

枸橼酸盐透析液对慢性肾衰患者外周血 Th17 的影响

高 军¹, 郝 丽¹, 马胜银²

摘要 目的 探讨枸橼酸碳酸氢盐透析液对慢性肾衰(CRF)维持性透析患者外周血 Th17 的影响。方法 选择维持性透析 3 个月以上且无活动性感染 CRF 患者 57 例, 随机分为 2 组, 分别给予枸橼酸碳酸氢盐透析液和普通碳酸盐透析液进行维持性透析治疗 12 个月, 采用酶联免疫吸附法和流式细胞仪测定患者外周血白细胞介素-17(IL-17)含量水平及 Th17 亚群百分率。结果 采用枸橼酸碳酸氢盐透析液的患者维持性血透 6 个月后外周血 IL-17 含量水平及 Th17 亚群百分率均明显低于普通碳酸盐透析液的患者; 此外 枸橼酸碳酸氢盐透析液患者长期应用不良反应发生率明显低于普通碳酸盐透析液患者。结论 枸橼酸碳酸氢盐透析液对 CRF 维持性血透患者的促炎症作用低于普通碳酸盐透析液患者, 明显减少微炎症状态, 临床值得推广。

关键词 枸橼酸; 碳酸氢盐; 慢性肾衰; 血液透析

中图分类号 R 459.5; R 692.5; R 714.252; R 364.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)10-1436-05

心血管并发症^[1]是造成慢性肾衰(chronic renal failure, CRF)患者死亡率居高不下的主要因素。CRF 炎症反应对心血管并发症发生具有促进作用。Th17 是 CD4⁺T 淋巴细胞亚群之一, 其分泌白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 介导炎症反应^[2]。研究^[3]显示 CRF 患者外周血 Th17 水平高低与 CRF 多种心血管并发症发生具有一定相关性。维持性血液透析是延长 CRF 患者生命周期最有效的方式, 但长期应用对 CRF 炎症反应具有放大作用。目前透析液大多采用碳酸氢盐, 为防止 Ca²⁺、Mg²⁺沉淀, 需加少量醋酸根离子, 但醋酸根离子促炎作用较强^[4]。枸橼酸为多元羧酸, 可络合 Ca²⁺ 和 Mg²⁺, 用于透析液, 在临床逐渐被推广使用^[5]。枸橼酸盐透析液对 CRF 患者外周血 Th17 影响未见文献报道。该研究比较枸橼酸碳酸氢盐透析液和普通碳酸氢盐透析液对维持性血透患者 Th17 的影响, 为其在临床

2014-05-04 接收

基金项目: 安徽省高等学校省级自然科学研究项目(编号: KJ2013Z155)

作者单位:¹ 安徽医科大学第二附属医院肾脏内科, 合肥 230601

² 皖北煤电集团总医院肾脏内科, 宿州 234000

作者简介: 高军, 男, 硕士研究生;

郝丽, 女, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: haoliqilin@163.com

推广应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 Dialog⁺型血液透析机购自德国贝朗公司; REXEED-45UC 型透析器购自旭化成医疗器械有限公司, 聚砜膜, 膜面积 1.5 m², 超滤系数 7.33 ml/(h·kPa); EPICS-XL 型流式细胞仪购自美国 Beckman-Coulter 公司; 枸橼酸碳酸氢盐透析液和普通碳酸氢盐透析液购自天津市肾友达医疗设备技术有限公司; IL-17 试剂盒购自北方生物技术研究所; DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司; 佛波醇乙酯、离子霉素和莫能霉素购自美国 Alexis 公司; 藻红蛋白(PE)标记的 IL-17A 单抗、固定和改变细胞膜渗透性试剂盒购自美国 eBioscience 公司。

