

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.20.011

连翘酯苷对盐水负荷模型大鼠的利尿作用*

史向华¹, 薛润苗¹, 牛丹¹, 史沁², 续艳^{1△}

(1. 山西省药品审评中心·山西省医药与生命科学研究院, 山西太原 030006; 2. 湖北医药学院, 湖北十堰 442000)

摘要:目的 探讨连翘酯苷对盐水负荷模型大鼠的利尿作用。方法 将建模成功的大鼠随机分为模型组、呋塞米(0.01 g/kg)组,以及连翘酯苷高、中、低剂量(1.5, 0.75, 0.375 g/kg)组,灌胃给药每日 1 次,连续 8 d,于末次给药前,按 3 mL/100 g 给予 0.9% 氯化钠溶液以复制盐水负荷大鼠模型。给药后,立即置代谢笼中,记录累积尿量。采用电解质分析仪检测尿液中 K⁺, Na⁺, Cl⁻ 含量,以酶联免疫吸附(ELISA)法测定血浆中心钠素(ANP)、抗利尿激素(ADH)、血管紧张素转换酶(ACE)、血管紧张素 II(Ang II)、醛固酮(ALD)水平及 Na⁺, K⁺-ATP 酶含量,以光学显微镜观察肾脏组织的病理变化。**结果** 与模型组比较,连翘酯苷中、低剂量组大鼠给药 3, 6 h 后的累积尿量明显增多,高剂量组大鼠尿液中 K⁺ 含量明显增加($P < 0.05$),高、中剂量组大鼠尿液中 Na⁺, Cl⁻ 含量明显增加,中剂量组大鼠的 ANP 含量明显增加,高、中剂量组大鼠的 Ang II, ACE 及 Na⁺, K⁺-ATP 酶含量明显减少($P < 0.05$),高、中、低剂量组大鼠 ADH 含量明显减少($P < 0.05$),中、低剂量组大鼠 ALD 含量明显减少($P < 0.05$)。病理结果显示,各组大鼠的肾脏组织结构均完整、清晰,且无异常改变。**结论** 连翘酯苷有明显利尿作用,其作用机制与减少 Ang II, ACE, ALD, ADH 含量,增加 ANP 含量,抑制 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性,促进水钠排泄,维持电解质平衡等有关,且对肾脏组织无明显影响。

关键词:连翘酯苷; 盐水负荷; 利尿作用; 大鼠

中图分类号:R932;R285.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)20-0036-04

Diuretic Effect of Forsythiaside on Saline-Loaded Model Rats

SHI Xianghua¹, XUE Runmiao¹, NIU Dan¹, SHI Qin², XU Yan¹

(1. Shanxi Drug Evaluation Center · Shanxi Institute of Medicine and Life Science, Taiyuan, Shanxi, China 030006; 2. Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei, China 442000)

Abstract: Objective To investigate the diuretic effect of forsythiaside on saline-loaded model rats. **Methods** The successfully modeled rats were randomly divided into the model group, furosemide (0.1 g/kg) group, and forsythiaside high-dose, medium-dose, and low-dose (1.5, 0.75, 0.375 g/kg) groups, and they were administered by gavage once a day for 8 d. Before the last administration, 0.9% Sodium Chloride Injection was given at the dose of 3 mL/100 g to replicate the saline-loaded rat model. After administration, the rats were placed in the metabolic cage immediately and the cumulative urine output was recorded. The contents of K⁺, Na⁺, Cl⁻ in urine were detected by electrolyte analyzer. The levels of atrial natriuretic peptide (ANP), antidiuretic hormone (ADH), angiotensin-converting enzyme (ACE), angiotensin II (Ang II), aldosterone (ALD) and Na⁺, K⁺-ATPase were measured by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The pathological changes of renal tissue were observed by the optical microscope. **Results** Compared with those in the model group, the cumulative urine output of rats in the forsythiaside medium-dose and low-dose groups increased significantly after 3, 6 h of administration, the content of K⁺ in the urine of rats in the forsythiaside high-dose group increased significantly, the contents of Na⁺, Cl⁻ in the urine of rats in forsythiaside high-dose and medium-dose groups increased significantly ($P < 0.05$), the content of ANP in forsythiaside medium-dose group increased significantly ($P < 0.05$), and the contents of Ang II, ACE, Na⁺, K⁺-ATPase in forsythiaside high-dose and medium-dose groups decreased significantly ($P < 0.05$), the content of ADH in forsythiaside high-dose, medium-dose and low-dose groups decreased significantly ($P < 0.05$), and the content of ALD in forsythiaside medi-

