

粗齿兔耳风提取物利尿活性及其机制

魏娟, 曾金祥*, 毕莹, 王晓云, 罗光明

(江西中医药大学中药资源与民族药研究中心, 南昌 330004)

[摘要] **目的:**研究粗齿兔耳风提取物对大鼠的利尿作用并探讨其机制。**方法:**将大鼠随机分为5组, 每组6只, 兔耳风提取物高、中、低剂量(2.5, 10, 20 g·kg⁻¹)和呋塞米(10 mg·kg⁻¹)灌胃给药。第1次给药后, 收集大鼠1, 2, 4, 6, 24 h的尿液, 研究并比较各给药组对大鼠排尿量和尿中Na⁺, K⁺, Cl⁻排泄量的影响。连续给药8 d, 取其肾脏研究各给药组对肾髓质水通道蛋白(AQP)₁, AQP₂, AQP₃的mRNA表达影响。**结果:**与正常组比较, 单次给药后粗齿兔耳风提取物在4 h后能明显增加大鼠的尿液量, 24 h尿液中Na⁺, K⁺, Cl⁻的浓度明显增加。每天给药1次, 给药8 d后与正常组比较, 粗齿兔耳风提取物给药组能显著下调大鼠肾髓质水通道蛋白AQP₂的mRNA表达, 对AQP₃的mRNA表达也有一定的下调作用, 对AQP₁的mRNA表达调节作用则无显著性差异。**结论:**粗齿兔耳风提取物具有利尿作用, 促进Na⁺, K⁺, Cl⁻的排泄和抑制水通道蛋白AQP₂, AQP₃ mRNA表达是其可能机制。

[关键词] 粗齿兔耳风; 利尿活性; 水通道蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0166-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014070166

Diuretic Activity and Mechanism of *Ainsliaea grossedentata*

WEI Juan, ZENG Jin-xiang*, BI Ying, WANG Xiao-yun, LUO Guang-ming

(The Chinese Medicine Resource and National Medicine Research Center of Jiangxi Province, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of the present study was to evaluate the diuretic effect and explore its mechanism of *Ainsliaea grossedentata* in water-loaded rats. **Method:** The rats were divided and given extractive of *A. grossedentata* at three different dose (2.5, 10, 20 g·kg⁻¹), and given furosemide (10 mg·kg⁻¹) as positive control group. After the first administration, the urine of rats was collected at 1, 2, 4, 6, 24 h to study the effect of urine output and electrolyte concentration (Na⁺, K⁺ and Cl⁻) and regulation of the relative mRNA expression of aquaporin-1 (AQP₁), aquaporin-2 (AQP₂) and aquaporin-3 (AQP₃) in water-loaded rats. **Result:** Compared with normal group, after single dose of the extract of *A. grossedentata*, urine output was significantly increased, which began at 4 h after the treatment. The extract increased urinary levels of Na⁺, K⁺, and Cl⁻ at 24 h markedly. After administration of 8 days, the extract significantly reduced expression of AQP₂ and lower expression of AQP₃ to some extent, but there was no significant difference in the expression of AQP₁. **Conclusion:** *A. grossedentata* has conspicuous diuretic activity, the possible mechanisms may restrain the relative mRNA expression of AQP₁ and AQP₂ as well as renal tubular reabsorption function.

[Key words] *Ainsliaea grossedentata*, diuretic activity, aquaporins

兔耳风属植物药用种类较多, 具有多种药效, 但现代研究较多的为杏香兔耳风, 其他种类的药用植

[收稿日期] 20130730(012)

[基金项目] 江西省教育厅基金项目(GJJ11544)

[第一作者] 魏娟, 硕士研究生, 从事中药种质资源与品质评价研究, E-mail: 247314073@qq.com

[通讯作者] *曾金祥, 副教授, 博士, 从事中药资源及中药生物传感研究, E-mail: zjinxiang@163.com

物研究较少。粗齿兔耳风(*Ainsliaea grossedentata* Franch.)是兔耳风属植物的一种,收载于《中华本草》^[1],又名光棍草、灯台草、观音草,具有风热感冒、热淋、小便不利之功效,在民间长期、广泛应用于清热利尿。

