

· 实验研究 ·

醋制对商陆促利尿作用的影响及其机制研究

程梓烨¹, 郁红礼^{1,2,3}, 吴皓^{1,2,3}, 王卫¹, 张元斌¹, 单雪莲¹, 陈云¹, 李书晖¹, 曹婧¹

(1.南京中医药大学药学院,江苏 南京 210023;2.江苏省中药炮制重点实验室,江苏 南京 210023;3.国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心,江苏 南京 210023)

摘要:目的 探索毒性中药商陆醋制前后对机体利尿作用及相关指标的影响。方法 灌胃给予盐水负荷模型大鼠商陆醋制前后的水煎液,测定给药 5 h 内尿量变化、血浆抗利尿激素(ADH)、醛固酮(ALD)、心房钠尿肽(ANP)含量及肾脏水通道蛋白 AQP2、AQP3、AQP4 表达水平。结果 商陆醋制前后均能导致大鼠尿量显著增加($P < 0.01$),醋制品较生品组大鼠尿量有显著增强($P < 0.05$);商陆生品仅高剂量可显著降低血浆 ADH 水平($P < 0.01$),同时有降低 ALD、增加 ANP 水平的趋势,但无显著性差异;商陆醋品则可显著降低血浆 ADH、ALD 水平,升高 ANP 含量($P < 0.05 \sim 0.01$);商陆生品可显著抑制肾脏中 AQP2、AQP3 和 AQP4 蛋白表达($P < 0.05 \sim 0.01$),醋制后可显著抑制 AQP2、AQP3 蛋白表达水平($P < 0.01$),对 AQP4 蛋白表达与模型组相比无显著性影响,且醋制品较生品抑制 AQP3 蛋白表达更显著($P < 0.05$)。结论 商陆经醋制后仍具有较强的利尿作用,且分子水平的效应比生品更强。商陆利尿作用的机制除与其改变机体体液代谢相关的激素水平外,还可能与其抑制肾脏远曲小管和集合管 AQP 蛋白表达,进而抑制水的重吸收有关。

关键词:商陆;醋制;利尿作用;抗利尿激素;醛固酮;心房钠尿肽;水通道蛋白

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1672-0482(2019)02-0156-04

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2019.0156

引文格式:程梓烨,郁红礼,吴皓,等.醋制对商陆促利尿作用的影响及其机制研究[J].南京中医药大学学报,2019,35(2):156-159.

Study on Diuretic Effects and Its Mechanism of *Phytolacca Radix* Before and After Vinegar Processing

CHENG Zi-ye¹, YU Hong-li^{1,2,3}, WU Hao^{1,2,3}, WANG Wei¹, ZHANG Yuan-bin¹, SHAN Xue-lian¹, CHEN Yun¹, LI Shu-hui¹, CAO Jing¹

(1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing, 210023, China; 3. Engineering Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing, 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of *phytolaccae radix* before and after vinegar processing on diuretic effects and related factors. **METHODS** Saline-loaded model rats were given different kinds of *phytolaccae radix* decoction by gavage to detect the changes of urine volume within 5 h, plasma concentrations of ADH, ALD, ANP and protein expression levels of AQP2, AQP3 and AQP4. **RESULTS** *Phytolaccae radix* before and after vinegar processing significantly increased the urine volumes of rats ($P < 0.01$) and vinegar product significantly increased urine volume compared to raw product ($P < 0.05$). Only high dose of raw product significantly reduced plasma concentration of ADH ($P < 0.01$) and caused a tendency to reduce ALD and increase ANP content, without significant difference. Vinegar product significantly reduced plasma concentrations of ADH, ALD and increased ANP content ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Raw product significantly inhibited the protein expressions of AQP2, AQP3 and AQP4 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) while vinegar product significantly inhibited the protein expressions of AQP2 and AQP3 ($P < 0.01$), whereas showed no significant influence on AQP4 protein expression, compared to control group. Moreover, vinegar product inhibited the protein expression of AQP3 more significantly than raw product ($P < 0.05$). **CONCLUSION** *Phytolaccae radix* after vinegar processing still retains diuretic effect and its efficacy is better than that of raw product at the molecular levels. The diuretic mechanism of *phytolaccae radix* maybe associated with changing hormone levels of fluid metabolism, and the inhibition of AQP 蛋白 expressions in renal distal convoluted tubules and collecting ducts,

收稿日期:2018-09-29

基金项目:国家中医药行业科研专项(201507002);江苏省高校自然科学基金(16KJB150033)

第一作者:程梓烨,女,硕士研究生,E-mail:chengzy2012@126.com

通信作者:吴皓,女,教授,博士生导师,主要从事中药炮制学与海洋药物研究与开发,E-mail:whao5795@vip.sina.com;

郁红礼,女,副教授,主要从事中药炮制学研究,E-mail:yuhongli76@126.com

which can inhibit water reabsorption.

