

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.09.003

温补肾阳法治疗肾阳虚模型大鼠多尿症状的机制研究 *

热依汗古丽·乌修尔 由丽娜 帕提古丽·尼亚孜 须玉红 周璇 宋国宏

(新疆医科大学第五附属医院中医内科 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要 目的:探讨温补肾阳法治疗肾阳虚模型大鼠多尿症状的作用机制。**方法:**90只雄性SD大鼠随机分成干预组、抑制剂组、空白组、模型组,干预组根据中药剂量分为高剂量组、中剂量组、低剂量组。模型组、干预组及抑制剂组接受肾阳虚模型制备,干预组在成模后每日接受7 g/kg、14 g/kg、28 g/kg剂量中药灌胃,连续灌胃14 d。抑制剂组大鼠接受尾静脉注射通路抑制剂H-89。干预结束后比较各组脏器指数、24 h尿量、24 h尿蛋白水平以及尿液钠离子(Na^+)、钾离子(K^+)、氯离子(Cl^-)浓度、肾脏病理变化、血清醛固酮(ALD)、乙醇脱氢酶(ADH)、促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)、大鼠促肾上腺皮质激素(ACTH)、大鼠皮质醇(CORT)、蛋白激酶A(PKA)、蛋白激酶A(cAMP)含量、肾脏组织水通道蛋白2(AQP-2)蛋白表达的变化。**结果:**温补肾阳法可明显减少肾阳虚模型大鼠尿量,改善临床症状,且具有一定的剂量依赖性($P<0.05$)。经过中药干预后大鼠24 h尿蛋白、脏器指数、尿液 Na^+ 、 Cl^- 均下降,尿液 K^+ 、血清ALD、ADH、CRF、ACTH、CORT、PKA、cAMP含量、肾脏组织AQP-2蛋白表达上调($P<0.05$),且抑制剂H-89可阻断该作用。**结论:**温补肾阳法可明显改善肾阳虚模型大鼠多尿症状,其作用机制可能通过cAMP-PKA-AQP2通路介导。

关键词:肾阳虚模型;多尿症;温补肾阳法;cAMP-PKA-AQP2通路

中图分类号:R-33;R256.5;R243 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2022)09-1614-06

Study on the Mechanism of Warming and Tonifying Kidney Yang in the Treatment of Polyuria in Rat Model of Kidney Yang Deficiency*

Reyihanguli·Wuxiuer, YOU Li-na, Patiguli·Niyaz, XU Yu-hong, ZHOU Xuan, SONG Guo-hong

(Internal Medicine of Traditional Chinese Medicine, The Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830000, China)

ABSTRACT Objective: To explore the mechanism of Warming and Tonifying Kidney Yang in the treatment of polyuria in rats with kidney yang deficiency. **Methods:** 90 male SD rats were randomly divided into intervention group, inhibitor group, blank group and model group. The intervention group was divided into high dose group, medium dose group and low dose group according to the dose of traditional Chinese medicine. Model group, intervention group and inhibitor group received kidney yang deficiency model, and intervention group received 7 g/kg, 14 g/kg, 28 g/kg dose of traditional Chinese medicine intragastric administration after model establishment, for continuous gavage for 14 days. Rats in the inhibitor group received tail-vein injection of the pathway inhibitor H-89. After the intervention, each viscera index, 24 h urine output, 24 h urine protein levels and urine (Na^+), potassium(K^+), chloride(Cl^-) concentration, kidney pathological changes, serum aldosterone (ALD), alcohol dehydrogenase (ADH), adrenocorticotrophic hormone releasing factor (CRF), adrenocorticotrophic hormone of rats (ACTH), cortisol (CORT), protein kinase A (PKA), protein kinase A (cAMP) and kidney aquaporin 2 (AQP-2) protein expression were compared in each group. **Results:** Warming and Tonifying kidney yang could significantly reduce urine volume and improve clinical symptoms of kidney yang deficiency model rats, and it had a certain dose dependence($P<0.05$). After Chinese medicine intervention, 24 h urine protein, organ index, urine Na^+ , Cl^- were decreased, urine K^+ , serum ALD, ADH, CRF, ACTH, CORT, PKA, cAMP content and kidney tissue AQP-2 protein expression were increased, the above effects were dose-dependent ($P<0.05$), and the inhibitor H-89 could block the effect. **Conclusion:** Warming and tonifying kidney yang can significantly improve polyuria in kidney yang deficiency rat model, and its mechanism may be mediated by the cAMP-PKA-AQP2 pathway.