*基金项目:山西省重点研发计划项目[201803D31217]。

第一作者:史向华,男,高级工程师,研究方向为药理毒理学,(电子信箱)270780750@qq.com。

△通信作者:续艳,女,工程师,研究方向为新药药效及毒理学评价,(电子信箱)1632683369@qq.com。

- [6] 李仲昆,林杉,李海蜀,等. 双黄连粉针与 4 种抗生素伍用的体外最小抑菌浓度研究[J]. 中成药,1999,21(3):137-139.
- [7] 周可炎,曹迎春,谭超,等. TMP 对中草药煎液的抗菌增效作用[J]. 湖南农业大学学报,1999,25(6):3-5.
- [8] 尹长江,路国兵,赵长祺,等. 常见抗菌中草药对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抑菌作用[J]. 时珍国医国药,2013,24(6):1380-1381.
- [9] 刘玉婕,王长福,齐彦,等. 金银花、连翘及其配伍后对临

床 11 种致病菌的作用研究[J]. 中医药学报,2016,44(5):43-47.

- [10] JONES N, PFALLER MA, DOERN GV, et al. Antimicrobial Activity and Spectrum Investigation of Eight Broad-Spectrum β -Lactam Drugs: A 1997 Surveillance Trial in 102 Medical Centers in the United States[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 1998,30(3):215-228.

(收稿日期:2021-03-31;修回日期:2021-05-11)

um-dose and low-dose groups decreased significantly ($P < 0.05$). The pathological results showed that the renal tissue structure of rats in each group was complete and clear without abnormal changes. **Conclusion** Forsythiaside has an obvious diuretic effect. Its mechanism is related to reducing the content of Ang II, ACE, ALD and ADH, increasing the content of ANP, inhibiting the activity of Na^+ , K^+ -ATPase, promoting water and sodium excretion and maintaining electrolyte balance, and has no significant effect on renal tissue.

Key words: forsythiaside; saline-loaded; diuretic effect; rats

连翘是木樨科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实,有清热解毒、散结消肿、清心利尿功效,主治温热、丹毒、斑疹、痈疡肿毒、瘰疬(淋巴结结核)、小便淋闭等证^[1],历来有“疮家圣药”之称。连翘主产于山西、河南、陕西等地,主要含苯乙醇苷类、木脂体及其苷类、五环三萜类、挥发油等化学成分。连翘酯苷属苯乙醇苷类,具有抗菌、抗病毒、抗氧化、抑制弹性蛋白酶活力、解热等作用^[2-4]。本研究中探讨了连翘提取物连翘酯苷对盐水负荷模型大鼠的利尿作用,可为其临床应用提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器:CP114 型电子天平(美国 Ohaus 公司);SB-5200 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技有限公司);HWS-24 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);TgL-18 型高速冷冻离心机(四川蜀科仪器有限公司);AC9801 型电解质分析仪(江苏奥迪康医学科技股份有限公司);Cytation5 型多功能微孔读数仪(美国 BioTek 公司);Histocentre 3 型石蜡包埋机、Finesse 325 型石蜡切片仪、Excelsior 型全自动组织脱水机(英国 Shandon 公司);BX53 型荧光显微成像系统(日本 Olympus 公司)。

