

当归补血汤对腹膜透析相关性大鼠腹膜功能衰竭的影响

杜丽东^{1,2}, 吴国泰^{1,2}, 王霞³, 张秀秀¹, 邵晶^{1,2}, 王瑞琼^{1,2}, 任远^{1,2*}

(1. 甘肃中医药大学药学院, 兰州 730000;

2. 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室, 兰州 730000;

3. 甘肃省人民医院, 兰州 730000)

[摘要] 目的:研究当归补血汤(Danggui Buxue Tang, DBT)对腹膜透析相关性大鼠腹膜功能衰竭的影响,并探讨相关的作用机制。方法:SD大鼠ip 4.25%高糖透析液100 mL·kg⁻¹,连续40 d,在第8,10,12天ip 大肠埃希菌脂多糖5 mg·kg⁻¹,建立腹膜功能衰竭大鼠模型;造模大鼠随机分为4组,每组10只,分别为模型组,贝那普利组(2.1 mg·kg⁻¹),DBD高、低剂量组(12,6 g·kg⁻¹),另设正常组,各组大鼠造模的同时ig给药;实验期间观察各大鼠活动状态,第40天末次ip透析液2 h后进行腹膜平衡实验,计算超滤量(UF),检测血清肌酐(P_{Cr})和尿素氮(P_{UN}),腹透液中肌酐(D_{Cr}),尿素氮(D_{UN}),葡萄糖(D_{Glu})及4.25%透析液中的葡萄糖(D_{0Glu}),计算腹膜转运功能参数(D_{Cr}/P_{Cr}, D_{UN}/P_{UN}, D_{Glu}/D_{0Glu}),取大鼠壁层腹膜采用苏木素-伊红(HE)观察组织形态变化,并用免疫组化法检测转化生长因子-β₁(TGF-β₁)蛋白的表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠P_{Cr}和P_{UN}均显著升高(P<0.01),D_{Cr}和D_{Glu}显著降低,D_{UN}显著升高(P<0.01),UF, D_{Cr}/P_{Cr}, D_{UN}/P_{UN}及D_{Glu}/D_{0Glu}均显著降低(P<0.01),腹膜间皮细胞受损明显,腹膜TGF-β₁表达增高(P<0.01);与模型组比较,DBT高、低剂量组P_{Cr}和P_{UN}均显著降低(P<0.05),D_{Glu}显著升高(P<0.01),DBT低剂量组D_{UN}显著升高(P<0.05),DBT高剂量组大鼠UF显著升高(P<0.05),DBT高、低剂量组D_{Cr}/P_{Cr}, D_{UN}/P_{UN}及D_{Glu}/D_{0Glu}均显著升高(P<0.01);DBT高、低剂量组大鼠腹膜组织形态明显改善,且TGF-β₁表达显著降低(P<0.05, P<0.01)。结论:DBT能抑制腹膜透析相关性大鼠腹膜功能衰竭,保护腹膜结构。

[关键词] 当归补血汤;腹膜透析;透析效能;腹膜结构;转化生长因子β₁

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)20-0112-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016200112

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160830.0756.022.html>

[网络出版时间] 2016-08-30 7:56

Effect of Danggui Buxue Tang on Peritoneal Function Failure Induced by Peritoneal Dialysis in Rats

DU Li-dong^{1,2}, WU Guo-tai^{1,2}, WANG Xia³, ZHANG Xiu-xiu¹, SHAO Jing^{1,2},

WANG Rui-qiong^{1,2}, REN Yuan^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Gansu Provincial Key Laboratory of Pharmacology and Toxicology of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 3. Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the protective effects of Danggui Buxue Tang (DBT) on peritoneal function failure induced by peritoneal dialysis in rats. **Method:** Peritoneal function failure model in rats were established by intraperitoneally injecting 4.25% of high-glucose peritoneal dialysate (100 mL·kg⁻¹) for 40 d and administering lipopolysaccharide (LPS, 5 mg·kg⁻¹) at 8, 10, 12 d. The rats were randomly divided into four groups, with 10 rats in each group. They were respectively model group, Benazepril Hydrochloride group (BH 2.1 mg·kg⁻¹), DBT high-dose and low-dose groups (12, 6 g·kg⁻¹). The other 10 rats were randomly chosen as

[收稿日期] 20151024(013)

[基金项目] 甘肃省自然科学基金项目(1310RJZA090);甘肃中医学院中青年基金项目(BH2012-023)

