

泽泻及其炮制品对肾阴虚水肿模型大鼠的作用机制

严林^{1,2}, 欧则民², 王艳静³, 张瑶³, 程怡², 王梓丞⁴, 刘德文^{2*}, 王锦玉^{2*}, 马振山², 仝燕²

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004;

2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

3. 天津中医药大学, 天津 301617; 4. 北京城市学院, 北京 100089)

[摘要] 目的:通过研究泽泻及其炮制品对肾阴虚水肿模型大鼠的药效作用,探讨泽泻及其炮制品改善肾阴虚水肿的作用机制。方法:将42只SPF级雄性SD大鼠随机分为正常组、模型组、阳性药六味地黄丸组、泽泻低、高剂量组,盐泽泻低、高剂量组,每组6只。除正常组外,其余各组大鼠均通过尾静脉注射阿霉素和灌胃甲状腺素复制肾阴虚水肿模型,正常组和模型组给予等体积蒸馏水,阳性药组给予六味地黄丸(1.4 g·kg⁻¹),药物治疗组分别给予泽泻低、高剂量(1.4 g·kg⁻¹),盐泽泻低、高剂量(1.4 g·kg⁻¹),连续给药4周。末次给药后取大鼠肾脏,通过苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠肾脏组织病理变化,放射免疫法检测血清中三碘甲状腺原氨酸(T₃)、甲状腺素(T₄)、促卵泡生成激素(FSH)、睾酮(T)的含量,全自动生化分析仪测定血清中肌酐(CREA)、尿素(UREA)、胆固醇(CHOL)、甘油三酯(TG)的含量;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中促性腺激素释放激素(GnRH),血浆中环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)的含量,分别用免疫组织化学法和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肾脏中水通道蛋白(AQP)-1、AQP-2的表达和mRNA的转录水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠体质量、尿量显著降低(P<0.01),饮水量明显增加(P<0.05),肾脏有大量炎症细胞浸润及纤维组织增生;T₃、T₄、cAMP/cGMP、CREA、FSH、AQP-1、AQP-2表达及转录水平显著上升(P<0.01),CHOL、TG含量明显升高(P<0.05),GnRH和T的含量显著降低(P<0.01)。与模型组比较,泽泻和盐泽泻低、高剂量组体质量均有所增加,其中泽泻低剂量组和盐泽泻低剂量组显著增加(P<0.01),各组大鼠尿量均有所增加,但差异无统计学意义,肾脏组织炎症细胞浸润减少;明显降低T₄、cAMP/cGMP、UREA、CREA、FSH、CHOL、TG的含量(P<0.05, P<0.01),升高GnRH的水平(P<0.01),其中泽泻高剂量组和盐泽泻低、高剂量组大鼠肾脏AQP-1、AQP-2 mRNA的转录水平显著下降(P<0.01)。结论:泽泻及其炮制品对肾阴虚水肿模型大鼠均有改善作用,其机制可能与下调AQP-1、AQP-2表达和纠正下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴紊乱有关。

[关键词] 泽泻; 盐泽泻; 肾阴虚水肿症; 利尿; 水通道蛋白; 下丘脑-垂体-性腺轴

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R256.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)24-0042-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20222280

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20221025.1829.006.html>

[网络出版日期] 2022-10-26 10:43

Mechanism of Alismatis Rhizoma and Its Processed Product Against Edema of Kidney Yin Deficiency in Rats

YAN Lin^{1,2}, OU Zemin², WANG Yanjing³, ZHANG Yao³, CHENG Yi², WANG Zicheng⁴,
LIU Dewen^{2*}, WANG Jinyu^{2*}, MA Zhenshan², TONG Yan²

(1. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, Chinese Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China;

4. Beijing City University, Beijing 100089, China)

[收稿日期] 2022-09-01

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82003951);中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(ZXKT19026)

[第一作者] 严林,在读硕士,从事中药制剂研究,E-mail:3104483640@qq.com

[通信作者] *刘德文,副研究员,从事中药制剂研究,E-mail:dwlou@icmm.ac.cn;

