

· 药剂与炮制 ·

缩泉丸中益智仁盐炙前后 对肾阳虚大鼠肾脏功能的改善作用

吴珊珊, 龚晓猛, 张美, 李梦琪, 高明阳, 胡麟, 胡昌江*
(成都中医药大学药学院, 成都 611137)

[摘要] **目的:**通过分析缩泉丸中益智仁盐炙前后对肾阳虚多尿模型大鼠肾脏功能的改善作用及肾脏水通道蛋白2 (AQP-2)表达的影响,探讨“盐炙入肾-肾主水”的作用机制。**方法:**采用腺嘌呤致肾阳虚多尿大鼠模型,比较缩泉丸中益智仁盐炙前后对肾阳虚多尿模型大鼠脏器系数、尿量,血中肌酐、尿素氮和 β_2 -微球蛋白,肾脏AQP-2 mRNA和蛋白表达差异的影响。**结果:**与模型组相比,给药组能降低大鼠尿量,对各脏器指数的变化有一定抑制作用,降低血清肌酐、尿素氮和 β_2 -微球蛋白含量的异常升高;提高AQP-2 mRNA和蛋白的表达,且与生品组相比,盐炙品组降低尿素氮、 β_2 -微球蛋白含量和提高AQP-2 mRNA和蛋白的表达作用显著增强。**结论:**益智仁盐炙后纳入缩泉丸中能较好地改善模型大鼠的肾脏功能和AQP-2的表达,盐炙后作用明显增强,证实了缩泉丸中益智仁盐炙增强疗效的科学性。

[关键词] 缩泉丸; 益智仁; 盐炙; 肾脏功能; AQP-2

[中图分类号] R283.1;R283.2;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)05-0001-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016050001

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160120.1443.002.html>

[网络出版时间] 2016-01-20 14:43

Improvement of Renal Function of Adenine-induced Kidney-yang Deficiency Rats Before and After Being Processed of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* in Suoquan Wan

WU Shan-shan, GONG Xiao-meng, ZHANG Mei, LI Meng-qi, GAO Ming-yang, HU Lin, HU Chang-jiang*
(Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss mechanism of stir fried with salt into the kidney-the kidney controlling water metabolism by analyzing effects of being processed of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* in Suoquan Wan on renal function of adenine-induced kidney-yang deficiency rats with much urine and expression of aquaporin-2 (AQP-2). **Method:** Effects of being processed of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* in Suoquan Wan on urine volume, viscera indexes, creatinine (Cr), urea nitrogen (BUN) and β_2 -microglobulin (β_2 -MG) in blood, AQP-2 mRNA and protein expression of adenine-induced kidney-yang deficiency rats were investigated. **Result:** Compared with the model group, each treatment group could reduce urine of rats, change of viscera indexes could be obviously inhibit, contents of Cr, BUN and β_2 -MG in blood significantly reduced, expression of AQP-2 mRNA and protein increased. After being processed with salt of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* in Suoquan Wan, effects strengthened obviously in comparison with the raw group. **Conclusion:** *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* before and after being processed in Suoquan Wan have improving effects on renal function and protein expression of AQP-2 of adenine-induced kidney-yang deficiency rats, but effects strengthen obviously after salt processing.

[Key words] Suoquan Wan; *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*; salt processing; renal function; AQP-2

[收稿日期] 20150705(008)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81473353,30973941)

[第一作者] 吴珊珊,在读硕士,从事中药炮制学原理研究,Tel:15802825791,E-mail:569222020@qq.com

[通讯作者] *胡昌江,教授,博士生导师,从事中药炮制学原理研究,Tel:13980980796,E-mail:hhecjj@hotmail.com

复方入药、炮制是中医用药的两大特色,目前在复方中探讨药物炮制机制的研究较少^[1]。本实验将药物炮制前后纳入缩泉丸中,研究炮制作用的机制,以反映中药炮制与中医临床用药的实际关联性。缩泉丸出自《妇人良方》^[2],由山药、乌药和盐益智仁 3 味药组成,功效补肾缩尿^[3-7]。方中益智仁为君药,生品主归脾经,以温脾止泻、收摄涎唾力胜,盐炙后主入肾经,以温肾固精缩尿为主,《中国药典》2015 年版(一部)规定缩泉丸中益智仁用盐炒,但科学内涵尚未阐明。本实验以缩泉丸的补肾缩尿功效为切入点,在前期研究基础上^[8-14],比较缩泉丸中益智仁盐炙前后对肾阳虚多尿大鼠尿量,血中肌酐(Cr),尿素氮(BUN)和 β_2 -微球蛋白(β_2 -MG),以及对肾脏水通道蛋白 2(AQP-2)mRNA 表达差异,探讨益智仁炮制前后对缩泉丸肾功能改善作用的影响,拟阐述中医药理论“盐炙入肾-肾主水”的科学内涵。