[第一作者] 杜丽东,博士,讲师,从事中药药理与毒理研究工作, Tel:13919030726, E-mail: lidong_du@126.com

[通讯作者] *任远,教授,从事中药药理与毒理研究工作, Tel:0931-8762653, E-mail: Leyuan816@163.com

normal control group. During modeling, rats in each group were given drugs, *ig.* During the experiment, body weights and general states of all rats were detected. At 40 d, the two hour later after intraperitoneal administration with dialysate, the peritoneal equilibration test was performed to detect the ultrafiltration volume (UF , P_{Cr} , P_{UN} , D_{Cr} , D_{UN} and D_{Glu}), and calculate peritoneal transport function parameters (D_{Cr}/P_{Cr} , D_{UN}/P_{UN} , D_{Glu}/D_{0Glu}). Parietal peritoneum tissues of rats were stained with hematoxylin-eosin (HE) to observe the changes of peritoneal morphology, the transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) expression in parietal peritoneum of rats WAS observed by Immunohistochemical method. **Result:** Compared with normal group, in the model group, P_{Cr} , P_{UN} , D_{UN} were increased ($P < 0.01$), the levels of D_{Cr} , D_{Glu} , UF , D_{Cr}/P_{Cr} , D_{UN}/P_{UN} and D_{Glu}/D_{0Glu} were decreased ($P < 0.01$), peritoneal mesothelioma cells were significantly impaired, and the expression of TGF- β_1 was also increased ($P < 0.01$). Compared with model group, in DBT high-dose and low-dose groups, P_{Cr} , P_{UN} were decreased ($P < 0.05$), the levels of D_{Glu} were significantly increased ($P < 0.01$), D_{Cr}/P_{Cr} , D_{UN}/P_{UN} and D_{Glu}/D_{0Glu} were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), with obvious improvement in peritoneal histomorphology and decrease in TGF- β_1 expression ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** DBT shows the protective effects on peritoneal function failure induced by peritoneal dialysis in rats.

[Key words] Danggui Buxue Tang; peritoneal dialysis; dialysis efficiency; peritoneal structure; transforming growth factor- β_1

腹膜透析(PD)是终末期肾病的有效治疗方法之一,随着透析时间延长出现腹膜超滤和转运功能下降、腹膜纤维化、甚至腹膜功能衰竭成为腹膜透析终止的主要原因^[1-2]。在长期的腹膜透析过程中极易产生腹膜炎反应和腹腔积血,腹膜间皮细胞分泌大量的细胞因子,促进间皮细胞发生细胞间充质转化,细胞外基质合成增加,降解减少,间皮细胞凋亡增多,导致腹膜纤维化,引起腹膜功能衰竭^[3-4]。临床表现为透析不充分,出现水肿,氮质血症加重,血压升高,甚至出现心力衰竭等,迫使终止腹膜透析治疗。

目前尚无有效保护腹膜结构和功能的药物,中医药在防治腹膜透析相关性腹膜功能衰竭方面取得了一定的成果^[5]。当归补血汤出自金元时代李东垣的《内外伤辨惑论》,由当归、黄芪按 1:5 组成(当归 6 g,黄芪 30 g),具有益气补血的功效,多用于治劳倦内伤,气血虚,阳浮于外之虚热证,该方是中医补气生血的经典名方,在临床上广泛应用。现代研究表明其具有促进造血、调节免疫、保护心脑血管等方面的作用^[6]。近来有研究报道显示,当归补血汤和当归补血汤总苷具有防治大鼠血吸虫病肝纤维化、肺及肾纤维化作用^[7-9]。本研究采用高糖透析液联合大肠埃希菌脂多糖复制大鼠腹膜功能衰竭模型,观察当归补血汤对大鼠腹膜透析效能、腹膜结构和转化生长因子 β_1 -(TGF- β_1) 表达的影响,为扩大当归补血汤的临床用途提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠,50 只,体重(160 ± 20)

g,雌雄各半,由甘肃中医药大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(甘)2011-0004。饲养于环境通风良好,室温 18 ~ 22 °C,相对湿度 40% ~ 70%,12 h 光照昼夜循环的环境中,适应 7 d 开始实验。