Key words: Kidney yang deficiency model; Polyuria; Warming and Tonifying kidney yang; CAMP-PKA-AQP2 pathway

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R256.5; R243 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)09-1614-06

前言

肺气宣发肃降、脾气传导运化、肾气的气化蒸腾、肝疏泄气机以及三焦的通调是调节机体津液代谢的基础^[1]。《素问》云:"

肾者水藏,主津液",认为肾气的蒸化推动在整个津液代谢中发挥重要作用^[2]。不同原因导致的肾阳虚可引起精神萎靡、腰膝酸软、形寒肢冷、尿频多等人体水液代谢紊乱症状,见于慢性肾炎、甲状腺功能减退、糖尿病肾病等临床常见疾病^[3]。大量水通

* 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2018D01C306)

作者简介:热依汗古丽·乌修尔(1977-),女,硕士,副主任医师,研究方向:中医内科临床与基础,E-mail: re_yihan@163.com

(收稿日期:2021-10-08 接受日期:2021-10-30)

道蛋白分布于肾脏,有研究^[4]显示大部分肾小管末端的水分是通过水通道蛋白2(AQP2)重吸收,而AQP2上游受cAMP-PKA通路调控,形成的cAMP-PKA-AQP2通路在机体肾脏原尿形成过程中发挥重要作用。温补肾阳法是治疗肾阳虚的重要原则,本研究根据肾阳虚的病因病机,总结出温补肾阳方,包含补骨脂、仙灵脾、金樱子、菟丝子,整方共奏温补肾阳之功^[5]。通过临床实践表明其可改善肾阳虚患者临床症状^[6],但有关机制尚未明确,基于此本研究利用肾阳虚模型鼠进一步深入探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物 温补肾阳法处方组成:仙灵脾10 g,金樱子15 g,补骨脂12 g,菟丝子10 g。按传统煎药法煎取药液,再按照《药理实验方法学》对药量进行折算,将中药配制成2.0 g/mL混悬液,对悬浊液进行去渣浓缩,再用波美度计算法对浓缩后药液进行浓度计算,使最终药液浓度为1.06 g/mL。

1.1.2 试剂及仪器 盐酸多柔比(爱必信(上海)生物科技有限公司,货号:39283-02);氢化可的松(货号:C-106,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司);钠离子(Na⁺)检测试剂盒(福建福缘生物有限公司,货号:190723-02);钾离子(K⁺)检测试剂盒(福建福缘生物有限公司,货号:E-BC-K279-M);氯离子(Cl⁻)检测试剂盒(上海沪震实业有限公司,货号:1234-00-00);醛固酮(ALD)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(货号:ZY-ALD-Ge,上海泽叶生物科技有限公司);蛋白激酶A(PKA)活性检测试剂盒(美国abcam公司,货号:ab139435);乙醇脱氢酶(ADH)活性检测试剂盒(货号:BC1085,北京索莱宝科技有限公司)。环磷酸腺苷(cAMP)ELISA试剂盒(货号:E-EL-0056c,武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司),PKA通路抑制剂H-89(Sigma-Aldrich,批号:0130964352),水通道蛋白2(AQP2)检测试剂盒(货号:3487S,美国CST公司)。大鼠促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)ELISA试剂盒(批号ER0388,中国菲恩生物科技有限公司),大鼠皮质醇(CORT)ELISA试剂盒(产品编号ER02070,中国菲恩生物科技有限公司),大鼠促肾上腺皮质激素(ACTH)ELISA试剂盒(产品编号ER03412,中国菲恩生物科技有限公司);切片机(德国莱卡公司,型号:CM3050S);高速冷冻离心机(型号:H2100R,湖南湘仪离心机仪器有限公司);全自动酶标仪(上海闪谱生物科技公司,型号:SuPerMax 3100型)。

1.2 实验动物

纳入3月龄SD大鼠90只,体重(250±10)g。所有大鼠均购自斯贝福(北京)生物技术有限公司(合格证号:京科动检2021(3)-7 SCXK(京)2019-0004)。于新疆医科大学实验动物中心饲养所有大鼠,自由饮水摄食,正常光照,适应性喂养1周。本研究方案经新疆医科大学动物管理制度和使用委员会批准(伦理号:3292839)。

1.3 实验方法

1.3.1 肾阳虚模型制备 肾阳虚模型制备方法^[7]:于第1d及第8d对大鼠尾静脉注射盐酸多柔比,剂量分别为4 mg/kg、3.5 mg/kg,同时大鼠每日接受3.75 mg/kg氢化可的松臀部肌肉注射,连续注射14日至成模。成模判定标准:造模过程中大鼠

