

黄芪注射液对含糖乳酸盐腹膜透析液所致水孔蛋白 1 表达异常的影响

王 怡¹ 舒 静¹ 胡维华²

(1. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院肾内科, 上海市甘河路 110 号, 200437; 2. 山东省青岛市海慈医院)

[摘 要] **目的** 观察黄芪注射液对含糖乳酸盐腹膜透析液所致水孔蛋白 1(AQP-1) 表达异常的影响。**方法** 腹腔注射不同含糖浓度透析液和黄芪注射液, 8 周后观察大鼠腹膜透析超滤量、腹膜清除率、腹膜结构、AQP-1 及其基因的表达。**结果** 含糖组 and 黄芪组腹膜透析超滤量与对照组比较明显减少($P<0.05$); 高糖组尿素氮清除率明显低于对照组($P<0.05$); 腹膜透析后大鼠腹膜组织出现不同程度损伤, 高糖组损伤尤为严重; 高糖高黄芪组 AQP-1 表达较对照组明显减少($P<0.05$)。**结论** 一定浓度的黄芪注射液可保护腹膜, 但对 AQP-1 的表达尚无明确作用。

[关键词] 黄芪注射液; 腹膜透析; 水孔蛋白 1

Effect of Huangqi Injectio on Abnormal Expression of Aquaporin-1 Caused by Glucose Lactate Peritoneal Dialysis Solution
WANG Yi¹, SHU Jing¹, HU Weihua²
(1. Yueyang Hospital of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437; 2. Haici Hospital of Qingdao City)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Huangqi (Radix Astragali seu Hedysari) Injectio on the abnormal expression of aquaporin-1 (AQP-1) caused by glucose lactate peritoneal dialysis solution. **Methods** Different glucose concentration lactate peritoneal dialysis solutions and Huangqi Injectio given to the rats intraperitoneally. Eight weeks later, the ultrafiltration of peritoneal dialysis, peritoneum clearance, peritoneal structure, AQP-1 and its gene expression were observed. **Results** Compared with the control group, in the glucose and Huangqi groups, the ultrafiltration of peritoneal dialysis was remarkably decreased ($P<0.05$); in the high glucose group, urea nitrogen clearance was remarkably lower ($P<0.05$). After the dialysis, the injuries of peritoneal structure in different degrees existed, especially worse in the high glucose group. The AQP-1 expression in the high glucose and high Huangqi group was remarkably decreased in comparison with the control group ($P<0.05$). **Conclusion** The Huangqi Injectio can protect the peritoneum, but its definite function on the AQP-1 expression is not yet determined.

Key Words Huangqi (Radix Astragali seu Hedysari) Injectio; Peritoneal dialysis; Aquaporin-1

腹膜透析作为终末期肾病的一种主要替代疗法, 其有效性依赖于腹膜作为透析器官的长期保护作用。腹膜间皮细胞内的水孔蛋白(AQP)是腹膜透析时水分跨细胞转运的通道, 对超滤功能具有重要作用。目前临床常规的含糖乳酸盐腹膜透析液对腹膜间皮细胞具有直接的抑制损伤作用, 从而可能引起腹膜间皮细胞内 AQP 的表达异常, 使水跨细胞转运发生改变, 这可能是腹膜超滤衰竭的原因之一。本实验通过给动物腹腔内用药的方法, 研究中药黄芪注射液能否拮抗腹透液对腹膜间皮细胞内 AQP 的影响。

1 材料

1.1 实验动物

正常清洁级 SD 雄性大鼠 84 只, 体重(200±30)g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 许可证号: SCXK(沪) 2003-0003。

1.2 药品及试剂

黄芪注射液(上海福达制药有限公司, 批号:

050102, 规格 5ml/支, 相当于生药 10g); 1.5% 乳酸盐腹透液(广州百特医疗用品有限公司, 批号: 6AB9866, 含糖量 1.5%); 4.25% 乳酸盐腹透液(广州百特医疗用品有限公司, 批号: 6AB9896, 含糖量 4.25%)。兔抗鼠 AQP-1 多克隆抗体 50μl 购自以色列 Alomone Labs 公司; Western-blot 试剂盒购自美国 Chemicon 公司; RT-PCR 荧光探针和荧光反应试剂购自上海达为科生物技术有限公司。

