

· 实验研究 ·

# 当归、丹参和川芎嗪注射液对腹膜透析 腹腔巨噬细胞功能的干预作用\*

李继承<sup>1</sup> 杨泽然<sup>1</sup> 张 凯<sup>2</sup>

**内容提要** 目的:研究当归、丹参和川芎嗪注射液(简称中药)对腹膜透析(PD)腹腔巨噬细胞(MC)功能的影响。方法(1)将MC置于含当归、丹参和川芎嗪的腹膜透析液(CDS)的培养液中培养24h,测定3个中药组、CDS组和对照组MC的一氧化氮(NO)含量和对四甲基偶氮唑盐(MTT)还原能力。(2)MC分别置于含2、10、100μg/ml的3个中药的CDS中培养24h,观察不同浓度中药对MC吞噬能力、NO含量和MTT还原能力的影响,对照组为等量培养液代替CDS。结果:CDS组MC的NO含量和MTT还原能力均明显低于对照组( $P < 0.01$ );与CDS组比较,川芎嗪组的MC NO含量和3个中药组MC MTT还原能力均有明显提高( $P < 0.01$ ),并随着培养液中的中药浓度的提高,3个中药组MC吞噬能力和NO含量均有显著增加。结论:在CDS中加中药能改善腹膜腔MC的防御功能,降低腹膜炎的发生率,对提高PD疗效有重要意义。

**关键词** 当归 丹参 川芎嗪 腹膜透析液 巨噬细胞 一氧化氮 腹膜透析

**The Intervention Effects of Angelica Sinensis, Salvia Miltiorrhiza and Ligustrazine on Peritoneal Macrophages During Peritoneal Dialysis** LI Ji-cheng, YANG Ze-ran, ZHANG Kai *Institute of Cytobiology and Tissue Engineering, Zhejiang University, Hangzhou (310031)*

**Objective:** To study the effect of Angelica sinensis, Salvia miltiorrhiza and Ligustrazine on function of peritoneal macrophages during peritoneal dialysis. **Methods:** Peritoneal macrophages of mice were cultured in culture medium (control), peritoneal dialysate (PD), drugs contained PD containing Angelica, Salvia and Ligustrazine combined (PD-ASL) or separated (PD-A, PD-S, PD-L) with concentration of 2μg/ml, 10μg/ml and 100μg/ml, separately for 24 hrs. The nitric oxide (NO) content, methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) reducing capacity (MTT-RC) and phagocytosis capacity of macrophages were determined and compared. **Results:** NO content and MTT-RC of macrophages cultured in PD group were significantly lower than those of the control ( $P < 0.01$ ), as compared with those in drug contained PD groups, the NO content in the PD-L group and the MTT-RC in the PD-ASL group were higher significantly ( $P < 0.01$ ). The phagocytosis capacity and NO content in the PD-ASL group were raised along with the increased concentration of drug in PD. **Conclusion:** Administering Chinese herbal medicine during peritoneal dialysis has important significance in improving the defense function of peritoneal macrophages, reducing the incidence of peritonitis and enhancing the therapeutic effect of peritoneal dialysis.

**Key words** Angelica sinensis, Salvia miltiorrhiza, Ligustrazine, peritoneal dialysate, macrophage, nitric oxide, peritoneal dialysis

近年来由于腹膜透析(peritoneal dialysis, PD)技术的发展,PD患者生存率较以往有了显著提高,使PD作为一种血液透析的替代疗法,正被越来越多的患者所接受。然而,长期PD时腹膜透析液(commercial

dialysate solution, CDS)对腹腔巨噬细胞(MC)的功能有明显抑制作用,使腹膜的防御功能降低,腹膜炎的发生率增加,引起PD失超滤(ultrafiltration failure),导致PD失败<sup>(1)</sup>。最近有研究认为中药(川芎嗪、丹参等)在PD中的应用能提高PD效能和腹膜对小分子物质清除,增加PD超滤量,改善腹膜功能<sup>(2)</sup>。然而在PD时,中药的干预作用和对腹腔MC的免疫功能影响尚鲜见报道。本实验应用活血化瘀类中药当归、丹参和川芎嗪注射液(简称中药)研究PD时腹腔MC防御功能的变