*王锦玉,研究员,从事中药制剂研究,E-mail:jinyu024@163.com

[Abstract] **Objective:** To evaluate the pharmacological effect of *Alismatis Rhizoma* (AR) and its processed product on rats with edema of kidney Yin deficiency and explore the mechanism. **Method:** A total of 42 male SPF SD rats were randomized into normal group (equivalent volume of distilled water), model group (equivalent volume of distilled water), positive medicine Liuwei Diguangwan group ($1.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), low- and high-dose AR groups ($1, 4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively), and low- and high-dose salt-processed AR (SAR) groups ($1, 4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively), with six rats in each group. Adriamycin (tail vein injection) and thyroxine (gavage) were used to induce edema of kidney Yin deficiency in rats except the normal group. The administration lasted 4 weeks for all the groups. After the last administration, histopathological changes of rat kidneys were observed based on hematoxylin-eosin (HE) staining. Serum content of triiodothyronine (T_3), thyroxine (T_4), follicle-stimulating hormone (FSH), and testosterone (T) was determined by radioimmunoassay, and serum content of creatinine (CREA), urea (UREA), cholesterol (CHOL) and triglyceride (TG) by automatic biochemical analyser. The levels of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), cyclic adenosine monophosphate (cAMP), and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) in plasma were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the expression of aquaporin(AQP)-1 and AQP-2 and the transcription of mRNA in kidney were measured by immunohistochemistry and real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), respectively. **Result:** Compared with normal group, the rats in model group showed decrease in body mass and urine volume ($P<0.01$), increase in water consumption ($P<0.05$), infiltration of a large number of inflammatory cells and fibrous tissue proliferation in the kidney, rise of the expression and transcript levels of T_3 , T_4 , cAMP/cGMP, CREA, FSH, AQP-1, and AQP-2 ($P<0.01$), the contents of CHOL and TG were significantly increased ($P<0.05$), and reduction in the levels of GnRH and T ($P<0.01$). Body mass increased in both the low- and high- dose groups of AR and SAR compared with that in model group, with significant differences between the low-dose AR group and the low-dose SAR group ($P<0.01$). Moreover, compared with model group, low- and high-dose AR and SAR insignificantly increased the urine volume of rats, reduced the inflammatory cells in kidney tissues, significantly decreased the levels of T_4 , cAMP/cGMP, UREA, CREA, FSH, CHOL and TG in serum ($P<0.05, P<0.01$), and elevated the level of GnRH ($P<0.01$), high-dose AR, low- and high-dose SAR significantly lowered the transcription levels of AQP-1 and AQP-2 mRNA in the kidneys of rats ($P<0.01$). **Conclusion:** Both AR and SAR alleviated the edema of kidney Yin deficiency in rats by down-regulating the expression of AQP-1 and AQP-2 and correcting the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis disorder.

[Keywords] *Alismatis Rhizoma* (AR); salt-processed *Alismatis Rhizoma* (SAR); edema of kidney Yin deficiency; diuresis; aquaporin(AQP); hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis

肾阴虚水肿症是一种具有中医证候特点的疾病,中医理论认为该病的发生多由禀赋不足,肾阴素亏,或久病伤阴,波及肾阴所致,临床表现为大量蛋白尿、低蛋白血症、高脂血症、水肿及腹水形成等^[1]。西医认为该病是由于多种因素例如肾炎、肾病综合征等使肾脏损伤导致水肿^[2],主要原因是水钠潴留、血管内外液体交换平衡失调所致,一般治疗方法多使用利尿剂如氢氯噻嗪、呋塞米等改善水液失调;同时控制炎症,抑制肾损害以减轻反应症状。研究表明,长期使用抗炎和噻嗪类药物不良反应较多,严重者损坏肾脏功能,不利于患者身心健康^[3]。因此,寻求一种低毒有效的利尿剂对于肾性

水肿的治疗有重要意义。

泽泻为泽泻科植物泽泻的干燥块茎,收载于2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》),功能主治为利水渗湿,泄热,化浊降脂;是我国使用历史悠久的利尿良药,在许多治疗水肿的方剂中均有使用,例如四苓散、五苓散、白术散、泽泻汤等。研究报道泽泻有降血脂、降血糖、利尿、抗炎等多种生物活性^[4-6],活性成分主要集中在萜类物质上^[7-8],且肾损伤较小^[9]。盐泽泻是泽泻的炮制品种,一同收载于2020年版《中国药典》,临床使用广泛,按中医“盐制入肾”理论盐泽泻对肾脏疾病的效果应强于泽泻,但药理实验显示,不同产地的泽泻

和盐泽泻对大鼠的利尿效果不一样,可能促进也可能抑制^[10-11],伍小燕等^[12]关于泽泻水提物对正常大鼠利尿活性的研究中提出泽泻的利尿作用可能与降低大鼠肾脏髓质水通道蛋白-2(AQP-2)mRNA的表达有关。但对泽泻及其炮制品的利尿机制缺乏更深入的研究,还需进一步明确。

为了探讨泽泻及其炮制品治疗肾阴虚水肿症的药效作用和可能的作用机制,笔者通过肾阴虚水肿大鼠模型,采用尾静脉注射阿霉素和灌胃甲状腺素的复合造模方法,测定三碘甲状腺原氨酸(T₃)、甲状腺素(T₄)、环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)、尿素(UREA)、肌酐(CREA)等指标评价大鼠肾阴虚和肾脏损伤程度。同时,笔者测定了下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴、水钠离子通道的浓度水平,以期探讨泽泻及其炮制品改善肾阴虚水肿模型大鼠可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SD雄性大鼠42只,体质量180~220 g, SPF级,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号SCXK(京)2021-0011。普通饮食、饮水,室温20~25℃,相对湿度50%~60%,自然昼夜节律光照。本实验获得中国中医科学院中药所实验动物伦理委员会批准,严格执行伦理委员会要求,伦理审查编号2022B012。

1.2 药物与试剂 泽泻(批号2105090)、盐泽泻(批号2105145)饮片均购自四川新荷花中药饮片股份有限公司,由中国中医科学院中药研究所何希荣鉴定,符合2020年版《中国药典》规定。盐酸阿霉素(上海麦克林生化科技有限公司,批号c12475180,纯度98%);六味地黄丸水蜜丸(北京同仁堂,批号19031346);甲状腺片(山东仁和制药有限公司,批号014190403);cAMP、cGMP酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(美国Cayman公司,货号分别为0631976、0634993);促性腺激素释放激素(GnRH)ELISA试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号E-EL-0071c);EASYspin Plus组织/细胞RNA提取试剂盒、TRUE script RT Master Mix、2× Sybr Green实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Mix(北京爱博森生物科技有限公司,货号分别为RA2802、PR5802、PR3302);T₃、T₄、促卵泡生成素(FSH)、睾酮(T)试剂盒(北京北方生物技术研究所有限公司,货号分别为A10PZB、A02PZB、B03PZB、B10B);UREA、CREA、胆固醇(CHOL)、甘油三酯(TG)测定试剂盒(北京北检新创源生物技术