2 方法

2.1 动物分组与给药

将大鼠随机分为 7 组, 每组 12 只。各组用一次性注射器给大鼠腹腔内注射不同药物, 每次进液 30ml, 每日 1 次, 共 8 周, 具体方法如下: (1) 对照组: 0.9% 生理盐水; (2) 低糖组: 1.5% 腹透液; (3) 高糖组: 4.25% 腹透液; (4) 低糖低黄芪组: 1.5% 腹透液加黄芪注射液 10g/L; (5) 高糖低黄芪组: 4.25% 腹透液加黄芪注射液 10g/L; (6) 低糖高黄芪组: 1.5% 腹透液加黄芪注射液 20g/L; (7) 高糖高黄芪组: 4.25% 腹透液加黄芪注射液 20g/L。

2.2 腹腔引流液的留取与保存

各组大鼠腹腔内注射各浓度腹透液 30ml, 在大鼠腹腔内保留 2 小时(1 个透析周期)后, 用 16G 医用注射器针头穿刺大鼠左下腹引流, 引流液以计量管计量并取部分送检。

2.3 腹膜透析超滤量的检测

超滤量=引流液总量-灌入液总量(30ml)

2.4 腹膜对 K⁺、葡萄糖、尿素氮(BUN)、肌酐(SCr)清除率的观察

留取引流液同时断尾(4 周时)取血和腹主动脉穿刺(8 周时)取血 3ml 做生化检测。按下列公式计算腹透周期腹膜对某种物质的清除率:清除率(ml/min)=腹腔引流液物质含量(mmol/L)/静脉血中物质含量(mmol/L)×腹腔引流液总量(ml)/透析周期时间(min)。

2.5 腹膜组织标本的留取、保存与检测

大鼠以 2%戊巴比妥(0.2mg/kg)腹腔注射麻醉, 沿腹白线剪开腹壁, 于正中及左上腹壁取壁层腹膜组织两份, 一份置于 10%中性缓冲甲醛中做常规病理和免疫组化检测, 另一份置于液氮中并转于-70℃冰箱冻存以备提取 RNA。

2.6 腹膜组织常规光镜检查

于两侧腹前壁腹膜各取材 1 块(10mm×10mm), 标本用 4%多聚甲醛固定后常规梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋。5μm 石蜡切片, 常规脱蜡, 苏木精染色, 盐酸乙醇分化, 伊红复染, 常规梯度乙醇脱水, 中性树脂封片, 光镜下观察病理改变。

2.7 免疫组织化学法检查腹膜 AQP-1 表达

采用 Envision 法。以上石蜡切片、组织切片在 60℃恒温箱中烘烤过夜后, 微波抗原修复, 加 AQP-1 一抗 50μl, 4℃保存过夜。PBS 冲洗 3 次各 5 分钟, 滴加二抗 50μl, 室温静置 30 分钟后 PBS 漂洗, DAB 显色 5 分钟; PBS 冲洗 10 分钟; 苏木精复染, 盐酸酒精分化; 冲洗、透明、封片、镜检。每张切片随机选择 5 个高倍视野, 计量阳性细胞总数作为阳性细胞表达率。

2.8 荧光定量 PCR 法检测腹膜组织 AQP-1mRNA 表达

2.8.1 细胞总 RNA 抽提 将腹膜组织加入 1ml Trizol(预冷)后匀浆, 加入氯仿激烈振荡, 吸出水层加入二倍体积的异丙醇, 混匀, 置于-20℃冰箱 30 分钟, 再反复离心, 洗涤沉淀, 经紫外分光光度仪测定各总 RNA 的吸光度(A₂₆₀)值。并将所有样本稀释成相同浓度, -20℃冰箱保存待用。

2.8.2 逆转录 cDNA 试剂盒复融, 将 5×逆转录缓冲液, dNTPmix(含 dATP、dCTP、dGTP、dTTP), Money 鼠白血病毒(MMLV)逆转录酶, AQP-1 上

游引物: 5'-TCT GGA TCC CTT GGA CAC CTC-3', AQP-1 下游引物: 5'-CAG GAA TTC TCT ATT TGG GCT TCA-3', 扩增片段长度为 298bp。β微球蛋白基因上游引物: 5'-ACC CCC ACT GAA AAA GAT GA-3', β微球蛋白基因下游引物: 5'-TAC TTC AAA CCT CCA TGA TG-3', 扩增片段长度为 110bp。10000 转/分钟, 离心数秒。将经过稀释后的 RNA 样本逆转录成 cDNA, 反应体系总体积 20μl, 反应条件为 37℃, 1 小时, 然后 95℃, 5 分钟, 以灭活 MMLV 逆转录酶终止反应。