\* 国家中医药管理局重点项目基金(No. 97Z031),浙江省中医药管理局研究基金和浙江省分析测试基金资助项目

1. 浙江大学细胞生物学和组织工程学研究所(杭州 310031) 2. 杭州市红十字会医院  
万方数据

化,为临床降低腹膜炎的发生,延长腹膜使用寿命,提高 PD 疗效有积极意义。

### 材料和方法

1 动物 健康成年雄性 NIH 小鼠 296 只,体重 25.5 ~ 36.4g,由浙江大学实验动物中心提供。

2 CDS 和试剂 Baxter 腹透液(广州百特医疗用品有限公司生产),葡萄糖含量为 2.5%,pH5.2,含乳酸 448mg/L;MTT 为 Fluka 产品;RPMI-1640 购自 GIBCO 公司;小牛血清为杭州四季青生物工程研究所产品。

3 中药 盐酸川芎嗪注射液(无锡市第七制药厂,批号 9911181,pH 2.1,含  $K^+$  < 0.01mmol/L, $Na^+$  12.0mmol/L, $Ca^{2+}$  < 0.01mmol/L);丹参注射液(江苏高邮制药厂,批号 9910142,pH 5.9,含  $K^+$  < 0.01mmol/L, $Na^+$  90.0mmol/L, $Ca^{2+}$  0.6mmol/L);当归注射液(江苏常熟制药厂,批号 9503162,pH 5.9,含  $K^+$  3.70mmol/L, $Na^+$  140.2mmol/L, $Ca^{2+}$  0.04mmol/L)。

4 MC 诱生 小鼠处死前 4 天腹腔注射 3% 硫乙醇酸盐。收集腹腔 MC,以 D-Hanks 液洗涤 2 次,调细胞至  $1 \times 10^6/ml$  培养于含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中,加入 24 孔板,0.5ml/孔,置 37℃,5%  $CO_2$  孵箱中,2h 后洗去非贴附细胞,重新加入等量含所需浓度中药的 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液或经 CDS 修饰的 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液(CDS 与培养液 1:1 混合),并设相应对照组,培养 24h,测 MC 吞噬功能、MTT 还原能力和上清液中一氧化氮(NO)含量。

5 实验分组 当归组、丹参组、川芎嗪组、对照组、CDS 组。中药 3 组分别设低(2 $\mu g/ml$ )、中(10 $\mu g/ml$ )、高(100 $\mu g/ml$ ) 3 种浓度;对照组以等量培养液代替 CDS。

6 MC 吞噬功能检测 采用中性红吞噬法<sup>[3]</sup>。在培养 MC 中加入 0.1% 的中性红溶液 1ml,继续培养 2h,弃上清液,用 D-Hanks 液洗 3 次,加入 1% 的十二烷基磺酸钠(SDS)溶液 0.5ml,将细胞裂解、混匀,取 100 $\mu l$  加入 96 孔板,于全自动酶标仪上 570nm 处测光密度(A)值,以 A 值表示 MC 的吞噬功能。

7 MC 对 MTT 还原能力的检测 将培养 24h 的 MC 加入 5mg/ml 的 MTT 50 $\mu l$ ,继续培养 3h,弃上清液,每孔加入二甲基亚砷 1ml,取 96 孔板在 570nm 处测定光密度(A)值,以 A 值表示 MC 活力。

8 NO 的检测 取上清液 100 $\mu l$ ,加入等量 Griess 试剂,混匀,室温放置 3min,于全自动酶标仪 570nm 处测定光密度(A)值,以  $NO_2^-$  量表示 NO 含量,并以  $NaNO_2$  为标准品绘制标准曲线,将 A 值换算为  $\mu mol/L$ 。

9 统计学方法 采用 SPSS/9.0 统计软件进行一元方差分析。

### 结 果

1 不同浓度的 3 种中药对 MC 吞噬功能的影响 见图 1。MC 中性红吞噬功能(A 值,  $\bar{x} \pm s$ ):对照组为  $0.370 \pm 0.015$ ,CDS 组为  $0.200 \pm 0.021$ ,两组比较差异

有显著性( $P < 0.01$ )表明 CDS 对 MC 中性红的吞噬功能有显著的抑制作用;随着当归、丹参或川芎嗪浓度的增加,MC 对中性红的吞噬作用逐渐恢复,与 CDS 组比较,差异有显著性( $P < 0.01$ );但与对照组比较,CDS 对 MC 吞噬作用的抑制仍然存在。