有限公司,货号分别为B2017、B2018、B2002、B2001);伊红、苏木素染液(珠海贝索生物科技有限公司,批号分别为BA4022、G1004);兔AQP-1、AQP-2抗体(美国Affinity公司,货号分别为AF5231、DF7560);辣根过氧化物酶(HRP)标记免疫球蛋白G(IgG)(北京义翘神州科技有限公司,货号SSA004)。

1.3 仪器 BT125D型1/10万电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],XH6080型放免仪(西安核仪器厂),120型全自动生化分析仪(日本东芝公司),1510-02284型酶标仪(美国赛默飞公司),LightCycler480型Real-time PCR系统(瑞士Roche公司)。

2 方法

2.1 药物制备 取适量泽泻、盐泽泻饮片粉碎,过5号筛(80目),收集药粉备用。

2.2 动物分组与造模 SD雄性大鼠42只适应性饲养3 d,期间正常饮食和进水。3 d后将大鼠按体质量随机分为正常组、模型组、阳性药组(六味地黄丸组)、生泽泻低、高剂量组、盐泽泻低、高剂量组,共7组,每组6只。参考文献[13-14]造模方法,除正常组外其余组大鼠每天上午灌胃甲状腺素75 mg·kg⁻¹(配制为15 g·L⁻¹),连续14 d;同时于第1、8天尾静脉注射阿霉素(2 mg·kg⁻¹);正常组灌胃等体积蒸馏水,连续14 d,于第1、8天尾静脉注射等体积生理盐水。造模14 d时检测尿液中白蛋白与肌酐比值(ACR)与正常组比较,差异具有显著统计学意义即造模成功^[13],期间各组大鼠正常进食和饮水。

2.3 给药方法 实验中泽泻、盐泽泻均以生药粉给药,称取适量泽泻、盐泽泻生药粉加入定量饮用水搅拌均匀即可。2020版《中国药典》记载泽泻使用的生药量最大为10 g,按人和大鼠间等效剂量的折算系数^[15]进行换算,泽泻低、高剂量比为1:4,得到泽泻的低、高剂量分别为1、4 g·kg⁻¹,盐泽泻同理;六味地黄丸参考文献[16-17]确定为1.4 g·kg⁻¹,正常组灌胃等体积饮用水,每天1次,从造模第1天开始连续给药28 d,灌胃体积均为10 mL·kg⁻¹。

2.4 样品采集与检测

2.4.1 一般指标 实验末次给药时记录大鼠体质量,给药结束后排光余尿立即将各组大鼠置于代谢笼中,一只一笼,24 h后排尽膀胱余尿取出,记录各笼大鼠的饮水量、尿量,期间记录大鼠进食量,留取各笼大鼠尿液适量用于后续尿液中尿肌酐、尿白蛋白水平的测量。

2.4.2 生化指标检测 采用腹腔注射1%戊巴比妥

钠麻醉大鼠后进行腹主动脉取血,分别置于促凝管和抗凝管中,静置1 h后于4 °C、3 500 r·min⁻¹离心15 min(离心半径8 cm),得到血清和血浆。采用放射免疫法检测血清中T3、T4、FSH、T的含量;全自动生化分析仪测定血清中CREA、UREA、CHOL、TG的含量;采用ELISA测定血清中GnRH,血浆中cAMP、cGMP的含量。

2.4.3 肾脏组织观察 采血结束剪取大鼠左右肾脏,生理盐水漂洗后右肾置于10%中性甲醛中固定,采用苏木素-伊红(HE)染色法观察肾脏病理变化,免疫组化法检测肾脏AQP-1、AQP-2表达量。左肾分装后液氮速冻于-80 °C保存,用于后续Real-time PCR测定肾脏AQP-1、AQP-2 mRNA的表达。

2.4.4 Real-time PCR检测 取适量肾脏组织液氮研磨成细粉,按照EASY spin Plus RNA提取试剂盒进行抽提得到RNA,测定浓度后用无酶水将样本RNA调整至同一浓度,再用TRUE script RT Master Mix反转录得到cDNA,在Real-time PCR仪上检测AQP-1、AQP-2 mRNA水平,扩增条件为94 °C预变性30 s;94 °C变性5 s,55 °C退火15 s,72 °C延伸10 s,45个循环。以 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参基因,用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算目的mRNA的表达量。实验所用引物由北京擎科生物科技有限公司合成,引物序列见表1。

表2 泽泻及其炮制品对肾阴虚水肿模型大鼠一般指标的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Alismatis Rhizome(AR) and salt-processed Alismatis Rhizome(SAR) on general indexes of rats with edema of kidney Yin deficiency(EKYD)($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	体质量/g	进食量/g	饮水量/mL	尿量/mL
正常组		412.75±13.21	29.56±1.86	16.83±4.07	32.00±5.87
模型组		334.23±16.77 ²⁾	19.55±2.19	29.17±7.81 ¹⁾	12.83±3.60 ²⁾
六味地黄丸组	1.4	371.85±10.21 ⁴⁾	26.71±2.35	17.83±4.02 ³⁾	28.33±6.83 ⁴⁾
泽泻低剂量组	1	379.43±17.11 ⁴⁾	25.70±1.84	12.33±5.61 ⁴⁾	19.67±3.44
泽泻高剂量组	4	336.37±12.13	21.93±1.66	17.00±4.47 ³⁾	23.33±4.37
盐泽泻低剂量组	1	372.32±17.86 ⁴⁾	26.03±0.04	12.33±8.19 ⁴⁾	19.83±4.71
盐泽泻高剂量组	4	332.02±16.42	21.80±0.78	13.50±6.98 ⁴⁾	23.00±7.56