1 材料

352 型酶标仪(芬兰 Labsystems Multiskan MS), PikoRed 96 型荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪和 TCA0096 型热循环仪(美国 Thermo Fisher 仪器有限公司),DYY-6C 型电泳仪和 ChemiDoc™ XRS + system 型凝胶扫描成像仪(美国 Bio-Rad 公司),大鼠代谢笼(自制,专利号 ZL 201220284428. X)。

益智仁、乌药和山药均购于四川省成都市荷花池药材市场,批号分别为 20150312, 20150314, 20150305,经成都中医药大学药教研室卢先明教授鉴定,均符合《中国药典》2010 年版(一部)相关项下要求;AQP-2 抗体、兔多克隆抗体、生物素化山羊抗兔 IgG(H + L)[艾博抗(上海)贸易有限公司],大鼠 β_2 -微球蛋白 ELISA 试剂盒(上海商红生物科技有限公司)。

清洁级 SD 雄性大鼠,体重 220 ~ 250 g,由成都达硕生物科技有限公司提供,合格证号 SCXK(川)2013-0024。

2 方法与结果

2.1 药液的制备^[15]

2.1.1 缩泉丸生品 将生品益智仁与山药、乌药粉碎过 8 号筛,按 2015 年版《中国药典》规定三者按 1:1:1 比例混合为缩泉丸生品,临用时用水配制成 0.117 g·mL⁻¹缩泉丸生品的混悬液。

2.1.2 缩泉丸炙品 将盐炙益智仁与其余 2 味药材粉碎过 8 号筛,按 2015 年版《中国药典》规定按 1:1:1 比例混合为缩泉丸炙品,临用时用水配成 0.117 g·mL⁻¹缩泉丸炙品的混悬液。

2.1.3 阳性药物 取金匱肾气丸研碎,临用时用水配置成 1.08 g·mL⁻¹混悬液。

2.1.4 腺嘌呤混悬液 腺嘌呤临用前用水配制成 20 g·L⁻¹混悬液。

2.2 造模及给药 取 SD 大鼠 50 只,随机分为 5 组,分别为正常组、模型组、金匱肾气丸组、缩泉丸生品组、缩泉丸炙品组,每组 10 只。除对照组外,将其余 4 组大鼠按 200 mg·kg⁻¹剂量灌胃腺嘌呤造模 4 周,从造模后 2 周待大鼠出现体重降低,尿量增多,弓背蜷缩,精神萎靡,毛发萎黄,无光泽等阳虚表现时开始给药,连续灌胃给药 4 周后测定尿量,股动脉取血,离心(4 000 r·min⁻¹, 10 min)并摘取脏器。

2.3 数据分析 采用 SPSS 20.0 软件进行数据处理,各组数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间用独立样本 *T* 检验,*P* < 0.05 则认为有统计学意义。

2.4 对大鼠尿量影响 正常组、模型组、金匱肾气丸组、缩泉丸生品组、缩泉丸炙品组大鼠 24 h 尿量分别为 22.58, 34.19, 29.16, 29.54, 27.83 mL。与正常组相比,模型组大鼠 24 h 尿量显著增加(*P* < 0.05);与模型组相比,给药后尿量显著减少(*P* < 0.05)。表明缩泉丸具有缩尿作用,且缩泉丸中君药盐炙后作用有增强的趋势。

2.5 对大鼠脏器系数的影响 结果见表 1。模型组各脏器系数增大,与正常组相比均具有统计学意义(*P* < 0.05),说明模型组大鼠各脏器出现了不同程度的病变。给药后肾脏、肾上腺、睾丸的脏器系数减小并趋于正常,与模型组相比具有统计学意义(*P* < 0.05),表明缩泉丸能对腺嘌呤致肾阳虚多尿大鼠各脏器系数的变化有一定抑制作用。

2.6 对大鼠血清 Cr, BUN 和 β_2 -MG 含量的影响 按 Cr, BUN 和 β_2 -MG 检测试剂盒说明书操作,通过酶标仪测量吸光度,计算 BUN, Cr 和 β_2 -MG 的含量,见表 2。结果发现模型组大鼠血清 BUN, Cr 和 β_2 -MG 与正常组相比含量显著升高(*P* < 0.01),表明肾功能严重受损。给药后血清中 BUN, Cr, β_2 -MG 含量均与模型组相比显著降低(*P* < 0.05),且与生品组相比,缩泉丸中益智仁盐炙后能增强对 BUN, β_2 -MG 异常变化的抑制作用(*P* < 0.05)。

