

• 论 著 •      doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.21.001

下调 PKC-α 基因对大鼠腹膜透析超滤衰竭的影响研究\*

李玲麟,毕丹青,杨艳萍,何 杰,袁红伶<sup>△</sup>  
(昆明医科大学第一附属医院,昆明 650032)

**[摘要]** 目的 探讨蛋白激酶 C-α(PKC-α)基因在腹膜透析大鼠超滤衰竭中的作用。方法 细胞水平检测下调 PKC-α 基因后血管内皮生长因子(VEGF)基因的表达量。将雄性 SD 大鼠分为正常对照组、假手术组、尿毒症组、腹膜透析 2 周组(PD2 组)、腹膜透析 4 周组(PD4 组)、腹膜透析 4 周后腹腔注射空质粒组(NC 组)、腹膜透析 4 周后腹腔注射 PKC-α siRNA 组(PKC-α siRNA 组)。处死前行腹膜平衡试验(PET),测定超滤量和葡萄糖转运量(MTG);Masson 染色观察腹膜形态学变化;CD34 免疫染色计数腹膜组织微血管密度(MVD),评估腹膜血管新生程度;检测各组大鼠腹膜组织 PKC-α mRNA 和蛋白表达水平。结果 在细胞中下调 PKC-α 基因后,VEGF 表达量明显降低。与正常对照组相比,尿毒症、PD2、PD4、NC 组和 PKC-α siRNA 组大鼠腹膜功能明显降低,MVD 明显增大,PKC-α mRNA 和蛋白表达水平明显升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。与尿毒症组相比,PD2、PD4 组和 NC 组大鼠腹膜组织 MVD 明显增大,PKC-α mRNA 和蛋白表达水平明显升高,且 PD4 组和 NC 组变化更明显。与 PD4 组和 NC 组比,PKC-α siRNA 组大鼠腹膜功能明显好转,MVD 明显减小,PKC-α mRNA 和蛋白表达水平明显降低。结论 有可能通过下调 VEGF 基因的表达量,延缓超滤衰竭进程;通过改善透析液生物相容性、药物治疗或基因转染,以期减少细胞因子对治疗的影响。

**[关键词]** 蛋白激酶 C-α;血管内皮生长因子;超滤衰竭;腹膜透析;腹膜平衡试验;微血管密度  
**[中图法分类号]** R459.5      **[文献标识码]** A      **[文章编号]** 1671-8348(2019)21-3601-07

Study on influence of down-regulating PKC-α gene on ultrafiltration failure in rat peritoneal dialysis model\*  
LI Linglin, BI Danqing, YANG Yanping, HE Jie, YUAN Hongling<sup>△</sup>  
(First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650023, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the role of protein kinase C-α (PKC-α) gene during the ultrafiltration failure process in peritoneal dialysis rats. **Methods** The vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression level was detected in the cellular level. Male SD rats were divided into the normal group, sham operation group and uremic group. And the peritoneal dialysis groups included the non-treatment group, peritoneal dialysis for 2 weeks group (PD2 group), peritoneal dialysis for 4 weeks group (PD4 group), PD4 injected with empty plasmid group (NC group) and PKC-α siRNA group (PKC-α siRNA group). The peritoneal balance test (PET) was performed before sacrifice, the ultrafiltration amount and glucose transport amount (MTG) were determined. Then the peritoneal morphological changes were observed by the Masson staining. The peritoneal microvessel density (MVD) was counted by the CD34 immunostaining, and the degree of peritoneal angiogenesis was evaluated. The expression levels of PKC-α mRNA and protein in rat peritoneal tissues were detected in each group. **Results** The VEGF expression level was significantly decreased after down-regulating intracellular PKC-α gene. Compared with the normal control group, the peritoneal function in the uremic group, PD2, PD4, NC and PKC-α siRNA groups was decreased significantly, while MVD and the expression level of PKC-α mRNA and protein in peritoneal tissues were increased significantly, and the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). Compared with the uremic group, the MVD and the expression level of PKC-α mRNA and protein in peritoneal tissues in the PD2, PD4 and NC groups were increased significantly, moreover, these changes were more significant in the PD4 and NC groups. Compared with the PD4 and NC groups, the peritoneal function in the PKC-α siRNA group was improved significantly, MVD and the expression level of PKC-α mRNA and protein were significantly decreased. **Conclusion** The ultrafiltration failure process may be delayed through down-regulating the VEGF gene expression level; improving the dialysate biocompatibility,

\* 基金项目:国家自然科学基金地区基金项目(81460649,81360662);云南省科技厅应用基础研究项目(2013FZ);云南省内设机构项目(2014NS229);云南省医学领军人才项目(L-201606)。 作者简介:李玲麟(1992—),硕士,主要从事基因对腹膜透析超滤衰竭的影响研究。  
<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: kmyuanhongling@163.com。

medication therapy or gene transfection may be expected to decrease the influence of cytokines on the therapy.