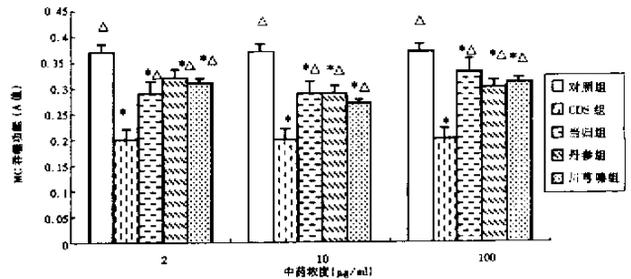


图 1 中药对 MC 吞噬功能的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

注:与对照组比较,\* $P < 0.01$ ;与 CDS 组比较, $\Delta P < 0.01$

2 不同浓度的 3 种中药对 MC MTT 还原能力的影响 见图 2。MC 的 MTT 还原能力(A 值,  $\bar{x} \pm s$ ):对照组为  $0.280 \pm 0.011$ ,CDS 组为  $0.170 \pm 0.006$ ,两组比较差异有显著性( $P < 0.01$ ),表明 CDS 对 MC MTT 还原能力有明显的抑制作用;中药应用可减轻 CDS 的抑制,但与对照组比较,CDS 对 MC 的抑制作用依然存在,且并不随 3 种中药浓度的增加而抑制作用减少或消除。

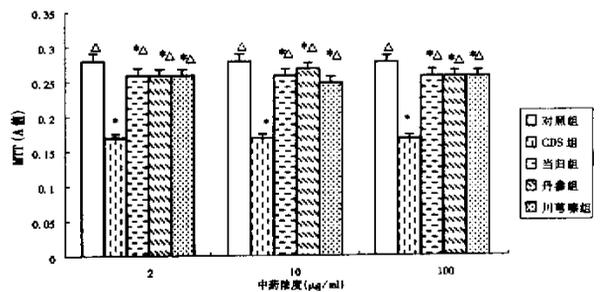


图 2 中药对 MC MTT 还原能力的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

注:与对照组比较,\* $P < 0.01$ ;与 CDS 组比较, $\Delta P < 0.01$

3 不同浓度的 3 种中药对 MC NO 含量的影响 见图 3。MC 的 NO 含量( $\mu mol/L, \bar{x} \pm s$ ):对照组为  $5.30 \pm 0.40$ ,CDS 组为  $3.34 \pm 0.32$ ,两组比较差异有显著性( $P < 0.01$ );应用中药后,CDS 对 MC 产生 NO 的抑制作用减轻,并随着 3 种中药浓度的增加,MC 产生 NO 的功能逐渐恢复。当中药浓度达到 100 $\mu g/ml$  时,MC 产生 NO 的功能基本恢复,与对照组比较差异无显著性( $P > 0.05$ )。

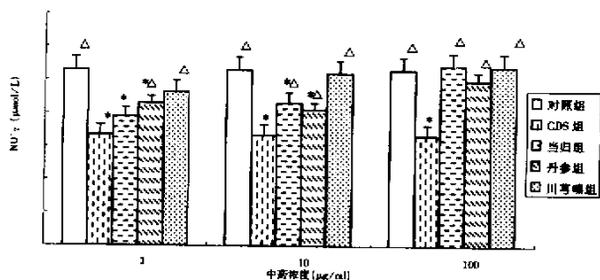


图3 中药对 MC NO 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

注:与对照组比较, \*  $P < 0.01$ , 与 CDS 组比较,  $\Delta P < 0.01$

### 讨 论

长期 PD 可抑制 MC 功能,降低腹膜的防御作用,引起腹膜炎,导致 PD 失败<sup>(4)</sup>,CDS 对 MC 吞噬、分泌细胞因子等多种功能均有抑制作用。在临床上,复发性腹膜炎是 PD 主要而严重的并发症,是引起腹膜硬化的主要因素。长期 PD 患者容易并发顽固性腹膜炎与腹腔 MC 功能降低有关<sup>(5)</sup>。我们的实验发现,MC 经短时间 CDS 暴露后,其吞噬功能受到明显抑制,当在 CDS 中加入 3 种中药则能明显改善 MC 对中性红的吞噬功能,使腹腔的防御功能得到增强。为进一步研究中中药对改善 MC 功能的量效关系,我们选择不同剂量的中药进行实验,发现随着中药剂量的增加,MC 吞噬功能逐渐增加,两者有明显的量效关系。