试剂:连翘酯苷(笔者自制,含量 35.75 mg/mL);呋塞米(上海朝晖药业有限公司,批号为 1810N13);0.9% 氯化钠注射液(石家庄四药有限公司,批号为 2001122007);心钠素(ANP)、抗利尿激素(ADH)、血管紧张素转换酶(ACE)、血管紧张素 II(Ang II)、醛固酮(ALD)的酶联免疫吸附(ELISA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号均为 20200525); Na^+ , K^+ -ATP 酶检测试剂盒(金克隆<北京>生物技术有限公司,批号为 20200422);水合氯醛(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号为 20170924)。

动物:SPF 级 SD 大鼠,雄性,6 周龄,体质量 180~200 g。购自中国食品药品检定研究院,实验动物生产许可证号 SCXK(京)2017-0005,实验动物使用许可证号 SYXK(晋)2017-0001。饲养于山西省医药与生命科学研究院药理研究室清洁级动物房。所有大鼠置代谢笼中适应性喂养 48 h 后,禁食不禁饮 18 h,每只大鼠均按 2.5 mL/100 g 灌胃 0.9% 氯化钠注射液,使大鼠体内水平衡,排尽膀胱内余尿,收集 2 h 内尿液。尿量为给水量

的 40% 以上者为合格^[5-7]。

1.2 方法

取模型大鼠 40 只,随机分为模型组、呋塞米组(0.01 g/kg),以及连翘酯苷高、中、低剂量组(1.5, 0.75, 0.375 g/kg),各 8 只。各给药组均按 5 mL/kg 灌胃,模型组给予等体积水,每日 1 次,持续 8 d。末次给药 30 min 后每组均以 0.9% 氯化钠溶液 3 mL/100 g 灌胃,复制盐水负荷大鼠模型。

1.3 观察指标

累积尿量:大鼠成功建模后立即置代谢笼中,第 3, 6, 12, 24 h 分别记录 1 次尿量,并计算累积尿量。

实验室指标:采用电解质分析仪检测尿液中 K^+ , Na^+ , Cl^- 含量。累计尿量 3 h 后眼眶静脉丛采血,分别用肝素锂和 EDTA 采血管收集,4℃ 下 3 000 r/min 离心 15 min,分离血浆,以 ELISA 法测定 ANP, ADH, ACE, Ang II, ALD 及 Na^+ , K^+ -ATP 酶含量,严格按试剂盒说明书操作。

组织病理形态学:记录 24 h 尿量后,10% 水合氯醛麻醉大鼠,摘取左肾(10% 中性甲醛液)固定,常规石蜡包埋切片,苏木素-伊红(HE)染色,显微镜下观察大鼠肾脏组织结构变化。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用 t 检验,多组均数比较先行方差齐性检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

结果见表 1 至表 3。光学显微镜显示,各组大鼠肾脏组织结构完整、清晰,无异常改变,表明各剂量连翘酯苷对大鼠肾脏组织无明显影响。详见图 1。

3 讨论

连翘利尿作用显著^[8],但其利尿成分及作用机制尚不明确,本研究建立盐水负荷模型大鼠,从大鼠排尿量,尿液电解质水平,血浆中 ANP, Ang II, ACE, ALD, ADH 和 Na^+ , K^+ -ATP 酶含量初步探讨连翘酯苷的利尿作用机制。

肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)是人体重要的体液调节系统,参与调节组织和脏器的生理和病理活动^[9],还可调节人体电解质和体液平衡,在内环境稳定方面发挥重要作用。RAAS 主要包括肾素、ACE、血管紧张素酶原和 Ang II 等。其中,ACE 还可刺激肾上腺皮质分泌 ALD,ALD 进入远曲小管和集合管上皮细胞后,

表 1 各组大鼠累积尿量比较 ($\bar{X} \pm s, \text{mL}, n = 8$)