**[Key words]** protein kinase C- $\alpha$ ; vascular endothelial growth factors; ultrafiltration failure; peritoneal dialysis; peritoneal balance test; microvessel density

腹膜透析是治疗终末期肾病(ESRD)的一种有效的替代疗法<sup>[1]</sup>。ESRD 若不能得到及时诊治,肾单位会进行性破坏,机体也会因代谢产物无法排出而破坏内环境的稳定。20 世纪 60 年代首次引入腹膜透析作为肾脏替代疗法,全球约 11% 的肾脏替代治疗患者接受腹膜透析<sup>[2]</sup>。与血液透析相比,腹膜透析具有操作简便、早期生存率较高、残肾功能保护作用良好等优点<sup>[3]</sup>。然而,近 40% 的患者接受 3 年腹膜透析后会发​​生超滤衰竭,这是长期腹膜透析患者终止治疗的主要原因<sup>[4]</sup>。以往的研究表明,小分子 RNA、蛋白激酶、细胞因子等因素均与超滤衰竭有关<sup>[5-7]</sup>。

蛋白激酶 C(PKC)属于丝/苏氨酸蛋白激酶家族,在细胞增殖、分化和凋亡等过程中发挥重要作用,目前至少有 12 种同工酶亚型<sup>[8]</sup>。PKC- $\alpha$  是经典 PKC 家族成员之一,负责维持细胞增殖与凋亡之间的平衡。PKC- $\alpha$  在包括癌症在内的几种主要疾病的发生、发展中起着重要作用<sup>[9]</sup>。研究发现 PKC- $\alpha$  与肿瘤多药耐药有关,用 siRNA 干扰 PKC- $\alpha$  基因可部分逆转肿瘤细胞耐药性<sup>[10]</sup>。另外有研究指出 PKC- $\alpha$  可诱导血管内皮生长因子(VEGF)的表达从而促进人内皮细胞的血管生成<sup>[11]</sup>。高糖腹膜透析液及尿毒症环境是诱发 VEGF 表达增加的关键因素,可导致血管新生最终导致腹膜超滤衰竭<sup>[12]</sup>。然而,有关超滤量与 PKC- $\alpha$  基因之间的关系研究较少。因此,本文拟研究下调 PKC- $\alpha$  基因对大鼠腹膜透析过程中超滤衰竭的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞培养及转染** 设计 3 组 siRNA 序列(广州 Ribuo Biotech 公司)见表 1,分别退火后连接到 pLK0.1 TRC 克隆载体上构建 shRNA;以质粒 shRNA: psPAX2: pMD2G=4:3:1 的比例转染 293T 细胞包被 shRNA 慢病毒,慢病毒感染 NRK-52E 细胞(美国 ATCC 公司)后提取 RNA。real-time RT-PCR 检测 PKC- $\alpha$  基因的下调情况和 VEGF 基因的表达情况。

**1.2 实验材料及分组** 7 周龄雄性 SD 大鼠 56 只购于河南省实验动物中心,体质量 190~210 g。按实验大鼠饲养规范饲养,分为 7 组,每组 8 只。正常对照组无处理;假手术组行双侧肾脏包膜剔除术,左右肾相隔 1 周;尿毒症组行 5/6 肾脏切除术;腹膜透析 2 周组(PD2 组)行 5/6 肾脏切除术后,腹膜透析 2 周;腹膜透析 4 周组(PD4 组)行 5/6 肾脏切除术后,腹膜透析 4 周;腹膜透析 4 周后腹腔注射空质粒组(NC 组)行 5/6 肾脏切除术后,膜透析 4 周,并于第 3、4 周腹腔注射 0.1 mg/kg 空质粒;腹膜透析 4 周后腹腔注射 PKC- $\alpha$  siRNA 组(PKC- $\alpha$  siRNA 组)行 5/6 肾脏

切除术后,腹膜透析 4 周,并于第 3、4 周腹腔注射 0.1 mg/kg PKC- $\alpha$  siRNA(广州 Ribuo Biotech 公司),除 NC 组外其余组于相同时间腹腔注射等体积生理盐水。PKC- $\alpha$  siRNA 正义链 5'-GGC GUC CUG UUG UAU GAA ADA DT-3',反义链 3'-DTD ACC GCA GGA CAA CAU ACU UU-5'<sup>[13]</sup>。

## 1.3 方法

**1.3.1 构建模型** 尿毒症组与 PD 组均行 5/6 肾脏切除术。左肾 2/3 切除,10%水合氯醛 0.3 mL/100 g 麻醉后俯卧位固定大鼠,取脊柱旁约 0.5 cm 与左肋下 1 cm 交界处为手术切口,游离左肾并剔除左肾包膜,梯形切除肾脏组织上、下极各 1/3,称量肾组织,明胶海绵按压切口止血后缝合切口。1 周后行右肾全切术,术后均需青霉素抗感染 3 d。6 周后大鼠摘眼球取血 1~2 mL,检测血尿素(BUN)和血肌酐(Scr)评价其肾功能,确认模型是否构建成功。将大鼠麻醉后仰卧位固定,于肋下 2 cm 处植入腹透管经皮下隧道于头颈部背侧两耳连线中点下处引出腹透管,注入生理盐水,液体流出通畅视置管成功。青霉素抗感染,每日肝素 50 U 经透析管腹腔注入,1 周后经腹膜透析管进行 4.25% 双联腹膜透析液透析,每日 3 mL/100 g 大鼠体质量。透析后称重,检测 Scr 评价大鼠肾功能,确认模型是否构建成功。

**1.3.2 腹膜平衡试验(PET)** 大鼠腹膜透析 2 d 后,进行 PET,测定各组大鼠的超滤量和葡萄糖转运量,评价各组大鼠腹膜运转功能。向大鼠腹腔内灌注 25 mL 透析液,于 0 h 和 4 h 分别采集 1 mL 透出液,留取静脉血。4 h 后开腹,用纱布吸干腹腔液体后称重。检测葡萄糖(Glu)、Scr、BUN 水平。