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3-表7同)

3.2 对大鼠尿液中ACR值的影响 与正常组比较,模型组大鼠14、28 d的ACR值均显著升高(P<0.01),表明造模14 d后模型复制成功;与模型组比较,给药28 d后各给药组ACR值均显著降低(P<0.01)。见表3。

3.3 对大鼠肾脏组织的影响 正常组大鼠肾脏组织结构正常,肾小管排列整齐,上皮细胞未见变性,组

表1 引物序列

Table 1 Sequence primers

引物	序列(5'-3')	长度/bp
AQP-2	上游GCCACCTCCTTGGGATCTAT	175
	下游CTCTGGTCGAGGGGAACAG	
AQP-1	上游TCAGATCAGCATCCTCCGGG	139
	下游CACACCGTGAGCCAGGTCAT	
β -actin	上游GTACTCTGTGTGGATCGGTGG	141
	下游GCAGCTCAGTAACAGTCCG	

2.5 统计学分析 实验数据采用Origin 2021软件进行统计分析,数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组数据比较时,采用单因素方差分析,先进行正态性和方差齐性检验,检测同时满足正态性和方差齐性,用Tukey检验;检测不同时满足正态性和方差齐性,用Kruskal-Wallis检验,P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠一般指标的影响 与正常组比较,模型组大鼠体质量、尿量显著降低(P<0.01),饮水量明显增加(P<0.05),进食量减少,但差异无统计学意义;与模型组比较,泽泻低剂量组、盐泽泻低剂量组大鼠体质量显著增加(P<0.01),泽泻低、高剂量组和盐泽泻低、高剂量组饮水量明显减少(P<0.05, P<0.01),大鼠进食量和尿量都有所增加,但差异无统计学意义。见表2。

织未见明显炎症细胞浸润;模型组大鼠肾脏组织结构异常,大量肾小管结构紊乱,上皮细胞变性,可见大量炎症细胞浸润及纤维组织增生;与模型组比较,各给药组大鼠肾脏组织肾小管结构紊乱程度减轻,上皮细胞变性数量和炎症细胞数量均减少,损伤程度有所改善。其中泽泻高剂量组和盐泽泻低剂量组肾脏组织有少量炎症细胞浸润,炎症程度明显改善

表3 泽泻及其炮制品对肾阴虚水肿模型大鼠14、28 d尿液ACR值的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of AR and SAR on ACR in urine for 14 and 28 days of rats with EKVD ($\bar{x}\pm s, n=6$)

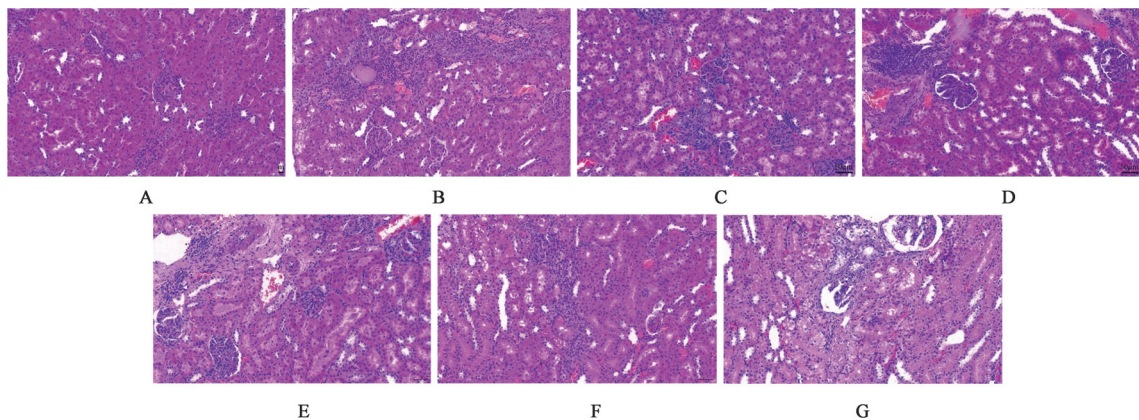
组别	剂量/g·kg ⁻¹	14 d	28 d
正常组		108.99±48.26	83.45±26.73
模型组		236.52±24.16 ²⁾	182.40±45.27 ²⁾
六味地黄丸组	1.4	124.20±44.48 ⁴⁾	99.26±42.24 ⁴⁾
泽泻低剂量组	1	153.12±46.94 ³⁾	88.46±20.52 ⁴⁾
泽泻高剂量组	4	117.85±43.99 ⁴⁾	91.99±15.79 ⁴⁾
盐泽泻低剂量组	1	127.23±64.38 ⁴⁾	87.07±36.59 ⁴⁾
盐泽泻高剂量组	4	141.98±37.83 ³⁾	85.32±29.42 ⁴⁾