逐渐出现体重下降、食欲减退、体温降低、拱背畏寒、蜷缩、毛发枯槁、反应迟钝、尿量减少、大便稀薄等体征,并对大鼠的24 h尿蛋白进行检测,将24 h尿蛋白量≥20 mg且存在上述临床表现的大鼠视为造模成功。

1.3.2 分组及药物干预方法 90只SD大鼠按照随机数字表法分成空白组、模型组、干预组、抑制剂组,其中干预组根据中药剂量分为低剂量组、中剂量组及高剂量组:(1)空白组(n=15只):未进行模型制备,第15日起每日仅进行模拟抓取。(2)模型组(n=15只):进行模型制备,第15日起每日仅进行模拟抓取。(3)低剂量组(n=15只):进行模型制备,第15日起每日接受7 g/kg剂量中药灌胃,连续灌胃14 d。(4)中剂量组(n=15只):进行模型制备,第15日起每日接受14 g/kg剂量中药灌胃,连续灌胃14 d。(5)高剂量组(n=15只):进行模型制备,第15日起每日接受28 g/kg剂量中药灌胃,连续灌胃14 d。(6)抑制剂组(n=15只):进行模型制备,第15日起每日接受14 g/kg剂量中药灌胃,连续灌胃14 d,灌胃第11d时使用浓度为0.4 mg/mL浓度的H-89溶液按照400 Hg/Kg比例进行尾静脉注射,1次/日,连续注射3 d。

1.4 观察指标

1.4.1 大鼠一般症状观察和脏器指数的计算 观察各组大鼠体重、肛温、进食量的变化,以及在日常抓取中各组大鼠激惹反应的变化。干预结束后每组随机抓取3只大鼠,充分麻醉后于冰上快速分离肾、肾上腺、下丘脑、垂体,对各个脏器的湿重进行称量后计算出脏器指数,脏器指数=脏器湿重/体重。称重完成后将脏器置于液氮中保存备用。

1.4.2 24 h尿量、24 h尿蛋白水平以及尿液Na⁺、K⁺、Cl⁻浓度检测 干预完成后将大鼠置于代谢笼中,禁食不禁水24 h,收集尿量,将尿液置于4℃、5000×g条件下离心7 min,取上清待测,尿液中的Na⁺、K⁺、Cl⁻浓度采用ELISA法检测,严格按照说明书进行有关操作。

1.4.3 HE染色观察肾脏病理变化 干预结束后每组随机抓取3只大鼠,充分麻醉后采用事先配置好的多聚甲醛溶液对大鼠进行灌流,灌流结束后在冰上快速取出左侧肾脏,再将肾脏组织修剪成大小约2 cm³,使用PBS将样本表面残留物彻底清洗后置于梯度乙醇中充分脱水,利用石蜡对样本进行包埋,切片、修片、烤片后再利用二甲苯对样本进行脱蜡,脱蜡结束后将样本置于苏木素中染色2 min,再用流动水对浮色进行冲洗后再进行酒精伊红染色3 min,再次用流动水清洗浮色后将样本置于梯度乙醇中进行再次脱水5 min,透明处理、树脂封片,肾脏的病理学改变经光镜下观察获取。

1.4.4 血清ALD、ADH、CRF、ACTH、CORT、PKA、cAMP含量检测 干预结束后每组随机抓取3只大鼠,充分麻醉后置于冰上,取腹主动脉血约5 min,将收集的血液经过室温下静置后4℃、5000×g条件下离心10 min,取上清液,将上清液加入至预先包被抗体的反应孔中,再加入经过辣根过氧化酶标记的靶抗体(ALD、ADH、CRF、ACTH、CORT、PKA、cAMP),将反应孔封闭后室温下静置60 min,再将孔板重复冲洗3次后拍干,加入50 μL底物A、B,在室温下避光静置15 min,每个反应孔加入终止液,严格按照说明书进行操作。

