

中药消臌方利水消臌作用的机制研究

毛连根,李继承,丁世萍(浙江大学医学院淋巴学研究室,浙江 杭州 310031)

摘要:目的 观察中药消臌方(简称方剂)的利水消臌作用并探讨作用机制。方法 中药提取;尿液 Na^+ 测定;Griess 法血清 NO 浓度测定;膈腹膜扫描电镜制样及计算机图像处理系统定量分析腹膜淋巴孔。结果 中药消臌方剂能提高尿液 Na^+ 的排泄($P < 0.01$);能增加膈腹膜淋巴孔面积、密度和周长($P < 0.01$);中药消臌方剂诱导的小鼠血清一氧化氮(NO)升高能被一氧

基金项目:国家自然科学基金(No.39970934)、浙江省中医管理局科研基金、杭州市科委基金(No.2000123B27)、浙江省分析测试基金(No.00159)基金资助项目。

作者简介:毛连根 男 1957.6 杭州人 实验师 从事实验药理学研究工作

化氮合酶(NOS) 抑制剂(L- 硝基精氨酸) 抑制($P < 0.01$)。结论 中药方剂通过刺激活化 NOS 诱导机体内源 NO 升高实现利尿水消肿作用。

关键词: 中药; 腹膜淋巴孔; 一氧化氮合酶; 腹水

中图分类号: R285.5; R575.2

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2003)03-0198-03

To Study the mechanism of Traditional Chinese Medicine (TCM) on the ascites drainage.

Mao Liangen, Li Jicheng, Ding Shiping(*Department of Lymphology, Medical College of Zhejiang University, HangZhou 310031, China*)

ABSTRACT:OBJECTIVE To study the mechanism of traditional chinese medicine (TCM) on the ascites drainage. **METHOD** The extract of traditiona chinese medicine, The measurement of the concentration of sodium and NO in the serum. Scanning electron microscope and computer image processing were used to analysis the peritoneal lymphatic stomata. **RESULTS** Compared to N.S group and model group, TCM could significantly enhance the drainage of sodium ($P < 0.01$), and increase the perimeter and the area of the peritoneal lymphatic stomata, promote its distribution density ($P < 0.01$) and increase the concentration of NO. The effect of TCM on the peritoneal lymphatic stomata and the concentration of sodium was altered by adding NO supplier or NOS suppressor(L- LMNM) to the peritoneal cavity. **CONCLUSION** The observations indicated that TCM might regulate the peritoneal lymphatic stomata to drain materials in the peritoneal cavity by activating nos to induce the concentration of internal- NO.

KEY WORDS: traditional Chinese medicine (TCM); lymphatic stomata; NO synthase; ascites

观察中药消肿复方(党参、泽泻、白术、丹参及益母草五味中药组方) 的利尿消肿作用, 以 NO 供体硝普钠为阳性对照, 以 NOS 抑制剂(L- 硝基精氨酸) 为分析工具探讨中药方剂利尿消肿作用机制。

1 材料与方法

1.1 仪器

ZFQ85-A 型旋转蒸发器, 上海电子管十一厂; Hitachi S570 电镜- 计算机图象分析术系统, 日立公司; IB-5 型离子溅射镀金膜, 日立公司 HCP-2 型临界点干燥仪, 日立公司; 贝克曼 Cx- D7 型全自动生化分析仪, 美国贝克曼仪器公司。

1.2 药品

硝普钠, 温州制药二厂, 批号: 980506; 泽泻、党参、白术、丹参、益母草, 浙江中医研究院中药房售; L- 硝基精氨酸(L- LMNM), Sigma 公司。

1.3 动物

25 ~ 27g δ 清洁级 NIH 种小鼠, 购自浙江大学医学院实验动物中心, 合格证号: 医(动) 字第 22-9601018 号。

1.4 中药提取

取党参 30g, 白术 50g, 丹参 30g, 泽泻 30g, 益母草 80g, 用体积分数为 75% 乙醇浸泡 24h, 取浸液, 将浸液置于 ZFQ85-A 旋转蒸发器回流蒸发至总生药浓度为 15.2g/ mL, 置于冰箱 4℃ 冷藏备用。

1.5 肝纤维化小鼠模型制备及分组

取 25 ~ 27g δ NIH 小鼠若干, 以体积分数为 5% 乙醇代替饮用水, 除生理盐水对照组外, 其余小鼠于 d10 起 ig10% CCl_4 , 0.1 mL/10g, 每隔 3d/1 次, 第 6 周取 6 只小鼠肝脏做形态观察以确定假小叶是否形成, 然后将假小叶形成小鼠随机分成模型组、方剂量组(456g/ kg)、硝普钠组(50 μ g/ 只)、方剂