1.2 病历资料 选取 2012 年 6 月~2013 年 6 月在皖北煤电集团总医院进行维持性透析治疗 CRF 患者 132 例。病例排除标准:① 透析期间伴有急慢性感染;② 透析期间伴有活动性出血;③ 透析期间伴有自身免疫性疾病活动期;④ 透析期间使用过免疫抑制剂。CRF 患者被随机分为对照组(普通碳酸氢盐透析液)和实验组(枸橼酸碳酸氢盐透析液)。对照组一般资料如下:男 13 例, 女 15 例, 年龄 21~76 (47.7 ± 11.1) 岁, 血清肌酐 (515.6 ± 145.7) μmol/L, 其中糖尿病肾病 8 例, 动脉硬化性肾病 3 例, 慢性肾炎 12 例, 多囊肾 2 例, 狼疮肾炎 3 例; 实验组一般资料如下:男 19 例, 女 10 例, 年龄 29~70 (48.0 ± 10.3) 岁, 血清肌酐 (488.3 ± 117.1) μmol/L, 其中糖尿病肾病 8 例, 动脉硬化性肾病 4 例, 慢性肾炎 11 例, 多囊肾 2 例, 狼疮肾炎 4 例。正常组标本来自我院体检中心健康体检者, 其中男 11 例, 女 7 例, 年龄 22~64 (39.9 ± 9.3) 岁, 血清肌酐 (89.5 ± 11.8) μmol/L。研究过程均遵循人体试验委员会制订的伦理学标准, 并已获入选对象的知情同意。

1.3 血液透析方案 实验组和对照组患者除透析液不同外, 其余均采用相同的维持性血液透析治疗方案:首次透析 2 h, 维持透析 4 h, 每周 2~3 次。血流量 200~250 ml/min, 透析液流量 500 ml/min, 血管通路采用自体动静脉内瘘, Kt/V > 1.2, 常规肝素钠抗凝。

1.4 标本采集 实验组和对照组患者分别在透析前、维持透析3个月、维持透析6个月和维持透析12个月空腹静脉取血约10 ml置于抗凝管内备用，正常组血样选自健康体检者早晨空腹静脉血。

1.5 IL-17含量检测 外周血离心(1 500 r/min, 10 min)分离出血浆,收集上清液,-20℃冷冻备用。血浆中IL-17含量水平检测步骤参照试剂盒说明书进行。

1.6 外周血淋巴细胞分离 新鲜血样与生理盐水等体积混合后加入人淋巴细胞分离液,离心(2 000 r/min 20 min)后用毛细管将分层后中层液体转移至另一离心管,加入3倍体积磷酸盐缓冲液(PBS),离心(1 500 r/min, 10 min)后弃去上清液。重复洗涤细胞1次。加入含有10%小牛血清的DMEM培养液,显微镜下观察细胞形态及计数,调整细胞浓度为 $1 \times 10^9/L$ 。

1.7 Th17亚群流式分析 取细胞悬液100 μl,依次加入刺激剂佛波醇乙酯(50 μg/L)、离子霉素(1 mg/L)培养2 h,加入莫能霉素(1 mg/L)混匀后37℃、5% CO₂条件下培养4 h,加入10 μl FITC-CD4,避光孵育15 min,加入2 ml PBS,离心(1 000 r/min, 5 min)弃上清液,加入细胞破膜剂A 200 μl,避光15 min,再次加入2 ml PBS,混匀,离心(1 000 r/min 5 min)弃上清液,加入适量PBS重悬细胞,随后加入试剂B 200 μl和PE-IL-17A 10 μl,避光15 min,同法洗涤以及重悬细胞,上流式细胞仪分析。此外另取一份细胞悬液100 μl作为平行对照,除加入试剂B 200 μl和各单抗相应的同行对照-PE 10 μl之外,其余操作同前。

1.8 统计学处理 采用SPSS 11.0软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析和T检验。

2 结果

2.1 枸橼酸碳酸氢盐透析液对CRF患者血浆IL-17含量水平的影响 实验组和对照组CRF患者血浆IL-17的含量水平明显高于正常组($P < 0.01$; $F = 64.098$);与对照组相比,实验组患者维持性透析3个月血浆IL-17的含量降低,但差异无统计学意义,而维持性透析6个月和12个月的外周血IL-17水平则明显低于对照组($P < 0.01$),见图1。

2.2 枸橼酸碳酸氢盐透析液对CRF患者外周血T淋巴细胞亚群Th17的影响 实验组和对照组患者外周血Th17所占百分率均明显高于正常组($P <$

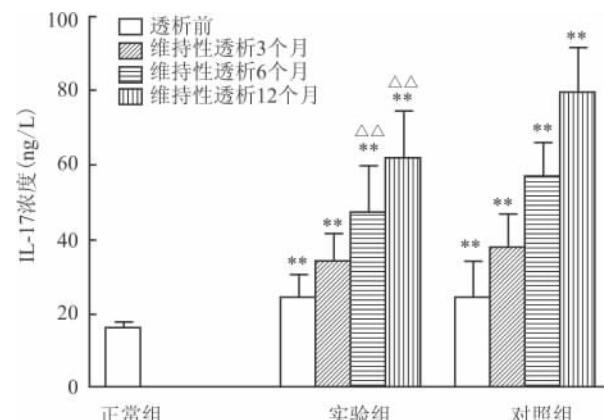


图1 枸橼酸碳酸氢盐透析液对CRF患者

血浆IL-17含量水平的影响($\bar{x} \pm s$)

