

六味地黄汤对肾阴虚大鼠水通道蛋白2的影响

单德红^{1*}, 郑晓霓², 王德山¹

(1. 辽宁中医药大学基础医学院, 辽宁 沈阳 110032; 2. 沈阳市东陵区中医院, 辽宁 沈阳 110015)

[摘要] 目的:从尿液浓缩机制方面研究六味地黄汤的滋阴作用机制。方法:36只成年雄性SD大鼠分为正常对照组、模型组和中药组。采用放免法测定血浆血管升压素(AVP)水平、免疫组化法检测肾髓质水通道蛋白2(AQP₂)表达。结果:与正常对照组相比,模型组大鼠的体重、尿量明显减少,AVP水平上升,AQP₂表达增加;中药组上述指标恢复到接近正常组或正常组水平。结论:肾阴虚时机体尿液浓缩机制亢进,六味地黄汤的滋阴作用与其抑制亢进的尿液浓缩机制有关。

[关键词] 肾阴虚;六味地黄汤;血管升压素;水通道蛋白2;尿液浓缩机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)01-0091-02

中医理论认为肾阴亏虚可导致机体水液不足,出现口干咽燥、小便短赤等症状,常治以六味地黄汤。现代医学认为,机体缺水时可通过增强尿液浓缩机制进行代偿。本研究以此为切入点,观察肾阴虚模型大鼠的尿液浓缩机制变化,探讨六味地黄汤的滋阴作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组 成年雄性SD大鼠36只(购于中国医科大学),体重(220 ± 24)g,室温20℃,自由饮水进食。所有动物适应性饲养1周后,随机分为正常对照组、肾阴虚模型组(模型组)和肾阴虚+六味地黄汤治疗组(中药组),每组12只。

1.2 肾阴虚模型复制方法 参照《中药药理研究方法学》^[1],建立糖皮质激素型肾阴虚模型。正常对照组大鼠sc无菌生理盐水外,其余各组均sc醋酸氢化可的松注射液,45 mg · kg⁻¹ · d⁻¹,连续6 d。

1.3 各组干预方法 于造模成功后进行。中药组ig六味地黄汤(购于辽宁中医药大学附属第一医院:熟地黄24g,山茱萸12g,山药12g,泽泻9g,茯苓9g,牡丹皮9g),常规水煎后取汁、浓缩(1生药g · mL⁻¹),4℃备用。剂量10 g · kg⁻¹,1次/d,持续14 d。正常对照组和模型组给予同体积蒸馏水。

1.4 体重、尿量及尿渗透压检测 用药结束后,测

各组大鼠体重后,再将其置于代谢笼中,收集24 h尿液。利用冰点渗透压计(广州市中璐仪器有限公司,Osmo 16S)检测尿液渗透压。

1.5 大鼠血浆AVP检测 大鼠ip 20%氨基甲酸乙酯(4 mL · kg⁻¹)麻醉后,按试剂盒说明书经腹主动脉取血,采用放免法检测。此项工作由沈阳202医院内分泌室完成。AVP试剂盒购于解放军总医院放免研究所(批号:20071025)。

1.6 大鼠肾髓质AQP₂表达 SABC法。按1.5方法麻醉大鼠,升主动脉150 mL生理盐水快速灌注冲去血液,取双侧肾脏髓质,4%多聚甲醛固定4 h,常规制片,厚度4 μm。取切片常规脱蜡至水,置于3% H₂O₂(室温10 min),蒸馏水洗3次;切片浸入0.01 mol · L⁻¹枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0),加热至沸腾,间隔5 min后再加热至沸腾,室温冷却后用0.1 mol · L⁻¹ PBS(pH7.3)洗涤2次;滴加抗原修复液I(室温20 min),0.1 mol · L⁻¹ PBS(pH7.3)洗涤2次;滴加正常山羊血清封闭液(室温20 min),甩去多余液体,不洗;滴加兔抗大鼠AQP₂一抗(1:400稀释)(武汉博士德,批号:BA0406),4℃过夜,0.1 mol · L⁻¹ PBS(pH7.3)洗涤2 × 5 min;滴加生物素化羊抗兔IgG(室温25 min),0.1 mol · L⁻¹ PBS(pH7.3)洗涤2 × 5 min;滴加试剂SABC(室温25 min),0.1 mol · L⁻¹ PBS(pH7.3)洗涤2 × 5 min;DAB显色,苏木素轻度复染,约30 s,自来水水洗,1%盐酸酒精稍分色后兰化片刻;常规脱水、透明、中性树胶封片。阴性对照用PBS缓冲液替代一抗。利用BI-2000医学图像分析系统分析AQP₂表达的灰度值。AQP₂表达