粗齿兔耳风广泛分布于湖南、湖北、四川、重庆、贵州、江西等地,在我国具有较为丰富的资源。粗齿兔耳风虽然长期作为利尿中药材使用,但国内外至今仍缺少其利尿方面的实验性研究,致使其利尿功效及机制仍不明确。另一方面,利尿药物由于在高血压、心力衰竭和水肿的治疗中占重要地位^[2-4],而西药利尿剂在应用中极易出现电解质紊乱,特别是易出现高血钠或低血钾从而导致严重后果^[5],而天然利尿中草药因其疗效温和且不良反应较少,已成为现代利尿药物的研究热点^[6]。基于此,本文采用大鼠经典水负荷模型,针对粗齿兔耳风提取物利尿的功效进行现代药理学验证,并对其机制进行探讨。

1 材料

1.1 仪器 大鼠代谢笼(广州市赛柏诺生物科技有限公司),WFX-120A 原子吸收分光光度计(美国 Beckman-coulter 公司),高速冷冻离心机(美国 Beckman Allegra 公司),BS224S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),RE-52-05 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),超低温冰箱(美国 Thermo 公司),DYY-5 稳压稳流电泳仪(北京市六一仪器厂),MJ-PTC200 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),SIM 凝胶成像系统(美国 SIM 公司)。

1.2 药物与试剂 粗齿兔耳风由江西中医药大学曹岚老师采自四川,经张寿文教授鉴定为 *Ainsliaea grossedentata* Franch.。呋塞米片(上海朝晖药业有限公司,国药准字 H31021074),TRNzol-A⁺ 总 RNA 提取试剂(批号 OSR-M610, Tiangen 公司),M-MLV 反转录酶(批号 M1701,购自 Promega 公司),水通道蛋白(AQP)₁,AQP₂,AQP₃,内参还原磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成,水为超纯水,其余试剂为分析纯。

1.3 动物 SD 大鼠,雄性,体重(190 ± 10)g,SPF 级,合格证号 SCXK(湘)2011-0003,湖南斯莱克景达实验动物有限公司,标准鼠笼饲养,光照周期 12/12 h,相对湿度 50% ~ 60%,环境温度 21 ~ 23 ℃。

2 方法

2.1 药物制备 称取粗齿兔耳风干药材 480 g,用 95% 乙醇浸泡过夜,分别用 4 倍量 95%,80%,65% 乙醇回流提取 1 次,每次提取时间 2 h,提取液过滤

后回收溶剂至干,提取物用 0.9% NaCl 溶液混悬,分别制成生药含量 800,400,100 g·L⁻¹ 的给药溶液。阳性对照药呋塞米,用 0.9% NaCl 溶液配成 0.4 g·L⁻¹ 的给药溶液。

2.2 动物的筛选 取实验用大鼠数只,ig 给予生理盐水 25 mL·kg⁻¹,代谢笼收集 2 h 尿液,尿量达灌入水量 40% 以上者可用于以下实验^[7]。

2.3 利尿实验 取预选试验中排尿功能合格的大鼠 30 只,随机分为 5 组,每组 6 只,分别为正常组(给药 0.9% NaCl 溶液)、阳性药物组(给药 0.4 g·L⁻¹ 的呋塞米,以下简称阳性组)、兔耳风提取物高剂量组(兔高组,生药含量 800 g·L⁻¹)、兔耳风提取物中剂量组(兔中组,生药含量 400 g·L⁻¹)和兔耳风提取物低剂量组(兔低组,生药含量 100 g·L⁻¹)。将大鼠置于标准鼠笼适应 2 d,代谢笼中适应 3 d,实验前禁食(不禁水)18 h,以减少粪便的干扰^[8]。各组大鼠按 25 mL·kg⁻¹ 体重,用生理盐水灌胃,造成水负荷模型,实验开始时先轻压动物下腹,排尽余尿。给含受试药物的 0.9% NaCl 溶液 25 mL·kg⁻¹,造成水钠潴留状态,分别收集大鼠 1,2,4,6,24 h 的尿液,测定尿液体积并将其冻存于 -20 ℃ 冰箱中。连续给药 8 d,第 8 天给药 1 h 后处死大鼠,取肾,分离肾浆膜后立即置于 -80 ℃ 冰箱保存。

