

· 药理 ·

桑白皮各化学拆分组分对阿霉素肾病大鼠水钠潴留的影响

郑晓珂^{1,2}, 周静^{1,2}, 于洋^{1,2}, 王小兰¹, 黄岩杰³,
吴广操¹, 曾梦楠^{1,2}, 匡海学⁴, 冯卫生^{1,2*}

(1. 河南中医药大学药学院, 郑州 450046;

2. 呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心, 郑州 450046;

3. 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000; 4. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:探讨桑白皮各化学拆分组分对阿霉素肾病大鼠水钠潴留的影响及其作用机制。方法:采用一次性尾静脉注射阿霉素($6.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)建立阿霉素肾病模型,造模7 d后开始 *ig* 给药,连续给药21 d。实验期间于第7,14,21,28天留取尿液,检测大鼠尿量,24 h尿蛋白,尿钠及尿渗透压。给药3周后,测定各组大鼠血液渗透压、电解质及血液中总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),白蛋白(ALB),尿素氮(BUN),肌酐(Cr),抗利尿激素(AVP)的含量,同时计算肾脏指数,并检测肾脏中抗利尿激素V2受体(AVPV2R),水通道蛋白-2(AQP2)的水平及 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的活性等指标,蛋白免疫印迹法(Western bolt)检测肾脏AQP2的表达。结果:桑白皮水煎液能够降低阿霉素肾病大鼠的尿蛋白含量,改善低蛋白血症与高脂血症,并且以低剂量($476 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)效果最好;各化学拆分组分中桑白皮30%乙醇洗脱组分能够显著降低阿霉素肾病大鼠24 h尿蛋白,TC,TG,AVP,AVPV2R,AQP2含量,降低 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性及肾脏指数($P < 0.05, P < 0.01$),能够明显增加阿霉素肾病大鼠ALB,尿量,尿钠及尿渗透压($P < 0.05, P < 0.01$)。结论:桑白皮水煎液能够显著改善阿霉素肾病大鼠的各项病理症状,其30%乙醇洗脱组分为最佳有效部位,且其改善阿霉素肾病大鼠水钠潴留的机制可能与调节血浆AVP,肾脏AVPV2R,AQP2表达及 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性有关。

[关键词] 桑白皮; 化学拆分组分; 阿霉素肾病; 水钠潴留; 抗利尿激素V2受体(AVPV2R); 水通道蛋白-2(AQP2)

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)23-0103-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016230103

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160920.0950.060.html>

[网络出版时间] 2016-09-20 9:50

Effect of Chemical Splitting Fractions of Mori Cortex on Water Sodium Retention in Rats with Adriamycin-induced Nephrotic Syndrome

ZHENG Xiao-ke^{1,2}, ZHOU Jing^{1,2}, YU Yang^{1,2}, WANG Xiao-lan¹, HUANG Yan-jie³, WU Guang-cao¹,
ZENG Meng-nan^{1,2}, KUANG Hai-xue⁴, FENG Wei-sheng^{1,2*}

(1. College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

2. Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment & Chinese Medicine Development of Henan Province, Zhengzhou 450046, China;

3. First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;

4. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of chemical splitting fractions of Mori Cortex on water sodium retention in rats with Adriamycin-induced nephrotic syndrome and explore its mechanism. **Method:** The

[收稿日期] 20160303 (001)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2013CB531802)

[第一作者] 郑晓珂, 博士, 教授, 从事中药活性成分及作用机制研究, Tel:13623855366, E-mail:zhengxk.2006@163.com

[通讯作者] *冯卫生, 博士, 教授, 从事中草药活性成分研究及新药开发的研究, Tel:0371-65680011, E-mail:fwsh@hactmedu.cn

adriamycin nephropathy models were established by single tranvenous injection of adriamycin (dosage $6.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). The drugs were used continuously for 21 days from the 7th day. On days 7, 14, 21 and 28, urine output, 24 h urine protein, urinary sodium and urinary osmolality of these rats were detected. After 3 weeks of drug administration, plasma osmolality, plasma electrolyte, total cholesterol (TC), triglycerides (TG), albumin (ALB), blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (Cr), and antidiuretic hormone (AVP) levels were detected, and the kidney index was calculated, antidiuretic hormone receptor 2 (AVPV2R), aquaporin-2 (AQP2) levels in kidney and $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity were detected as well. At last, the expression level of AQP2 in kidney was detected by Western bolt. **Result:** Mori Cortex water decoction could down-regulate the level of 24 h urinary protein, improve hypoalbuminemia and hyperlipidemia, and the low dose ($476 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) showed the best effect, 30% ethanol fraction of Mori Cortex could significantly down-regulate 24 h urinary protein, TC, TG, AVP, AVPV2R, and AQP2 levels, decrease $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity and kidney index ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and significantly up-regulate the levels of ALB, urine output, urinary sodium and urinary osmolality ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Mori Cortex water decoction could significantly improve the pathological symptoms of rats with adriamycin-induced nephropathy, and 30% ethanol fraction is the most effective part. Its mechanism for improving water sodium retention in Adriamycin-induced nephropathy may be associated with regulating the expression levels of plasma AVP, renal AVPV2, AQP2 and $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity.

