

基于尿液生成排泄探讨缩泉丸配伍机制

邱琼华¹, 吴君², 赖焕玲¹, 黄萍^{1*}, 操红缨¹, 吴清和¹

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 山东中医药高等专科学校, 山东烟台 264100)

[摘要] 目的:探讨缩泉丸配伍的机制,确定各味药物在方中的作用。方法:对缩泉丸进行全拆方研究,正常对照组、模型对照组、缩泉丸组(3.9 g·kg⁻¹·d⁻¹)、益智组、乌药组、山药组(均为 1.3 g·kg⁻¹·d⁻¹)、益智+乌药组、益智+山药组、乌药+山药组(均为 2.6 g·kg⁻¹·d⁻¹)。除正常对照组外各组用 D-半乳糖诱导亚急性衰老模型,造模给药后各组用尿动力仪检测膀胱功能,用 ELISA 法测定与尿液生成相关的水通道蛋白(AQP2),血清中神经内分泌激素醛固酮(ALD)、抗利尿激素(ADH)的含量。结果:与正常组比较,模型组 AQP2,ADH,ALD 含量显著降低(P<0.01),尿动力检测中膀胱漏尿点压(BLPP)、腹压漏尿点压(ALPP)、最大膀胱排尿压(MVP)显著升高(P<0.01),顺应性(BC)显著下降(P<0.01)。缩泉丸全方对所测指标都有显著影响(与模型组比较 P<0.01),且与各拆方组比较作用最强。单味药比较益智作用最强,乌药对尿液生成方面作用显著,与益智配伍后增效;山药能显著改善衰老膀胱功能,与乌药配伍后药效显著增强,对所测指标均有显著作用(与模型组比较 P<0.01~0.05)。结论:本研究结果与缩泉丸益智仁为君,乌药为臣,山药为佐的传统配伍诠释相符。

[关键词] 缩泉丸; 配伍机制; 尿液生成; 膀胱功能

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0207-04

[doi] 10.11653/syfyj2013100207

Study on Compatibility of Suoquan Pill based on Excretion of Urine

QIU Qiong-hua¹, WU Jun², LAI Huan-ling¹, HUANG Ping^{1*}, CAO Hong-ying¹, WU Qing-he¹

(1. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;
2. Shandong College of Traditional Chinese Medicine, Yantai 264100, China)

[收稿日期] 20121231(013)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2010B030700025)

[第一作者] 邱琼华, 硕士研究生, 从事缩泉丸药效物质基础研究, Tel:13430310433, E-mail: qionghua_qiu@126.com

[通讯作者] * 黄萍, 教授, 博士生导师, 从事新药与保健品开发, E-mail: hping331@126.com

物的感染症状不明显,这些都十分有利于试验的开展。

[参考文献]

[1] 赵保胜,董淑云,霍海如,等. 2型糖尿病动物模型的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(5):62.

[2] 顾迁,高鑫,徐平,等. GK大鼠生物学特性观察[J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(12):688.

[3] 李海英,唐爱存,梁丽英,等. 葫芦茶不同提取物对链脲佐菌素致糖尿病小鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20):251.

[4] 邓棋卫,徐步海,陈文,等. 白羽连玉合剂对糖尿病小鼠的治疗作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20):278.

[5] 郭建茹,李焕彬,梁楚燕,等. 3个活血化瘀复方治疗2型糖尿病大鼠的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20):220.

[6] 石永兵,钱桐荪. 强力宁对被动型 Heymann 肾炎的疗效研究[J]. 南通医学院学报, 1994, 14(4):434.

[7] 师长宏,张海,赵勇,等. sGLP-1对GK大鼠治疗效果的研究[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(10):31.

[8] 孙焕,陈广,陆付耳. 介绍几种诱发性糖尿病动物模型[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(2):65.

[9] 李桂云,吴正治. STZ建立2型糖尿病大鼠模型的剂量探讨[J]. 深圳中西医结合杂志, 2007, 17(2):74.

[10] 张雯,庄秀园,逢秀凤. 几种实验性2型糖尿病动物模型制备方法的比较[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(23):4576.