1.2 药物及试剂 当归和黄芪饮片(兰州复兴厚药材有限公司,批号分别为 20141108 和 20150117),经甘肃中医药大学刘峰林副教授鉴定,分别为伞形科植物当归 *Angelicae sinensis* 和豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 的干燥根;腹膜透析液(4.25%,广州百特医疗用品有限公司,批号 G1409021),贝那普利片(上海新亚药业闵行有限公司,批号 140803),大肠埃希菌脂多糖(LPS,美国 Sigma 公司,批号 044M4004V),水合氯醛(天津市致远化学试剂有限公司,批号 20150120),兔抗人 TGF- β_1 抗体、二抗和 DBA(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 Lo414,15121A04,K146712F)。

1.3 仪器 AU5400 型全自动生化分析仪及 BX51-32H01 型显微镜(日本 Olympus 公司),DL-5M 型台式离心机(湖南新科科学仪器有限公司),BS110 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

2 方法

2.1 药物制备、造模、分组及给药^[10-11] 取当归、黄芪按 1:5 质量比混合,加 8 倍量纯净水浸泡 30 min,煎煮 1 h,滤过,药渣再加 6 倍量水煎煮 1 h,合并 2 次滤液,过滤,浓缩至生药量 1 g · mL⁻¹ 备用。50 只 SPF 级 SD 大鼠,按性别体重随机分为正常组、

模型组、贝那普利组、当归补血汤高、低剂量组,共 5 组,每组 10 只。除正常组外,其余 4 组 *ip* 4.25% 高糖透析液 $100 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续 40 d,在第 8,10,12 天 *ip* 大肠埃希菌脂多糖 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。造模的同时 *ig* 给药,贝那普利组给予 $2.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 贝那普利(相当于临床 60 kg 体重成人日用量的 10 倍),当归补血汤高、低剂量组分别给予当归补血汤 $12,6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (相当于临床 60 kg 体重成人日用量的 20 倍和 10 倍),正常组和模型组给予等容量生理盐水,给药容量 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,每天 1 次,连续 40 d。

2.2 标本采集 给药第 40 天,各大鼠 *ip* 4.25% 透析液(轻揉按摩大鼠腹部使腹透液均匀地充满腹腔)2 h 后,*ip* 10% 水合氯醛溶液($3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉,心脏采血约 3 mL, $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,分离血清待测。颈椎脱臼处死大鼠,开腹,抽取腹水约 5 mL, $1\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液待测,准确计量腹腔内的液体容量。取各组大鼠右侧远离注射部位的壁层腹膜组织 $2 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$,用生理盐水冲洗,10% 的甲醛固定,待测。

2.3 观测指标

2.3.1 体重和活动状态 各组大鼠分别在造模前和造模第 10,20,30,40 天称体重,并观察活动状态。

2.3.2 血清肌酐(P_{Cr})和尿素氮(P_{UN})的测定 取血清,全自动生化分析仪检测血清中肌酐(P_{Cr}),尿素氮(P_{UN})的含量。

2.3.3 腹透液中肌酐(D_{Cr}),尿素氮(D_{UN})及葡萄糖(D_{Glu})的测定 取腹膜透析液上清液,全自动生

化分析仪检测 D_{Cr} , D_{UN} 及 D_{Glu} 含量。

2.3.4 腹膜转运功能参数^[12] 按下列公式计算超滤量(UF)和腹膜转运功能参数(D_{Cr}/P_{Cr} , D_{UN}/P_{UN} , D_{Glu}/D_{0Glu}),其中 D_{0Glu} 为 4.25% 透析液中的葡萄糖含量)。UF(mL)为腹腔内液体容量(包括已抽出的透析液 5 mL,用注射器可抽出的液体量和纱布提取的液体量)。

纱布提取的液体量(mL) = [湿纱布质量(g) - 干纱布质量(g)] $\times 1.08$ (透析液的密度为 $1.08 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

2.3.5 腹膜组织形态 10% 甲醛固定腹膜组织,石蜡包埋、切片,HE 染色,100 倍光镜下观察腹膜组织形态,主要观察间皮细胞的紧密连接,是否有脱落,间皮下基质是否增生,成纤维细胞、炎症细胞及血管数量。

2.3.6 免疫组化法检测腹膜 TGF- β_1 表达量^[13] 10% 甲醛固定腹膜组织,石蜡包埋、切片,免疫组化染色,400 倍光镜下观察,每张切片随机选取 5 个视野,使用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统,计算阳性信号的平均积分吸光度 IA。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠体重的影响 给药前和给药第 10,20,30,40 天各组大鼠体重增加正常,组间差异均无统计学意义,活动状态均未见异常。见表 1。