2.4 尿中钾、钠、氯离子浓度的测定 分别取各组大鼠的尿液,采用原子吸收分光光度计测定钠离子和钾离子的浓度,采用银量法测定尿液中氯离子浓度。

2.5 RT-PCR 法测定肾髓质水通道蛋白 mRNA 表达 取出冻存于 -80 ℃ 冰箱中的大鼠肾脏样品,切取 30 ~ 50 mg,按照试剂盒说明书提取其中的总 RNA,取总 RNA 1 μL,加 DEPC 水稀释后,在 260,280 nm 下测定吸光度(A),以 A₂₆₀/A₂₈₀ 确定其纯度。利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳方法鉴定,在紫外灯下观察总 RNA 完整性。

取 8 μL 总 RNA,按照 Promaga 反转录酶使用说明书上操作步骤进行反转录,合成 cDNA。引物序列和 PCR 扩增反应按照文献[9]中所述进行,并略有修改。引物序列: AQP1 (5'-ATTGCAGCGTCATGTCTGAG-3', 3'-GAACTAGGGG CATCCAAAC-5'); AQP2 (5'-TTGCAGGAACCAGAC ACTTG-3', 3'-GCGGAGACGAGCACTTTTAC-5'); AQP3 (5'-ACTCCAGTGTGGAGGTGGAC-3', 3'-GCCCCTAGTTGAGGATCA-5'); GAPDH (5'-GAGAAGATTTGGACCACC-3', 3'-CATCACAA TGCCAGTGGTAC-5')。PCR 反应体系总体积为 25 μL。APQ₁, APQ₂, APQ₃ 引物和内参

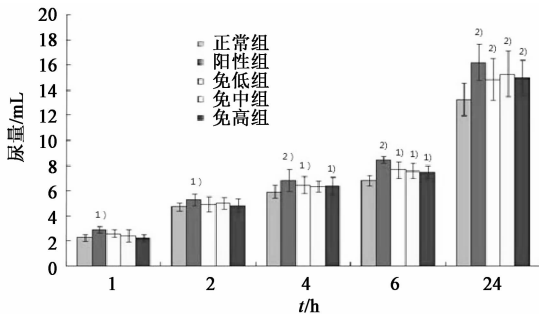
GAPDH 引物扩增条件为 95 ℃ 预变性 2 min, 94 ℃ 变性 30 s, 58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 25 s, 共 36 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。

PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳、溴化乙啶染色后, 在凝胶成像分析仪上分析。计算待测基因与 GAPDH 的比值, 从而得到待测基因的相对表达值。

2.6 统计分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均数比较用单因素方差分析, 所有统计学处理均由 SPSS 19.0 软件统计完成, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 SD 大鼠排尿量的影响 粗齿兔耳风提取物对 SD 大鼠的排尿量的影响见图 1。由图可知, 在 1~2 h 内粗齿兔耳风提取物高、中、低剂量组与正常组大鼠尿量无明显差异, 阳性药物组大鼠与正常组比较具有明显利尿效果 ($P < 0.05$)。兔耳风各剂量组在 4~6 h 后可产生显著的利尿效应, 24 h 内兔耳风提取物各剂量组大鼠产生的尿量与正常组相比有极显著性差异 ($P < 0.01$)。



阳性组: 呋塞米 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); 兔耳风 2.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; 兔耳风 10 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; 兔耳风 20 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 1, 图 4 同)

图 1 各组大鼠 24 h 内尿量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 对大鼠 24 h 尿液中 $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Cl}^-$ 浓度的影响

各组大鼠 24 h 尿液中的离子浓度见表 1。由表 1 可以看出, 阳性药物组大鼠尿液中的 Na^+, Cl^- 浓度与正常组相比有极显著性差异 ($P < 0.01$), 但对 K^+ 的影响并不显著。粗齿兔耳风各剂量组大鼠尿液中的 $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Cl}^-$ 浓度与正常组相比较均有极显著差异 ($P < 0.01$)。兔耳风组大鼠尿液中 Na^+, Cl^- 浓度较兔耳风组、兔耳风组高, 兔耳风组大鼠尿液中 K^+ 浓度与兔耳风组、兔耳风组相比相对最高。在粗齿兔耳风提取物中, 各剂量组大鼠尿液中离子浓度以 Cl^- 最高。由以上结果表明, 粗齿兔耳风的利尿活性可能与促进 $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Cl}^-$ 的排泄有关。

