

· 药理 ·

生淫羊藿与炙淫羊藿对肾阳虚证水肿模型大鼠的影响

白宛鑫¹, 赵良友², 张娜², 卢意¹, 焦月华², 刘树民^{2*}
(1. 黑龙江中医药大学 中医药研究院, 哈尔滨 150040;
2. 黑龙江中医药大学 药物安全性评价中心, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:研究生品与炮制后的淫羊藿对肾阳虚水肿模型大鼠的作用,为阐明炮制前后淫羊藿治疗肾阳虚水肿的作用机制。方法:用氯化可的松联合盐酸多柔比星复制肾阳虚水肿大鼠模型,即造模第 1,8 天分别尾静脉注射盐酸多柔比星(3.5 mg·kg⁻¹),与此同时,连续 14 d 腹腔注射强化可的松注射液(3.75 mg·kg⁻¹·d⁻¹)进行造模,造模结束后将造模成功的大鼠分为模型组,生淫羊藿组(204.86 mg·kg⁻¹),炙淫羊藿组(204.86 mg·kg⁻¹),同时设立正常组,各组大鼠分别给予相应药物(10 mL·kg⁻¹),正常组和模型组给予同体积蒸馏水,连续灌胃 14 d。给药结束后,大鼠代谢笼法测 24 h 尿量,采用紫外分光光度法测定尿液中尿蛋白的含量;血清中指标的测定,采用全自动生化分析仪测血浆白蛋白(ALB),血清总蛋白(TP),血清肌酐(Scr),血清尿素氮(BUN)含量;采用酶联免疫测定(ELISA)检测环磷酸腺苷(cAMP),环磷酸鸟苷(cGMP),三碘甲状腺原氨酸(T₃),甲状腺素(T₄),雌二醇(E₂),睾酮(T)指标含量,取肾脏适量做苏木素-伊红(HE)染色病理切片。结果:与正常组比较,模型组大鼠从外观指标,生化指标,病理切片指标上均证明模型组大鼠处于肾阳虚水肿状态($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,生淫羊藿给药组与炙淫羊藿给药组对肾阳虚水肿的外观指标与病理切片指标均有回调作用,且在生化指标上,生、炙淫羊藿给药组均能回调尿量,尿蛋白,Scr,BUN,cAMP/cGMP,E₂,T 指标($P<0.05$, $P<0.01$),但是回调强度有所不同。生淫羊藿给药组极显著性回调尿量,尿蛋白,Scr,BUN($P<0.01$);炙淫羊藿给药组极显著性回调 cAMP/cGMP,E₂,T($P<0.01$)。此外,生淫羊藿给药组还可以回调 ALB,TP($P<0.05$, $P<0.01$),而炙淫羊藿给药组对这 2 个指标没有回调作用,炙淫羊藿给药组可以回调 T₃,T₄,肛温($P<0.05$, $P<0.01$),而生淫羊藿给药组对这 2 个指标没有回调作用。结论:生淫羊藿与炙淫羊藿给药组均可以治疗肾阳虚水肿,机制可能与改善阿霉素所致的肾小球足细胞损伤有关。生淫羊藿与炙淫羊藿治疗肾阳虚水肿侧重点有所不同,生淫羊藿性寒,更侧重于加强肾阳虚水肿大鼠的肾脏排泄功能来治疗肾阳虚水肿。炙淫羊藿经羊油炮制后产生了淫羊藿苷等物质,药性由寒转温,偏重改善肾阳虚水肿大鼠肾阳虚状态来治疗肾阳虚水肿。

[关键词] 炙淫羊藿;生淫羊藿;肾阳虚水肿;电镜观察
[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2019)05-0085-07
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190501
[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181119.0945.001.html>
[网络出版时间] 2018-11-21 11:07

Effect of Crude Epimedii Folium and Processed Epimedii Folium on
Kidney Yang Deficiency Edema Model Rats

BAI Wan-xin¹, ZHAO Liang-you², ZHANG Na², LU Yi¹, JIAO Yue-hua², LIU Shu-min^{2*}
(1. Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;
2. Center for Drug Safety Evaluation, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] Objective: To compare the effects between crude and processed Epimedii Folium on the rats of kidney-Yang deficiency and edema, in order to discuss the mechanism. Method: The rat model of kidney-Yang