Tab. 1 Comparison of cumulative urine output of rats in each group ($\bar{X} \pm s, \text{mL}, n = 8$)

组别	剂量(g/kg)	3 h	6 h	12 h	24 h
模型组		6.94 ± 1.42	9.12 ± 1.43	14.25 ± 2.32	23.47 ± 3.28
呋塞米组	0.01	10.27 ± 1.87**	12.36 ± 2.31**	14.66 ± 2.68	29.38 ± 11.79
高剂量组	1.5	6.55 ± 2.50	7.50 ± 2.89	12.11 ± 6.07	23.44 ± 11.85
中剂量组	0.75	9.84 ± 1.65**	10.44 ± 1.23*	13.50 ± 2.61	23.31 ± 9.11
低剂量组	0.375	11.56 ± 2.60**	13.00 ± 2.43**	15.31 ± 3.44	26.60 ± 10.32

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。下表同。

Note:Compared with those in the model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$, as well as the following tables.

表 2 各组大鼠尿液中电解质含量比较 ($\bar{X} \pm s, \text{mmol/L}, n = 8$)

Tab. 2 Electrolyte content in the urine of rats in each group ($\bar{X} \pm s, \text{mmol/L}, n = 8$)

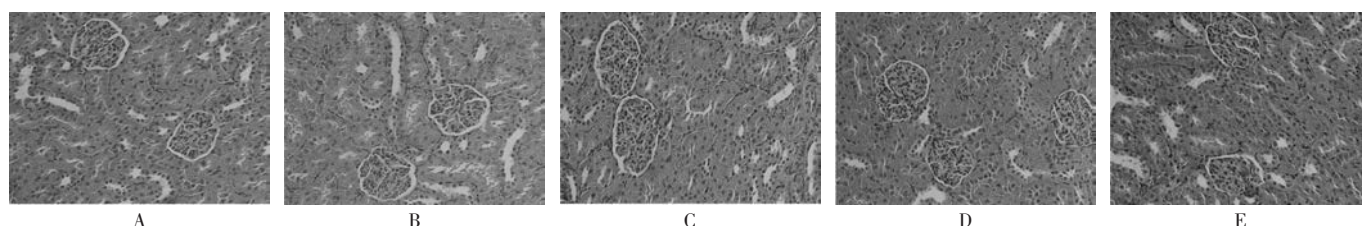
组别	剂量(g/kg)	K ⁺	Na ⁺	Cl ⁻
模型组		30.23 ± 6.19	44.03 ± 5.08	53.38 ± 14.73
呋塞米组	0.01	34.72 ± 7.75	53.60 ± 3.65**	55.18 ± 13.18
高剂量组	1.5	39.10 ± 9.33*	52.36 ± 6.08*	83.40 ± 22.15**
中剂量组	0.75	27.21 ± 8.09	53.26 ± 5.53**	68.35 ± 10.43*
低剂量组	0.375	31.00 ± 4.80	46.44 ± 2.40	55.83 ± 6.12

加强 Na⁺ 重吸收^[10-11]。本研究结果显示,与模型组比较,中、低剂量组大鼠 3,6 h 累积尿量明显增多;高剂量连翘酯苷可明显促进尿液中 Na⁺,K⁺,Cl⁻ 的排出,高剂量组大鼠尿液中 Na⁺ 相比中剂量组有所减少,未造成大量 Na⁺ 流失,提示连翘酯苷利尿效果较好,且不会造成电解质紊乱。还可明显降低 Ang II,ACE,ALD 减少,表明其可通过调节 RAAS,减少 Ang II 和 ACE 的分泌,拮抗 ALD 分泌,抑制肾小管重吸收,从而促进排尿。

表 3 各组大鼠血浆中 ANP,Ang II,ACE 和 Na⁺,K⁺-ATP 酶,ADH,ALD 含量比较 ($\bar{X} \pm s, n = 8$)