[**Key words**] Mori Cortex; chemical splitting fractions; adriamycin nephropathy; water sodium retention; antidiuretic hormone receptor 2 (AVPV2R); aquaporin-2 (AQP2)

桑白皮具有泻肺平喘、利水消肿的功效,常用于治疗肺热咳喘,水肿胀满尿少,面目肌肤浮肿^[1]。桑白皮含有多种类型的化学成分,决定了其具有的药理活性比较广泛。现代药理学研究表明,桑白皮具有利尿、降压、免疫、降血脂、抗炎、抗菌、抗病毒及抗氧化、镇痛等作用,如桑白皮浸膏的丙酮提取物有显著的平喘、利尿作用^[2]。本课题组在前期研究的基础上,通过检索古文献并结合现代药理临床研究资料,已将桑白皮拆分为化学成分互不交叉的 30% 乙醇洗脱组分,50% 乙醇洗脱组分,80% 乙醇洗脱组分,醇沉组分和脂肪油组分^[3],并建立了桑白皮性味药理学评价体系,目前已经完成了桑白皮水煎液及化学拆分组分止咳祛痰平喘、免疫调节、降糖、利尿作用研究^[4-7],并已经初步阐明其发挥药效的主要物质基础。本实验室在研究桑白皮利尿的过程中发现桑白皮能够增加正常大鼠的尿量及尿钠的排泄,为良好的利尿剂,且副作用小,但是其对肾病大鼠水盐代谢的影响研究较少,故本研究探讨桑白皮对肾水肿大鼠的改善作用,并筛选其发挥药效的最佳有效部位,探讨其可能作用机制。

肾病综合征(NS)是常见的水钠潴留性疾病之一,由肾小球疾病引起,以大量蛋白尿、低蛋白血症、高脂血症及不同程度地水肿等为临床特征^[8]。阿霉素(ADR)诱导的肾病综合征模型是模拟人类肾脏疾病的经典动物模型^[9],目前已广泛应用于肾脏相关疾

病的实验研究中^[10-11]。本实验采用阿霉素诱导的肾病综合征模型研究桑白皮水煎液及各化学拆分组分对其的影响,以期阐释桑白皮改善肾病综合征的最佳有效部位及其改善水钠潴留的作用机制。

1 材料

1.1 药物 桑白皮购自郑州市中药材市场,由河南中医药大学药学院生药学科陈随清教授鉴定为桑科植物桑 *Morus alba* 的干燥根皮。桑白皮水煎液的制备:称量桑白皮 500 g,加 10 倍量水煎煮 3 次,每次煎煮 1 h,4 层纱布滤过,收集滤液,减压浓缩,得到桑白皮水煎液,提取率为 17.0%。桑白皮化学拆分组分制备^[3]:桑白皮水煎液浓缩后,加 2 倍量的石油醚萃取,上清液浓缩回收溶剂后真空干燥 6 h,得石油醚组分(该组分为脂肪油组分),提取率为 2.80%。其余水提液上 Diaion HP-20 柱,依次用水,30% 乙醇,50% 乙醇,80% 乙醇洗脱。其中水洗脱液经过醇沉、干燥得到醇沉组分,提取率为 3.70%。其他洗脱液浓缩干燥分别得到 30% 乙醇,50% 乙醇,80% 乙醇洗脱组分,提取率分别为 6.82%,0.380%,0.195%。

1.2 动物 SPF 级雄性健康 SD 大鼠,体重 180 ~ 220 g,购自山东鲁抗医药股份有限公司,合格证号 SCXK(鲁)2013-0001。饲养于清洁级动物实验室内,适应性喂养 7 d。

1.3 试剂 注射用盐酸阿霉素(山西普德药业股份有限公司,批号 H14023143);盐酸苯那普利(北

京诺华制药有限公司,批号 140502);尿蛋白定量试剂盒,Na 测试盒,三磷酸腺苷(ATP)酶测试盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20140828,20140711,20140605);抗利尿激素(AVP),抗利尿激素 V2 受体(AVPV2R),水通道蛋白-2(AQP2)酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(江苏卡尔文生物技术有限公司,批号均为 20141101A);总胆固醇(TC),血(尿)肌酐(Cr),甘油三酯(TG),尿素氮(BUN)测定试剂盒(宁波医杰生物科技有限公司,批号分别为 14081703,14111001,14092601,20140620);AQP2, β -肌动蛋白(β -actin)抗体(Abcam 公司,批号分别为 GR270583-4,GR10422-1);哺乳动物组织总蛋白提取试剂,BCA 蛋白浓度测定试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为 10D24C01,20150827);增强化学发光法(ECL)试剂盒(北京康为世纪生物技术有限公司,批号 P0018-2)。

1.4 仪器 CS-400 型全自动生化分析仪(长春迪瑞医疗科技股份有限公司);DYY-7C 型电泳仪(北京六一仪器厂);Trans-Blot Turbo System 型蛋白快速转膜仪,iMark 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);Amersham Imager 600 型超灵敏多功能成像仪(美国 GE 公司);OM815 型冰点渗透压仪(德国罗泽公司);HORRORON H900 型电解质分析仪(深圳市希莱恒医用电子有限公司);BIOMATE 3S 型紫外分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 阿霉素肾病模型的建立 取 200 只雄性健康 SD 大鼠,按体重均衡原则,随机抽取 8 只作为正常组,剩余大鼠作为造模组。参照文献[12]及预实验结果,实验第 1 天,造模组大鼠尾静脉一次性注射阿霉素 $6.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (0.9% 生理盐水溶解),正常组大鼠尾静脉一次性注射生理盐水 0.5 mL。注射阿霉素 7 d 后 24 h 尿蛋白 $\geq 20 \text{ mg}$ 为造模成功。