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与对照组比较: △△ $P < 0.01$

0.01; $F = 69.902$);与对照组患者相比,实验组患者维持性透析6个月和12个月后外周血Th17的百分率明显较低($P < 0.01$),见图2、3。

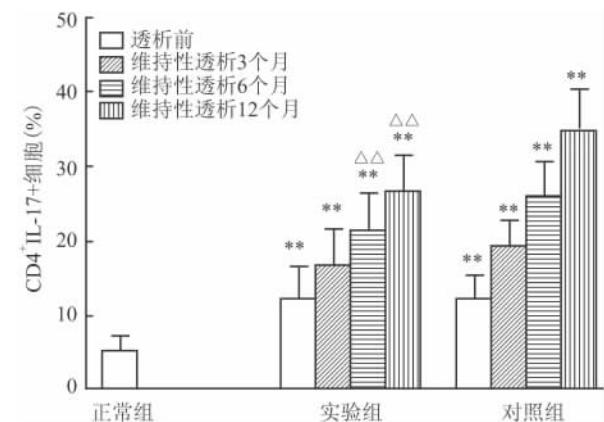


图2 枸橼酸碳酸氢盐透析液对CRF患者

外周血T淋巴细胞亚群Th17的影响($\bar{x} \pm s$)

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与对照组比较: △△ $P < 0.01$

2.3 枸橼酸碳酸氢盐透析液长期应用不良反应分析 枸橼酸碳酸氢盐透析液长期应用于维持性血透患者发生皮肤瘙痒1例、肌肉痉挛2例、低血压2例、四肢麻木1例和心悸1例,明显低于对照组,见表1。

表1 枸橼酸碳酸氢盐透析液对维持性血透患者不良反应的影响

不良反应	实验组(n=29)		对照组(n=28)		F值
	例数	百分率(%)	例数	百分率(%)	
皮肤瘙痒	1	3.4	2	7.1	0.390
肌肉痉挛	2	6.9	4	14.3	0.826
头痛	0	0.0 [△]	4	14.3	4.456
低血压	2	6.9	5	17.9	1.589
四肢麻木	1	3.4	3	10.7	1.153
心悸	1	3.4	4	14.3	2.091