**1.3.3 免疫组织化学染色** 兔抗鼠 PKC- $\alpha$  单克隆抗体(1:1 000,ab32376,Abcam)和生物素标记的山羊抗兔 IgG(1:1 000,ab6789,Abcam)二抗进行免疫组织化学制片。每张切片随机选取高倍镜( $\times 200$ )下 5 个视野,每个视野计数 100 细胞,计算阳性细胞百分比。切片中 0~10% 细胞质染色棕黄色为阴性(-),10% 以上为阳性(+)<sup>[14]</sup>。

**1.3.4 Masson 染色** 壁层腹膜行经典 Masson 染色,观察腹膜间皮细胞形态学变化,测定腹膜厚度。

**1.3.5 CD34 染色** CD34 抗体标记内皮细胞,对大网膜进行染色并计数<sup>[15]</sup>。血管密度最高区随机观察 5 个高倍视野( $\times 200$ ),每个视野计数血管平均值为微血管密度(MVD)。单个内皮细胞或内皮细胞簇不论是否有血管腔均计数为 1 个血管,分辨不清或染色模糊的细胞及管腔面积大于 8 个红细胞直径的血管不计数在内。

表 1 siRNA 序列

| 名称          | 正义链(5'-3')                                                                       | 反义链(5'-3')                                                                        |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| shratPKCα-1 | CCG GGG ACT GTT CTT TCT TCA CAA ACT CGA<br>GTT TGT GAA GAA AGA ACA GTC CTT TTT G | AAT TCA AAA AGG ACT GTT CTT TCT TCA CAA<br>ACT CGA GTT TGT GAA GAA AGA ACA GTC C  |
| shratPKCα-2 | CCG GCA TTC AGC AAG TCG GAA AAT TCT CGA<br>GAA TTT TCC GAC TTG CTG AAT GTT TTT G | AAT TCA AAA ACA TTC AGC AAG TCG GAA AAT T<br>CTC GA GAA TTT TCC GAC TTG CTG AAT G |
| shratPKCα-3 | CCG GCC AGC CAG TGG ATG GTA CAA GCT CGA<br>GCT TGT ACC ATC CAC TGG CTG GTT TTT G | AAT TCA AAA ACC AGC CAG TGG ATG GTA CAA<br>GCT CGA GCT TGT ACC ATC CAC TGG CTG G  |

表 2 引物序列

| 名称      | 正义链(5'-3')           | 反义链(5'-3')          |
|---------|----------------------|---------------------|
| β-actin | GAGCACAGAGCCTCGCCTTT | TGACCCATGCCACCATCAC |
| PKC-α   | CGTAGGAGTGTCCTGGA    | TCGGAACCATGTATCG    |

表 3 大鼠造模前后体质量及肾功能情况( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别    | <i>n</i> | Scr (μmol/L) | BUN (mmol/L) | 造模前体质量(g)    | 造模 6 周体质量(g) |
|-------|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 正常对照组 | 8        | 24.98±5.61   | 2.69±1.13    | 359.12±15.23 | 447.32±16.24 |
| 假手术组  | 8        | 25.09±4.73   | 2.71±1.02    | 361.36±15.46 | 444.84±15.83 |
| 尿毒症组  | 8        | 67.32±5.28   | 9.54±1.48    | 358.49±14.67 | 396.55±16.56 |

表 4 大鼠透析前后体质量及肾功能情况( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别    | <i>n</i> | 透析前 Scr(μmol/L) | 透析后 Scr(μmol/L) | 透析前体质量(g)   | 透析后体质量(g)   |
|-------|----------|-----------------|-----------------|-------------|-------------|
| 正常对照组 | 8        | 25.15±4.93      | 26.90±5.81      | 345.86±8.69 | 441.90±8.73 |
| 假手术组  | 8        | 26.49±5.83      | 26.38±4.65      | 346.04±8.54 | 442.04±8.63 |
| 尿毒症组  | 8        | 68.24±7.33      | 70.34±7.56      | 354.35±7.50 | 352.32±8.63 |
| PD 组  | 32       | 67.28±8.22      | 61.83±5.88      | 399.44±9.19 | 427.31±7.79 |

1.3.6 real-time RT-PCR 检测 提取 RNA,根据 Genebank 中 PKC-α 核苷酸序列设计引物,见表 2。引物由 Invitrogen 公司合成。real-time RT-PCR 采用北京全式金公司的反应体系,β-actin 为内参对照,按照 2<sup>-ΔΔCt</sup> 进行半定量分析。

1.3.7 Western blot 检测 提取总蛋白,经蛋白样本处理,每孔上样 40 μg 电泳分离蛋白后转膜。PKC-α 一抗(1:1 000,Cell Signal),β-actin 一抗(1:1 000,Cell Signal Technology) 4 ℃ 孵育过夜,清洗一抗后二抗室温孵育,Bio-rad Gel Dol EZ 成像仪显影。目的条带采用 Image J 软件进行灰度分析,β-actin 设为内参。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 进行统计分析。计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,两组之间比较采用 *t* 检验,多组之间比较采用 One-Way ANOVA 单因素方差分析。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 下调 PKC-α 基因对 VEGF 基因的影响 siPKCα-1、siPKCα-2、siPKCα-3 分别在 NRK-52E 细胞中对 PKC-α 基因进行下调,3 组中 PKC-α 基因与正常对照组相比明显降低(*P*<0.01),VEGF 基因也明显降低(*P*<0.01),见图 1。