($P<0.05$)。见图1。

3.4 对大鼠T₃、T₄、cAMP、cAMP/cGMP的影响
与正常组比较,模型组T₃、T₄、cAMP、cAMP/

cGMP均明显升高($P<0.05, P<0.01$),表明模型组大鼠处于肾阴虚状态;与模型组比较,泽泻低剂量组、盐泽泻低剂量组T₃含量明显降低($P<0.05$),泽泻低、高剂量组和盐泽泻低、高剂量组T₄含量明显降低($P<0.05, P<0.01$),泽泻高剂量组和盐泽泻低、高剂量组cAMP含量明显降低($P<0.05$),且各给药组cAMP/cGMP均显著减小($P<0.01$)。见表4。

3.5 对大鼠血清中UREA、CREA、CHOL及TG的影响
与正常组比较,模型组大鼠血清中UREA、CREA显著升高($P<0.01$);与模型组比较,泽泻和盐泽泻低、高剂量组均能显著降低UREA、CREA的水平($P<0.01$)。与正常组比较,模型组大鼠CHOL、TG含量均明显升高($P<0.05$);与模型组比较,泽泻低、高剂量组和盐泽泻低、高剂量组CHOL含量明显降低($P<0.05, P<0.01$),TG含量显著降低($P<0.01$)。见表5。



注:A.正常组;B.模型组;C.六味地黄丸组;D.泽泻低剂量组;E.泽泻高剂量组;F.盐泽泻低剂量组;G.盐泽泻高剂量组

图1 泽泻及其炮制品对肾阴虚水肿模型大鼠肾脏组织的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of AR and SAR on renal tissue of rats with EKVD (HE,×200)

表4 泽泻及其炮制品对肾阴虚水肿模型大鼠T₃、T₄、cAMP、cAMP/cGMP的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of AR and SAR on T₃, T₄, cAMP and cAMP/cGMP in rats with EKVD ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	T ₃ /g·mL ⁻¹	T ₄ /μg·L ⁻¹	cAMP/nmol·L ⁻¹	cAMP/cGMP
正常组		0.38±0.13	61.99±16.25	116.79±24.14	8.38±2.39
模型组		0.68±0.13 ²⁾	90.42±6.68 ²⁾	180.06±54.65 ¹⁾	33.15±4.28 ²⁾
六味地黄丸组	1.4	0.50±0.04	67.77±14.41 ³⁾	117.82±33.24	15.12±5.93 ⁴⁾
泽泻低剂量组	1	0.44±0.09 ³⁾	67.82±12.85 ³⁾	124.26±34.05	7.83±2.51 ⁴⁾
泽泻高剂量组	4	0.48±0.05	59.75±8.04 ⁴⁾	113.66±16.01 ³⁾	7.11±2.86 ⁴⁾
盐泽泻低剂量组	1	0.42±0.05 ³⁾	56.73±6.30 ⁴⁾	110.14±45.30 ³⁾	12.88±5.78 ⁴⁾
盐泽泻高剂量组	4	0.53±0.05	63.27±5.81 ⁴⁾	113.38±20.45 ³⁾	10.75±3.60 ⁴⁾

3.6 对大鼠HPG轴及AQP-1、AQP-2表达的影响
与正常组比较,模型组大鼠血清中GnRH、T水平显著降低($P<0.01$),FSH水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠GnRH含量均显著升高

($P<0.01$),FSH含量显著降低($P<0.01$),泽泻高剂量组和盐泽泻低、高剂量组T的水平明显上升($P<0.05$)。与正常组比较,模型组大鼠肾脏AQP-1、AQP-2的表达量显著增多($P<0.01$);与模型组比较,

表5 泽泻及其炮制品对肾阴虚水肿模型大鼠血清中UREA、CREA、CHOL及TG的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of AR and SAR on UREA, CREA, CHOL and TG of rats with EKVD ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	UREA/mmol·L ⁻¹	CREA/μmol·L ⁻¹	CHOL/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹
正常组		4.38±0.34	20.83±0.75	1.07±0.19	0.49±0.05
模型组		5.48±0.53 ¹⁾	24.33±1.03 ²⁾	1.62±0.45 ¹⁾	0.64±0.10 ¹⁾
六味地黄丸组	1.4	3.87±0.57 ⁴⁾	19.33±1.97 ⁴⁾	1.07±0.36 ³⁾	0.47±0.08 ⁴⁾
泽泻低剂量组	1	4.42±0.35 ⁴⁾	19.67±1.51 ⁴⁾	0.85±0.18 ⁴⁾	0.40±0.09 ⁴⁾
泽泻高剂量组	4	4.13±0.52 ⁴⁾	18.00±1.90 ⁴⁾	0.82±0.17 ⁴⁾	0.39±0.09 ⁴⁾
盐泽泻低剂量组	1	4.32±0.41 ⁴⁾	18.33±1.21 ⁴⁾	0.95±0.24 ⁴⁾	0.39±0.05 ⁴⁾
盐泽泻高剂量组	4	4.20±0.40 ⁴⁾	18.67±2.25 ⁴⁾	1.02±0.27 ³⁾	0.46±0.07 ⁴⁾

泽泻低、高剂量组和盐泽泻低、高剂量组 AQP-1 表达量明显减少 ($P<0.05, P<0.01$), AQP-2 表达量明显降低, 差异具有统计学意义 ($P<0.05, P<0.01$)。见表6和图2、图3。