[责任编辑 聂淑琴]

[Abstract] Objective: To study the compatibility of the Suoquan pill based on excretion of urine. **Method:** The combinations including *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*, *Linderae Radix*, *Dioscoreae Rhizoma*, *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* + *Linderae Radix*, *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* + *Dioscoreae Rhizoma*, *Linderae Radix* + *Dioscoreae Rhizoma*, *Linderae Radix* + *Dioscoreae Rhizoma* and Suoquan pill. Treated respectively with the combination of herbs and *D*-gal, seted up normal group at the same time. To assess the bladder function by urodynamics and measure the aquaporin 2 (AQP2), aldosterone (ALD), antidiuretic hormone (ADH) associated with the urine formation by ELISA technology. **Result:** Compared with the normal group, model group AQP2, ADH, ALD content significantly reduced ($P < 0.01$), Bladder Leak Point Pressures (BLPP), abdomen leak point pressure (ALPP), maximum voiding pressure (MVP) significantly reduced ($P < 0.01$), also, and the bladder compliance (BC) elevated ($P < 0.01$). Among separated recipes groups, Suoquan pill was better than other groups. *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* has strongest efficacy of single herb; *Linderae Radix* was significant effects in the urine formation, combination of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* has better efficacy. *Dioscoreae Rhizoma* plays an important part in ameliorating the senescent bladder function, combination of *Linderae Radix* has better efficacy in all we check. **Conclusion:** The result is conformed to the theory of traditional Chinese medicine.

[Key words] Suoquan pill; compatibility; Urine formation; bladder function

缩泉丸出自《校注妇人良方》，收录于 2010 年版《中国药典》，由益智仁、乌药、山药 3 味药按 1:1:1 组成，具有温肾祛寒，缩尿止遗的功效。主治膀胱虚寒，小便频数，或遗尿。由于临床上老年人多见多尿、尿频、遗尿、尿失禁等水液代谢异常症状，在前期研究的基础上^[1-2]，本实验拟用 *D*-半乳糖诱导的亚急性衰老大鼠为动物模型，对缩泉丸进行全拆方研究，探讨缩泉丸配伍的机制，阐明方中各味药物的作用。

1 材料

1.1 药物 益智仁 (*Alpinia oxyphylla* Miq, 批号 110801), 乌药 (*Lindera aggregata* Kosterm, 批号 110901), 山药 (*Dioscorea opposita* Thunb, 批号 110901), 由广东和翔制药有限公司提供, 经广州中医药大学中药鉴定教研室张丹雁教授鉴定为正品。

1.2 拆方及药物制备 将缩泉丸处方全方拆方为 7 个组: 益智仁、乌药、山药、益智仁 + 乌药、益智 + 山药、乌药 + 山药、缩泉丸全方 (益智 + 乌药 + 山药)。益智仁、乌药、山药分别用打粉机粉碎, 过 200 目筛。各组药物按设计剂量用蒸馏水配制为混悬液以大鼠给药量 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 计算浓度。

1.3 动物 SD 大鼠 200 ~ 220 g, 雌性, 165 只, 广州中医药大学实验动物中心提供。许可证号 SCXK (粤) 2008-0020。

1.4 仪器 JA1203N 型电子天平 (上海精密仪器有限公司), T-2100C 酶标仪, RT-2100C 酶标仪 (深圳雷杜生命科学股份有限公司), Laborie UDS-94 型尿

动力学检查仪 (加拿大 Laborie 公司), HVE-50 型高温灭菌柜 (HIRAYAMA Manufacturing Corporation), WZ-50C6 型微量注射泵 (浙江史密斯医学仪器有限公司)。

1.5 试剂 *D*-半乳糖 (Sigma 公司, 批号 BCBF8673V), 乌来糖 (国药集团化学试剂有限公司, 批号 T20090312), 硫酸庆大霉素注射液 (天津药业焦作有限公司, 批号 110620260), 水通道蛋白 2 (AQP2) 试剂盒 (批号 BV-E12072703), 醛固酮 (ALD) 试剂盒 (批号 BV-E12072701), 抗利尿激素 (ADH) 试剂盒 (批号 BV-E12072702), 均由武汉俊泰生物技术有限公司提供。