[收稿日期] 20180715(002)
[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2013CB531802)
[第一作者] 白宛鑫,博士,从事中药药性理论相关问题研究,Tel:0451-82193278,E-mail:1762822831@qq.com
[通信作者] * 刘树民,教授,博士生导师,从事中药药性及中药毒性研究,Tel:0451-82193278,E-mail: keji-liu@163.com

edema was duplicated with hydrocortisone and doxorubicin hydrochloride. At day 1 and day 8 of modeling, the rats were injected with doxorubicin hydrochloride ($3.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) via tail vein, while being intraperitoneally injected with hydrocortisone ($3.75\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) for 15 days. After modeling, the rats were divided into model group, crude Epimedii Folium group ($204.86\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and processed Epimedii Folium group ($204.86\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and a normal control group was set up additionally. Rats in each treatment group were given the corresponding drugs, and those in normal and model groups were given the same volume of normal saline by gavage for continuous 14 days. At the end of the administration, 24 h urine was measured by rat metabolic cage method; 24 h urinary protein was detected by ultraviolet spectrophotometry; the content of plasma albumin (ALB) and total serum protein (TP) were measured by an automatic biochemical analyzer; and the content of adenosine monophosphate was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cyclic guanosine monophosphate (cGMP), triiodothyronine (T_3), thyroxine (T_4), serum creatinine (SCr), serum urea (BUN), estradiol (E_2), testosterone (T) indicator content were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Kidney tissues were collected to make pathological section by htoxylin eosin (HE) staining. **Result:** Compared with the normal group, all the indicators of appearance, biochemistry and pathological section in the model group indicated kidney Yang deficiency edema in the rats ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, both crude Epimedii Folium group and processed Epimedii Folium group showed a regulatory effect on indicators of appearance and pathological section kidney Yang deficiency edema; and in biochemical indicators, both crude Epimedii Folium group and processed Epimedii Folium group can regulate urine, urine protein, SCr, BUN, cAMP/cGMP, E_2 , T indicators to varying degrees ($P<0.05$, $P<0.01$). Crude Epimedii Folium group showed a significantly regulatory effect on urine, urine protein, SCr, BUN ($P<0.01$); whereas processed Epimedii Folium group showed a significantly regulatory effect on cAMP/cGMP, E_2 , T ($P<0.01$). In addition, crude Epimedii Folium group can also regulate ALB, TP ($P<0.05$, $P<0.01$), while processed Epimedii Folium group had no regulatory effect on these two indicators; however, processed Epimedii Folium group could regulate T_3 , T_4 and anal temperature ($P<0.05$, $P<0.01$), while crude Epimedii Folium group had no regulatory effect on these two indicators. **Conclusion:** Both crude Epimedii Folium group and processed Epimedii Folium group have certain effect in treating kidney Yang deficiency edema, and the possible mechanism is to alleviate glomerular podocyte injury induced by doxorubicin. Their emphasis in the treatment of kidney Yang deficiency edema is different. Crude Epimedii Folium has a cold property, and can treat kidney Yang deficiency edema by strengthening renal excretion function of rats with kidney Yang deficiency edema. Processed Epimedii Folium is processed with sheep oil to produce icariin and other substances, and its property changed from cold to warm, with a focus on alleviating the kidney Yang deficiency status of rats with kidney Yang deficiency edema.

[**Key words**] processed Epimedii Folium; crude Epimedii Folium; kidney Yang deficiency edema; electron microscopy observation

淫羊藿来源于小檗科植物淫羊藿、箭叶淫羊藿或朝鲜淫羊藿等品种的干燥叶^[1]。始载于《神农本草经》,被列为中品,具有补肝肾,强筋骨,祛风湿的作用。淫羊藿为 973 课题“利水功效古存今失中药的药性研究”中具有利水功效的典型中药。有学者认为,生淫羊藿具有寒性,无促进性机能作用,且部分指标显示有抑制性机能的作用,炙淫羊藿具有促性机能作用。说明经甘温的羊油炮制后,淫羊藿药性由寒转温,具有温肾壮阳的作用^[2]。这说明药性