1.4.5 蛋白质印迹(Western blotting)法测定肾脏组织AQP-2蛋白表达水平 干预结束后每组随机抓取3只大鼠,充分麻醉

后于冰上快速取出左侧肾脏,修切成重量约200 mg,加入1 mL含蛋白酶抑制剂(PMSF)裂解缓冲液于冰上进行匀浆,匀浆离心后取上清液进行BCA蛋白浓度测定。使用10%SDS-PAGE聚丙烯酰胺凝胶在适当条件下进行电泳,结束电泳后转印到PVDF膜上,转膜时间依据目标蛋白分子量而定。取出转印好的PVDF膜用TBST清洗,5%脱脂牛奶封闭液常温摇床封闭2 h。封闭结束后再用TBST荡洗5 min,而后加入按比例稀释的一抗AQP-2(1:1000)、β-actin(1:3000),在4℃低温操作室摇床孵育过夜。取出PVDF膜在TBST荡洗3次,5 min后加入二抗山羊抗兔IgG二抗(1:10000),孵育1 h。TBST荡洗3次,10 min后加入显影液。使用Image(BIO-RAD公司)图像进行分析,以β-actin作为内参,计算AQP-2蛋白表达水平。

1.5 统计学处理

表1 各组大鼠一般症状的变化($\bar{x} \pm s$)Table 1 Changes of general symptoms of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	Anal temperature(℃)	Food intake(g)	Weight(g)
Blank group(n=3)	37.23±0.04	10.44±1.52	250.78±10.78
Model group(n=3)	35.92±0.02*	4.29±0.59*	212.65±4.37*
Low dose group(n=3)	36.13±0.01**#	4.41±0.28**#	214.57±2.84**#
Medium dose group(n=3)	36.34±0.03**&	6.12±0.72**&	225.88±7.27**&
High dose group(n=3)	36.94±0.05**#	8.14±0.72**#	236.72±7.89**#
Inhibitor group(n=3)	35.78±0.02*	4.28±0.55*	211±3.95*

Note: *means compared with the blank group $P<0.05$, #means compared with the model group $P<0.05$, & means compared with the inhibitor group $P<0.05$.

2.2 各组大鼠脏器指数比较

与空白组相比,经过模型制备的各组大鼠脏器指数均明显升高($P<0.05$);与模型组相比,高、中、低剂量组大鼠脏器指数

采用SPSS 22.0软件统计分析,用($\bar{x} \pm s$)描述计量资料,组间两两比较行LSD-t检验,多组间比较采用单因素方差分析,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般症状

与空白组大鼠相比,成模后大鼠体重明显下降,肛温降低,且在日常抓取中,经过模型制备的大鼠激惹反应明显削弱;经过温补肾阳法中药干预后高、中、低剂量组大鼠的进食量明显增多,肛温及体重有所回升,与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$),并具有一定的剂量依赖性;与中剂量组比较,抑制剂组肛温降低,体重下降($P<0.05$),具体见表1。

表2 各组大鼠脏器指数的变化($\bar{x} \pm s$)Table 2 Changes of organ index of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	Kidney(%)	Adrenal gland(%)	Hypothalamus(%)	Pituitary(%)
Blank group(n=3)	6.98±0.95	13.29±2.13	12.38±1.28	11.23±2.31
Model group(n=3)	28.38±3.94*	30.23±8.01*	31.23±3.12*	29.38±3.33*
Low dose group(n=3)	21.23±3.01**#	25.67±6.58**#	28.38±2.77**#	25.28±2.87**#
Medium dose group(n=3)	19.01±1.78**&	21.02±4.28**&	24.28±2.01**&	21.23±2.32**&
High dose group(n=3)	12.37±1.02**#	18.23±3.02**#	16.28±1.65**#	16.23±2.78**#
Inhibitor group(n=3)	27.89±3.88*	29.98±7.97*	30.89±3.23*	29.34±3.24*

Note: *means compared with the blank group $P<0.05$, #means compared with the model group $P<0.05$, & means compared with the inhibitor group $P<0.05$.

2.3 各组大鼠24 h尿量与24 h尿蛋白水平比较

与空白组相比,模型组24 h尿量增多,24 h尿蛋白水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$);经过温补肾阳法中药干预后高、中、低剂量组大鼠24 h尿量有所减少,24 h尿蛋白水平逐渐下降,与模型组相比有统计学差异($P<0.05$),具有剂量依赖性。与中剂量组相比,抑制剂组24 h尿蛋白、24 h尿量水平均升高($P<0.05$),具体见表3。

2.4 各组大鼠尿液Na⁺、K⁺、Cl⁻浓度比较

与空白组相比,经过模型制备的各组大鼠尿液Na⁺、Cl⁻均

均下降($P<0.05$),具有剂量依赖性。与中剂量组相比,抑制剂组大鼠脏器指数升高($P<0.05$),具体见表2。

明显升高,K⁺浓度下降($P<0.05$);与模型组相比,高、中、低剂量组大鼠尿液Na⁺、Cl⁻均下降,K⁺浓度上调($P<0.05$),具有剂量依赖性。与中剂量组相比,抑制剂组大鼠尿液Na⁺、Cl⁻均升高,K⁺浓度下降($P<0.05$),具体见表4。