+ NOS 抑制剂组, 另加生理盐水组, 共 5 组, 每组 10 只。

1.6 方法

取分组小鼠, 分别 ig 生理盐水(0.2 mL/10g) 和中药方剂(0.2 mL/10g), 共 21d。硝普钠组于实验 d20 和 d21 分别给予硝普钠各 1 次(50 μ g/ 次/ 只); 方剂 + NOS 抑制剂组于实验 d20 和 d21 分别给予 NOS 抑制剂各 1 次(80 μ g/ 次/ 只), 每次给药后收集 2h 小鼠尿液, 贝克曼 Cx- D7 型全自动生化分析仪测定尿 Na^+ 浓度。各组于第 2 次给药后 1h 取血, Griess 法^[1]测定血清 NO; 取右膈腹膜 5mm $\times$ 5mm 制作扫描电镜样本观察分析腹膜淋巴孔。

1.7 扫描电镜制样

取右膈腹膜 5mm $\times$ 5mm 作戊二醛- 锇酸双重固定单宁酸液导电处理, 梯度乙醇脱水, 醋酸异戊脂置换, CO_2 临界点干燥仪干燥, 离子溅射仪喷金, 扫描电镜观察, 加速电压 20kV。电镜扫描观察, Elscopell .0 计算机图象分析软件处理分析。

1.8 统计分析处理

SPSS 数据统计分析系统, 组间均数比较 t 检验。

2 结果

2.1 方剂组与硝普钠组小鼠的尿液 Na^+ 浓度均大于生理盐水组和模型组($P < 0.01$); 方剂组与硝普钠组小鼠血清 NO 浓度均高于生理盐水组和模型组($P < 0.01$); 血清 NO 浓度升高与尿液 Na^+ 浓度趋向一致; 方剂 + NOS 抑制剂组的血清 NO 浓度及尿液 Na^+ 浓度均低于方剂组($P < 0.01$), 见表 1。

2.2 方剂组及硝普钠组小鼠的淋巴孔周、面积、密度大于模型组, 组间差异显著($P < 0.01$); 方剂 + NOS 抑制剂组小鼠的淋巴孔周、面积、密度小于方剂组, 组间差异显著($P <$

0.01)见表2。

表1 中药消臌复方对肝纤维化小鼠尿液排Na⁺量及血清NO的影响 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Influence of ascites drainage formula on the concentration of sodium and no in serum of liver fibrosis mice(n = 10 , $\bar{x} \pm s$)

组 别	NO (OD ₅₅₀ 值)	Na ⁺ (mmol/ L)
对照组	0.0092 ± 0.0013	91.55 ± 23.42
模 型 组	0.0067 ± 0.0017	97.48 ± 42.32
模型 + 方剂组	0.0261 ± 0.0089 ^{1,3)}	170.78 ± 17.06 ^{1,3)}
模型 + 硝普钠组	0.0119 ± 0.0055 ³⁾	163.80 ± 11.47 ^{1,3)}
模型 + 方剂 + NOS 抑制剂组	0.0190 ± 0.0040 ²⁾	139.28 ± 26.02 ²⁾

注:与生理盐水组比¹⁾ P < 0.01 ;与方剂组比²⁾ P < 0.01 ;与模型组比³⁾ P < 0.01 。

Note:compared with NS group¹⁾ P < 0.01 ;compared with recipe group²⁾ P < 0.01 ;compared with model group³⁾ P < 0.01

表2 中药消臌复方对肝纤维化小鼠腹膜淋巴孔的调控作用 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The regulation effect of ascites drainage formula on peritoneal lymphatic stomata of liver fibosis mice($\bar{x} \pm s$)

分组	淋巴孔周长 (μm)	淋巴孔面积 (μm ²)	淋巴孔密度 (个/0.1 mm ²)
对照组	7.306 ± 1.325	3.589 ± 1.292	6.699 ± 0.543
模型组	7.000 ± 0.844	3.852 ± 1.106	4.280 ± 1.335
模型 + 方剂组	9.094 ± 1.499 ^{1,2)}	5.925 ± 1.866 ^{1,2)}	6.24 ± 0.462 ^{1,2)}
模型 + 硝普钠 组	7.407 ± 1.605 ²⁾	4.372 ± 1.105 ²⁾	8.609 ± 0.537 ²⁾
模型 + 方剂 + NOS 抑制剂组	5.740 ± 1.366 ³⁾	2.702 ± 1.300 ³⁾	6.082 ± 3.079 ³⁾