的改变会影响药物的功效的变化。药味与药物的具体功效相关,药性是药物通过不同途径以影响药物疗效发挥或副作用发生有关的一类生物学效应^[3]。本实验基于此中药性味科学内涵新假说,探讨生淫羊藿炮制前后药性由寒变为温性,是否功效由利水作用向温阳作用转变,初步阐释淫羊藿炮制前后药性与功效之间的关系。

肾阳虚水肿为肾性水肿的一种分型,肾阳虚水肿为先天禀赋不足,后天失养,或老年体衰,为久病

失养以致肾阳虚衰,膀胱气化失司,水液停留体内而致。文献报道肾阳虚水肿模型大鼠自主活动减少,大便溏泻,尿蛋白,环磷酸鸟苷(cGMP)含量增加,环磷酸腺苷(cAMP),三碘甲状腺原氨酸(T₃)和甲状腺素(T₄)含量降低^[3-4]。对于肾阳虚水肿的治疗,缩泉丸中的益智仁盐炙后能较好地改善肾阳虚水肿模型大鼠的肾脏功能和水通道蛋白 2(AQP2)的表达,盐炙后作用明显增强^[5],这说明药物炙后可能会对加强对病症的治疗作用,基于此观点,进行了本文的研究,采取腹腔注射氢化可的松联合尾静脉注射多柔比星的方法复制大鼠肾阳虚水肿大鼠模型,观察淫羊藿与炙淫羊藿对肾阳虚水肿模型大鼠的治疗作用,探讨淫羊藿炮制前后对肾阳虚水肿证治疗作用的影响,并初步研究其作用机制,以期为中医临床合理用药提供依据。

1 材料

1.1 动物 4 周龄 SD 雄性大鼠,SPF 级,体质量 180~220 g,购自黑龙江中医药大学安全评价中心,合格证号 SCXK(黑)2018-0004。实验大鼠在温度(22±2)℃,相对湿度 40%~50%的环境中饲养,自由饮食饮水。本研究获得黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会批准,实验均符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。

1.2 药物 淫羊藿药材(世一堂中药材有限公司,批号 140316),经黑龙江中医药大学中药资源学教研室王振月教授鉴定为小檗科植物淫羊藿 *Epimium brevicornum* 的干燥叶,符合 2015 年版《中国药典》规定。按每 100 kg 淫羊藿,用羊脂油(炼油)20 kg,取羊脂油加热熔化,加入淫羊藿,用文火炒至均匀有光泽。取出,放凉。再用蒸馏水提取成水煎液并制成冻干粉备用。2015 年版《中国药典》中规定淫羊藿成人临床每日最高用量为 10 g,依据出膏率约 19.81%,换算成实验大鼠的给药剂量为 204.86 mg·kg⁻¹。

1.3 试剂 氢化可的松(河南润弘制药股份有限公司,批准文号国药准字 H41020789);注射用盐酸多柔比星(又名阿霉素)(浙江海正药业股份有限公司,批准文号国药准字 H33021980);大鼠 cAMP, cGMP, T₃, T₄, 雌二醇(E₂)及睾酮(T)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号均为 20170701);血浆白蛋白(ALB),血清总蛋白(TP),血清肌酐(SCr),血清尿素氮(BUN)生化试剂(德国罗氏公司,批号均为 612379);苏木素-伊红(HE)染色试剂和考马斯亮蓝 G250 染料(江苏世泰

实验器材有限公司,批号均为 1808305)。

1.4 仪器 AL204 型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],KDC160HR 型高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司),MC-246 型电子体温计(欧姆龙大连有限公司),infinite M200 PRO 型酶标仪[帝肯(上海)贸易有限公司],cobas C311 型全自动生化分析仪(德国 Roche 公司),Uvnini-1240 型紫外分光光度计(日本岛津公司)。

2 方法

2.1 造模^[3-4,6-7]与分组 将大鼠置于代谢笼内适应性喂养 3 d。取雄性 SD 大 32 只。除正常组 8 只外,其余大鼠按 3.75 mg·kg⁻¹体质量腹腔注射氢化可的松,自由饮水,饮食,连续 14 d。除正常组外,大鼠于第 1 天 14:00 按照 4 mg·kg⁻¹体质量第 1 次尾静脉注射阿霉素溶液,于实验第 7 天按照 3.5 mg·kg⁻¹体质量第 2 次尾静脉注射阿霉素溶液。将造模成功大鼠随机分为模型组、淫羊藿组、炙淫羊藿组,每组 8 只,自实验第 15 天开始,在每日上午 9:00~10:00 按照 10 mL·kg⁻¹灌胃给与淫羊藿组(204.86 mg·kg⁻¹),淫羊藿组(204.86 mg·kg⁻¹),正常组给予等体积蒸馏水,连续灌胃 14 d。