2.2 桑白皮水煎液给药 将造模成功大鼠分为模型组,苯那普利 ($0.93 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组,桑白皮水煎液低、高剂量 ($476.00, 952.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组。桑白皮水煎液 *ig* 剂量按照人临床用量,以体表面积折算为大鼠等效剂量的 14,21 倍量给药,空白组和模型组 *ig* 等体积蒸馏水,连续给药 3 周。

2.3 桑白皮各化学拆分组分给药 将造模成功大鼠分为模型组、桑白皮水煎液 ($476.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组,30% 乙醇洗脱组分 ($190.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组,50% 乙醇洗脱组分 ($10.64 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组,80% 乙醇洗脱组分 ($5.46 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组,醇沉组分 ($103.60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组,脂肪油

组分 ($84.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组。水煎液按前期实验筛选的最佳作用剂量 ($476.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) *ig*,各拆分组分 *ig* 剂量按各拆分组分得率与水煎液低剂量相当折算,空白组和模型组 *ig* 等体积蒸馏水,连续给药 3 周。

2.4 肾病综合征基础指标检测 实验期间于第 7,14,21,28 天收集各组大鼠 24 h 尿液,记录 24 h 尿量, $4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液置 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。测定 24 h 尿蛋白含量。持续给药至第 28 天,收集尿液,每组大鼠麻醉后,右侧股动脉插管采血,静置后, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,用全自动生化分析仪测定血清 TC, TG, BUN, Cr 的含量, ELISA 法检测血清白蛋白 (ALB) 的含量,按照试剂盒说明操作。取血后处死动物,快速摘除双侧肾脏,称质量计算肾脏指数,在冰面上分离肾脏内髓与皮质,置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存备用。

2.5 尿钠、尿渗、血渗及血清电解质检测 采用冰点降低法测量大鼠尿渗透压、血渗透压, Na 测试盒测量大鼠尿钠的排泄,离子选择电极法测量大鼠血清电解质。

2.6 血浆 AVP,肾脏 AVPV2R 和 AQP2 检测 采用 ATP 酶测试盒检测肾脏 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性, ELISA 法检测血浆 AVP,肾脏 AVPV2R 和 AQP2,按照试剂盒说明操作。

2.7 蛋白免疫印迹法 (Western bolt) 检测肾脏 AQP2 蛋白表达 取冻存肾脏组织,按照哺乳动物总蛋白提取试剂盒操作步骤提取各组肾脏总蛋白, BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,经 SDS-PAGE 电泳分离后转移至 PVDF 膜上,用 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h,加入一抗 AQP2 (1:500), β -actin (1:1 000), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,分别加入二抗山羊抗兔 (1:2 000) 于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h, ECL 化学发光试剂盒显色,采用超灵敏多功能成像仪采集蛋白条带,并用 Quantity One 软件对蛋白条带进行分析。

2.8 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 桑白皮水煎液对阿霉素肾病大鼠 24 h 尿蛋白的影响 与正常组比较,注射阿霉素 7 d 后,模型组大鼠 24 h 尿蛋白含量明显增加,到第 14 天开始出现大量蛋白尿,在第 28 天达到高峰 ($P < 0.05, P < 0.01$)。第 28 天,与模型组比较,苯那普利组、桑白皮水煎液低、高剂量组均能显著降低 24 h 尿蛋白含量 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 桑白皮水煎液对阿霉素肾病大鼠 24 h 尿蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of Mori Cortex water decoction on 24 h urinary protein in rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

mg · (24 h)⁻¹

组别	剂量/mg · kg ⁻¹	7 d	14 d	21 d	28 d
正常	-	7.97 ± 1.96	8.96 ± 1.06	12.56 ± 0.93	7.59 ± 1.48
模型	-	20.8 ± 7.67 ¹⁾	220.74 ± 56.98 ²⁾	319.27 ± 50.94 ²⁾	371.66 ± 44.88 ²⁾
苯那普利	0.93	18.35 ± 7.69	188.49 ± 32.07	212.21 ± 35.67 ⁴⁾	242.22 ± 74.42 ⁴⁾
桑白皮水煎液	476	21.25 ± 9.64	211.63 ± 17.76	270.844 ± 41.55	243.06 ± 85.32 ⁴⁾
	952	22.92 ± 6.79	235.91 ± 19.47	280.46 ± 49.81	261.41 ± 49.97 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~9,图 1 同)。

3.2 桑白皮水煎液对阿霉素肾病大鼠 TC, TG, ALB, BUN, Cr 的影响 与正常组比较,模型组大鼠 TC, TG, BUN, Cr 水平升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), ALB 水平显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较,苯

那普利组,桑白皮高、低剂量组可以明显降低 TC, TG 的水平 ($P < 0.05, P < 0.01$),提高 ALB 的水平 ($P < 0.05, P < 0.01$),对 BUN, Cr 的水平影响不明显。见表 2。