KEY WORDS: *Phytolacca Radix*; vinegar processing; diuretic effect; ADH; ALD; ANP; aquaporins

商陆为商陆科植物商陆 *Phytolacca acinosa* Roxb.或垂序商陆 *Phytolacca americana* L.的干燥根,性寒、味苦、有毒,归肺、脾、肾、大肠经,具有逐水消肿,通利二便的功效^[1]。商陆属于峻下逐水药,泻下逐水经典方疏凿饮子就以商陆作为君药治疗水肿^[2]。现代药理研究表明其具有利尿、镇咳、祛痰、平喘等作用^[3-4]。商陆有毒,误服或使用不当可引起交感神经兴奋和胃肠道刺激等急性中毒反应^[5-6],故临床使用须经炮制。

商陆采用醋制法炮制,《中国药典》^[1]、全国及地方炮制规范^[7]均记载商陆和醋商陆。课题组前期研究发现,商陆经醋制法炮制后可显著降低其致炎及肠道毒性^[8-10],但对其醋制后利尿作用变化及机制研究未见有深入报道。

尿液的生成受肾脏自身调节和体液调节。其中尿量主要取决于肾脏远曲小管和集合管对水的重吸收量^[11],此段分布的水通道蛋白表达变化直接影响水的快速重吸收^[12-13]。水通道蛋白主要分布亚型为AQP2、AQP3和AQP4^[14-16]。此外,机体多种体液因素参与尿生成的调节,其中抗利尿激素(ADH)、醛固酮(ALD)和心房钠尿肽(ANP)最为重要。ADH和ALD均能促进远曲小管和集合管对水的重吸收,导致尿液浓缩,尿量减少;而ANP则能促进肾脏排水,增加尿量^[11]。

本文通过建立大鼠盐负荷模型,考察商陆醋制前后对大鼠尿液生成相关的激素水平及肾脏AQPs表达水平影响,为商陆醋制减毒存效作用机制研究、饮片生产、质量控制及临床应用提供依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂

Milli-Q超纯水机(美国Millipore公司),KQ-500DE型医用数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司),Enspire多功能酶标仪(美国PerkinElmer公司),电泳装置(美国Bio-rad公司),转膜装置(美国Bio-rad公司),凝胶成像系统(美国Proteinsimple公司)。

SDS-PAGE用标准蛋白marker 10~180 kDa(美国Thermo公司);Western blot化学发光HRP底物(美国Millipore公司);牛血清白蛋白、Anti- β -actin mab(Mouse)、Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)HRP、Goat Anti-Mouse IgG(H+L)HRP、RIPA组

织细胞高效裂解液、PMSF(100 mmol/L)、大鼠ADH ELISA试剂盒、大鼠ALD ELISA试剂盒、大鼠ANP ELISA试剂盒(翼飞雪生物科技有限公司,批号:YB0006-100、YFMA0052、YFSA02、YFSA01、YWB001、YP0100、YFXER00873、YFXER00683、YFXER00847);AQP2、AQP4 Antibody(absin公司,批号:abs137041、abs131248);AQP3 Antibody(EnoGene公司,批号:E1A5222);BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型)(碧云天生物技术研究所,批号:P0010);镇江香醋(江苏恒顺醋业股份有限公司);氢氯噻嗪片(山西云鹏制药有限公司,批号:G170503,规格:25 mg/片);氯化钠注射液(辰欣药业股份有限公司)。

1.2 药材

生商陆饮片购自安徽万生中药饮片有限公司,产地:河南,批号:20180114。药材经江苏省食品药品检验所胡皓彬主任药师鉴定为商陆科植物商陆 *Phytolacca acinosa* Roxb.的干燥根。