2.2 尿毒症大鼠模型鉴定 正常对照组与假手术组

大鼠生长情况良好,饮食正常,活动较多,体质量稳定增加,存活率 100%。尿毒症组大鼠活动较少,饮食差,体质量减轻,存活率 88.9%,术后死亡大鼠考虑为失血性休克死亡,每组选取 8 只进行后续实验。与正常对照组相比,假手术组大鼠肾功能无明显变化(*P*>0.05),尿毒症组大鼠 BUN 和 Scr 水平明显升高(*P*<0.05),建模成功,见表 3。

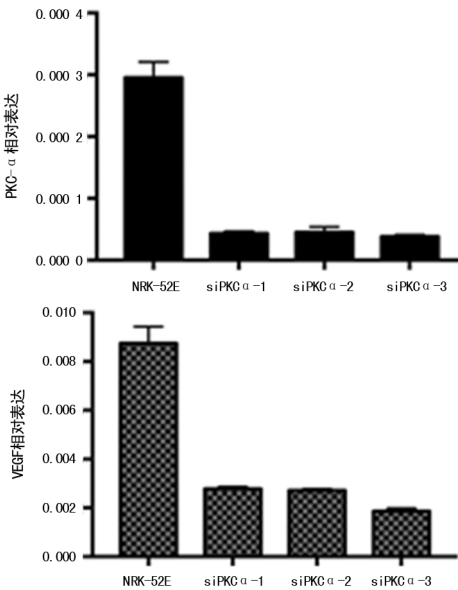
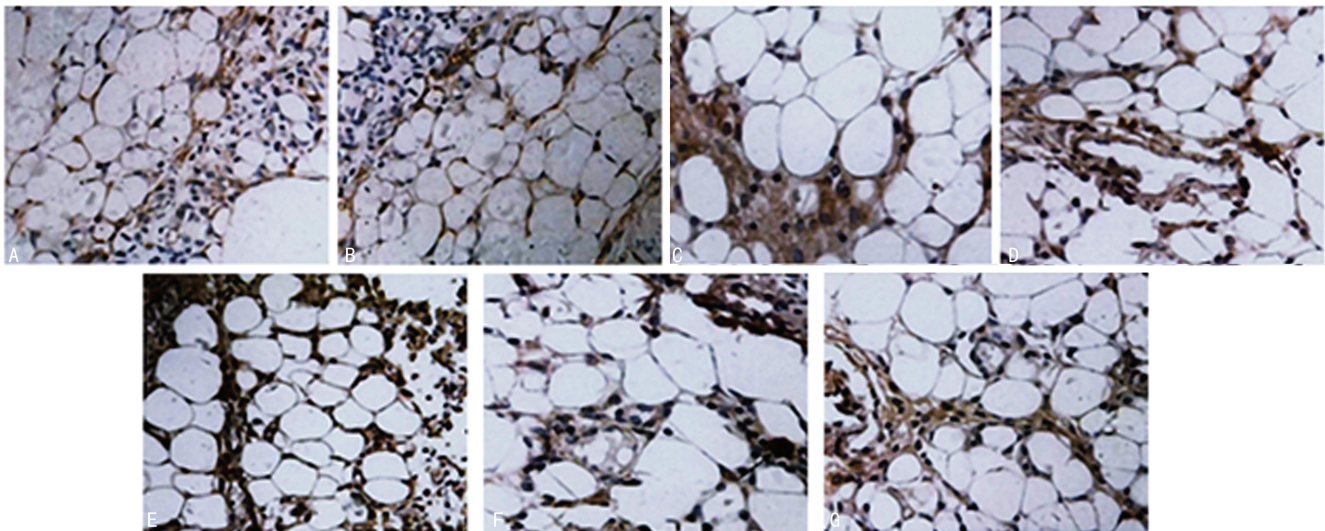


图 1 细胞水平检测下调 PKC-α 对 VEGF 的影响



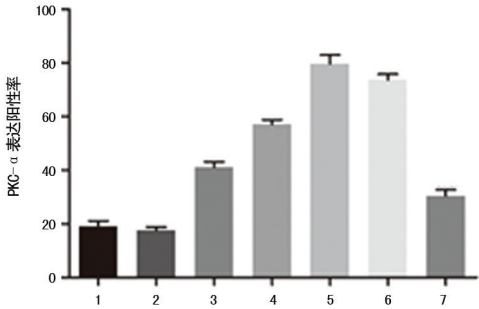
A: 正常对照组; B: 假手术组; C: 尿毒症组; D: PD2 组; E: PD4 组; F: NC 组; G: PKC- $\alpha$  siRNA 组  
图 2 各组大鼠腹膜组织免疫组化染色情况( $\times 200$ )

**2.3 尿毒症腹膜透析大鼠模型鉴定** 与正常对照组相比,假手术组大鼠体质量和肾功能无明显变化( $P>0.05$ ),尿毒症组大鼠体质量明显降低( $P<0.05$ ),Scr 水平明显升高( $P<0.05$ )。与尿毒症组相比,PD 组大鼠体质量明显升高( $P<0.05$ ),Scr 水平降低,建模成功,见表 4。