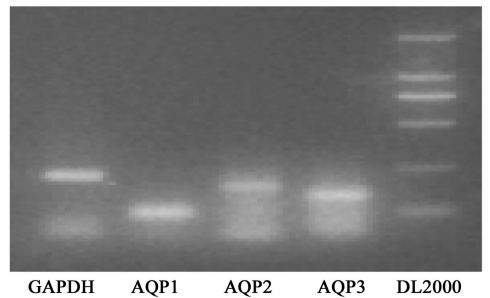
3.3 各引物扩增产物大小 本实验采用 RT-PCR 检测肾髓质水通道蛋白 mRNA 的表达 (见图 2),

表 1 粗齿兔耳风提取物对大鼠尿液 Na^+, K^+ 和 Cl^- 浓度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	Na^+	K^+	Cl^-
正常	0	88.98 ± 5.19	83.14 ± 13.75	125.38 ± 29.76
阳性	0.01	$108.08 \pm 4.42^{1)}$	93.79 ± 6.71	$160.74 \pm 7.54^{1)}$
兔低	2.5	$123.75 \pm 2.91^{1)}$	$113.25 \pm 4.96^{1)}$	$181.35 \pm 3.26^{1)}$
兔中	10	$117.3 \pm 3.73^{1)}$	$151.83 \pm 5.69^{1)}$	$171.05 \pm 4.06^{1)}$
兔高	20	$136.75 \pm 3.58^{1)}$	$138.02 \pm 3.17^{1)}$	$217.42 \pm 5.21^{1)}$

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

GAPDH 为内参, DL2000 为 DNA 相对分子质量标记。由图可知, 本实验成功地扩增了水通道蛋白各基因, 因而能对水通道蛋白 $\text{AQP}_1, \text{AQP}_2, \text{AQP}_3$ 的调节作用进行研究。



GAPDH. 299 bp; AQP1. 100 bp; AQP2. 174 bp; AQP3. 147 bp

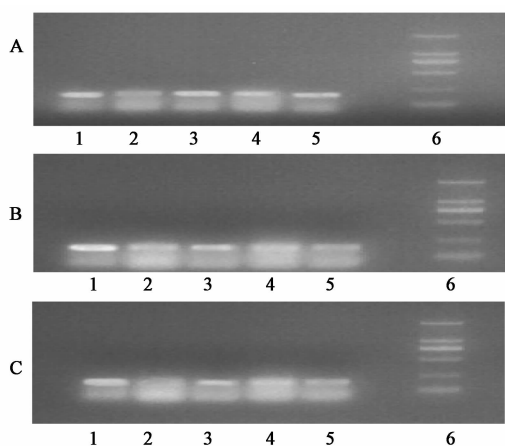
图 2 水通道蛋白 RT-PCR 产物电泳图

3.4 各给药组对大鼠肾髓质水通道蛋白的表达影响

图 3 为大鼠给药后 $\text{AQP}_1, \text{AQP}_2, \text{AQP}_3$ 蛋白基因 RT-PCR 产物典型电泳图。各给药组 SD 大鼠肾脏水通道蛋白 $\text{AQP}_1, \text{AQP}_2, \text{AQP}_3$ mRNA 的表达结果分析见图 4。由图可知, 兔耳风提取物对 $\text{AQP}_1, \text{AQP}_2, \text{AQP}_3$ 有不同的影响。与生理盐水组比较, 兔耳风低剂量组对 AQP_2 mRNA 的表达有极显著的下调作用 ($P < 0.01$), 对显著下调 AQP_3 mRNA 的表达 ($P < 0.05$), 但对 AQP_1 的表达无明显影响; 兔耳风组、兔耳风组对水通道蛋白表达的影响与兔耳风组基本一致。综上所述, 兔耳风提取物能显著下调 SD 大鼠肾脏水通道蛋白 AQP_2 mRNA 相对表达含量 ($P < 0.05$), 且对 SD 大鼠肾脏水通道蛋白 AQP_3 mRNA 的表达也有一定的下调作用, 但对 AQP_1 mRNA 的表达无明显的调节作用。