注:与对照组比较¹⁾ P < 0.01 ;与模型组比²⁾ P < 0.01 ;与方剂组比³⁾ P < 0.01 。

Note:compared with control group¹⁾ P < 0.01 ; compared with recipe group²⁾ P < 0.01 ;compared with model group³⁾ P < 0.01

3 讨论

肝硬化是引起腹水的病因之一,由于病变过程较长硬变早,中期的患者长期受少量腹水之困扰,治疗较棘手。传统中医以健脾益气,活血化淤,利水消胀原则治理肝性腹水,并取得一定疗效^[2],因其不良反应小而深受重视,但中药消臌化水机制不明。随着腹膜淋巴孔的发现及腹腔-腹膜淋巴孔-脉管系通路在腹水归转中作用的阐明^[3],为探明中药消臌化水作用及机制提供了实验室研究操作平台。以往许多研究已证明传统常用消臌中药有调控腹膜淋巴孔的作

用^[4],但作用是通过何机制实现的,一时也难以弄清。近年来 NO 气体信使参与多种生理病理过程的研究报道给探明中药消臌利水作用机制提供了思路。本实验从 75 味常用消腹水中药中选取党参、白术、丹参、泽泻、益母草五味中药组成方,以硝普钠为阳性对照组,以 NOS 抑制剂(L-硝基精氨酸)为工具,研究观察中药方剂的消臌化水作用与 NO 之间的关系。结果显示:中药方剂除对肝纤维化小鼠腹膜淋巴孔的有开启作用外,对小鼠尿 Na⁺的排泄也有作用;中药方剂组小鼠血清的 NO 水平普遍升高(P < 0.01),小鼠血清 NO 水平的提高与小鼠尿 Na⁺排泄量的多少及腹膜淋巴孔的开启的大小趋向一致,这结果与供体组硝普钠组一致。NOS 抑制剂(L-硝基精氨酸)组小鼠的血清 NO 水平明显低于中药组(P < 0.01),其小鼠的淋巴孔周长、面积和密度也小(或低)于中药组(P < 0.01),尿 Na⁺排泄量也低于中药组(P < 0.01),这表明中药诱导的 NO 升高能被 NOS 抑制剂抑制。中药消臌化水作用与小鼠机体 NO 浓度的变化有关。

NO 是一种气体高反应自由基,在体内经 NOS 催化从 L-精氨酸产生,通过激活鸟苷酸环化酶,增加 cGMP 的生成发挥生物效应^[5]。本实验认为中药消臌利水作用主要是中药刺激活性血管内皮及淋巴管内皮的 iNOS,增加 NO 的产生,提高机体 NO 水平的结果。其途径有:(1)促进尿 Na⁺排泄降低血管离子渗透压;(2)增加血管的离子通透性,使组织液及腹水中的 Na⁺主动归转血液,从而消除钠储留现象;3.作用毛细淋巴管内皮,舒张毛细淋巴管内皮间隙、腹膜淋巴孔,利用淋巴系统的强大引流功能将含有大分子物质的腹水引流归转血液,从而利水消臌^[6]。

参考文献

[1] 茅惠明.血清中硝酸盐的镀锡还原测定法[J].临床检验杂志,1995,13(1):90.

[2] 李邦华,昆山.益气活血利水汤为主治疗肝硬化 41 例[J].中西医结合肝病杂志,1997,7(2):117.

[3] Li JC,Zhao ZR, Zhou JL, et al. A Study of threedis mensional organ- zation of the human diaphragmatic lymphatic lacunae and lymphatic drainage units[J]. Ann Anat,1996;178:537.

[4] 李继承,丁伟勇,沈毅.丹参、泽泻、茯苓和茯苓皮对小鼠腹膜淋巴孔的影响[J].中国病生生理杂志,1999,15(5):414.

[5] Palatka K, Actorjiay C, Huszka M, et al. Nitrogen monoxide (NO) in the function of the gastroiestinal tract and the liver[J]. Orv- Hetil.1997,138(24):1555.

[6] 李继承,张凯,杨泽然.巨噬细胞腹膜淋巴孔调控与透析色超滤机制研究[J].肾脏病与透析肾移植杂志,2000,9(1):13.

收稿日期:2001-12-29