表 2 桑白皮水煎液对阿霉素肾病大鼠 TC, TG, ALB, BUN, Cr 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of Mori Cortex water decoction on TC, TG, ALB, BUN and Cr levels in rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg · kg ⁻¹	TC/mmol · L ⁻¹	TG/mmol · L ⁻¹	ALB/mmol · L ⁻¹	BUN/mmol · L ⁻¹	Cr/μmol · L ⁻¹
正常	-	1.59 ± 0.08	0.53 ± 0.05	36.68 ± 5.61	3.49 ± 0.67	28.23 ± 3.30
模型	-	8.22 ± 2.21 ²⁾	6.23 ± 2.55 ²⁾	26.26 ± 2.89 ²⁾	4.73 ± 1.62 ¹⁾	31.99 ± 5.41 ¹⁾
苯那普利	0.93	3.44 ± 1.45 ⁴⁾	1.77 ± 1.02 ⁴⁾	32.67 ± 4.20 ⁴⁾	4.45 ± 1.00	29.12 ± 2.91
桑白皮水煎液	476	4.38 ± 0.52 ⁴⁾	2.80 ± 0.81 ⁴⁾	33.71 ± 2.30 ⁴⁾	4.18 ± 0.47	29.60 ± 3.00
	952	4.75 ± 0.79 ³⁾	3.06 ± 0.91 ³⁾	30.96 ± 4.11 ³⁾	4.21 ± 1.44	30.15 ± 3.05

3.3 桑白皮各化学拆分组分对阿霉素肾病大鼠 24 h 尿蛋白的影响 与正常组比较,注射阿霉素 7, 14, 28 d,模型组大鼠 24 h 尿蛋白含量明显增加 ($P <$

0.05, $P < 0.01$)。28 d 时与模型组比较,桑白皮水煎液,30% 乙醇洗脱组分均能显著降低 24 h 尿蛋白含量 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 桑白皮各化学拆分组分对阿霉素肾病大鼠 24 h 尿蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of chemical splitting fractions of Mori Cortex on 24 h urinary protein in rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

mg · (24 h)⁻¹

组别	剂量/mg · kg ⁻¹	7 d	14 d	28 d
正常	-	11.47 ± 3.68	11.48 ± 3.18	11.58 ± 1.28
模型	-	21.57 ± 2.64 ¹⁾	209.86 ± 31.22 ²⁾	332.71 ± 66.90 ²⁾
水煎液	476.00	20.57 ± 3.64	155.19 ± 37.80 ³⁾	223.20 ± 66.12 ⁴⁾
30% 乙醇洗脱组分	190.00	21.28 ± 3.76	175.96 ± 75.25	258.42 ± 22.45 ⁴⁾
50% 乙醇洗脱组分	10.64	22.64 ± 2.58	197.19 ± 35.73	304.13 ± 95.57
80% 乙醇洗脱组分	5.46	20.64 ± 1.28	193.35 ± 51.58	333.20 ± 66.12
醇沉组分	103.60	20.67 ± 2.71	190.81 ± 52.19	286.86 ± 74.88
脂肪油组分	84.00	21.58 ± 1.27	197.10 ± 52.70	340.73 ± 77.35

3.4 桑白皮各化学拆分组分对阿霉素肾病大鼠 TC, TG, ALB, BUN, Cr 的影响 与正常组比较,模型组大鼠 TC, TG, BUN, Cr 水平明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), ALB 水平明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较,桑白皮水煎液,30% 乙醇洗脱组分和醇沉组分能够明显降低 TC, TG 水平 ($P < 0.05, P < 0.01$),明显提高 ALB 水平 ($P < 0.05, P < 0.01$)。对 BUN, Cr

水平的影响不明显。见表 4。

3.5 桑白皮各化学拆分组分对阿霉素肾病大鼠肾脏指数的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾脏指数显著性增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较,桑白皮水煎液,30% 乙醇,50% 乙醇洗脱组大鼠肾脏指数明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 5。

3.6 桑白皮各化学拆分组分对阿霉素肾病大鼠尿

表 4 桑白皮各化学拆分组分对阿霉素肾病大鼠 TC, TG, ALB, BUN, Cr 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of chemical splitting fractions of Mori Cortex on TC, TG, ALB, BUN and Cr levels in rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	ALB/mmol·L ⁻¹	BUN/mmol·L ⁻¹	Cr/ μ mol·L ⁻¹
正常	-	1.76 ± 0.23	0.48 ± 0.14	33.79 ± 2.79	5.30 ± 0.71	29.64 ± 2.71
模型	-	7.66 ± 2.17 ²⁾	6.98 ± 0.62 ²⁾	25.51 ± 2.90 ¹⁾	6.05 ± 0.32 ¹⁾	32.97 ± 0.95 ¹⁾
水煎液	476.00	3.54 ± 1.96 ⁴⁾	3.13 ± 1.08 ⁴⁾	32.36 ± 4.81 ⁴⁾	5.54 ± 0.83	30.48 ± 1.15
30% 乙醇洗脱组分	190.00	4.84 ± 1.89 ⁴⁾	3.67 ± 0.97 ⁴⁾	32.63 ± 5.62 ⁴⁾	5.82 ± 0.56	30.32 ± 1.93
50% 乙醇洗脱组分	10.64	6.53 ± 1.10	5.35 ± 2.08	28.11 ± 6.43	5.44 ± 0.49	31.53 ± 4.80
80% 乙醇洗脱组分	5.46	6.83 ± 0.78	6.17 ± 2.75	26.95 ± 3.00	5.64 ± 0.19	30.64 ± 2.93
醇沉组分	103.60	5.92 ± 1.63 ³⁾	4.13 ± 2.17 ⁴⁾	31.20 ± 3.05 ³⁾	5.41 ± 0.44	31.70 ± 1.89
脂肪油组分	84.00	7.37 ± 1.19	5.85 ± 1.59	28.02 ± 4.50	6.06 ± 0.77	30.12 ± 2.47