2.8.3 FQ-PCR 反应 将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增, 扩增条件: (1) 93℃, 2 分钟; (2) 93℃, 45 秒; 55℃, 1 分钟, 10 个循环; (3) 93℃, 45 秒; 55℃, 1 分钟, 30 个循环, 并进行实时检测。

2.9 统计学方法

应用 SPSS 11.0 统计软件包, 采用方差分析(ANOVA)检验, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组腹膜透析超滤量比较

表 1 示, 4 周时除低糖低黄芪组外, 其余各组大鼠腹膜透析超滤量较对照组均有下降趋势, 但无统计学意义。8 周时, 低糖组、高糖组、低糖高黄芪组、高糖高黄芪组大鼠腹膜透析超滤量较对照组均明显减少, 差异有统计学意义(P<0.05)。

表 1 各组大鼠腹膜透析超滤量比较(ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	4 周		8 周	
	标本数	超滤量	标本数	超滤量
对照组	12	37.29±3.81	8	43.88±7.70
低糖组	12	33.71±9.44	8	34.38±4.24*
高糖组	12	30.13±8.87	8	34.57±6.13*
低糖低黄芪组	12	37.42±7.18	8	38.25±6.71
高糖低黄芪组	12	36.58±4.23	8	37.88±4.19
低糖高黄芪组	12	35.95±5.65	8	36.38±8.82*
高糖高黄芪组	12	32.64±5.94	8	34.14±4.63*

与对照组同时段比较, *P<0.05

3.2 各组腹膜清除率比较

4 周时各组大鼠腹膜对 K⁺、葡萄糖、BUN、SCr 的清除率差异均无显著性意义。表 2 示, 8 周时高糖组、高糖高黄芪组对 BUN 的清除率较对照组明显降低(P<0.05)。

3.3 各组大鼠腹膜组织结构变化的比较

腹膜透析后大鼠腹膜组织出现不同程度变化, 表现为腹膜层增厚, 腹膜间皮细胞脱落, 纤维素和炎性细胞渗出, 间皮下结缔组织松散等现象, 以高糖组腹膜间皮细胞损伤情况、炎性细胞渗出状况尤为明显, 黄芪组也有腹膜间皮细胞损伤、增生的表现, 但程度较轻, 高糖高黄芪组以腹膜增生、纤维化表现多见。

表 2 8 周时各组大鼠腹膜对 K⁺、葡萄糖、BUN、Scr 的清除率比较(ml/min·x±s)

组别	标本数	K ⁺	葡萄糖	BUN	Scr
对照组	8	0.271±0.057	1.443±0.526	0.277±0.059	0.175±0.038
低糖组	8	0.211±0.028	0.987±0.422	0.232±0.037	0.156±0.037
高糖组	8	0.230±0.118	0.871±0.422	0.213±0.050*	0.162±0.038
低糖低黄芪组	8	0.260±0.059	0.908±0.147	0.241±0.048	0.192±0.058
高糖低黄芪组	8	0.262±0.040	1.083±0.053	0.244±0.039	0.166±0.073
低糖高黄芪组	8	0.235±0.054	0.944±0.349	0.248±0.066	0.212±0.756
高糖高黄芪组	8	0.216±0.052	0.817±0.207	0.214±0.049*	0.210±0.045

与对照组同项目比较, *P<0.05

3.4 各组 AQP-1 表达变化比较

表 3 示, AQP-1 表达于腹膜间皮细胞细胞膜, 部分腹膜因间皮细胞缺如而相应部位没有 AQP-1 表达, 各组 AQP-1 阳性染色的部位和强度基本一致。

表 3 8 周时 AQP-1 在各组大鼠腹膜中表达的比较(x±s)

组别	标本数	AQP-1	AQP-1 mRNA
对照组	8	13.13±2.03	14.29±3.04
低糖组	8	12.25±1.67	13.55±3.84
高糖组	8	11.75±1.98	15.60±5.22
低糖低黄芪组	8	12.88±2.42	16.85±2.43
高糖低黄芪组	8	11.75±1.83	14.06±2.49
低糖高黄芪组	8	11.38±1.85	18.00±2.61▲
高糖高黄芪组	8	11.00±1.77*	16.29±4.60