2.2 样品采集与处理 给药 14 d 后,将各组大鼠放置于代谢笼中,收集 24 h 尿液,量取尿量,并收集尿液,3 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清。用 10%水合氯醛麻醉大鼠,打开腹腔,腹主动脉取血,静置 1 h 后,3 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清。取血后,快速摘除大鼠两侧肾脏,将尿液,血清和肾脏置于-80℃冰箱保存,待测。

2.3 相应指标的测定方法

2.3.1 大鼠一般情况观察 实验中观察记录大鼠体毛状态、行为活动、粪便状态、体质量、饮水量、进食量,按正常、轻、中、重(0,1,2,3 分)赋分,取平均值组间比较^[8]。见表 1。

2.3.2 CBB 法检测 24 h 尿蛋白含量 取出收集的尿液,采用考马斯亮蓝 G-250 染料结合法(CBB 法)检测大鼠尿液中的尿蛋白含量,按照试剂盒说明书进行操作。

2.3.3 ELISA 检测 cAMP, cGMP, T₃, T₄, T, E₂ 含量 取出收集的血清,往预先包被 cAMP 抗体的包被微孔中加入对照品和样本,每孔加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体,封住反应孔,37℃恒温箱温育 60 min。重复洗板 5 次,每次 1 min,拍干,每孔加底物 A, B 各 50 μL,37℃避光孵育 15 min,每孔

表 1 肾阳虚水肿模型体征指标评分标准

Table 1 Evaluation criteria for body sign index score of renal Yang deficiency edema model

体征指标	0 分	1 分	2 分	3 分
体毛状态	柔顺,光泽	蓬松晦暗,轻度发黄	暗淡泛黄,无光泽	蓬松竖起脱落、体毛枯疏
行为活动	灵活敏捷	活动减少,刺激后仍能急剧活动	喜卧,刺激后活动减慢	神情倦怠,反应低下,刺激后活动明显减少
粪便状态	坚硬椭球型	质软椭球型	质软,不成椭球型	烂便,便溏
体质量	正常缓慢增加	平均下降 0 ~ 5 g	平均下降 5 ~ 10 g	平均下降 10 g 以上
饮水量	正常	平均下降 0 ~ 5%	平均下降 5% ~ 10%	平均下降 10% 以上
进食量	正常	平均下降 0 ~ 10%	平均下降 10% ~ 20%	平均下降 20% 以上

加入终止液 50 μL,450 nm 波长处测定各孔的吸光度 A 。cGMP、 T_3 、 T_4 、T、 E_2 的检测方法同 cAMP。

2.3.4 采用全自动生化分析仪测 ALB、TP、SCr、BUN 含量 取出收集的血清适量,放入离心管中,将待测样品依次放入全自动生化仪中,ALB、TP、SCr、BUN 选项进行测定。

2.3.5 HE 染色观察肾脏组织病理学变化 取肾脏去血液后称质量,对肾脏组织用 4% 甲醛固定,石蜡包埋,切片,HE 染色,采用光学显微镜进行病理组织学观察。

2.4 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件进行

统计,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组样本均数间差别的假设检验用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况观察 正常组体毛柔顺、行动灵活、二便正常、饮食正常,模型组体毛枯槁、报团少动、便溏、较对照组体型消瘦,附分后,造模第 14 天时,与正常组比较,模型组有明显差异($P < 0.05$),表明造模后大鼠符合模型要求。给药第 15 天时,淫羊藿组,炙淫羊藿组与模型组比较,均有明显差异($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 造模后第 14 天,给药第 15 天各组体征指标评分情况($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 On 14th day after modeling, and 15th day after drug administration, scores of physical indicators of each group were evaluated