**2.4 各组大鼠腹膜功能情况** 与正常对照组相比,PKC- $\alpha$  siRNA、NC、PD2 组和 PD4 组大鼠超滤量均降低,葡萄糖转运量(MTG)均升高( $P<0.05$ )。NC、PD4 周组和 PD2 周组相比,超滤量降低,MTG 升高( $P<0.05$ )。与 PD4 组和 NC 组相比,PKC- $\alpha$  siRNA 组大鼠超滤量明显升高,MTG 明显降低( $P<0.05$ ),见表 5。

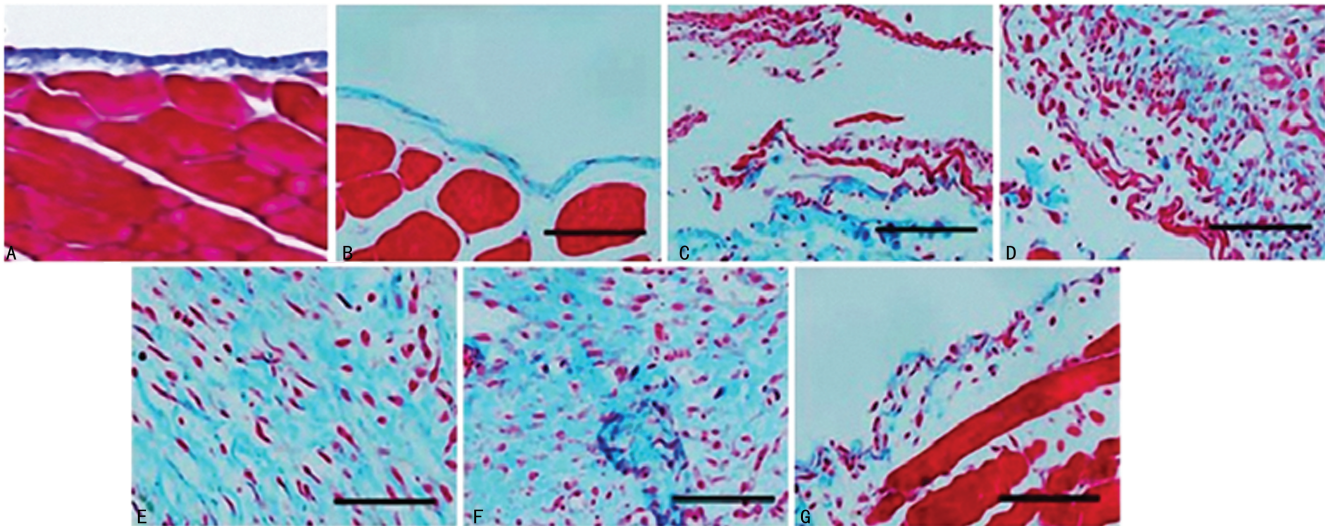
**2.5 各组大鼠 PKC- $\alpha$  表达阳性率** 在正常肾组织中,PKC- $\alpha$  主要表达于肾小管上皮细胞,少量表达于肾小管系膜细胞。与正常对照组相比,假手术组无明显变化( $P>0.05$ ),其余 5 组 PKC- $\alpha$  表达均上升

( $P<0.05$ );与尿毒症组相比,PD2、PD4 和 NC 组大鼠腹膜组织 PKC- $\alpha$  表达均升高,其中 PD4、NC 组比 PD2 组变化更明显( $P<0.05$ )。与 PD4 和 NC 组相比,PKC- $\alpha$  siRNA 组大鼠腹膜组织 PKC- $\alpha$  表达明显降低( $P<0.05$ ),见图 2、3。

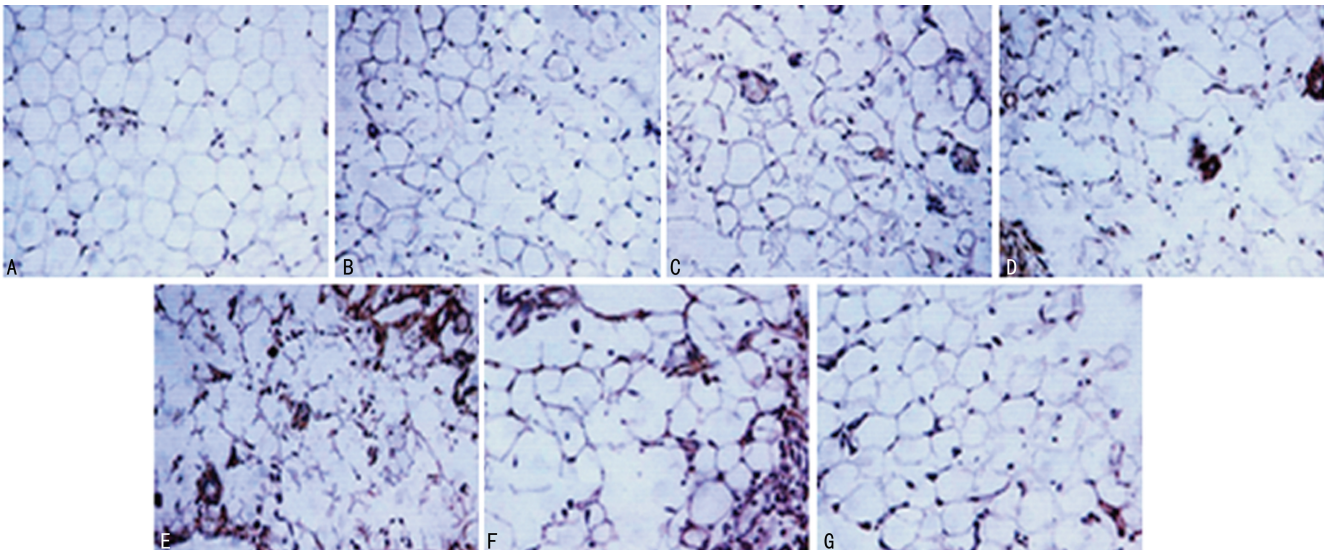


1: 正常对照组; 2: 假手术组; 3: 尿毒症组; 4: PD2 组; 5: PD4 组; 6: NC 组; 7: PKC- $\alpha$  siRNA 组