与对照组比较: [△] $P < 0.05$

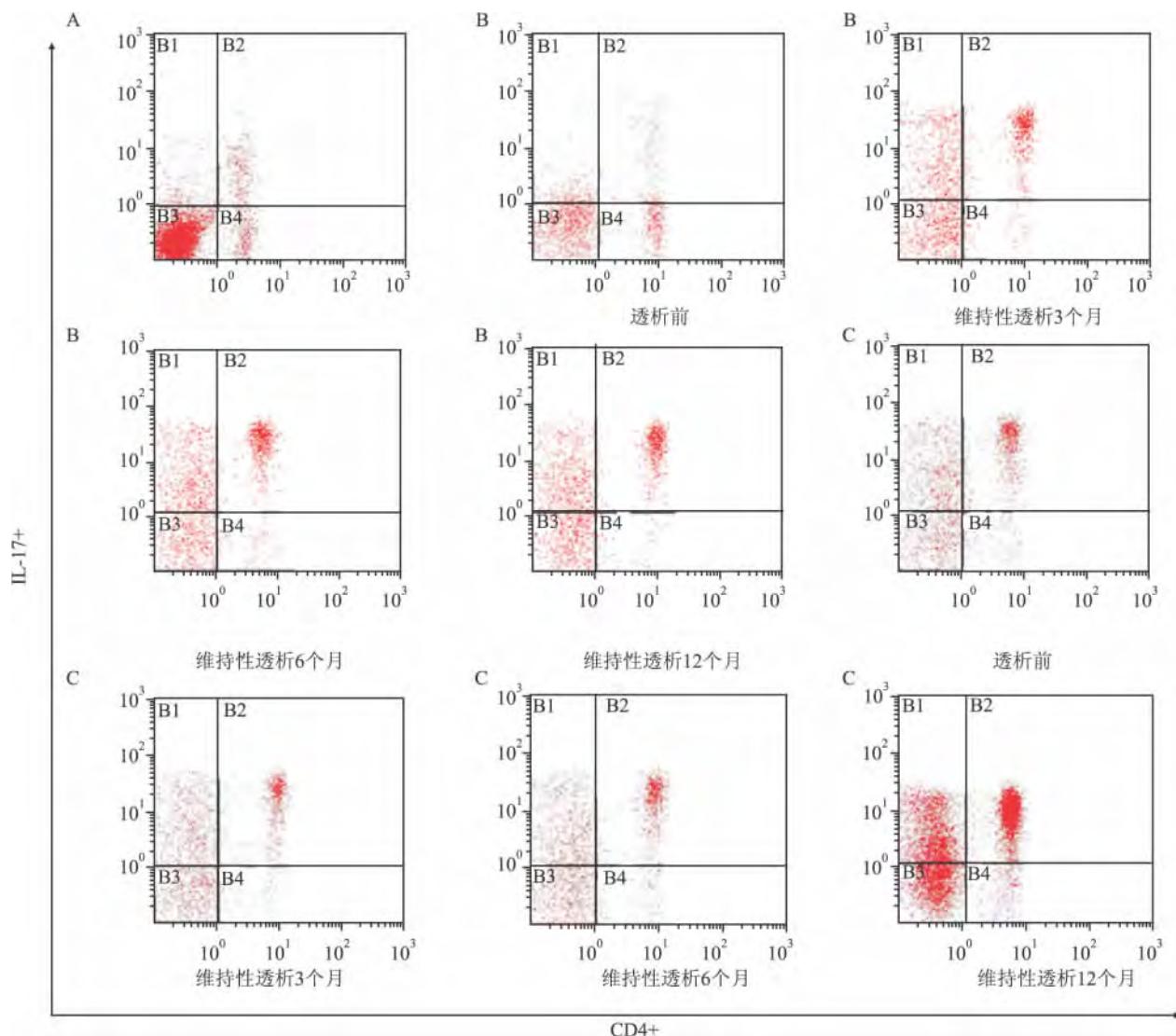


图3 CRF患者外周血T淋巴细胞亚群Th17所占的百分率

A:正常组;B:实验组;C:对照组

3 讨论

血液透析是临床CRF主要治疗方式,虽然延长患者生命周期,但随透析时间延长,心血管系统并发症发生频率和严重程度逐渐升高^[6],患者死亡率仍居高不下。Th17是CD4⁺T淋巴细胞主要亚群之一,其分泌炎性细胞因子IL-17在介导和放大机体炎症反应中发挥重要作用^[2]。研究^[7~8]显示多种心血管疾病患者体内IL-17含量水平以及Th17的分化能力均异常升高。Chen et al^[9]研究发现外周血Th17分化水平与CRF心血管并发症(如不稳定性心绞痛、心律失常、左心室肥大和充血性心力衰竭)具有显著相关性,提示Th17水平高低是预测CRF

心血管并发症危险因素重要的生物标志物。

CRF体内存在微炎症反应,炎性细胞因子含量水平较高^[10],长期血液透析对炎症反应具有一定放大作用,可进一步促进炎性细胞因子释放,如肿瘤坏死因子(TNF-α)和IL-6^[11]。Leurs et al^[12]提出这与透析过程中血管感染、透析膜生物不相容性以及透析液中潜在促炎性物质等因素有关。选择合适的透析液会在一定程度上减轻CRF炎症反应。Tommo^[13]发现长期使用无醋酸碳酸氢盐透析液的CRF患者体内C-反应蛋白和炎性细胞因子IL-6水平均明显低于使用醋酸碳酸氢盐透析液患者,但由于制备复杂以及价格昂贵等因素导致该项技术未能在临幊上广泛应用。枸橼酸属于三元羧酸,可络合透析