表6 泽泻及其炮制品对肾阴虚水肿模型大鼠HPG轴、AQP-1、AQP-2表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of AR and SAR on HPG axis, AQP-1 and AQP-2 in rats with EKVD ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GnRH/ng·L ⁻¹	FSH/U·L ⁻¹	T/μg·L ⁻¹	AQP-1	AQP-2
正常组		174.48±27.40	1.08±0.14	3.68±1.26	0.118±0.006	0.117±0.009
模型组		97.12±22.37 ²⁾	3.05±0.30 ²⁾	1.11±0.41 ²⁾	0.153±0.008 ²⁾	0.155±0.010 ²⁾
六味地黄丸组	1.4	179.19±23.53 ⁴⁾	1.82±0.36 ⁴⁾	4.01±1.33 ⁴⁾	0.116±0.012 ⁴⁾	0.132±0.015 ³⁾
泽泻低剂量组	1	209.42±42.71 ⁴⁾	1.93±0.18 ⁴⁾	2.47±0.52	0.120±0.007 ⁴⁾	0.110±0.014 ⁴⁾
泽泻高剂量组	4	162.54±19.37 ⁴⁾	1.74±0.19 ⁴⁾	2.99±0.77 ³⁾	0.126±0.013 ⁴⁾	0.123±0.004 ⁴⁾
盐泽泻低剂量组	1	213.40±32.28 ⁴⁾	1.78±0.35 ⁴⁾	3.02±1.00 ³⁾	0.133±0.015 ³⁾	0.134±0.014 ³⁾
盐泽泻高剂量组	4	179.81±32.59 ⁴⁾	2.09±0.18 ⁴⁾	3.09±0.87 ³⁾	0.122±0.010 ⁴⁾	0.113±0.007 ⁴⁾

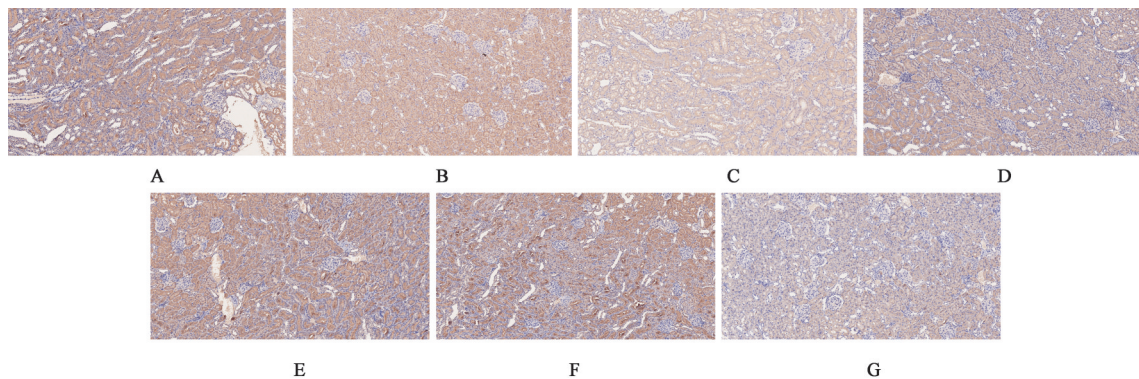


图2 泽泻及其炮制品对肾阴虚水肿模型大鼠肾脏组织AQP-1表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 2 Effect of AR and SAR on AQP-1 expression in renal tissue of rats with EKVD (IHC, ×200)

3.7 对大鼠肾脏AQP-1、AQP-2 mRNA表达水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾脏AQP-1、AQP-2 mRNA表达显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,泽泻高剂量组和盐泽泻低、高剂量组AQP-1 mRNA表达显著降低 ($P<0.01$),各组AQP-2 mRNA表达水平均显著下调,差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。见表7。

4 讨论

阿霉素的肾脏毒性易造成大鼠肾性水肿,能较

好模拟人类肾脏疾病^[13]。肾阴虚按造模方式可分为病因模型、病理模型、复合模型和病证结合模型,目前多采用前两种方法进行造模^[18-19]。病因模型采用长期激怒法或温燥药进行造模,但重复性较差;而病理模型以甲亢型肾阴虚为主,通过灌胃过量甲状腺素使大鼠甲亢,提高基础代谢,症状体征与中医肾阴虚证基本相符。较于病因模型,病理模型方法稳定、数据可靠、重复性好,在中医药新药药理研究中应用广泛,获得了较高认可。最后选择尾静脉

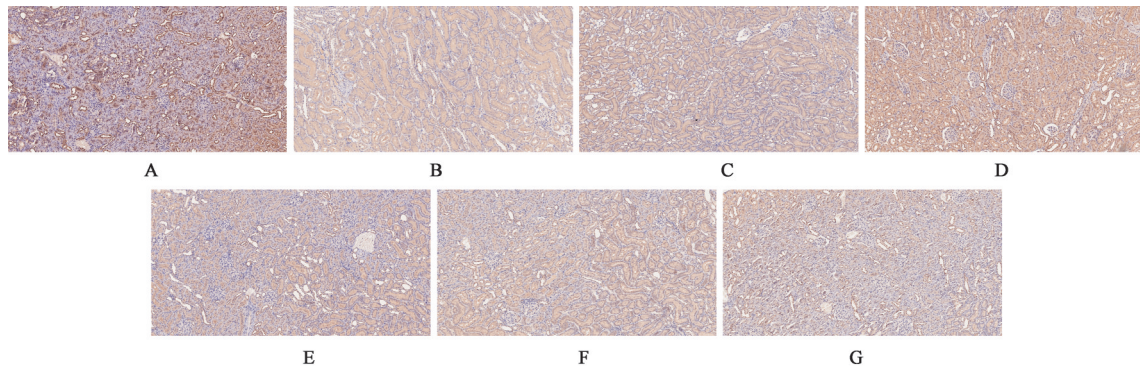


图3 泽泻及其炮制品对肾阴虚水肿模型大鼠肾脏组织AQP-2表达的影响(免疫组化,×200)