($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	造模第 14 天	给药第 15 天
正常	—	1.98 ± 1.05	2.01 ± 0.855
模型	—	$8.44 \pm 1.22^{1)}$	$8.66 \pm 1.34^{1)}$
生淫羊藿	204.86	$8.23 \pm 0.95^{1)}$	$5.83 \pm 1.22^{3)}$
炙淫羊藿	204.86	$8.73 \pm 0.82^{1)}$	$6.27 \pm 0.74^{3)}$

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 3,4 同)。

3.2 淫羊藿炮制前后对肾阳虚证水肿大鼠肛温, cAMP/cGMP、 T_3 、 T_4 、 E_2 、T 含量的影响 与正常组比较,模型组大鼠肛温, cAMP/cGMP、 T_3 、 T_4 、 E_2 、T, 含量明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比

较,生淫羊藿 cAMP/cGMP、 E_2 、T 含量明显上升($P < 0.05$, $P < 0.01$);炙淫羊藿肛温, cAMP/cGMP、 T_3 、 T_4 、 E_2 、T 含量明显上升($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 3。

表 3 淫羊藿炮制前后对肾阳虚证水肿大鼠肛温, cAMP/cGMP、 T_3 、 T_4 、 E_2 、T 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of crude and processed Epimedii Folium of anal temperature cAMP/cGMP、 T_3 、 T_4 、 E_2 、T contents in rats with kidney-Yang deficiency and edema($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	肛温/ $^{\circ}\text{C}$	cAMP/cGMP	$T_3/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$T_4/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$E_2/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	T/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	—	38.83 ± 0.44	12.97 ± 12.28	16.73 ± 4.76	193.23 ± 46.33	232.39 ± 108.04	184.66 ± 71.56
模型	—	$30.70 \pm 1.12^{2)}$	$2.42 \pm 2.66^{2)}$	$9.88 \pm 4.62^{2)}$	$123.49 \pm 53.86^{2)}$	$112.62 \pm 132.64^{1)}$	$106.56 \pm 41.19^{1)}$
生淫羊藿	204.86	32.93 ± 0.48	$3.39 \pm 49.81^{3)}$	9.70 ± 4.65	130.29 ± 50.10	$164.21 \pm 42.12^{3)}$	$171.92 \pm 29.69^{3)}$
炙淫羊藿	204.86	$38.40 \pm 0.18^{3)}$	$13.74 \pm 1.41^{4)}$	$16.74 \pm 6.85^{4)}$	$191.43 \pm 49.73^{4)}$	$187.04 \pm 13.71^{4)}$	$206.82 \pm 19.45^{4)}$

3.3 淫羊藿炮制前后对肾阳虚证水肿大鼠尿量,尿蛋白,ALB,TP,SCr,BUN 含量的影响 给药 14 d 后,与正常组比较,模型组大鼠 ALB,TP,24 h 尿量明显下降($P<0.05$, $P<0.01$);尿蛋白,SCr,BUN 含量明显上升($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,

生淫羊藿 ALB,TP,尿量,尿蛋白含量明显上升($P<0.05$, $P<0.01$);SCr,BUN 含量明显下降($P<0.05$, $P<0.01$)。炙淫羊藿尿量,尿蛋白明显上升($P<0.05$, $P<0.01$);SCr,BUN 含量明显下降($P<0.05$, $P<0.01$)。见表 4。

表 4 淫羊藿炮制前后对肾阳虚证水肿大鼠 ALB,TP,SCr,BUN, 24 h 尿量,尿蛋白含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of crude and processed Epimedii Folium on content of ALB,TP,SCr,BUN, 24 h urine and urine protein in rats with kidney-Yang deficiency and edema($\bar{x} \pm s, n = 8$)