表 5 桑白皮各化学拆分组分对阿霉素肾病大鼠肾脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 Effect of chemical splitting fractions of Mori Cortex on kidney index in rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	体重/g	肾重/g	肾脏系数/g·(100 g) ⁻¹
正常	-	379.17 ± 23.16	2.51 ± 0.63	0.67 ± 0.13
模型	-	320.00 ± 27.45 ¹⁾	3.34 ± 0.56 ¹⁾	1.04 ± 0.17 ²⁾
水煎液	476.00	343.80 ± 35.76	2.61 ± 0.51 ³⁾	0.76 ± 0.14 ⁴⁾
30% 乙醇洗脱组分	190.00	338.33 ± 54.47	2.70 ± 0.87	0.79 ± 0.19 ⁴⁾
50% 乙醇洗脱组分	10.64	327.11 ± 55.83	2.71 ± 0.49	0.83 ± 0.14 ³⁾
80% 乙醇洗脱组分	5.46	296.67 ± 39.11	3.19 ± 0.50	1.08 ± 0.19
醇沉组分	103.60	317.44 ± 28.20	3.10 ± 0.40	0.98 ± 0.31
脂肪油组分	84.00	299.67 ± 59.00	2.85 ± 0.38	0.96 ± 0.13

量、尿钠、尿渗透压的影响 与正常组比较,模型组大鼠尿量、尿钠、尿渗透压显著降低 ($P < 0.01$),说明模型组大鼠出现水钠潴留。与模型组比较,桑

白皮水煎液和 30% 乙醇洗脱组分能够明显增加大鼠尿量、尿钠、尿渗透压 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 6。

表 6 桑白皮各化学拆分组分对阿霉素肾病大鼠尿量、尿钠、尿渗透压的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 6 Effect of chemical splitting fractions of Mori Cortex on urine output, urinary sodium and urinary osmolality in rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	尿量/mL·(100 g) ⁻¹	尿钠/mmol·L ⁻¹	尿渗透/moms
正常	-	12.48 ± 1.12	51.77 ± 7.00	1 062.70 ± 314.51
模型	-	7.05 ± 1.04 ²⁾	22.10 ± 5.92 ²⁾	688.40 ± 142.35 ²⁾
水煎液	476.00	9.99 ± 1.62 ⁴⁾	37.97 ± 9.29 ⁴⁾	940.14 ± 120.09 ³⁾
30% 乙醇洗脱组分	190.00	9.37 ± 2.23 ³⁾	36.66 ± 8.93 ⁴⁾	934.43 ± 105.12 ³⁾
50% 乙醇洗脱组分	10.64	8.34 ± 1.48	29.03 ± 8.38	839.80 ± 326.57
80% 乙醇洗脱组分	5.46	6.86 ± 2.76	28.26 ± 4.91	744.90 ± 105.87
醇沉组分	103.60	7.43 ± 1.36	30.92 ± 8.05 ³⁾	849.50 ± 383.59
脂肪油组分	84.00	7.88 ± 1.13	26.10 ± 5.27	773.00 ± 116.21

3.7 桑白皮各化学拆分组分对阿霉素肾病大鼠血渗透压及血电解质的影响 与正常组比较,各组大鼠血渗透压、血钾、血钠、血氯水平均在正常范围内,且组间比较无显著差异,说明一次性尾静脉注射阿霉素 28 d 后,大鼠体内血渗透压及血电解质水平并未受到太大影响。见表 7。

3.8 桑白皮各化学拆分组分对阿霉素肾病大鼠肾

脏 Na⁺-K⁺-ATP 酶的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾脏 Na⁺-K⁺-ATP 酶显著性增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较,桑白皮水煎液组,30% 乙醇洗脱组分和醇沉组分均能显著降低肾脏 Na⁺-K⁺-ATP 酶的活性 ($P < 0.01$)。见表 8。