与对照组同项目比较, *P<0.05; 与低糖组同项目比较, △P<0.01; 与高糖低黄芪组比较, ▲P<0.05

4 讨论

随着肾病一体化治疗模式的推行, 腹膜透析在慢性肾功能衰竭的替代疗法中占有愈来愈重要的地位。近年来大量临床和实验研究发现, 长期应用含糖乳酸盐腹膜透析液进行腹膜透析可出现腹膜结构和功能进行性损伤, 并最终导致超滤衰竭^[2,3]。本研究光镜观察发现, 腹膜透析后大鼠和对照组相比, 腹膜组织出现不同程度腹膜层增厚, 腹膜间皮细胞脱落, 纤维素和炎性细胞渗出, 间皮下结缔组织松散等现象, 以高糖组腹膜间皮细胞损伤、炎性细胞渗出状况尤为明显, 非生理性腹透液的长时间刺激是其发生的主要原因。

AQP 家族是近年来发现的一组参与跨细胞水转运的细胞膜蛋白, 在维持机体水平衡中起重要作用^[4]。AQP-1 是腹膜滤过屏障中表达量最大的水孔蛋白, 被认为是腹膜跨细胞的水转运通道^[5]。AQP 的表达、结构或功能异常, 可使水跨细胞转运发生改变, 可能是超滤衰竭的原因之一。本研究显示, 各透析组和对照组在造模 4 周时, AQP-1 的表达无明显差异, 和某些文献报道一致^[6]。因而推测在超滤衰竭的发生机制中, AQP-1 结构的改变可能比其表达量的改变更为重要。腹膜透析可能通过糖基化或其他机制改变分子结构或单个水通道的功能, 最终引起腹膜超滤衰竭。

既往研究提示, 腹透液中加入黄芪可提高腹透效

能, 防止腹膜纤维化和硬化, 能拮抗乳酸盐腹膜透析液对腹膜间皮细胞的损伤作用^[7,8]。本研究显示, 黄芪注射液无明显提高腹膜小分子物质清除率的作用, 但可部分拮抗腹透液对腹膜超滤功能的影响, 其对 AQP-1 的保护作用尚无法确定。此外, 不同浓度的黄芪注射液对大鼠腹膜透析效能的影响是相同的, 对 AQP-1 表达的影响无明显差异, 但在造模 8 周后, 添加高浓度黄芪注射液的腹膜透析超滤量与对照组比较有所下降, 光镜观察发现高糖高黄芪组腹膜透析 8 周时, 部分大鼠间皮细胞增生、腹膜纤维化程度明显加重, 部分电镜结果亦显示细胞吞噬黄芪颗粒的表现, 这可能和中药制剂的提纯有一定的关系, 也提示中药制剂的应用应注意选择合适的用量或浓度。

参考文献

[1]Yeaman C, Grindstaff KK, Nelson WJ. New perspective on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiol Rev*, 1997, 79(1) : 73~98.

[2]卓莉, 李军, 李岩, 等. 葡萄糖透析液与腹膜纤维化. *国外医学泌尿系统分册*, 2003, 23(6) : 724~726.

[3]Witowski J, Wisniewska J, Korybalska K, et al. Prolonged exposure to glucose degradation products impairs viability and function of human peritoneal mesothelial cells. *J Am Soc Nephrol*, 2001, 12(11) : 2434~2441.

[4]Devuyst O, Nielsen S, Cosyns JP, et al. Aquaporin-1 and endothelial nitric oxide synthase expression in capillary endothelia of human peritoneum. *Am J Physiol*, 1998, 275 (1pt2) : H234~H242.

[5]Goffin E, Combet S, Jamar F, et al. Expression of aquaporin-1 in a long-term peritoneal dialysis patient with impaired transcellular water transport. *Am J Kidney Dis*, 1999, 33 (2) : 383~388.

[6]方炜, 钱家麒, 余志远, 等. 水孔蛋白 1 在人腹膜组织的表达及腹膜透析对其表达的影响. *中华肾脏病杂志*, 2003, 19 (1) : 29~33.

[7]孙铮, 张苗, 蒋春明. 腹膜透析液中添加黄芪对透析效能的影响. *江苏医药*, 2005, 31(4) : 258~260.

[8]黄一新, 易苗英. 高糖与炎症因子及黄芪对人腹膜间皮细胞毒性的影响. *中华中西医结合肾病杂志*, 2003, 4(5) : 262~264.