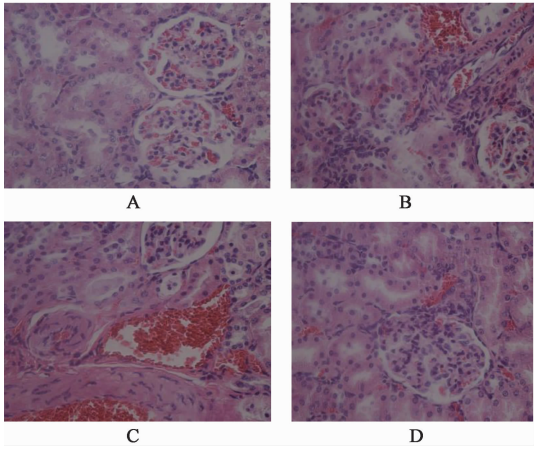
组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALB/g·L ⁻¹	TP/g·L ⁻¹	SCr/mmol·L ⁻¹	BUN/mmol·L ⁻¹	24 h 尿量/mL·kg ⁻¹	尿蛋白/mg·(24 h) ⁻¹
正常	-	41.87 ± 2.26	63.76 ± 3.67	25.29 ± 1.98	3.03 ± 0.49	50.88 ± 5.10	20.15 ± 2.30
模型	-	36.13 ± 7.82 ¹⁾	60.24 ± 2.10 ¹⁾	27.75 ± 0.89 ¹⁾	12.79 ± 3.00 ²⁾	35.50 ± 8.80 ²⁾	92.50 ± 12.20 ²⁾
生淫羊藿	204.86	38.78 ± 4.97 ³⁾	62.42 ± 2.73 ³⁾	18.83 ± 2.32 ⁴⁾	4.97 ± 1.67 ⁴⁾	46.25 ± 9.91 ⁴⁾	76.25 ± 9.91 ⁴⁾
炙淫羊藿	204.86	36.43 ± 3.58	60.63 ± 4.26	22.75 ± 3.30 ³⁾	6.98 ± 1.01 ³⁾	39.63 ± 7.04 ³⁾	81.89 ± 9.83 ³⁾

3.4 淫羊藿炮制前后对肾阳虚证水肿大鼠肾组织病理学的影响 光镜显示,正常组肾小球和肾小管结构正常,间质无炎性细胞游走聚集。模型组多数肾小球发生肿胀,肾小球囊腔变小,间质出现炎性细胞浸润,血管扩张充血;经给药组治疗后,与模型组比较,生淫羊藿组血管扩张充血减轻,生淫羊藿组肾小球肿胀减轻,周围炎性细胞减少,即模型组大鼠给予生淫羊藿与炙淫羊藿后,肾脏病变程度均有所减轻。见图 1。

抑制药物,有很肾毒性,易引起肾源性水肿^[9]。其肾毒性表现在能破坏肾静曲小管上皮细胞,使机体水液代谢紊乱,出现水肿病症^[10]。选用氢化可的松,可抑制下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴,停药后便暴露抑制状态,使内分泌紊乱,出现阳虚症状,且其也具有一定肾毒性,可引起肾细胞代谢紊乱,进一步加重机体肾水肿。阿霉素与氢化可的松合用,使得模型更接近于肾阳虚型下焦水肿模型。

大鼠肾阳虚水肿的体征指标判断标准依据《中药新药临床研究指导原则》^[8]制定。本实验结果表明,各组造模后大鼠均出现不同程度的毛发枯槁,脱落,便溏,抱团少动等肾阳虚水肿症状,均符合肾阳虚水肿标准,且各项体内指标均提示本实验造模成功。实验所得肾阳虚水肿模型稳定可靠,可用于生、炙淫羊藿对其影响的探讨。

另外,有关指标的检测也是作为鉴定肾阳虚证模型的条件。因为肾阳为人体阳气之根本,又被称为命门之火,是人体生命活动的原动力,具有蒸腾、推动、温煦及固摄等生理功能,能够促进机体新陈代谢,增强脏腑组织器官的功能活动,制约体内阴寒之气等,故当机体肾阳虚弱时往往表现出新陈代谢缓慢、组织器官功能减弱,以及体内寒凉之象,宜用温热药以致其阴,治寒以热,即中医主张的“寒者热之”。cGMP 和 cAMP 与中医理论中的阴阳相类似,二者是一对相互拮抗而又相互制约的物质,具有双向调控细胞的功能,阳虚时表现为 cAMP/cGMP 降低^[11]。文献报道肾阳虚水肿大鼠会出现下丘脑-垂体-甲状腺轴的障碍或功能低下,当甲状腺功能低下时,产热减少,能量代谢下降,全身机能减弱,此时



A. 正常组;B. 模型组;C. 生淫羊藿组;D. 炙淫羊藿组
图 1 淫羊藿炮制前后对肾阳虚证水肿大鼠肾组织病理学的影响 (HE, ×400)
Fig. 1 Effect of crude and processed Epimedii Folium on nephrohistopathology in rats with kidney-Yang deficiency and edema (HE, ×400)