图 3 各组 PKC- $\alpha$  表达情况



A: 正常对照组; B: 假手术组; C: 尿毒症组; D: PD2 组; E: PD4 组; F: NC 组; G: PKC- $\alpha$  siRNA 组  
图 4 各组大鼠腹膜组织 Masson 染色结果( $\times 200$ )



A:正常对照组;B:假手术组;C:尿毒症组;D:PD2 组;E:PD4 组;F:NC 组;G:PKC-α siRNA 组

图 5 各组大鼠腹膜组织 CD34 染色情况

**2.6 各组大鼠腹膜组织形态学变化** 与正常对照组相比,假手术组腹膜组织形态学无明显变化( $P>0.05$ ),其余 5 组大鼠壁层腹膜可见大量胶原纤维的沉积,致密层、腹膜明显增厚( $P<0.05$ )。与尿毒症组相比,PD2、PD4 组和 NC 组腹膜明显增厚( $P<0.05$ ),其中 PD4、NC 组比 PD2 组变化更明显( $P<0.05$ )。与 PD4 组和 NC 组相比,PKC-α siRNA 组腹膜明显变薄( $P<0.05$ ),见图 4。

表 5 各组大鼠腹膜功能比较( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别            | <i>n</i> | 超滤量(mL)   | MTG(mmol/kg BW) |
|---------------|----------|-----------|-----------------|
| 正常对照组         | 8        | 8.96±0.78 | 12.28±0.42      |
| PD2 组         | 8        | 4.92±0.88 | 15.56±0.72      |
| PD4 组         | 8        | 1.45±0.61 | 19.68±0.53      |
| NC 组          | 8        | 1.44±0.47 | 19.72±0.75      |
| PKC-α siRNA 组 | 8        | 6.93±0.73 | 14.69±0.71      |

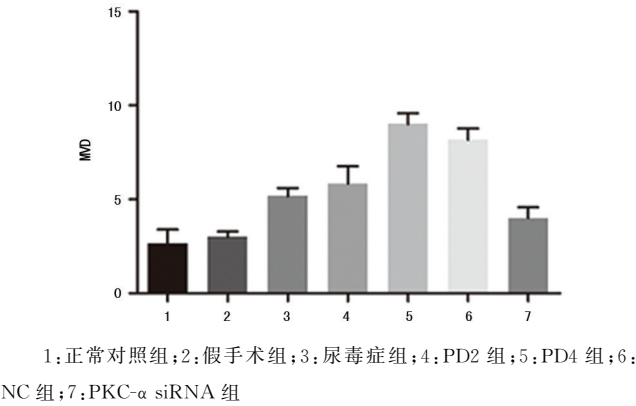
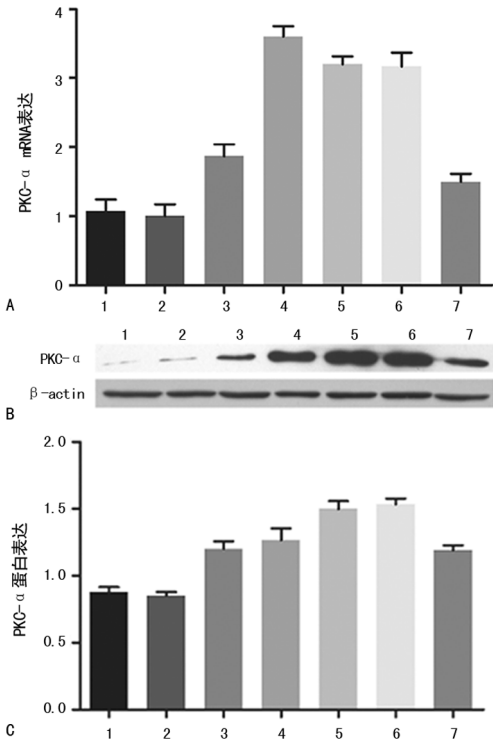


图 6 各组大鼠腹膜组织 MVD 计数情况

**2.7 各组大鼠腹膜组织 MVD 情况** 正常对照组、假手术组大鼠腹膜组织上基本无微血管,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),其余 5 组壁层腹膜组织 MVD 明

显增大( $P<0.05$ )。与尿毒症组相比,PD2 组、PD4 组和 NC 组大鼠腹膜组织 MVD 均明显增大,其中 PD4 组、NC 组比 PD2 组变化更明显( $P<0.05$ )。与 PD4 组和 NC 组相比,PKC-α siRNA 组腹膜组织 MVD 明显减小( $P<0.05$ ),见图 5、6。