表 1 当归补血汤对大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Danggui Buxue Tang on body weight in rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	给药前体重	给药后体重			
			第 10 天	第 20 天	第 30 天	第 40 天
正常	-	163.5 \pm 6.9	205.8 \pm 16.5	240.3 \pm 27.0	244.7 \pm 8.6	236.6 \pm 34.2
模型	-	165.3 \pm 1.3	203.3 \pm 14.1	227.9 \pm 25.5	243.8 \pm 28.6	253.4 \pm 29.2
贝那普利	2.3×10^{-3}	159.9 \pm 2.8	197.2 \pm 3.6	215.9 \pm 6.8	212.8 \pm 15.1	250.6 \pm 6.7
当归补血汤	12	162.2 \pm 5.2	206.3 \pm 8.7	226.8 \pm 24.9	242.1 \pm 33.7	254.2 \pm 31.6
	6	162.5 \pm 4.6	192.9 \pm 13.9	223.4 \pm 16.4	243.8 \pm 12.4	256.7 \pm 21.9

3.2 对大鼠 P_{Cr} 和 P_{UN} 的影响 与正常组比较,模型组大鼠 P_{Cr} 和 P_{UN} 均显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,当归补血汤高、低剂量组 P_{Cr} 和 P_{UN} 均显著降低($P < 0.01$),与贝那普利组比较,当归补血汤高剂量组 P_{Cr} 显著降低($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 对大鼠 D_{Cr} , D_{UN} 及 D_{Glu} 的影响 与正常组比较,模型组大鼠腹膜透析液中 D_{Cr} 和 D_{Glu} 显著降低, D_{UN} 显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,当归补血

汤高、低剂量组 D_{Glu} 显著升高($P < 0.01$),当归补血汤低剂量组 D_{UN} 显著升高($P < 0.05$)。见表 3。

3.4 对大鼠腹膜转运功能参数的影响 除正常组外,其余各组大鼠腹腔内液大致呈淡黄色,少数呈淡红色甚至出现血性。与正常组比较,模型组大鼠 UF, D_{Cr}/P_{Cr} , D_{UN}/P_{UN} 及 D_{Glu}/D_{0Glu} 显著降低($P < 0.01$);提示大鼠 *ip* 4.25% 的高糖透析液联合 LPS 可使腹膜对水的超滤作用下降,对小分子溶质肌

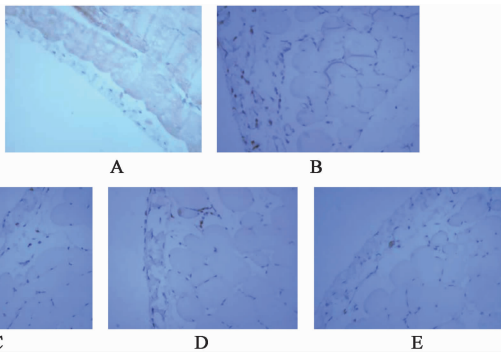


图 2 各组大鼠壁层腹膜 TGF-β₁ 的表达(免疫组化, ×400)

Fig. 2 TGF-β₁ expression in parietal peritoneum of rats in each groups(IHC, ×400)

表 5 当归补血汤对大鼠壁层腹膜 TGF-β₁ 表达 IA 的影响(̄x ± s, n = 10)

Table 5 Effect of Danggui Buxue Tang on expression IA of TGF-β₁ in parietal peritoneum of rats(̄x ± s, n = 10)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TGF-β ₁
正常	-	4 236.65 ± 581.83
模型	-	40 483.90 ± 13 787.69 ²⁾
贝那普利	2.3 × 10 ⁻³	28 774.87 ± 4 252.02 ⁴⁾
当归补血汤	12	19 894.18 ± 1 802.06 ^{4,6)}
	6	25 528.40 ± 5 438.68 ^{4,5)}

操作。LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁的结构成分,能刺激多种细胞因子释放,参与机体炎症反应,因此在腹膜透析液中加入 LPS 可以加速腹膜纤维化进程。按照文献报道,以人的平均寿命 75 年计算,其 15% 的生命周期 10 年作为长期透析时间,大鼠的生命周期为 28 周左右,其长期透析时间应为 16 ~ 20 周,本研究透析时间为 6 ~ 7 周,相当于人类腹膜透析 3 ~ 4 年,属于较长时间腹膜透析^[14]。