2.7 AQP-2 mRNA 与蛋白的表达 根据试剂盒说明书,提取肾脏近髓质组织 AQP-2,达到 RNA 纯度要求后进行逆转录,逆转录产物进行 PCR 扩增。内参 β -肌动蛋白(β -actin), AQP-2 mRNA 引物由国内公司设计合成, β -actin 引物上游为 5'-GAAGATCAAGATCATTCCTCCT-3',下游为 5'-TACTCCTGCTT

表 1 缩泉丸中益智仁盐炙前后对大鼠脏器系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of processing of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* in *Suoquan Wan* on viscera indexes of adenine-induced kidney-yang deficiency rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	肾脏	肾上腺	睾丸
正常	-	0.306 ± 0.034	0.007 ± 0.002	0.496 ± 0.050
模型	-	1.649 ± 0.218 ¹⁾	0.013 ± 0.002 ¹⁾	0.602 ± 0.082 ¹⁾
金匱肾气丸	1.08	1.411 ± 0.218 ²⁾	0.009 ± 0.002 ²⁾	0.507 ± 0.084 ²⁾
缩泉丸生品	1.17	1.413 ± 0.110 ²⁾	0.012 ± 0.001	0.504 ± 0.084 ²⁾
缩泉丸炙品	1.17	1.421 ± 0.181 ²⁾	0.010 ± 0.002 ²⁾	0.495 ± 0.084 ²⁾

注: ¹⁾与正常组比较 $P < 0.05$, ²⁾与模型组比较 $P < 0.05$ (表 2, 图 1 同)。

表 2 缩泉丸中益智仁盐炙前后对大鼠血清 BUN, Cr 和 β_2 -MG 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of processing of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* in *Suoquan Wan* on BUN, Cr and β_2 -MG in rat serum ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

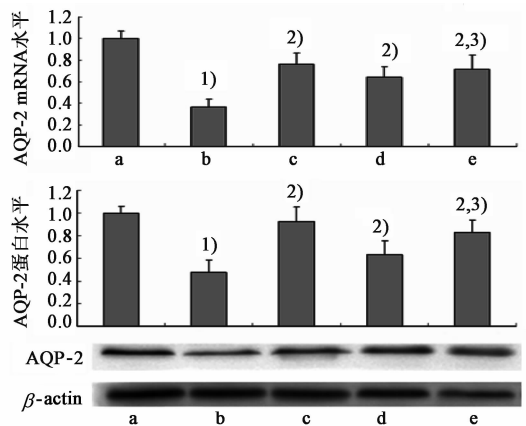
组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	BUN/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	Cr/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	β_2 -MG/ $mg \cdot L^{-1}$
正常	-	9.74 ± 1.36	48.53 ± 2.87	17.14 ± 2.23
模型	-	19.51 ± 2.83 ¹⁾	209.18 ± 28.20 ¹⁾	36.93 ± 5.27 ¹⁾
金匱肾气丸	1.08	14.47 ± 2.64 ²⁾	150.72 ± 28.57 ²⁾	27.50 ± 6.41 ²⁾
缩泉丸生品	1.17	16.02 ± 2.23 ²⁾	154.97 ± 34.85 ²⁾	28.40 ± 2.94 ²⁾
缩泉丸炙品	1.17	13.70 ± 1.56 ^{2,3)}	158.17 ± 20.18 ²⁾	23.96 ± 3.07 ^{2,3)}

注: ³⁾与缩泉丸生品组比较 $P < 0.05$ (图 1 同)。

GCTGATCCA-3', 扩增长度 111 bp; AQP-2 引物上游为 5'-GTCTCCTTC CTTCGAGCTGCCTTCT-3', 下游为 5'-GTGGCGTTG TTGTGCAGAGCATTGA-3', 扩增长度 137 bp; 并采用 ultrapage 纯化。总反应体系 20 μL , 扩增程序为预变性 95 $^{\circ}C$, 30 s; 变性 95 $^{\circ}C$, 5 s, 退火 55 $^{\circ}C$, 30 s, 末段延伸 72 $^{\circ}C$, 30 s, 循环 40 次。

AQP-2 蛋白根据试剂盒说明书提取肾脏近髓质组织总蛋白质, 采用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法检测组织蛋白浓度, 根据所测浓度, 每孔以蛋白量 100 μg 上样, 电泳, 将产物转移至硝酸纤维素膜上, 封闭 2 h, 分别经过一抗 [AQP-2 1:500, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 1:5000] 和二抗 (稀释浓度 1:5000) 孵育后洗膜, 显影、定影, 利用凝胶图像分析成像系统进行扫描分析, 结果以目的蛋白相对表达量表示。结果模型大鼠肾脏 AQP-2 mRNA 表达倍数减少, 与正常组比较具有统计学意义 ($P < 0.05$); 给药后 AQP-2 mRNA 的表达倍数与模型组比较明显增多, 具有统计学意义 ($P < 0.05$); 而药物盐炙后 AQP-2 mRNA 表达显著增多, 与生品组相比具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1。