A:各组大鼠腹膜组织中 PKC-α mRNA 表达情况;B:各组大鼠腹膜组织中 PKC-α 蛋白表达情况;C:各组大鼠腹膜组织中 PKC-α 蛋白表达情况;1:正常对照组;2:假手术组;3:尿毒症组;4:PD2 组;5:PD4 组;6:NC 组;7:PKC-α siRNA 组

图 7 各组大鼠腹膜组织中 PKC-α mRNA 与蛋白表达情况

**2.8 各组大鼠腹膜组织中 PKC-α mRNA 及蛋白表达情况** 与正常对照组相比,假手术组大鼠腹膜组织

中 PKC- $\alpha$  mRNA 及蛋白表达差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 其余 5 组大鼠腹膜组织中 PKC- $\alpha$  mRNA 及蛋白表达明显升高 ( $P<0.05$ )。与尿毒症组相比, PD2、PD4 组和 NC 组大鼠腹膜组织中 PKC- $\alpha$  mRNA 及蛋白表达均升高, 其中 PD4、NC 组变化更明显 ( $P<0.05$ )。与 PD4 组和 NC 组相比, PKC- $\alpha$  siRNA 组大鼠腹膜组织中 PKC- $\alpha$  mRNA 及蛋白表达明显下降 ( $P<0.05$ ), 见图 7。

### 3 讨 论

超滤衰竭使患者的治疗效果下降, 甚至危及患者生命<sup>[16]</sup>。GAO 等<sup>[17]</sup>研究指出血管表皮生长因子、碱性纤维生长因子等分泌性因子与超滤衰竭的产生密切相关, 为腹膜血管新生依据。本实验旨在分析尿毒症大鼠模型中 PKC- $\alpha$  的表达与超滤衰竭发生之间的联系。研究证实, BUN、Scr 可作为评价尿毒症大鼠模型腹膜透析功能的指标<sup>[18]</sup>。有报道显示, 二者在肾脏疾病中扮演了重要的角色, 并且与患者的生存预后及疾病的进展存在相关性<sup>[19-20]</sup>。

本实验结果显示尿毒症腹膜透析大鼠的超滤量降低, 并伴随着 MTG 升高。MTG 升高会使跨腹膜渗透压梯度难以维持, 从而影响水通道中蛋白含量, 最终导致腹膜超滤功能衰竭<sup>[21]</sup>。笔者发现尿毒症大鼠腹膜透析 4 周相比腹膜透析 2 周的超滤量下降更为明显, 提示在长期腹膜透析过程中超滤衰竭会加重, 这与 LOPES 等<sup>[22]</sup>学者的观点一致, 然而降低 PKC- $\alpha$  表达可以明显缓解腹膜超滤衰竭情况。血管新生中发挥重要作用的 VEGF, 参与葡萄糖吸收, 而导致血管超滤量下降<sup>[23-24]</sup>。在细胞中下调 PKC- $\alpha$  时, VEGF 基因的表达量也下降。另外, 除正常对照组和假手术组外, 其余 5 组大鼠壁层腹膜可见大量胶原纤维沉积, 腹膜明显增厚。腹膜纤维化也会造成新生血管生成, 溶质转移逐渐增加, 甚至出现超滤衰竭<sup>[25]</sup>。

有研究表明, 高糖腹膜透析液及尿毒症环境是诱发 VEGF 表达增加的关键因素, 可致血管新生最终导致腹膜超滤衰竭<sup>[12]</sup>。WANG 等<sup>[5]</sup>研究证实腹膜透析的大鼠腹膜组织中, 超滤量与 VEGF 表达呈负相关, VEGF 表达量与 MTG 及 MVD 呈正相关, VEGF 表达上升可诱发血管新生。研究发现, PKC- $\alpha$  基因在腹膜透析液所致腹膜功能障碍的病理生理过程中起着至关重要的作用, PKC- $\alpha$  表达增强可进一步导致腹膜纤维化、新生血管生成, 同时降低超滤量<sup>[6]</sup>。

CHANG 等<sup>[26]</sup>研究发现亲水性  $\alpha$ -生育酚衍生物, 2,2,5,7,8-五甲基-6-羟基色曼 (PMC) 可抑制 PKC- $\alpha$  易位, 阻断血管平滑肌细胞 (VSMCs) 的  $G_2/M$  期进展, 抑制增殖。和本文研究结果一致, 抑制 PKC- $\alpha$  表

达可进一步抑制腹膜血管新生, 从而改善腹膜功能, 最终达到缓解超滤衰竭的目的。

综上所述, 本研究发现 PKC- $\alpha$  在尿毒症腹膜透析大鼠模型中高表达, 通过 siRNA 下调能延缓大鼠超滤衰竭进程。分子机制有可能是通过下调 VEGF 基因的表达量, 延缓超滤衰竭进程。通过改善透析液生物相容性、药物治疗或基因转染, 以期减少细胞因子对治疗的影响, 这将为超滤衰竭的临床预防和治疗提供理论基础。