3.9 桑白皮各化学拆分组分对阿霉素肾病大鼠血浆 AVP,肾脏 AVPV2R, AQP2 水平的影响 与正常

表 7 桑白皮各化学拆分组分对阿霉素肾病大鼠血渗、血钾、血钠、血氯的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 7 Effect of chemical splitting fractions of Mori Cortex on plasma osmolality and plasma electrolyte in rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	血渗透压/mmol·L ⁻¹	血钾/mmol·L ⁻¹	血钠/mmol·L ⁻¹	血氯/mmol·L ⁻¹
正常	-	302.30 ± 24.08	4.54 ± 0.39	136.81 ± 1.05	99.83 ± 1.51
模型	-	311.91 ± 29.60	4.77 ± 0.28	136.67 ± 0.81	100.23 ± 1.10
水煎液	476.00	303.08 ± 15.39	4.90 ± 0.34	136.54 ± 1.48	100.74 ± 2.49
30% 乙醇洗脱组分	190.00	304.62 ± 22.38	4.90 ± 0.35	136.65 ± 1.24	101.15 ± 1.14
50% 乙醇洗脱组分	10.64	306.86 ± 15.74	4.83 ± 0.34	136.43 ± 1.28	99.96 ± 2.30
80% 乙醇洗脱组分	5.46	308.00 ± 13.85	4.84 ± 0.30	136.56 ± 1.75	100.98 ± 1.69
醇沉组分	103.60	307.67 ± 24.20	4.91 ± 0.40	137.21 ± 0.62	101.3 ± 1.41
脂肪油组分	84.00	305.11 ± 17.31	4.59 ± 0.24	136.75 ± 1.48	99.33 ± 0.67

表 8 桑白皮各化学拆分组分对阿霉素肾病大鼠肾脏 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 8 Effect of chemical splitting fractions of Mori Cortex on Na⁺-K⁺-ATPase activity in rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶/ $\mu\text{mol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{h})^{-1}$
正常	-	0.96 ± 0.03
模型	-	1.19 ± 0.10 ²⁾
水煎液	476.00	0.98 ± 0.14 ⁴⁾
30% 乙醇洗脱组分	190.00	1.03 ± 0.11 ⁴⁾
50% 乙醇洗脱组分	10.64	1.07 ± 0.07
80% 乙醇洗脱组分	5.46	1.15 ± 0.16
醇沉组分	103.60	1.01 ± 0.13 ⁴⁾
脂肪油组分	84.00	1.19 ± 0.13

组比较,模型组大鼠血浆 AVP 及肾脏 AVPV2R, AQP2 的水平明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,桑白皮水煎液组,30% 乙醇洗脱组分均能降低血浆 AVP 的水平 ($P < 0.01$); 桑白皮水煎

液,30% 乙醇,50% 乙醇洗脱组分和醇沉组分均能明显降低肾脏 AVPV2R, AQP2 的水平 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 9,图 1。

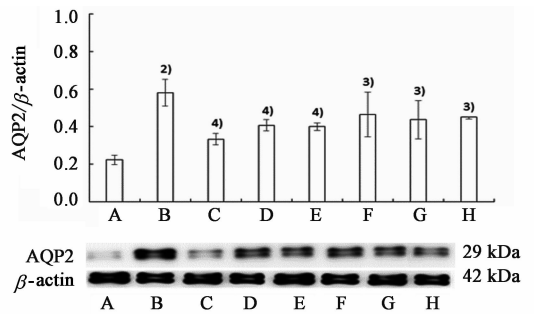


图 1 桑白皮各化学拆分组分对阿霉素肾病大鼠 AQP2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of chemical splitting fractions of Mori Cortex on protein expression levels of AQP2 in rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 9 桑白皮各化学拆分组分对阿霉素肾病大鼠 AVP, AVPV2R 和 AQP2 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 9 Effect of chemical splitting fractions of Mori Cortex on AVP, AVPV2R and AQP2 in rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	AVP	AVPV2R	AQP2
正常	-	9.77 ± 0.70	309 ± 23.08	310.95 ± 28.34
模型	-	12.40 ± 1.71 ²⁾	353.79 ± 36.35 ¹⁾	376.82 ± 21.31 ¹⁾
水煎液	476.00	8.34 ± 1.18 ⁴⁾	278.79 ± 21.54 ⁴⁾	231.11 ± 20.28 ⁴⁾
30% 乙醇洗脱组分	190.00	9.79 ± 2.27 ⁴⁾	293.4 ± 40.79 ⁴⁾	236.10 ± 22.00 ⁴⁾
50% 乙醇洗脱组分	10.64	11.10 ± 0.99	309.36 ± 40.57 ³⁾	256.20 ± 43.10 ⁴⁾
80% 乙醇洗脱组分	5.46	10.02 ± 0.66	323.41 ± 40.16	334.90 ± 57.02
醇沉组分	103.60	11.76 ± 3.64	286.57 ± 27.07 ⁴⁾	278.02 ± 83.77 ⁴⁾
脂肪油组分	84.00	12.37 ± 3.33	335.01 ± 51.28	328.92 ± 21.17

4 讨论

中医将肾病综合征通常归于“水肿”、“虚劳”、

“尿浊”等范畴^[13],其发病往往与肺、脾、肾三脏的功能失调有关。阿霉素诱导的肾病综合征模型是模

拟人类肾脏疾病的经典动物模型,传统的大鼠肾病模型多采取切除一侧肾脏或多次注射法,存在多次操作及对动物的损伤大等不足,阿霉素大鼠肾病模型简单高效,且在用药几天之内就发生肾脏的严重损伤,体重减轻,并且损伤发生的时段很稳定,而且可以预料^[14],但该模型的应用也存在一些不足,有许多因素能够影响造模的成功率。因此,为保证造模的成功率,本实验通过预实验确定阿霉素肾病大鼠模型的造模方法,阿霉素的注射剂量选择 $6.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,注射方式是一次性尾静脉注射。实验结果显示,模型组大鼠一次性尾静脉注射阿霉素后,与正常组比较从第 7 天开始出现蛋白尿,于第 28 天蛋白尿达到最高,且血清 ALB 含量降低,出现低蛋白血症,与文献报道一致^[15-16]。