1.3 动物

SD大鼠,雄性,体质量180~200 g,SPF级,由上海杰思捷实验动物有限公司提供,动物许可证号:SCXK(沪)2013-0006。

2 方法

2.1 药液的制备

取生商陆饮片适量,照《中国药典》2015版一部方法醋炙法炮制^[1],得醋商陆饮片。《中国药典》2015版规定,商陆每日服用量为3~9 g^[1],换算大鼠每日等效剂量为0.32~0.96 g/kg,因此取0.96 g/kg为高剂量,0.48 g/kg为低剂量。

分别称取生、醋商陆饮片100 g,各加8倍量水浸润30 min后煎煮30 min,过滤,滤渣加6倍量水煎煮30 min,过滤,合并滤液,浓缩至100 mL,得1 g/mL水煎液为原液。取生、醋商陆原液适量,加水稀释至0.038 g/mL作为高剂量组,加水稀释至0.019 g/mL作为低剂量组。取1片氢氯噻嗪于研钵中研细,加适量水溶解于烧杯内,置超声器中超声混匀,得0.4 mg/mL药液作为阳性对照药。所有药液均置于4℃冰箱备用。

2.2 盐水负荷模型造模与给药

SD大鼠适应性饲养3 d,实验前禁食不禁水18 h,灌胃前轻压大鼠下腹部使其膀胱排尽余尿,每

100 g 大鼠体质量灌胃给予 2.5 mL 生理盐水,置于代谢笼,每笼 1 只,选取 2 h 内排尿量达灌胃量 40% 以上的大鼠作为正式利尿实验对象^[17]。

取通过筛选的合格大鼠 60 只,按体质量随机分为模型组,氢氯噻嗪组、商陆生品高、低剂量组,醋制商陆高、低剂量组,共 6 组,每组 10 只。实验前禁食不禁水 18 h,实验当天轻压大鼠下腹,排尽余尿,每 100 g 大鼠体质量灌胃给予 2.5 mL 生理盐水,30 min 后各组按每 100 g 体质量灌胃给药 2.5 mL,模型组给予同等体积水。

2.3 指标检测

各组大鼠灌胃给药后立即置于代谢笼中,每笼 1 只,每隔 1 h 收集代谢笼中尿液,连续收集 5 h,测量每小时及 5 h 总尿量。5 h 后各组大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血,3 000 r/min 离心 20 min 取血浆,按 ELISA 试剂盒说明书操作,测定各组大鼠血浆中 ADH、ALD 和 ANP 的含量;解剖取肾脏于冻存管中,置于 -80 °C 冰箱保存。

2.4 Western blot 法测定商陆醋制前后对肾脏组织 AQP_s 蛋白表达的影响

2.4.1 组织总蛋白提取 取大鼠肾脏组织剪成细小碎片,取适量 RIPA 裂解液加入 PMSF,使 PMSF 终浓度为 1 mmol/L,每 20 mg 组织加入 250 μL 裂解液,于玻璃匀浆器内充分研磨,10 000 × g 离心 5 min,取上清得总蛋白。采用 BCA 法测定样品总蛋白,取适量样品加入 5 × Loading buffer 至其终浓度为 1 ×,于沸水中煮沸 10 min,样品于 -20 °C 冰箱保存备用。

2.4.2 Western blot 分析 配制 12% 分离胶和 5% 浓缩胶,marker 上样 5 μL,样品上样 50 μg。电泳电压 100 V,至溴酚蓝跑至底部时停止,100 V 湿法转膜 1 h,5% 牛血清白蛋白的 TBST 室温封闭 2 h,与对应的 β-actin(稀释浓度 1 : 750)、AQP2、AQP3 和 AQP4 抗体(稀释浓度 1 : 1 000)4 °C 孵育过夜, TBST 清洗 5 次,每次 10 min,再与对应的加入辣根过氧化物酶标记的二抗(稀释浓度 1 : 2 500)结合,室温孵育 2 h, TBST 清洗 5 次,每次 10 min 后加入曝光液进行凝胶成像,结果用灰度值表示。