[收稿日期] 2009-04-20

[基金项目] 辽宁省自然科学基金项目(20062071)

[通讯作者] *单德红, Tel: (024) 31207089; E-mail: Shandehong1971@163.com

为棕黄色颗粒,位于集合管上皮细胞胞膜和胞浆处。

1.7 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 软件进行统计处理,ANOVA 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 对大鼠一般状况的影响 实验过程中,3 组大鼠分别死亡 0,3,2 只。造模后,除正常对照组,其它 2 组大鼠出现极度消瘦,毛无光泽,反应迟钝,汗出,少尿,大便干结等表现。治疗 2 周后,中药组大鼠的

精神较好,较为活泼,毛色光亮;而模型组大鼠的表现变化不明显。

2.2 对大鼠体重、尿量及尿渗透压的影响 见表 1。结果显示,与模型组比,六味地黄汤可增加大鼠体重和尿量($P < 0.05$),已接近正常对照组水平。

2.3 对大鼠血 AVP 和肾髓质 AQP₂ 表达的影响 见表 1。结果显示,与模型组比,六味地黄汤可降低大鼠血 AVP 水平和肾髓质 AQP₂ 的表达($P < 0.05$),与正常对照组相似。

表 1 各组大鼠体重、尿量、尿渗透压、血 AVP 和 AQP₂ 表达情况

组别	剂量 (g · kg ⁻¹)	n	体重 (g)	尿量 (mL)	尿渗透压 (mosm · L ⁻¹)	AVP (ng · μL ⁻¹)	AQP ₂ 灰度值
正常对照组	-	12	245.8 ± 32.1 ¹⁾	18.75 ± 3.06 ¹⁾	1.194 ± 0.164	0.43 ± 0.11 ¹⁾	180.23 ± 39.2 ¹⁾
模型组	-	9	190.2 ± 28.8	9.26 ± 2.70	1.014 ± 0.111	0.75 ± 0.25	120.45 ± 28.0
六味地黄汤	10	10	230.4 ± 35.5 ¹⁾	16.80 ± 3.84 ¹⁾	1.021 ± 0.206	0.46 ± 0.16 ¹⁾	176.41 ± 41.6 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$

3 讨论

有关肾阴虚的研究较多,但从尿液浓缩机制方面开展研究还较少。肾阴虚时出现的水液不足与现代医学中的体液缺乏较为接近。现代医学认为体液不足时,机体可以启动尿液浓缩机制进行代偿,即下丘脑的视上核和室旁核合成分泌 AVP 增加,通过血液循环作用于肾脏集合管的上皮细胞,促进 AQP₂ 合成及其在管腔膜的表达,进而增强水的重吸收,浓缩尿液,减少水的排出。本实验中检测到肾阴虚模型大鼠的尿量减少、AVP 水平升高、AQP₂ 表达增加,说明肾阴虚时,大鼠的尿液浓缩机制已经启动,从而对抗水液不足的症状。实验结果提示肾阴虚与现代医学中的尿液浓缩机制有关。

六味地黄汤由熟地黄、山茱萸、淮山药、泽泻、茯苓、牡丹皮等 6 味中药组成,是治疗肾阴虚证的代表方剂。该方的现代医学研究较多^[2-3],但围绕尿液浓缩机制方面的工作还较少。本实验观察到六味地黄汤组大鼠的体重、尿量、尿渗透压等指标与正常对

照组无明显差异,说明六味地黄汤具有滋阴作用,能够对抗肾阴虚时出现的相关体液不足症状。六味地黄汤组大鼠血中 AVP 水平和集合管 AQP₂ 表达明显低于模型组且与对照组无显著差异,表明六味地黄汤能够恢复大鼠的 AVP 正常分泌和 AQP₂ 表达,提示该方的作用环节涉及到下丘脑和肾脏,但具体作用环节还需后续工作加阐明。

[参考文献]

[1] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1993,9:1038.

[2] 叶宏军,卞慧敏,张启春,等. 六味地黄汤对阴虚血瘀证模型大鼠血液流变性的影响[J]. 中国血液流变学杂志,2008,18(1):14-16.

[3] 毕明刚,周文霞,齐春会,等. 六味地黄汤及其拆方对正常小鼠和 SAMP8 胸腺淋巴细胞分化相关基因表达的影响[J]. 中国免疫学杂志,2008,24(1):24-27.