2 方法

2.1 动物筛选及分组 取雌性大鼠 165 只, 适应代谢笼 1 d, 于次日禁食不禁水 18 h 后, 灌胃给予生理盐水 $30 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 30 min 后, 再次给予 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 收集第 2 次水负荷后 2 h 的尿量, 淘汰排泄率低于 25% 和高于 50% 的动物 (排泄率 = 尿量/给水量)^[1]。取筛选合格的大鼠, 随机分为 9 组, 即正常对照组、模型对照组、缩泉丸组 ($3.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、益智仁组、乌药组、山药组 (均为 $1.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 益智仁 + 乌药组、益智仁 + 山药组、乌药 + 山药组 (均为 $2.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。

2.2 造模及给药 给药组及模型组动物皮下注射 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ *D*-半乳糖生理盐水溶液, 正常对照组皮下注射等体积生理盐水, 造模时间持续 8 周。造模 2 周后开始灌胃给药, 正常对照组、模型对照组给

予同体积蒸馏水,连续给药 8 周。

2.3 指标测定^[3-6]

2.3.1 尿液中 AQP2 含量的测定 用代谢笼收集各组末次给药后 24 h 尿液,以 $2\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 低温离心 5 min,取上清液用 ELISA 试剂盒测定 AQP2 含量。

2.3.2 血清中 ALD,ADH 含量的测定 各组大鼠眼眶静脉丛采血,以 $2\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min 取血清用 ELISA 试剂盒分别测定 ALD,ADH 含量。

2.3.3 膀胱功能的尿动力检测

2.3.3.1 检测前处理 大鼠以 25% 乌拉坦麻醉,固定。将 3F 导尿管插入膀胱,作为膀胱测压管和灌注管;将带球囊 3F 导尿管导入大鼠直肠,作为腹压测定管。测压管连接尿动力仪上压力传感器,灌注管连接微量注射泵。压力测定前排空大鼠膀胱。

2.3.3.2 充盈期膀胱内压及漏尿点压测定 开启微量注射泵,记录尿液自主溢出时的膀胱压,即为膀胱漏尿点压 (bladder leak point pressures, BLPP),此时停止灌注,观察压力曲线,其峰值即为最大膀胱排尿压 (maximum voiding pressure, MVP)。计算顺应性 (bladder compliance, $BC = \Delta V/\Delta P$)。排空膀胱,当灌注量达到膀胱最大容量 1/2 时,按压大鼠腹部

以模拟 Valsalva 动作,记录尿液溢出时的膀胱压即为腹压漏尿点压 (abdomen leak point pressure, ALPP)。以上操作均重复 2~3 次,取其平均值纳入统计。

2.4 统计方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异的显著性检验运用 SPSS 17.0 软件的非参数检验和单因素方差分析法。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对尿中 AQP2 含量以及血清中 ADH,ALD 含量的影响 与正常对照组比较模型组动物尿中 AQP2 和血中 ADH,ALD 均显著降低 ($P < 0.01$)。与模型对照组比较,单味药中益智仁能提高模型大鼠体内 AQP2,ALD 含量 ($P < 0.05$);乌药能提高 AQP2,ADH 含量 ($P < 0.01 \sim P < 0.05$);山药对 3 项指标均无显著影响。见表 1。

配伍药对中,益智仁 + 乌药组、益智仁 + 山药组能显著提高亚急性衰老大鼠体内 AQP2,ADH,ALD 含量 ($P < 0.01 \sim P < 0.05$);益智仁 + 山药组能显著提高 AQP2,ALD 含量 ($P < 0.01$),对 ADH 无显著影响。缩泉丸全方组能显著提高亚急性衰老大鼠体内 AQP2,ADH,ALD 含量 ($P < 0.01$),见表 1。