Fig. 3 Effect of AR and SAR on AQP-2 expression in renal tissue of rats with EKDY (IHC, ×200)

表7 泽泻及其炮制品对肾阴虚水肿模型大鼠肾脏AQP-1、AQP-2 mRNA表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 7 Effect of AR and SAR on transcription levels of AQP-1 and AQP-2 mRNA in rats with EKDY ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AQP-1	AQP-2
正常组		1.00±0.40	1.13±0.20
模型组		3.33±0.74 ²⁾	1.63±0.33 ²⁾
六味地黄丸组	1.4	2.21±0.16 ³⁾	1.32±0.47 ⁴⁾
泽泻低剂量组	1	2.88±0.66	0.64±0.20 ⁴⁾
泽泻高剂量组	4	1.77±0.93 ⁴⁾	0.52±0.13 ⁴⁾
盐泽泻低剂量组	1	1.28±0.36 ⁴⁾	0.25±0.09 ⁴⁾
盐泽泻高剂量组	4	0.97±0.07 ⁴⁾	0.36±0.12 ⁴⁾

注射阿霉素加灌胃甲状腺素的复合造模方法复制肾阴虚水肿模型,该方法也是近年研究肾阴虚水肿症的首选模型^[16-17,20-21]。以模型组ACR与正常组有显著性差异作为造模成功标准,与测定大鼠24 h尿蛋白比较,ACR可消除尿蛋白排泄率的时间差异和尿液浓度引起的误差,相对恒定,可更准确反映尿蛋白排泄情况^[22-23]。

T₃、T₄是甲状腺细胞分泌的一组维持机体代谢、促进生长发育的重要激素^[24];cAMP、cGMP是一对相互拮抗而又相互制约的物质,对细胞功能处于稳定状态具有双向控制调节作用^[25],研究认为T₃、T₄、cAMP、cAMP/cGMP升高说明机体处于阴虚状态。实验结果显示,模型组大鼠上述4个指标较正常组均显著升高,表明大鼠处于阴虚状态,给药后有所下调,说明泽泻及其炮制品对甲状腺素诱导的T₃、T₄、cAMP、cGMP紊乱有纠正作用,效果较好。CREA作为人体内代谢产生的废物,主要由肾小球滤过后排出体外。UREA是人体蛋白质代谢的主要终末产物,肾实质损害时,肾小球滤过率降低,导致血中尿素氮浓度升高^[26];血中肌酐和尿素可反映肾小球滤过功能。与模型组比较,可明显观察到给药

组UREA、CREA和ACR降低,表明泽泻及其炮制品可维持肾小球滤过膜的完整性,一定程度上改善阿霉素诱发的肾损伤。

下丘脑-垂体-靶腺轴是神经-内分泌-免疫网络的重要组成部分,对维持体内外周循环血中激素水平的平衡极为重要^[27]。HPG轴通过下丘脑分泌GnRH,使垂体释放FSH,调节性腺激素(T)的分泌,同时性激素对垂体及下丘脑进行负反馈调节。GnRH、FSH和T的测定结果显示在肾阴虚水肿模型大鼠中上述3种激素均出现不同程度紊乱,具体表现为GnRH和T水平降低,FSH水平升高;给药后明显回调,表明泽泻及其炮制品可改善3种激素的水平,纠正HPG轴紊乱。激素作为人体内调控机体稳态的重要因子,担任着不可或缺的角色,猜想泽泻及其炮制品改善肾阴虚水肿模型大鼠可能是通过纠正HPG轴紊乱实现的。

肾脏对排泄机体的代谢废物及调节水电解质平衡、维持内环境稳态有重要意义;肾阴虚水肿状态下,肾脏功能受损,机体常常发生水液代谢紊乱,而水通道蛋白在肾脏水液代谢中发挥着重要作用。AQP-1缺失会导致近曲小管渗透性及重吸收能力降低,AQP-2是肾脏集合管柱状上皮细胞内最重要的水通道蛋白,在肾小管浓缩、重吸收功能中起关键作用^[28]。通过下调AQP-1、AQP-2表达可减少水的转运与重吸收,减轻水肿。肾脏AQP-1、AQP-2表达和mRNA表达水平结果显示,与模型组比较,各给药组均显著降低了mRNA的表达,使蛋白表达量减少,减弱了肾小管的重吸收,该结果与给药组大鼠尿量增加的结果相互验证,猜想泽泻及其炮制品减轻水肿,调节水液代谢的机制可能与抑制肾脏AQP-1、AQP-2蛋白表达有关。对比泽泻和盐泽泻对AQP-1、AQP-2 mRNA抑制的影响,发现盐泽泻的抑制作用强于泽泻,猜测与泽泻盐制后增强了滋

阴利水的作用有关,但炮制前后的成分种类及含量变化还有待进一步研究。

综上所述,该研究证明了泽泻及其炮制品对肾阴虚水肿症有一定改善作用,其作用机制可能与纠正HPG轴紊乱,抑制AQP-1、AQP-2表达有关,但缺少该蛋白通路的进一步研究,后续拟通过蛋白质组学分析相关差异蛋白,同时对泽泻炮制前后的成分种类和含量变化进行研究,明确泽泻炮制后增效的物质基础,为泽泻后续研究和应用奠定基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 李霄. 基于肾阳(阴)虚水肿模型的五种利水消肿中药及其性味拆分组分的归经研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2018.