液游离的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 防止离子沉淀。研究^[14]显示枸橼酸碳酸氢盐制备的透析液在清除 CRF 内外源性毒素效果肯定,长期应用安全性高。本研究显示短期使用(<3 个月)枸橼酸碳酸氢盐透析液的 CRF 患者外周血 IL-17 含量水平与 Th17 分化能力与普通碳酸氢盐透析液相当,两者之间差异无统计学意义,但长期应用(>6 个月)的患者外周血 IL-17 浓度水平与 Th17 亚群百分率均明显较低,表明枸橼酸碳酸氢盐透析液长期应用促炎作用要低于普通碳酸氢盐透析液。研究还显示枸橼酸碳酸氢盐透析液长期应用维持性血透患者相关不良反应发生率明显低于普通碳酸氢盐透析液,这些结果提示枸橼酸透析液长期应用心血管并发症发生率可能会低于普通碳酸氢盐透析液。由于本研究样本量较少以及实验周期相对较短,未对透析患者心血管等长期并发症做进一步观察,如 Navarro-González et al^[15]认为 CRF 血透过程中血磷含量水平与炎性细胞因子具有明显正相关性。这些有待进一步研究完善。

综上所述,枸橼酸碳酸氢盐透析液临床长期应用促炎症作用弱于醋酸碳酸氢盐透析液,生物相容性相对较好,值得推广。

参考文献

- [1] Agarwal R , Nissen A R , Batlle D , et al. Prevalence , treatment , and control of hypertension in chronic hemodialysis patients in the United States [J]. Am J Med , 2003 ,115(4) :291 - 7.
- [2] Barbi J , Pardoll D , Pan F. Metabolic control of the Treg/Th17 axis [J]. Immunol Rev , 2013 ,252(1) : 52 - 77.
- [3] 汪鹏,张翠萍,任伟,等.维持血液透析患者微炎症与营养及血脂的关系[J].安徽医科大学学报,2013,48(9): 1099 - 102.
- [4] 贾利宁,杨阳,桂保松,等.枸橼酸碳酸氢盐血液透析液对外周细胞因子和 NOS 的影响[J].陕西医学杂志,2009,38(3): 303 - 5.
- [5] 徐斌,金波,季大玺,等.枸橼酸碳酸氢盐透析液对血液透析患者高血压的影响[J].肾脏病与透析肾移植杂志,2010,19(5): 424 - 9.
- [6] Furuya R , Kumagai H , Miyata T , et al. High plasma pentosidine level is accompanied with cardiovascular events in hemodialysis patients [J]. Clin Exp Nephrol , 2012 ,16(3) :421 - 6.
- [7] Liu Z , Zhao Y , Wei F , et al. Treatment with telmisartan/rosuvastatin combination has a beneficial synergistic effect on ameliorating Th17/Treg functional imbalance in hypertensive patients with carotid atherosclerosis [J]. Atherosclerosis , 2014 ,233(1) :291 - 9.
- [8] Li Q , Wang Y , Yu F , et al. Peripheral Th17/Treg imbalance in patients with atherosclerotic cerebral infarction [J]. Int J Clin Exp Pathol , 2013 ,6(6):1015 - 27.
- [9] Chen D , Huang X , Yang M , et al. Treg/Th17 functional disequilibrium in Chinese uremia on hemodialysis: a link between calcification and cardiovascular disease [J]. Ren Fail , 2012 ,34 (6) : 697 - 702.
- [10] 丁琼,张守柱,阐明,等.维持性血液透析患者同型半胱氨酸超敏 C 反应蛋白及肿瘤坏死因子与动脉粥样硬化关系[J].安徽医科大学学报 2007,42(5): 559 - 61.
- [11] 吴仁胜,李时琪,叶扬梅.血液透析对慢性肾功能衰竭患者血液中细胞因子的影响[J].皖南医学院学报 2009,28(3): 190 - 2.
- [12] Leurs P , Lindholm B , Stenvinkel P. Effects of hemodiafiltration on uremic inflammation [J]. Blood Purif , 2013 ,35 Suppl 1:11 - 7.
- [13] Tomo T. Preferred dialysis fluid for the high-performance membrane [J]. Contrib Nephrol 2011 ,173: 44 - 52.
- [14] Saito T , Saito O , Maeda T , et al. Metabolic and hemodynamic advantages of an acetate-free citrate dialysate in a uremic case of congenital methylmalonic academia [J]. Am J Kidney Dis ,2009 ,54 (4) : 764 - 9.
- [15] Navarro-González J F , Mora-Fernández C , Muros M , et al. Mineral metabolism and inflammation in chronic kidney disease patients: a cross-sectional study [J]. Clin J Am Soc Nephrol , 2009 ,4(10):1646 - 54.