表 1 缩泉丸拆方对模型大鼠尿中 AQP2 含量以及血清中 ADH,ALD 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	给药剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	AQP2/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	ADH/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	ALD/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$
正常对照	-	$2.42 \pm 0.47^{1)}$	$42.27 \pm 5.83^{1)}$	$190.77 \pm 23.53^{1)}$
模型对照	-	1.12 ± 0.31	30.18 ± 2.82	135.61 ± 23.64
缩泉丸	3.9	$2.09 \pm 0.48^{1)}$	$38.75 \pm 6.03^{1)}$	$186.13 \pm 30.15^{1)}$
益智仁	1.3	$1.54 \pm 0.36^{2)}$	31.81 ± 4.55	$184.41 \pm 38.82^{2)}$
乌药	1.3	$1.76 \pm 0.50^{2)}$	$38.52 \pm 5.05^{1)}$	157.64 ± 35.57
山药	1.3	1.27 ± 0.44	34.24 ± 5.76	159.40 ± 31.85
益智仁 + 乌药	2.6	$1.69 \pm 0.38^{1)}$	$38.88 \pm 4.64^{1)}$	$182.01 \pm 33.89^{2)}$
益智仁 + 山药	2.6	$1.92 \pm 0.43^{1)}$	31.51 ± 4.12	$189.15 \pm 30.51^{1)}$
乌药 + 山药	2.6	$1.46 \pm 0.32^{2)}$	$39.41 \pm 2.27^{1)}$	$172.32 \pm 33.61^{2)}$

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 对亚急性衰老大鼠膀胱功能的影响 与正常对照组比较,模型组大鼠 BLPP,ALPP,MVP 显著降低 ($P < 0.01$),BC 显著升高 ($P < 0.01$)。与模型对照组比较,单味药中益智仁、山药能显著升高亚急性衰老大鼠 BLPP,ALPP,MVP ($P < 0.01$);乌药能显著升高亚急性衰老大鼠 BLPP,MVP ($P < 0.01$)。见表 2。与模型对照组比较,配伍药对中益智仁 + 乌药只升高模型大鼠 ALPP ($P < 0.01$);益智仁 + 山药能升高大鼠 BLPP,ALPP,MVP ($P < 0.01$);乌药 + 山药、

缩泉丸全方组对亚急性衰老大鼠膀胱功能的各项指标均有显著改善作用 ($P < 0.01 \sim P < 0.05$)。见表 2。

4 讨论

本研究选择与尿液生成关系密切的水通道蛋白 AQP2 和神经内分泌激素 ALD,ADH 为观测指标,同时采用尿动力检测膀胱功能以观察各拆方组对机体尿液储尿和排泄的影响。水通道蛋白 AQP2 介导自由水跨生物膜转运,肾髓质上 AQP2 通过开放或闭

表 2 缩泉丸拆方对亚急性衰老大鼠 BLPP,ALPP,BC,MVP 的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	给药剂量/g·kg ⁻¹	BLPP/cm H ₂ O	ALPP/cm H ₂ O	BC/mL·cm ⁻¹ H ₂ O	MVP/cm H ₂ O
正常对照	-	24.02 ± 4.86 ¹⁾	50.62 ± 6.30 ¹⁾	0.45 ± 0.18 ¹⁾	28.45 ± 6.09 ¹⁾
模型对照	-	13.51 ± 4.07	37.30 ± 6.33	0.96 ± 0.29	20.64 ± 5.96
缩泉丸	3.9	24.00 ± 3.98 ¹⁾	44.18 ± 6.30 ²⁾	0.58 ± 0.24 ¹⁾	26.90 ± 3.87 ¹⁾
益智仁	1.3	21.98 ± 4.80 ¹⁾	48.16 ± 5.85 ¹⁾	0.92 ± 0.31	29.67 ± 4.26 ¹⁾
乌药	1.3	19.86 ± 4.13 ¹⁾	41.11 ± 6.76	0.74 ± 0.32	28.02 ± 4.02 ²⁾
山药	1.3	20.43 ± 3.48 ¹⁾	48.57 ± 7.95 ¹⁾	0.81 ± 0.31	28.85 ± 5.37 ²⁾
益智仁 + 乌药	2.6	15.92 ± 3.87	46.72 ± 4.40 ²⁾	0.88 ± 0.33	19.20 ± 5.38
益智仁 + 山药	2.6	22.28 ± 2.52 ¹⁾	50.57 ± 6.42 ¹⁾	1.08 ± 0.38	25.88 ± 4.03 ²⁾
乌药 + 山药	2.6	23.15 ± 5.44 ¹⁾	48.32 ± 6.66 ¹⁾	0.61 ± 0.25 ²⁾	29.85 ± 5.78 ¹⁾