4 讨论

有文献报道,用氢化可的松联合阿霉素制造大鼠肾阳虚水肿模型的原理是阿霉素是一种强效肿瘤

T₃ 和 T₄ 水平降低^[12], 肛温随着产热的减少也随之下降。肾阳虚大鼠还会出现下丘脑-垂体-性腺轴的紊乱^[3], T, E₂ 指标为性腺轴功能重要指标, 肾脏病变可影响其水平。SCr, BUN, ALB, TP 为肾脏排泄功能重要指标, 其含量异常与肾小球病变有关。尿蛋白则是水肿重要指标^[6]。

综上所述, 本实验中, 从模型大鼠外观指标初步可判断其处于肾阳虚水肿状态; 从生化指标来看, 模型组大鼠 cAMP/cGMP 下降说明模型组大鼠处于肾阳虚状态, T₃, T₄ 指标下降说明模型组大鼠甲状腺轴功能受到抑制, T, E₂ 等指标的下降说明模型组大鼠性腺轴受到抑制, 综上所述, 模型组大鼠整体处于甲状腺轴, 性腺轴, 能量代谢抑制状态, 说明模型大鼠整体处于肾阳虚状态。另外, 模型组大鼠尿蛋白, SCr, BUN 上升, 尿量, ALB, TP 下降, 说明模型组大鼠出现肾小球病变, 肾排泄功能失调和肾水肿。从病理切片可看出, 模型组多数肾小球发生肿胀, 肾小球囊腔变小, 间质出现炎性细胞浸润, 血管扩张充血, 再一次说明模型组大鼠的肾水肿。以上外观指标、生化指标及病理切片共同说明模型大鼠处于肾阳虚水肿模型成功。

生淫羊藿与炙淫羊藿在外观指标上对肾阳虚水肿的改善作用相差不大, 在病理切片上看, 两者都可以减少间质炎细胞浸润和消除肾小球肿胀, 肾小球囊腔变小, 缓解血管扩张充血, 从生化指标上看, 生淫羊藿与炙淫羊藿均能回调尿蛋白, SCr, BUN, 尿量, cAMP/cGMP, E₂, T 等指标, 以上 3 种指标说明生淫羊藿与炙淫羊藿对肾阳虚水肿均有一定的改善作用, 但是生淫羊藿与炙淫羊藿调节这些生化指标的强弱程度与侧重点有所不同, 具体如下。

与生淫羊藿比较, 炙淫羊藿对 cAMP/cGMP 等指标回调较显著, 说明炙淫羊藿能改善模型大鼠的肾阳虚状态, 并且, 炙淫羊藿能显著回调大鼠血清 T₃ 和 T₄ 含量, 说明炙淫羊藿也能够增强肾阳虚水肿大鼠甲状腺的功能, 另外, 炙淫羊藿还能能使 E₂ 和 T 的含量趋于正常, 说明炙淫羊藿还能够调节肾阳虚水肿模型大鼠的性激素水平, 以上均说明炙淫羊藿更擅长于通过增强机体能量代谢, 调节机体性激素水平来改善机体肾阳虚状态, 此外肛温升高再一次证明模型大鼠服用炙淫羊藿后机体能量代谢加强, 这与文献报道淫羊藿炮制后温性增强, 补肾壮阳作用增强相符^[3]; 这与加热后的淫羊藿产生更多的易于吸收的具有生物活性的黄酮, 如淫羊藿苷, 宝藿苷 1 有关^[13-14]。

与炙淫羊藿比较, 生淫羊藿对模型大鼠尿量, 尿蛋白, SCr, BUN, ALB, TP 回调更加显著, 说明生淫羊藿更擅长于通过改善肾排泄功能而增强利尿作用。生淫羊藿极显著性的增加尿量与极显著性的降低尿蛋白, 提示生淫羊藿是通过促进尿量排泄从而改善肾小球上皮细胞代谢及形态, 使肾脏功能向正常状态转变, 进而降低尿蛋白从病变肾小球的异常渗漏, 提高体内的 TP 与 ALB, 缓解阿霉素引起的低蛋白血症^[6]。