长期腹膜透析患者腹腔 MC 不同于常驻的 MC,即表现出不成熟性,有学者认为这是由于腹膜透析患者腹腔 MC 更新周期加快,导致血中单核细胞不断迁入造成。本实验采用 MTT 法观察了 CDS 对 MC 的 MTT 还原能力的影响,MTT 的还原能力与 MC 的活力或其活化程度呈正相关。结果表明,MC 经短时间 CDS 暴露后,MTT 的还原能力受到明显抑制。当归、丹参或川芎嗪注射液则能明显改善 MC 对 MTT 的还原作用,提高 MC 的免疫功能。

NO 是一种具有多种生理功能的信息分子,在 MC 发挥细胞毒、免疫调节及细胞内杀菌作用等方面具有重要意义。MC 经内毒素、细胞因子或其底物 L-精氨酸等激活后可产生大量 NO<sup>(6,7)</sup>。MC 可通过吞噬和细胞内杀伤作用来发挥抗菌作用,而 NO 在细胞内杀菌中有重要作用,在实验中,CDS 对 MC 释放 NO 作用有显著的抑制,而 CDS 对 MC 产生 NO 的抑制作用可能是 CDS 损害机体防御机能的一个重要方面。实验结果表明,当归、丹参或川芎嗪注射液能明显减轻 CDS 对 MC 释放 NO 的抑制,并随着药物剂量的增加,MC 的 NO 释放量增加,两者具有明显的量效关系。有研究表明当归、丹参能促进 MC 活化,NO 产生和吞噬功

能,并能维持 MC 细胞内钙稳定,从而保护 MC<sup>(8,9)</sup>;川芎嗪则具有抗菌和促进 MC 吞噬功能的作用<sup>(10,11)</sup>;但上述中药对 MC 的作用机制尚有待进一步研究。本实验结果提示,含当归、丹参或川芎嗪注射液的 CDS 能显著改善 PD 中 MC 的功能,增强腹腔的防御功能,对预防硬化性腹膜炎,延长腹膜使用寿命,提高 PD 疗效有重要的临床意义。

### 参 考 文 献

- Lai KN, Lai KB, Lam CW, et al. Changes of cytokine profiles during peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis* 2000 ;35(4):644—652.
- 陆才生,叶任高,孙林,等.含川芎嗪腹透液对腹膜透析效能的影响. *中国中西医结合杂志* 1998 ;18(12):709—711.
- 王起恩,樊晶光,吴卫东,等.温石棉与吸烟对肺巨噬细胞产生一氧化氮的影响. *中华劳动卫生职业病杂志* 1997 ;15(1):4—6.
- Wieczorowska TK, Polubinska A, Wisniewska J, et al. Multidirectional approach to study peritoneal dialysis fluid biocompatibility in a chronic peritoneal dialysis model in the rat. *Nephrol Dial Transplant* 2001 ;16(3):655—656.
- Lin CY, Chen WP, Yang LY, et al. Persistent transforming growth factor-beta 1 expression may predict peritoneal fibrosis in CAPD patients with frequent peritonitis occurrence. *Am J Nephrol* 1998 ;18(6):513—519.
- Plum J, Tabatabaei MM, Lordnejad MR, et al. Nitric oxide production in peritoneal macrophages from peritoneal dialysis patients with bacterial peritonitis. *Perit Dial Int* 1999 ;19 Suppl 2:S378—S383.
- Bauermeister K, Burger M, Almasreh N, et al. Distinct regulation of IL-8 and MCP-1 by LPS and interferon-gamma-treated human peritoneal macrophages. *Nephrol Dial Transplant* 1998 ;13(6):1412—1419.
- 高向东,吴梧桐.当归及其成分阿魏酸对小鼠免疫功能的影响. *中国生化药物杂志* 1994 ;15(2):107—110.
- 黄迪南,侯敢,祝其锋.复方丹参注射液对巨噬细胞一氧化氮合成的影响. *中国老年学杂志* 1999 ;19(1):41—42.
- 李逢春,周晓玲,蔡福盛,等.川芎嗪雾化吸入促进大鼠免疫. *中药药理与临床* 1994 ;10(4):30—32.
- 肖静.川芎嗪药理作用研究的新进展. *华西医药杂志* 1993 ;3(3):170—172.

(收稿 2001-05-25 修回 2001-11-23)