合影响远曲小管和集合管对水的重吸收,从而调节尿量^[7-8]。ALD,ADH 对尿量的调节、浓缩和稀释同样具有重要的作用^[9]。尿动力检测中 BLPP,ALPP,BC 反映了膀胱储尿功能,MVP 反映膀胱排泄功能^[6]。模型组大鼠尿中 AQP2 和血中 ALD,ADH 显著降低,尿动力检测指标中 BLPP,ALPP,MVP 也较正常组降低,BC 升高,则模型建立成功^[1,6],推测模型大鼠可能出现多尿、尿无力,尿不尽、尿频等症状。

与尿液生成相关的指标检测中,益智仁、乌药对 AQP2,ADH,ALD 起主要作用,两药配伍,有协同增效的效果。益智仁配伍山药,其药效与单味益智仁比较无明显差异;乌药配伍山药,则能显著增强 ALD 含量,减少尿量。益智仁、乌药的作用机制可能是通过改善衰老大鼠肾脏功能,提高神经内分泌功能,对水钠的重吸收增加,使尿液浓缩,尿量减少。改善衰老膀胱功能方面,益智仁、山药起主要作用,可以明显改善模型动物的膀胱功能,且药效相近,但两药配伍后未出现明显协同增效作用。益智仁配伍乌药可以改善尿道的关闭功能;益智仁、乌药、山药单独使用均未能改善衰老膀胱顺应性增高的现象,但山药配伍乌药,能显著降低衰老膀胱顺应性,增强膀胱储尿功能。配伍药对与单味药比较药效均有所增长,但对各指标影响不一致,且配伍后药效并不是单味药药效之和,推测药物的代谢产物发生了相互作用而产生增效或拮抗的作用。

综上所述,方中益智仁对衰老机体尿液生成,储存和排泄异常的各个环节都有显著改善的作用,是为君药,其显著的抗氧化作用也可能是其药效显著的原因之一^[10]。乌药在尿液生成的环节中发挥重要调节作用,与益智仁配伍而增效,是为臣药。山药能显著改善衰老膀胱的功能,对尿液生成环节无影响,但与乌药配伍后整体药效增强,显示佐助的作用,是为佐药。这与缩泉丸“益智仁为君,乌药为臣,山药为佐”的诠释相符。缩泉丸全方对所测指标都

有很好的改善作用,较之各拆方组,疗效最佳,是各味药物综合作用的结果,充分体现了缩泉丸配伍的合理性、科学性。本实验为阐明缩泉丸各味药物作用的机制及明确方中各位药物的地位提供科学了依据,为中药复方配伍研究提供了借鉴。

[参考文献]

[1] 谭莹,黄萍,操红纓,等. D-半乳糖致亚急性衰老大鼠尿液排泄情况观察及其多尿机制探讨[J]. 中国实验动物学报,2010,4(18):296.

[2] 邢秋娟,施祀,王拥军. D-半乳糖诱导衰老动物模型的机制极其在中医药方面的应用[J]. 上海中医药大学学报,2010,24(3):93.

[3] 胡卫锋,杜广辉,蔡丹,等. 雌性大鼠尿流动力学检查指标的年龄变化[J]. 临床泌尿外科杂志,2008,23(7):546.

[4] 陈园,杜广辉,陈忠,等. 大鼠压力性尿失禁模型的尿流动力学研究[J]. 华中科技大学学报:医学版,2009,38(2):232.

[5] 金锡御,宋波. 临床尿动力学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:60.

[6] 邝兆进,操红纓,黄萍,等. 两种不同膀胱测压方法对不同年龄大鼠尿动力测定的影响[J]. 中国药理学通报,2012,28(4):581.

[7] 操红纓,吴清和,黄萍. 缩泉丸对肾阳虚多尿大鼠肾脏 AQP-2 mRNA 与 AVPR-V2 mRNA 表达的影响[J]. 中药材,2009,32(6):926.

[8] Nielsen S, Agre P. The aquaporin family of water channels in kidney[J]. Kidney Int,1995,48:1057.

[10] 李淑雯,吴清和,黄萍,等. 缩泉丸对肾虚多尿大鼠肾素-血管紧张素-醛固酮系统的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,18(1):101.

[11] 陈玉兴,黄雪君,曾晓会,等. 益智汤对正常大鼠及 D-半乳糖致衰老小鼠抗氧化能力的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(7):63.

[责任编辑 聂淑琴]