阿霉素及其代谢产物直接损伤足细胞或使足细胞代谢紊乱及形态学的改变, 使肾小球滤过膜的分子屏障和电荷屏障受损导致蛋白尿的发生^[15], 后期尚发现阿霉素可造成局灶性节段性肾小球硬化^[16], 生淫羊藿与炙淫羊藿均可治疗肾阳虚水肿所致的尿蛋白增多, 推测可能与生淫羊藿与炙淫羊藿可改善阿霉素所致肾小球足细胞损伤有关。

由此可见, 生淫羊藿与炙淫羊藿均可以治疗肾阳虚水肿, 可能的机制是改善阿霉素所致的肾小球足细胞损伤有关。生淫羊藿与炙淫羊藿治疗肾阳虚水肿侧重点有所不同, 生淫羊藿性寒, 更侧重于加强肾阳虚水肿大鼠的肾脏排泄功能来治疗肾阳虚水肿。炙淫羊藿经羊油炮制后产生了淫羊藿苷等物质, 药性由寒转温, 偏重改善肾阳虚水肿大鼠肾阳虚状态来治疗肾阳虚水肿, 这与文献报道的淫羊藿油炙后能改善肾阳虚小鼠的交配能力和耐寒能力^[17], 炙淫羊藿炮制品温肾阳作用优于生品淫羊藿相符合^[18]。以上结论对临床针对性的选择入药, 具有指导意义。

[参考文献]

[1]

国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 320.

[2]

牛锐等. 淫羊藿炮制前后对小鼠血浆睾酮及附性器官的影响[J]. 中国中药杂志, 1989, 14(8): 14-20.

[3]

李苗, 曾梦楠, 张贝贝, 等. 麻黄水煎液及拆分组分对肾阳虚水肿大鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(22): 218-223.

[4]

王洪玉, 陈平平, 董婉茹, 等. 阿霉素诱发肾性水肿病症大鼠模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(12): 6-9.

[5]

吴珊珊, 龚晓猛, 张美等. 缩泉丸中益智仁盐炙前后对肾阳虚大鼠肾脏功能的改善作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(5): 1-4.

[6]

谭成, 冉小库, 窦德强. 等. 白术对大鼠肾阳虚型下焦水肿影响的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35

(2);352-354.

[7] 刘嘉琪,王秋红,匡海学. 防己与茯苓配伍对肾性水肿模型大鼠的影响[J]. 中华中医药杂志,2017,32(9):4248-4251.

[8] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京:中国医药科技出版社,2002:385-388.

[9] Quinn C J, Burns P D, Gibson N M, et al. Effects of chronic endurance exercise on doxorubicin-induced thymic damage[J]. Integr Cancer Ther,2016,15(4):535-541.

[10] Park E J, Kwon H K, Choi Y M, et al. Doxorubicin induces cytotoxicity through upregulation of p ERK-dependent ATF3[J]. PLoS One,2012,7(9):44-50.

[11] 陈英华,欧阳轶强,孙琪,等. 肾阳虚证动物模型规范化研究中诊断指标选择的初步探讨[J]. 中国中医基础医学杂志,2003,9(10):26-30.

[12] 崔凯恒,嵇冰. 肾阳虚证动物模型现代评价指标研究概述[J]. 甘肃中医药大学学报,2016,33(1):75-78.

[13] 吴文辉,胡麟,冯健,等. 淫羊藿炮制前后对正常和肾阳虚小鼠肾上腺 V_c 水平的影响[J]. 中成药,2014,34(11):2397-2399.

[14] 周一帆,星点设计-效应面法优选淫羊藿油炙工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(16):16-18.

[15] 卢文丽,方肇勤,潘志强,等. 小鼠气、血、阴、阳、虚等八种模型四诊的比较和评价[J]. 中国中医基础医学杂志,2006,12(6):433-438.

[16] 张悦,魏民,王谦,等. 阿霉素复制大鼠微小病变肾病模型的研究[J]. 临床与实验病理学杂志,2001,4(17):178-179.

[17] 熊瑞,胡昌江,张美,等. 生、炙淫羊藿对肾阳虚小鼠耐寒能力和交配能力研究[J]. 亚太传统医药,2015,11(3):5-7.

[18] 李寅超,何永侠,孙曼,等. 比较以不同品质的羊脂油炙淫羊藿的温肾阳作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(19):197-202.

[责任编辑 周冰冰]