当归补血汤是经典名方,药理作用广泛,根据“补气生血”、“气血双补”和“补脾生血”等中医理论,笔者推测其对组织纤维化和腹膜透析相关性大鼠腹膜功能衰竭具有一定的干预作用。本研究结果显示当归补血汤高剂量组大鼠 UF 显著升高,当归补血汤高、低剂量组 D_{Cr}/P_{Cr}, D_{UN}/P_{UN} 及 D_{Glu}/D_{OGlu} 均显著升高,说明当归补血汤能提高腹膜对水、尿素氮和肌酐的清除,同时使葡萄糖的重吸收降低;组织形态学显示,当归补血汤能不同程度改善腹膜功能衰竭的病理变化,抑制腹膜增厚,使腹膜间皮细胞脱落减少,成纤维细胞、炎症细胞和血管增生减少。TGF-β₁ 是一种多功能细胞因子,具有诱导组织纤维化的作用,能诱导腹膜上皮细胞-间充质转化和血管新生,从而改变腹膜功能和结构,下调 TGF-β₁ 的表达可以抑制腹膜纤维化^[10]。本研究中模型组大鼠

腹膜 TGF-β₁ 表达增多,与文献报道的细菌性腹膜炎所致腹膜透析相关性腹膜纤维化接近^[15],当归补血汤高、低剂量组 TGF-β₁ 表达显著减少,提示当归补血汤的抗纤维化作用较强。本研究开展了当归补血汤在防治腹膜透析致腹膜功能衰竭方面的有效性,但其作用机制仍有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Devuyst O, Topley N, Williams J D. Morphological and functional changes in the dialyzed peritoneal cavity: impact of more biocompatible solutions[J]. Nephrol Dial Transplant, 2002, 17(3): 12-15.

[2] 余学清. 中国腹膜透析的现状及其应对之策[J]. 中华肾脏病杂志, 2004, 20(6): 389-390.

[3] 杨劲松, 盛梅笑. 腹膜透析相关腹膜纤维化的研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(2): 377-380.

[4] 方炜, 钱家麒, 余志远, 等. 腹膜透析对人腹膜形态结构的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2002, 18(6): 425-429.

[5] 马卫平, 梁凯峰, 赵宗江. 中医药防治腹膜透析腹膜纤维化[J]. 中国临床康复, 2006, 10(39): 157-159.

[6] 范颖, 陈信仪. 当归补血汤的实验研究进展[J]. 中医药学刊, 2006, 24(9): 1643-1646.

[7] 陈园, 陶艳艳, 李风华, 等. 当归补血汤对大鼠肝纤维化与肝脏脂质过氧化的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(1): 39-42.

[8] 刘勇, 李俊, 高建, 等. 当归补血汤总苷抗大鼠肺纤维化的实验研究[J]. 安徽医科大学学报, 2009, 44(5): 594-598.

[9] 魏明刚, 何伟明, 刘蔚, 等. 加味当归补血汤抗肾脏纤维化的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(7): 904-908.

[10] 管红斌, 练建红, 彭忠兴, 等. 辛伐他汀抑制腹膜透析相关性腹膜纤维化的实验研究[J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(12): 1769-1772.

[11] Mujais S, Nolph K, Gokal R, et al. Evaluation and management of ultrafiltration problems in peritoneal dialysis. international society for peritoneal dialysis Ad Hoc Committee on Ultrafiltration Management in peritoneal dialysis[J]. Perit Dial Int, 2000, 20(S14): 5-21.

[12] 刁金凤, 盛梅笑, 朱莹莹, 等. 黄芪注射液对高通透性腹膜透析大鼠透析效能及腹膜结构的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2011, 27(1): 58-62.

[13] 林沁, 邹忠东, 项协隆, 等. 罗格列酮对大鼠腹膜透析相关性腹膜纤维化的影响[J]. 第二军医大学学报, 2011, 32(2): 144-149.

[14] Zweers M M, Splint L J, Krediet R T, et al. Ultrastructure of basement membranes of peritoneal capillaries in a chronic peritoneal infusion model in the rat [J]. Nephrol Dial Transplant, 2001, 16(3): 651-654.

[15] 刘伏友, 彭佑铭, 邹莎琳. 16 年腹膜透析的基础和临床研究回顾[J]. 中南大学学报: 医学版, 2009, 34(3): 269-276.

[责任编辑 周冰冰]