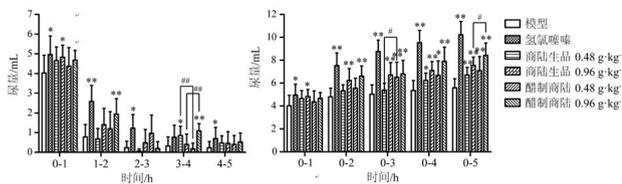
2.5 统计学方法

采用统计软件 SPSS16.0 进行数据处理,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 商陆醋制前后对盐水负荷模型大鼠尿量的影响

与模型组比较,商陆醋制前后在给药 5 h 内均能显著增加大鼠总尿量($P < 0.01$),商陆生品高剂量组在给药 0~1 h 内显著增加尿量($P < 0.05$),醋制商陆高剂量组在给药 1~2 h 内显著增加尿量($P < 0.01$);与对应剂量的商陆生品组比较,醋制商陆低剂量组在给药 3 h 内以及高剂量组在给药 5 h 内显著增加大鼠总尿量($P < 0.05$)。表明商陆经醋制后利尿作用增强,且作用更缓和持久,见图 1。

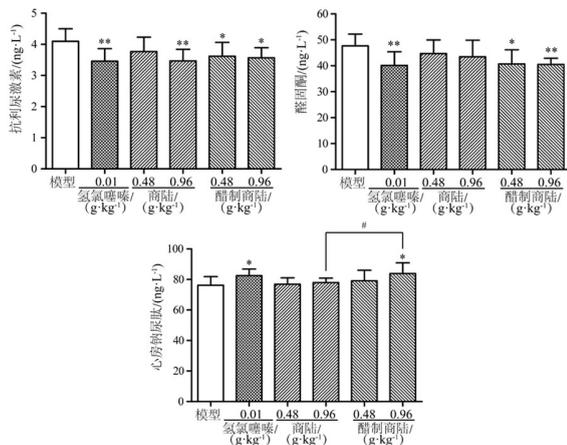


注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与对应剂量的商陆生品组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 10$ 。

图 1 商陆醋制前后对盐水负荷模型大鼠尿量的影响

3.2 商陆醋制前后对盐水负荷模型大鼠血浆激素水平的影响

与模型组比较,仅高剂量商陆生品组能显著降低血浆 ADH 含量($P < 0.01$),对 ALD、ANP 含量分别有降低和增加的趋势,但无显著性差异;醋制商陆高、低剂量组均可显著降低血浆 ADH、ALD 含量($P < 0.05 \sim 0.01$),高剂量组能显著增加血浆 ANP 含量($P < 0.05$);与对应剂量的商陆生品组比较,醋制商陆的高剂量组能显著增加血浆 ANP 含量($P < 0.05$)。见图 2。

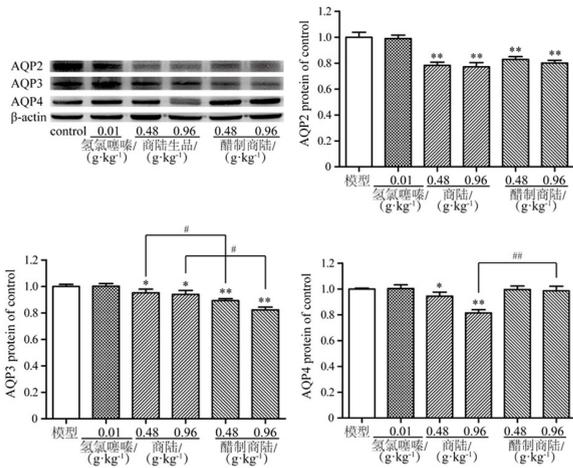


注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与对应剂量的商陆生品组比较,# $P < 0.05$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 10$ 。

图 2 商陆醋制前后对盐水负荷模型大鼠血浆 ADH、ALD、ANP 水平的影响

3.3 商陆醋制前后对盐水负荷模型大鼠肾脏 AQP_s 蛋白表达的影响

与模型组比较,商陆生品组显著降低大鼠肾脏 AQP₂、AQP₃ 和 AQP₄ 蛋白表达 ($P < 0.05 \sim 0.01$),醋制商陆组显著降低 AQP₂ 和 AQP₃ 蛋白表达 ($P < 0.01$),对 AQP₄ 蛋白表达无影响;与对应剂量的商陆生品组比较,醋制商陆高低剂量组可显著降低 AQP₃ 蛋白表达 ($P < 0.05$),高剂量组显著升高 AQP₄ 蛋白表达 ($P < 0.01$)。见图 3。