[2] 夏祖生,任雪迪,毛永炎. 实脾饮合五苓散加减治疗肾性水肿的疗效及安全性观察[J]. 湖北中医杂志,2022,44(6):39-41.

[3] 谌贻璞,陈洪宇,刘宝利,等. 肾性水肿的中西医结合诊断与治疗[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2020,21(9):843-846.

[4] 顾云龙,李兆健. 泽泻功用的本草考证及现代研究进展[J]. 中医药导报,2021,27(11):137-141.

[5] 吴珍. 23-乙酰泽泻醇B对肥胖模型小鼠糖脂代谢紊乱及肠道菌群的研究[D]. 广州:广东药科大学,2021.

[6] XU X M, LI L S, ZHANG Y M, et al. Zhang Hypolipidemic effects of Alismatis Rhizoma decoction on the lipid profile in hyperlipidemia rats by RNA-sequencing [J]. J Chin Pharm Sci, 2021, 30 (5) : 409-420.

[7] 黄小强,李宣宣,吴水生,等. 泽泻三萜对小鼠急性肺损伤的保护作用[J]. 中成药,2022,44(9):2979-2984.

[8] 严林,李新健,张冰冰,等. 泽泻汤的研究现状[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(16):191-197.

[9] LEE M J, JUNG H K, LEE K H, et al. A 90-day repeated oral dose toxicity study of Alismatis Rhizoma aqueous extract in rats[J]. Toxicol Res, 2019, 35(2) : 191-200.

[10] 严桂杰,蓝梦柳,丘建芳,等. 泽泻炮制前后化学成分及其利尿作用研究[J]. 中国中医药信息杂志,2020,27(4):59-65.

[11] 曾春晖,杨柯,刘海燕,等. 不同产地泽泻盐炙前后成分差异及利尿作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(2):148-152.

[12] 伍小燕,陈朝,张国伟. 泽泻水提物对正常大鼠利尿活性及肾脏髓质AQP2作用研究[J]. 实用临床医药

杂志,2010,14(21):5-7.

[13] 唐桂毅,温和,王晶晶,等. 阿霉素肾病大鼠模型的评价研究[J]. 药物评价研究,2020,43(1):66-71.

[14] 李爱平,张王宁,秦雪梅. 阿霉素肾病大鼠模型的优化[J]. 中草药,2018,49(1):151-159.

[15] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002.

[16] 李琳,蒋亚超,蒋佳岑,等. 基于“利水消肿”功效考察麻黄水煎液对肾性水肿病症结合模型的影响[J]. 中药药理与临床,2019,35(4):130-133.

[17] 牛艳,吴广操,郭月婷,等. 桑白皮水煎总提物及拆分组分对肾阴虚水肿模型大鼠的影响[J]. 中华中医药学刊,2019,37(1):145-150.

[18] 潘向军,楼百层,朱延涛. 肾阴虚模型制备方法及肾阴虚证研究进展[J]. 新中医,2019,51(3):23-27.

[19] 刘运华,赵宗江. 肾阴虚证动物模型造模方法及相关指标[C]//中国中西医结合学会实验医学专业委员会. 第十四次中国中西医结合实验医学学术研讨会论文汇编. 北京:中国中西医结合学会,2017:336-341.

[20] 周宁,郑晓珂,王秋红,等. 葶苈子对肾阴虚水肿模型干预作用的代谢组学研究[J]. 中药材,2017,40(9):2166-2171.

[21] 张子怡,陈宝军,张英杰,等. 肾阳虚、肾阴虚证大鼠模型的建立与稳定性观察[J]. 福建中医药,2015,46(1):51-54.

[22] 李培雄,石咏军. 慢性肾脏病患者晨尿白蛋白/肌酐比值与尿蛋白定量、定性的相关性分析[J]. 医学理论与实践,2022,35(12):1997-2001.

[23] 张水检,周琰,邵文琦,等. 半定量干化学法检测尿白蛋白/肌酐比值的临床应用价值[J]. 检验医学,2022,37(5):463-465.

[24] 李阳,高明松,祝炼,等. 夏枯草颗粒联合泼尼松治疗亚急性甲状腺炎疗效及对血清T3、T4及TSH水平的影响[J]. 中华中医药学刊,2020,38(11):225-228.

[25] 欧阳林旗,蒋司晨,陈镇,等. 乌药挥发油对寒凝气滞血瘀证大鼠血液流变学及NO-s GC-c GMP信号通路的影响[J]. 中草药,2022,53(15):4730-4737.

[26] 朱璐璐. 尿微量白蛋白与尿肌酐比值尿微量白蛋白及尿β2-微球蛋白诊断妊娠期糖尿病孕妇早期肾损伤的价值分析[J]. 中国妇幼保健,2022,37(11):1963-1965.

[27] 刘彦宏,武凤,于修芳,等. 杜仲提取物通过HPG轴对APP/PS1小鼠学习认知功能的影响[J]. 中药材,2022,doi:10.13863/j.issn1001-4454.2022.08.033.

[28] 宋纯东,宋丹,贾评评,等. 真武汤和越婢汤对阿霉素肾病大鼠AQP1/AQP2的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2020,26(3):334-337.

[责任编辑 孙丛丛]