### 参考文献

- [1] LAMEIRE N, VAN BIESEN W. Epidemiology of peritoneal dialysis: a story of believers and nonbelievers[J]. Nat Rev Nephrol, 2010, 6(2): 75-82.
- [2] STRUIJK D G. Peritoneal dialysis in western countries [J]. Kidney Dis (Basel), 2015, 1(3): 157-164.
- [3] FINKELSTEIN F O, ABU-AISHA H, NAJAFI I, et al. Peritoneal dialysis in the developing world: recommendations from a symposium at the ISPD meeting 2008 [J]. Perit Dial Int, 2009, 29(6): 618-622.
- [4] HEIMBURGER O, WANIEWSKI J, WERYNSKI A, et al. Peritoneal transport in CAPD patients with permanent loss of ultrafiltration capacity [J]. Kidney Int, 1990, 38(3): 495-506.
- [5] WANG Z K, WANG Z X, LIU Z Y, et al. Effects of RNA interference-mediated gene silencing of VEGF on the ultrafiltration failure in a rat model of peritoneal dialysis [J]. Biosci Rep, 2017, 37(4): BSR20170342.
- [6] WANG L, BALZER M S, RONG S, et al. Protein kinase C  $\alpha$  inhibition prevents peritoneal damage in a mouse model of chronic peritoneal exposure to high-glucose dialysate [J]. Kidney Int, 2016, 89(6): 1253-1267.
- [7] TERABAYASHI T, ITO Y, MIZUNO M, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-3 is a novel target to improve net ultrafiltration in methylglyoxal-induced peritoneal injury [J]. Lab Invest, 2015, 95(9): 1029-1043.
- [8] CLEMENS M J, TRAYNER I, MENAYA J. The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of cell proliferation and differentiation [J]. J Cell Sci, 1992, 103(Pt4): 881-887.
- [9] SINGH R K, KUMAR S, GAUTAM P K, et al. Protein kinase C- $\alpha$  and the regulation of diverse cell responses [J]. Biomol Concepts, 2017, 8(3/4): 143-153.
- [10] ZHAO L J, XU H, QU J W, et al. Modulation of drug resistance in ovarian cancer cells by inhibition of protein kinase C- $\alpha$  (PKC- $\alpha$ ) with small interference RNA (siRNA) agents [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(8): 3631-3636.
- [11] XU H, CZERWINSKI P, HORTMANN M, et al. Protein

- kinase C alpha promotes angiogenic activity of human endothelial cells via induction of vascular endothelial growth factor[J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 78(2): 349-355.
- [12] XIAO J, GAO H, JIN Y, et al. The abnormal expressions of tristetraproline and the VEGF family in uraemic rats with peritoneal dialysis[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 392(1/2): 229-238.
- [13] CHEN X, LIU Y, JIANG Z, et al. Protein kinase C $\alpha$  downregulation via siRNA-PKC $\alpha$  released from foldable capsular vitreous body in cultured human retinal pigment epithelium cells[J]. *Int J Nanomedicine*, 2011(6): 1303-1311.
- [14] SONG Y M, LIAN C H, WU C S, et al. Effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplanted via the portal vein or tail vein on liver injury in rats with liver cirrhosis[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(4): 1292-1298.
- [15] WEIDNER N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer[J]. *Am J Pathol*, 1995, 147(1): 9-19.
- [16] MIHALACHE O, BUGA C, DORAN H, et al. The time for surgery of peritonitis associated with peritoneal dialysis[J]. *J Med Life*, 2016, 9(3): 284-287.
- [17] GAO D, ZHAO Z Z, LIANG X H, et al. Effect of peritoneal dialysis on expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor and endostatin of the peritoneum in peritoneal dialysis patients[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2011, 16(8): 736-742.
- [18] FUJII Y, YAMAUCHI K, KOKUBA Y, et al. New peritoneal dialysis model in rats with bilateral nephrectomy[J]. *Ren Fail*, 2009, 31(5): 365-371.
- [19] CHENG G Y, LIU D W, ZHANG N, et al. Clinical and prognostic implications of serum uric acid levels on IgA nephropathy: a cohort study of 348 cases with a mean 5-year follow-up[J]. *Clin Nephrol*, 2013, 80(1): 40-46.
- [20] MATSUSHITA K, KWAK L, HYUN N, et al. Community burden and prognostic impact of reduced kidney function among patients hospitalized with acute decompensated heart failure: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Community Surveillance [J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0181373.
- [21] DEVUYST O. Water transport across biological membranes: Overton, water channels, and peritoneal dialysis [J]. *Bull Mem Acad R Med Belg*, 2010, 165(5/6): 250-255.
- [22] LOPES D M, RODRIGUEZ-CARMONA A, FALCON T G, et al. Analysis of ultrafiltration failure diagnosed at the initiation of peritoneal dialysis with the help of peritoneal equilibration tests with complete drainage at sixty minutes. a longitudinal study[J]. *Perit Dial Int*, 2016, 36(4): 442-447.
- [23] GUNAL A I, CELIKER H, AKPOLAT N, et al. By reducing production of vascular endothelial growth factor octreotide improves the peritoneal vascular alterations induced by hypertonic peritoneal dialysis solution[J]. *Perit Dial Int*, 2002, 22(3): 301-306.
- [24] GUO J, XIAO J, GAO H, et al. Cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor expressions are involved in ultrafiltration failure[J]. *J Surg Res*, 2014, 188(2): 527-536.
- [25] LAI K N, LEUNG J C. Inflammation in peritoneal dialysis[J]. *Nephron Clin Pract*, 2010, 116(1): 11-18.
- [26] CHANG C C, LEE J J, CHIANG C W, et al. Inhibitory effect of PMC, a potent hydrophilic  $\alpha$ -tocopherol derivative, on vascular smooth muscle cell proliferation; the pivotal role of PKC- $\alpha$  translocation[J]. *Pharm Biol*, 2010, 48(8): 938-946.

(收稿日期: 2019-04-20 修回日期: 2019-07-02)