Tab. 3 Comparison of the levels of ANP,Ang II,ACE and Na⁺,K⁺-ATPase in the plasma of rats in each group ($\bar{X} \pm s, n = 8$)

组别	剂量(g/kg)	ANP(ng/L)	Ang II(ng/L)	ACE(U/L)	Na ⁺ ,K ⁺ -ATP 酶(U/mL)	ADH(mU/L)	ALD(pg/mL)
模型组		38.64 ± 12.93	326.97 ± 63.03	17.87 ± 3.13	3.80 ± 0.92	3 613.91 ± 961.18	1 755.62 ± 524.44
呋塞米组	0.01	39.54 ± 10.16	241.69 ± 82.86	18.61 ± 3.01	2.59 ± 1.98	2 507.33 ± 537.94*	1 513.98 ± 342.27
高剂量组	1.5	41.21 ± 13.74	258.32 ± 61.53*	14.68 ± 1.73*	1.95 ± 0.90*	2 712.95 ± 351.21*	1 273.64 ± 534.19
中剂量组	0.75	61.05 ± 17.80*	264.84 ± 45.44*	15.14 ± 1.76*	2.14 ± 0.87*	2 632.34 ± 617.53*	1 087.05 ± 343.27**
低剂量组	0.375	46.15 ± 15.09	313.28 ± 69.17	13.94 ± 4.56	2.73 ± 0.64	3 537.94 ± 351.21*	1 196.09 ± 413.78*



A. 模型组 B. 呋塞米组 C. 连翘酯苷高剂量组 D. 连翘酯苷中剂量组 E. 连翘酯苷低剂量组

图 1 大鼠肾组织病理切片(HE, ×200)

A. Model group B. Furosemide group C. Forsythoside high-dose group D. Forsythoside medium-dose group E. Forsythoside low-dose group

Fig. 1 The pathological section of the renal tissue of the rats(HE, ×200)

ADH 主要作用是增加髓袢升支粗段对 Na⁺ 的重吸收,提高肾远曲小管和集合管对水的通透性,促进水的重吸收,是影响体液平衡的关键性调节因素。ANP 具有抑制血管升压素及血管紧张素、ALD、对抗肾素-血管紧张素和 ADH 的作用,发挥利钠、利尿作用^[12-13]。本研究结果显示,高、中、低剂量组大鼠 ADH 含量明显减少,中剂量组大鼠 ANP 含量明显增加,表明连翘酯苷可减少 ADH,升高 ANP,抑制肾远曲小管和集合管对水的重吸收,促进尿液排出,而 ANP 的增加又可抑制 ADH 和 ALD 的分泌与释放,阻碍尿液的浓缩过程,从而进一步促使大鼠尿量增多。

Na⁺,K⁺-ATP 酶主要参与钠钾细胞膜的主动转运,为肾小管重吸收水、离子交换的主要驱动力,具有调节肾脏水和电解质平衡的功能,其活性直接影响肾小管的重吸收能力^[14]。高、中剂量组该酶含量明显减少,提示连翘酯苷可抑制该酶活性,抑制肾小管重吸收 Na⁺,促进水钠排泄,同时可维持电解质平衡。

本研究中考考虑利尿作用实验剂量相对临床常用剂量明显提高,发现各组各指标随着剂量的变化而改变趋势不一致,其可能为连翘提取物以连翘酯苷为主,含有多种成分有效部位及具有双向调节作用,随着剂量的增大,剂量组超出了剂量效应,同时不同剂量影响药物在体内的吸收出现负反馈,且连翘提取物的利尿作用机制尚未明确,其相关靶点的相互作用还有待进一步研究。

综上所述,本研究中发现,连翘酯苷对模型大鼠有明显的利尿作用,且各剂量对大鼠肾脏组织无明显影响,表明其可通过调节 RAAS 发挥抑制肾小管重吸收作用,同时还可增加 ANP,减少 ADH,抑制 Na⁺,K⁺-