注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与对应剂量的商陆生品组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 10$ 。

图 3 商陆醋制前后对盐水负荷模型大鼠肾脏 AQP_s 的影响

4 讨论

本文研究发现商陆醋制后仍具有显著的利尿作用,且药效更为缓和持久。商陆生、醋品均可显著降低血浆 ADH 的含量,且醋制品能显著降低 ALD、升高 ANP 的含量。同时研究发现,商陆醋制前后均能显著下调大鼠肾脏 AQP₂、AQP₃ 蛋白表达,生品同时能使 AQP₄ 蛋白表达显著下降,醋制品较生品 AQP₃ 蛋白表达水平显著下降。表明商陆促进尿液生成的作用,除与其改变机体激素水平外,还可能与进一步改变肾脏中受激素调控相关的水通道蛋白的表达水平相关,且无论从激素改变和其调控的水通道表达水平变化,均可见醋制后对尿液的生成均具有促进作用,此分子水平变化结果与整体动物的醋商陆组尿液量生成增加的结果一致。

由课题组前期研究^[18]以及文献^[19]推测,商陆醋制后利尿作用的增强可能与其皂苷类成分的转化相关。其药效变化与成分变化的相关性有待于进一步研究。本文初步研究了商陆醋制前后的利尿作用及其作用机制,表明商陆醋制减毒增效的科学性和合理性,为商陆临床炮制用药提供依据。

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,2015:324-325.
- [2] 乔凤奎.古今名医临床应用商陆治疗水肿的经验总结[J].中医学报,2010,25(5):933-934.
- [3] 王鹏程,王秋红,赵珊,等.商陆化学成分及药理作用和临床应用研究进展[J].中草药,2014,45(18):2722-2731.
- [4] 黄国英,刘星星.中药商陆的药理及应用研究[J].中国实用医药,2013,8(15):249-250.
- [5] 胡莹,曾聪彦,梅全喜.急性商陆中毒反应 82 例文献分析[J].时珍国医国药,2011,22(12):3041.
- [6] 张金华.急性商陆中毒 12 例临床治疗观察[J].吉林医学,2011,32(4):734-735.
- [7] 于江泳,张村.全国中药饮片炮制规范辑要[M].北京:人民卫生出版社,2016:642-643.
- [8] 张程超,郁红礼,吴皓,等.商陆正丁醇部位醋制前后肠道毒性变化研究[J].中国中药杂志,2016,41(2):216-219.
- [9] 宫乐,吴皓,郁红礼,等.商陆提取物醋制前后毒性作用的比较研究[J].中国中药杂志,2013,38(10):1610-1613.
- [10] 陈琳,吴皓,王媚,等.商陆醋炙前后对动物黏膜刺激性比较研究[J].中国中药杂志,2011,36(7):859-863.
- [11] 邵水金,朱大诚.解剖生理学[M].北京:人民卫生出版社,2016:370-371,379-382.
- [12] 王鹏程,赵珊,王秋红,等.利水中药功效发挥与水通道蛋白之间的关系[J].中国中药杂志,2015,40(12):2272-2277.
- [13] YOOL AJ, CAMPBELL EM. Structure, function and translational relevance of aquaporin dual water and ion channels[J]. Mol Aspects Med, 2012, 33(5/6):553-561.
- [14] KORTENOEVEN ML, FENTON RA. Renal aquaporins and water balance disorders[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(5):1533-1549.
- [15] 唐淑萍,刘亚楠,马宏.水通道蛋白与肾脏疾病研究进展[J].中国药物与临床,2014,14(7):919-921.
- [16] HOLMES RP. The role of renal water channels in health and disease[J]. Mol Aspects Med, 2012, 33(5/6):547-552.
- [17] 李仪奎.中药药理实验方法学[M].2版.上海:上海科学技术出版社,2006:543-545.
- [18] 郁红礼,张程超,吴皓,等.醋制对商陆及商陆正丁醇部位中皂苷类成分含量的影响[J].中国中药杂志,2017,42(1):125-129.
- [19] 李林,殷放宙,关洪月,等.不同炮制方法对商陆中商陆皂苷含量的影响[J].南京中医药大学学报,2011,27(1):63-65.

(编辑:杨巍敏)