管明显增生。川芎嗪加入到高糖透析液中应用后,间皮细胞基本完好,基质无明显沉积。

本研究结果显示,腹膜透析液灌注后壁腹膜组织MCP-1与NF-κB p65表达明显增加,加入川芎嗪组可显著抑制MCP-1与NF-κB p65的组织表达量。MCP-1的表达与NF-κB p65的活化以及腹膜纤维化呈正相关,提示活化的NF-κB p65可能通过加强MCP-1的表达,从而诱导单核细胞浸润,加重腹膜纤维化的发展。川芎嗪能显著下调大鼠腹膜间皮细胞MCP-1与NF-κB p65的表达,使壁腹膜纤维化减轻。因此推测川芎嗪可能通过抑制MCP-1与NF-κB p65的表达,保护间皮细胞,保护腹膜结构和功能,发挥抗腹膜纤维化的作用。

参考文献:

[1] Margetts P J, Kolb M, Yu L, *et al*. Inflammatory cytokines, angiogenesis, and fibrosis in the rat peritoneum[J]. Am J Pathol, 2002, 160(6): 2285-2294.

[2] 阳晓, 叶任高, 杨琼琼, 等. 川芎嗪对大鼠腹膜超滤功能影响的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(9): 682-684.

[3] 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): 495-597.

[4] Lai K N, Lai K B, Lam C W, *et al*. Changes of cytokine profiles during peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis[J]. Am J Kidney Dis, 2000, 35(4): 644-652.

[5] Zweers M M, de-Waart D R, Smit W, *et al*. Growth factors VEGF and TGF-beta1 in peritoneal dialysis[J]. J Lab Clin Med, 1999, 134(2): 124-132.

[6] De-Vriese A S, Mortier S, Lameire N H. What happens to the peritoneal membrane in long term peritoneal dialysis[J]. Perit Dial Int, 2001, 21(Suppl 3): S9-S18

[7] Schreiber M. Membrane viability in the long-term peritoneal dialysis patients[J]. Perit Dial Int, 1997, 17(3): 19-24.

[8] Oreopoulos I. The optimization of continuous ambulatory peritoneal dialysis[J]. Kidney Int, 1999, 55(3): 1131-1149.

[9] 赵永辰, 陈信义. 川芎嗪临床应用研究[J]. 中国医药学报, 2002, 17(1): 53-56.

[10] 王齐荣. 川芎嗪对心肺复苏后脑缺血再灌注损伤的临床研究[J]. 中国实用医药, 2012, 7(17): 157.

[11] 阳晓，叶任高. 趋化因子与CAPD相关性腹膜炎[J]. 国外医学：泌尿系统分册，1999，19(1)：13－15.
[12] 董秀清，阳晓，叶任高，等. 川芎嗪抗腹膜间皮细胞损伤的实验研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志，2001，2(8)：441－443.
[13] 阳晓，叶任高，杨琼琼，等. 川芎嗪对腹膜间皮细胞CD40表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志，2001，21(12)：916－919.
[14] Yang X，Ye R G，Kong Q Y，*et al*. The effect of peritoneal dialysis solution on CD40 expression in rat peritoneal mesothellial cells[J]. Perit Dia Int，2001，21(Supp 1)：S38.
[15] 鹿中华，王锦权. 川芎嗪对脓毒症致肝损伤保护作用的研究进展[J]. 中国中西医结合急救杂志，2008，15(4)：252－253.
[16] 吴四海，楼跃，黄磊. 单核细胞趋化蛋白-1的作用机制研究进展[J]. 中华临床医师杂志：电子版，2012，6(10)：2773－2775.
[17] Witowski J. Korybalska K，Ksiazek K，*et al*. Peritoneal dialysis with solutions low in glucose degradation products is associated with improved biocompatibility profile towards peritoneal mesothelial cells[J]. Nephrol Dial Transplant，2004，19(4)：917－924.
[18] 刘杰，阚丹，刘立思. IKK/IκB/NF-κB信号通路阻断及临床应用[J]. 实用医学杂志，2008，24(23)：4147－4149.
[19] Perkins N D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function[J]. Nat Rev Mol Cell Biol，2007，8(1)：49－62.
[20] 郭汉城. NF-κB及其与肾脏疾病关系研究进展[J]. 国外医学：泌尿系统分册，1999，19(5)：197－200.

（**收稿**：2013-04-18；**修回**：2013-05-14）
（编辑　龙　亮）

短篇论著

文章编号：1000-5404(2013)15-1636-03

9例Castleman病临床观察及文献分析

符　刚，田小波，陈洁平，张　勇，陈　润　（400038 重庆，第三军医大学西南医院血液科）

［**摘要**］ **目的**　分析Castleman病(castleman disease，CD)的临床特点和治疗预后，提高对该病的认识和诊治水平。**方法**　回顾性分析我院2008－2012年收治的9例Castleman病患者的临床资料，并进行相关文献复习。**结果**　通过病理诊断确诊局灶型(localized CD，LCD)患者5例，多中心型(multicentric CD，MCD)患者4例。病理类型：透明血管型6例，浆细胞型3例。9例患者均出现淋巴结肿大，病程1～9个月。5例LCD患者中4例因无痛性包块就诊，1例CT示右肺可见一大小约3.5 cm×4.0 cm占位。经手术切除，效果较好，随访未复发。4例MCD患者全身症状明显，如盗汗、发热(低热)、消瘦、乏力、贫血，肝脾大，并有自身免疫性溶血性贫血，全身多处骨质破坏，月经紊乱等。MCD患者经联合化疗后病情稳定。**结论**　Castleman病主要依靠病理学确诊。LCD病变局限，病症较轻，手术治疗后长期生存。MCD病变广泛，常有多系统侵犯，需通过化疗控制其发展。

［**关键词**］ Castleman病；诊断；治疗
［**中图法分类号**］ R733.4　　［**文献标志码**］ A

Castleman病[1](castleman disease，CD)，又称血管滤泡性淋巴组织增生、巨大淋巴结增生症。是以无痛性巨大淋巴结肿大为突出临床特点的一种慢性淋巴组织增生性疾病，为原因不明的反应性淋巴结病之一。临床上根据患者淋巴结肿大和器官受累程度不同，分为局灶型(localized CD，LCD)和多中心型(全身型或系统型multicentric CD，MCD)[2]。其中多中心型病起病年龄较大，症状较重，预后差，早诊断、早治疗尤为重要。Castleman病临床较为少见，为进一步提高对其的认识，回顾分析我院2008－2012年收治的9例Castleman病患者临床资料并结合近年文献复习进行分析。

1　资料与方法

1.1　一般资料

2008－2012年我院收治9例Castleman病患者，包括男性3例，女性6例，年龄18～72岁，中位年龄39.6岁。患者入院后均有详细症状、体征记录，患者对诊治知情同意。9例患者均出现淋巴结肿大。病变部位：颈部6例、纵隔3例、腹腔内3例、腹股沟2例和右肺1例。肿块直径2.5～6.0 cm。病程1～9个月。5例LCD患者中4例因无痛性包块就诊，1例以咳嗽咳痰为首发症状，CT示右肺可见一大小约3.5 cm×4.0 cm占位。MCD型4例，均出现全身症状如盗汗、发热(低热)、消瘦、乏力、贫血，多处淋巴结肿大、肝脾大；其中1例出现自身免疫性溶血性贫血，并发生溶血危象，1例出现全身多处骨质破坏，

［**通信作者**］ 陈洁平，电话：(023)68765196，E-mail：chenjpxn@163.com
［**优先出版**］ http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130312.1339.004.html(2013-03-12)