桑白皮作为利水中药,在临床上常与其他中药配伍治疗肾病水肿^[17-18]。本实验室对桑白皮水煎液及各化学拆分组分的利尿作用研究中发现,桑白皮 30% 乙醇洗脱组分和脂肪油组分是桑白皮发挥利尿作用的有效部位^[7]。在前期研究及预实验的基础上,采用阿霉素诱导肾病综合征大鼠模型,探讨桑白皮水煎液对阿霉素肾病水肿的作用。结果显示,桑白皮水煎液($476,952 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组均能降低阿霉素肾病大鼠 24 h 尿蛋白,TC, TG 的水平,提高 ALB 的水平,但对 BUN, Cr 影响不大,说明桑白皮水煎液组均能降低阿霉素肾病的尿蛋白含量,改善低蛋白血症,改善高脂血症,并且以 $476 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 效果最好。因此本研究选用桑白皮低剂量为最佳给药剂量,在此基础上又对桑白皮各化学拆分组分对阿霉素肾病的影响进行研究。结果显示桑白皮 30% 乙醇洗脱组分能够改善阿霉素肾病大鼠的各项病理状况,起到了“量减效增”的效果,为最佳有效部位。

水肿是肾病综合征的主要临床表现之一,目前对于肾病综合征患者水肿的机制并不完全清楚,既往研究表明可能与肾脏水钠重吸收增加,即肾脏盐转运及水通道的调节紊乱,即水钠潴留有关^[19]。实验结果显示阿霉素肾病大鼠尿量减少,提示存在一定的水潴留;尿钠排泄减少,提示存在一定的水潴留;尿渗透压减少,提示水潴留超过水潴留,但对血渗透压及血电解质并没有产生太大的影响。给药后,桑白皮水煎液和 30% 乙醇洗脱组分能够增加尿量、尿钠的排泄,并提高尿渗透压,提示桑白皮水煎液和 30% 乙醇洗脱组分能够通过利尿、利钠的作用改善阿霉素肾病时的水钠潴留。

目前大多数学者认为肾脏原发性排钠障碍是肾

病综合征水肿形成的主要机制,其中钠潴留的部位主要在集合管, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶位于基底膜上,在肾脏钠重吸收中起决定性作用^[20]。肾小管基底膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性增加是肾脏钠潴留的肾内因素^[21-23],研究表明,肾病大鼠的尿钠排泄量与肾皮质 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的活性呈负性相关^[24]。本实验结果显示,桑白皮水煎液和 30% 乙醇洗脱组分能够抑制阿霉素肾病大鼠肾脏 ATP 酶活性,减少肾小管对钠的重吸收,促进尿钠的排泄,从而发挥利钠、利水效应,符合肾病水肿“治本”的需求。

目前,临床上对肾病患者的研究显示,患者体内抗利尿激素 AVP 水平的升高是肾病时水潴留的机制之一^[25-26]。AVP 与集合管上的 V2 受体集合后通过 Gs 蛋白激活腺苷酸环化酶,使细胞内 cAMP 升高,继而激活蛋白激酶 A (PKA),通过调节 AQP2 在集合管上皮细胞膜上的表达量来调控集合管对水的通透性,NS 患者水钠潴留发生时,其尿液 AQP2 和血浆 AVP 水平均高于正常,且 AQP2 随患者水肿分级的加重而增高^[27]。在阿霉素肾病大鼠模型中,也证实了肾病肾脏的 AVP 水平,AVPV2R,AVP,AQP2 mRNA 呈一致性高表达^[28]。本实验结果显示桑白皮水煎液和 30% 乙醇洗脱组分能够降低阿霉素肾病大鼠血浆 AVP,肾脏 AVPV2R 和 AQP2 的表达,提示桑白皮水煎液和 30% 乙醇洗脱组分对阿霉素肾病大鼠增加尿量,改善水肿的治疗作用与纠正 AVP,AVPV2R 和 AQP2 的高表达有关。

综上,桑白皮水煎液能够降低阿霉素肾病大鼠的尿蛋白含量,改善低蛋白血症,改善高脂血症,发挥利钠、利尿效应,30% 乙醇洗脱组分为最佳有效组分,并且其改善阿霉素肾病水肿时水钠潴留的机制可能与改善血浆 AVP,肾脏 AVPV2R,AQP2 和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的活性有关。本实验室已经完成了桑白皮各化学拆分组分化学成分的部分研究,从桑白皮各拆分组分中共分离并鉴定了 23 个化合物的结构,其中从 30% 乙醇洗脱组分中分离得到 16 个单体化合物^[29],接下来将从桑白皮 30% 乙醇洗脱组分继续深入研究,探讨其发挥疗效的物质基础及更深层次的作用机制,为提高桑白皮临床疗效及新药开发奠定一定基础。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:298.
- [2] 韦媛媛,徐峰,陈晓伟,等. 桑白皮黄酮平喘作用实验研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(11):2743-2745.