模型组 AQP-2 蛋白表达量明显减少, 与正常组比较具有统计学意义 ($P < 0.05$)。给药后表达量明显增大, 与模型组比较具有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明经给药治疗后肾脏 AQP-2 蛋白表达明显升高



a. 正常组; b. 模型组; c. 金匱肾气丸组; d. 缩泉丸生品组; e. 缩泉丸炙品组

图 1 缩泉丸中益智仁盐炙前后对 AQP-2 mRNA 和 AQP-2 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of processing of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* in *Suoquan Wan* on expression of AQP-2 mRNA and protein

并趋于正常; 而药物盐炙后 AQP-2 蛋白表达与生品组相比显著增大, 具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1。

3 讨论

缩泉丸主要用于治疗下元虚冷所致尿多、尿频或遗尿。灌胃腺嘌呤造成大鼠肾阳虚尿量明显增加, 同时伴随症状与体征基本符合中医肾阳虚证候, 故选择该模型作为研究对象^[16]。阳性药物金匱肾

气丸是治疗肾阳虚的经典方剂,整个方剂温补肾阳,对于肾阳虚所致的多尿证有一定的治疗作用,故本文选择金匮肾气丸为阳性药。

本文考察了益智仁盐炙前后纳入缩泉丸中对肾阳虚模型大鼠的影响,依据临床以复方用药为主,突出了中药临床用药的特点。缩泉丸中盐益智仁温补脾肾、涩精缩尿,乌药温膀胱助气化止小便频数,山药健脾补肾,剂量 $1.17 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 能显著降低肾阳虚多尿模型大鼠 24 h 尿量,较盐炙益智仁单味药 $9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 用药剂量明显减少^[12],证明复方入药能增强疗效的科学性。实验将中药炮制理论——盐炙入肾与中医基本理论——肾主水紧密结合,突出了中医药理论,增强了研究的实用性,下一步将从“盐炙入肾-肾主水”继续深入研究,拟阐明缩泉丸的作用机制。

[参考文献]

[1] 许济群. 方剂学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1998:133.

[2] 陈磊,夏星,何博赛,等. 近5年国家自然科学基金中药炮制学科资助与结题项目情况分析[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(9):1639-1643.

[3] 吴勤辉,庄洪涛. 缩泉丸治疗儿童遗尿症 60 例[J]. 陕西中医, 2007, 28(11):1521-1522.

[4] 杨开来. 缩泉丸加味治疗尿道综合征 48 例[J]. 湖北中医杂志, 2006, 28(4):40-41.

[5] 于冬梅,王依新. 缩泉丸加味治疗小儿遗尿证[J]. 吉林中医药, 2004, 24(6):25.

[6] 王素平. 桑螵蛸散合缩泉丸治疗小儿遗尿症[J]. 天

津中医药, 2003, 20(2):13.

[7] 刘淑萍. 缩泉丸治疗氯氮平所致遗尿 32 例[J]. 中国中医药科技, 2001, 8(4):218.

[8] 李文兵,胡昌江,李兴华,等. 益智仁盐炙前后指纹图谱对比研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2):305-306.

[9] 龙兰艳,胡昌江,李文兵,等. 益智仁挥发油薄层指纹图谱研究[J]. 成都中医药大学学报, 2012, 35(1):58-59.

[10] 帅小翠,胡昌江,王虎,等. 益智仁盐炙前后对缩泉丸缩尿作用的影响[J]. 成都中医药大学学报, 2011, 34(3):69-71.

[11] 李文兵,胡昌江,吴珊珊,等. 益智仁盐炙对水负荷多尿模型大鼠缩尿作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11):261-264.

[12] 李文兵,胡昌江,吴珊珊,等. 益智仁盐炙前后对肾阳虚多尿大鼠肾脏改善作用研究[J]. 中成药, 2012, 34(9):1767-1769.

[13] 吴珊珊,胡昌江,潘新,等. 益智仁盐炙前后对肾阳虚多尿大鼠 AQP-2 与 AVPR-V2 表达的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(21):1747-1750.

[14] 李文兵. 基于中医“标本兼治”研究益智仁盐炙“温肾缩尿”作用机理[D]. 成都:成都中医药大学, 2013.

[15] 邱琼华,吴君,赖焕玲,等. 基于尿液生成排泄探讨缩泉丸配伍机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10):207-210.

[16] 邵命海,肖静,王毅兴,等. 从“肾主生殖”角度评价腺嘌呤与氢化可的松诱导的肾阳虚模型[J]. 上海中医药杂志, 2008, 42(2):57-59.

[责任编辑 刘德文]