Effects of citrate dialysate on Th17 in peripheral blood of patients with chronic renal failure

Gao Jun¹, Hao Li¹, Ma Shengyin²

(¹Dept of Nephrology, The Second Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

²Dept of Nephrology, Wanbei Coal-Electricity Group General Hospital, Suzhou 234000)

Abstract Objective To investigate effects of maintenance hemodialysis with citrate-bicarbonate dialysate on Th17 in peripheral blood of patients with chronic renal failure (CRF). **Methods** The CRF patients ($n=57$) with maintenance hemodialysis for more than three months as well as free-active infection were selected and divided into two

骨髓增生异常综合征患者 SF3B1 基因突变的检测及意义

许 婧 孙自敏 徐修才 伍 权 汪 健 纪蒙蒙

摘要 目的 研究骨髓增生异常综合征(MDS)中关于 RNA 剪接因子 3B 第 1 亚单位(SF3B1)基因突变的检出率,进一步分析其与临床特征的关系。方法 收集 70 例血液病患者骨髓标本,采用聚合酶链式反应技术(PCR)扩增目的片段,随后进行直接测序检测 SF3B1 突变情况。结果 52 例 MDS 患者中有 4 例发生 SF3B1 基因突变,发生率为 7.7%,突变类型均为 K700E。突变发生在环形铁粒幼细胞(RS)增多的 MDS 为 3/4 例,发生率为 75%。突变患者显示较长时间的生存期,但病例数较少。结论 伴 RS 增多的 MDS 患者中 SF3B1 突变常见,突变阳性患者具有独特的临床特征和较好的预后。

关键词 SF3B1 基因;骨髓增生异常综合征;聚合酶链式反应

中图分类号 R 551.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)10-1440-04

骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome,MDS)是因造血干细胞恶性病变而引起的一组克隆性、异质性髓系肿瘤。染色体异常在 MDS 的预后中起着重要的作用。近年来,随着全基因组的测序技术和基因芯片等技术的开展应用,已有许多获得性基因突变被证明在 MDS 的发生、发展和预后起

2014-06-13 接收

基金项目:安徽省十二五科技攻关项目资助(编号:11010402164)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院血液科,合肥 230001

作者简介:许 婧,女,硕士研究生;

孙自敏,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:zmsun_vip@163.com

着重要的作用^[1-5]。最近,有研究^[6-9]显示 RNA 剪接因子 3B 第 1 亚单位(splicing factor 3B subunit 1,SF3B1)基因突变与 MDS 患者环状铁粒幼细胞(ring sideroblasts,RS)的出现密切相关,而国内有关 SF3B1 基因突变与 MDS 不同亚型的关系和预后鲜有报道^[10]。该研究旨在建立 SF3B1 基因检测方法,分析其在不同 MDS 亚型患者中的检出率及其与预后的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 DNA 抽提试剂盒购自南京 Karroten 公司;DNA 聚合酶试剂盒购自大连宝生生物公司。

1.1.2 主要仪器 紫外/可见光分光光度计:德国艾本德公司;TGL-16G 型低温超速离心机:上海飞鸽仪器厂;高速冷冻离心机:珠海黑马医学仪器有限公司;-80 °C 超低温冰箱:美国 Forma 公司;普通-20 °C 冰箱:中国海尔技术有限公司;精密电子天平:上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂;DK-8D 型电热恒温水槽:上海跃进医疗器械厂;PCR 扩增仪:德国 Biometra 公司;DYY-10 型恒压恒流电泳仪:北京六一仪器厂;Gel Doc 2000 系统紫外照相仪:美国 BIO-RAD 公司

1.2 方法

1.2.1 病例资料 收集 2012 年 3 月~2013 年 12

groups randomly, which were treated by citrate-bicarbonate dialysate and ordinary carbonate dialysate for maintenance dialysis in 12 month, respectively. The levels of interleulin-17 (IL-17) and percentages of Th17 subgroup in peripheral blood were detected by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometer, respectively. **Results** The levels of IL-17 and percentages of Th17 subgroup in patients treated with citrate-bicarbonate dialysate for more than six months were significantly lower than those treated with ordinary carbonate dialysate. Moreover, incidences of adverse reactions in group of citrate bicarbonate dialysate were lower than those of common carbonate dialysate group. **Conclusion** The pro-inflammatory effects of maintenance hemodialysis with citrate-bicarbonate dialysate on the patients are lower than those of ordinary carbonate dialysate. Citrate-bicarbonate dialysate causes the reduction of inflammatory state, and is worthy of being popularized in clinic.

Key words citrate; bicarbonate; chronic renal failure; hemodialysis