- [3] 王绅. 中药桑白皮性味拆分工艺研究[D]. 郑州:河南中医药大学, 2014.
- [4] 王小兰, 赫金丽, 张国顺, 等. 桑白皮水煎液及化学拆分组分止咳祛痰平喘作用研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(9): 1951-1956.
- [5] 冯志毅, 杨梦, 白义萍, 等. 桑白皮化学拆分组分免疫调节作用研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(9): 1968-1973.
- [6] 郑晓珂, 袁培培, 克迎迎, 等. 桑白皮水煎液及化学拆分组分降糖作用研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(9): 1957-1967.
- [7] 郑晓珂, 李玲玲, 曾梦楠, 等. 桑白皮水煎液及各化学拆分组分利尿作用研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(9): 1946-1950.
- [8] Charlesworth J A, Gracey D M, Pussell B A. Adult nephrotic syndrome: non-specific strategies for treatment [J]. *Nephrology: carlton*, 2008, 13(1): 45-50.
- [9] 张悦, 魏民, 王谦, 等. 阿霉素复制大鼠微小病变肾病模型的研究[J]. 北京中医药大学学报, 2002, 25(2): 16-18.
- [10] De Mik S M, Hoogduijn M J, de Bruin R W, et al. Pathophysiology and treatment of focal segmental glomerulosclerosis: the role of animal models [J]. *Bmc Nephrol*, 2013, 14(1): 1-10.
- [11] Takiue K, Sugiyama H, Inoue T, et al. Acatlasemic mice are mildly susceptible to adriamycin nephropathy and exhibit increased albuminuria and glomerulosclerosis [J]. *Bmc Nephrol*, 2012, 13(1): 1-10.
- [12] 张勇, 张蓓, 宁华英, 等. 单次尾静脉注射法阿霉素大鼠肾病模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(1): 1-4.
- [13] 吴承玉. 现代中医内科诊断与治疗学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 1204.
- [14] Pippin J W, Brinkkoetter P T, Cormack-Aboud F C, et al. Inducible rodent models of acquired podocyte diseases [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 296(2): 213-229.
- [15] 葛斌, 谢梅林, 顾振伦, 等. 肾炎灵对阿霉素肾病大鼠肾脏的保护作用[J]. 苏州大学学报: 医学版, 2009, 29(2): 252-255.
- [16] 王军建, 胡锐. 丹参酮 II_A 对阿霉素肾病大鼠肾小球 nephrin 和 TGF- β_1 的表达影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 245-251.
- [17] 赵丽敏. 中西医结合治疗肾病综合征 36 例[J]. 河南中医, 2004, 24(8): 55-56.
- [18] 胡艳. 麻黄连翘赤小豆汤合五皮饮治疗小儿肾病水肿 30 例[J]. 北京中医, 2003, 22(5): 17-18.
- [19] 桂定坤. 黄芪水提物促肾脏水钠排泄及肾脏保护作用的细胞分子机制研究[D]. 上海: 复旦大学, 2007.
- [20] Lee H S, Song C Y. Oxidized low-density lipoprotein and oxidative stress in the development of glomerulosclerosis [J]. *Am J Nephrol*, 2009, 29(3): 62-70.
- [21] Voqt B, Favre H. Na⁺, K⁺-ATPase activity and hormones in single nephron segments from nephritic rats [J]. *Clin Sic*, 1991, 80(6): 599-604.
- [22] LuS G, Jiang X Y, Hu M C, et al. Na(+) -K(+) -ATPase activity: role in the impaired sodium excretion of experimental nephrosis in rats [J]. *Chin Med J*, 1994, 107(7): 536-540.
- [23] Fersille E, Vogt B, Rousselot M, et al. Mechanism of enhanced Na-K-ATPase activity in cortical collecting duct from rats with nephritic syndrome [J]. *J Chin Invest*, 1993, 91(4): 1295-1300.
- [24] Deschenes G, Doucet A. Collecting duct (Na⁺/K⁺-ATPase) activity is correlated with urinary sodium excretion in rat nephrotic syndromes [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11(6): 604-615.
- [25] Pedersen E B, Danielsen H, Malsen M, et al. Defective renal water excretion in nephrotic syndrome: the relationship between renal water excretion and kidney function, arginine vasopressin, angiotensin II and aldosterone in plasma before and after oral water loading [J]. *Eur J Clin Invest*, 1985, 15(1): 24-29.
- [26] Usberti M, Federico S, Meccariello S, et al. Role of plasma vasopressin in the impairment of water excretion in nephrotic syndrome [J]. *Kidney Int*, 1984, 25(2): 422-429.
- [27] 柳继兴, 宋霞, 李桂英, 等. 肾病综合征患者血浆 AVP 及尿液 AQP2 水平观察[J]. 解放军预防医学杂志, 2009, 27(3): 223-224.
- [28] 马骥, 陈靖. 肾病综合征大鼠精氨酸血管加压素和 V2 受体与水孔蛋白-2 的研究及黄芪的治疗作用[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1999, 11(4): 315-318.
- [29] 冯卫生, 曹彦刚, 李芳, 等. 桑白皮各化学拆分组分化学成分研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2015, 17(3): 492-498.

[责任编辑 张丰丰]