4 讨论

粗齿兔耳风长期作为利尿中草药在民间广泛使用, 但其利尿功效与机制缺少现代药理学验证, 因而限制了其药用资源的现代化开发应用。本实验的研究结果表明, 粗齿兔耳风具有明显的利尿作用。其较



1. 正常组;2. 呋塞米 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;3. 兔耳风 $2.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;
4. 兔耳风 $10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;5. 兔耳风 $20 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组(图4同);6. DL2000
图3 典型 AQP₁(A),AQP₂(B),AQP₃(C) RT-PCR 产物电泳

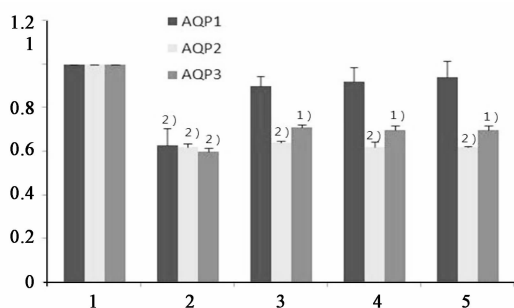


图4 粗齿兔耳风提取物对大鼠肾脏髓质水通道蛋白 mRNA 相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

短时间内利尿作用虽不如呋塞米迅速,但在较长的时间内却同样具有较好的利尿效果。

现代药理学研究表明,利尿作用往往与体内钠、钾、氯离子的排泄及水通道蛋白的调节作用密切相关。本实验结果表明,粗齿兔耳风提取物能明显促进SD大鼠钠、钾、氯的离子排泄,但呋塞米对钾离子的排泄与生理盐水组相比不具明显的差异。这说明粗齿兔耳风提取物利尿机制与呋塞米在一定程度上有所相似性,但不完全相同,而与泽泻提取物利尿效果类似^[10]。

肾水通道蛋白分布在肾近曲小管、细段和集合管,主要介导自由水跨生物膜转运,其中 AQP₁, AQP₂, AQP₃ 参与水的重吸收和尿液浓缩^[11]。研究结果表明粗齿兔耳风提取物可以通过调节水通道蛋白

AQP₂ 与 AQP₃ 的 mRNA 表达参与水的重吸收和尿液浓缩进而产生利尿作用,但其利尿机制远较呋塞米复杂,二者既有相似性,又有显著差异。这可能是由于兔耳风提取物的本身含有多种化学成分,能够作用于体内多种靶点,因而是多种化学成分共同作用的结果。

本实验首次研究了粗齿兔耳风的利尿功效与机制,粗齿兔耳风具有利尿作用,其利尿作用均匀而持久,其利尿机制较为复杂,研究结果为粗齿兔耳风的进一步开发与利尿药用提供了理论和实验基础,但其利尿具体机制尚还有待进一步研究确证。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:643.
- [2] 及焕亭. 中药利尿剂治疗高血压病的临床研究[J]. 河北中医药学报,2012,27(1):33.
- [3] 卢安庭. 利尿剂在心衰治疗中的应用[J]. 中外女性健康(下半月),2013(2):26.
- [4] 郑晓红,郭阳. 利尿剂在水肿治疗中的合理应用[J]. 辽宁医学杂志,2011,25(2):83.
- [5] 苏文亭,张健. 利尿剂在慢性心力衰竭治疗中的应用[J]. 中华心血管病杂志,2011,39(8):782.
- [6] 王光志. 川产兔耳风质量标准初步研究[J]. 中药与临床,2010,1(4):21.
- [7] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2011:433.
- [8] 武蕾蕾,才玉婷,常乐,等. 锦灯笼醇提取物对大鼠的利尿作用研究[J]. 牡丹江医学院学报,2012,33(2):5.
- [9] Xing Wang, Cai-Ping Wang, Qing-Hua Hua, et al. The dual actions of Sanmiao wan as a hypouricemic agent: Down-regulation of hepatic XOD and renal mURAT1 in hyperuricemic mice[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 128:107.
- [10] 伍小燕,陈朝,张国伟. 泽泻水提取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.
- [11] 常笑雪,黄鹂. 水通道蛋白在肾脏的表达及意义[J]. 河南科技大学学报:医学版,2004,22(3):236.

[责任编辑 聂淑琴]