2.5 各组大鼠肾组织病理学变化

通过HE染色可见,空白组大鼠肾脏组织存在大量的肾小球,毛细血管走形清晰,皮髓质具有明显的分界,肾小管排列整齐,上皮细胞未见畸形。模型组大鼠的肾脏明显肿胀,体积明显增大,皮髓质分界模糊不清,肾小球数量明显减少,肾小管明显

萎缩，并可见大量肉芽组织，结构紊乱，上皮细胞胞质出现大量空泡，部分肾小管管腔内存在炎性细胞；与模型组相比，各剂量组肾组织病理学形态改善程度不同，肾小球数量增多，组织结构

仍紊乱但程度有一定改善，肾小管结缔组织的增生较模型组缓解，炎症细胞浸润程度下降，其中以高剂量组改善最为明显；抑制剂组肾脏组织的病理学改变程度与模型组相仿。具体见图1。

表3 各组大鼠24 h尿量及24 h尿蛋白水平的变化($\bar{x} \pm s$)Table 3 Changes of 24 h urine volume and 24 h urinary protein level of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

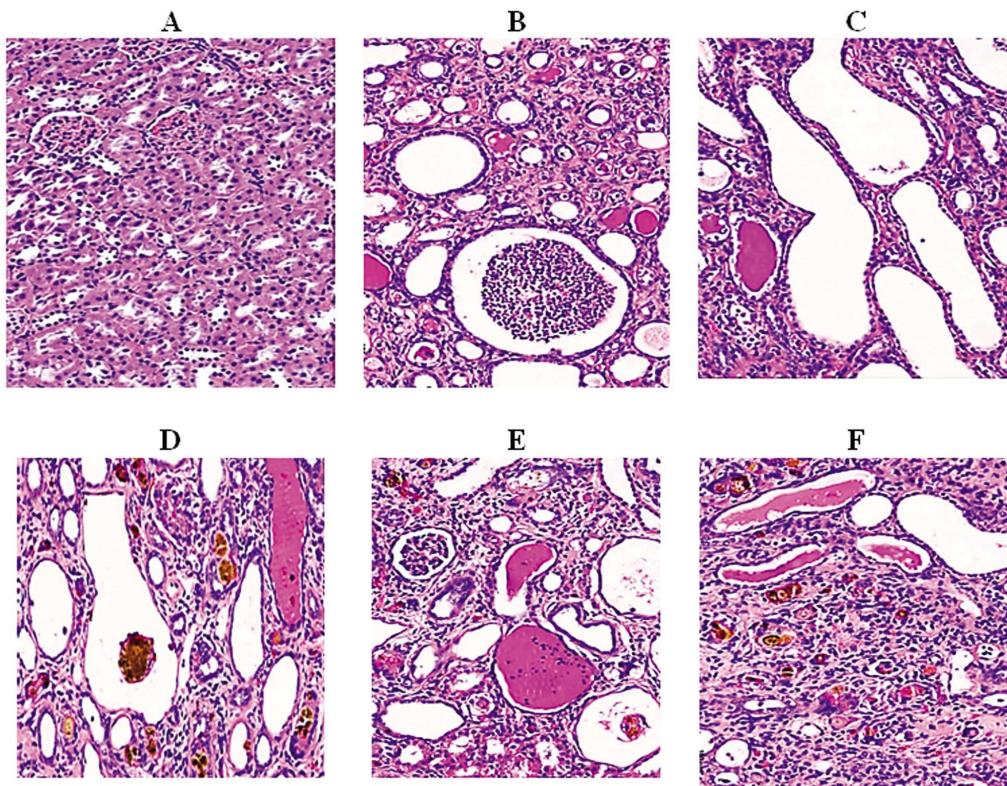
Groups	24 h urine volume (mL /100 g)	24 h urinary protein(g/24 h)
Blank group(n=3)	4.45± 1.17	11.25± 3.22
Model group(n=3)	5.92± 2.16*	329.39± 11.29*
Low dose group(n=3)	5.91± 2.21#	318.23± 12.38#
Medium dose group(n=3)	5.81± 2.05**&	188.23± 11.32**&
High dose group(n=3)	4.98± 1.24#	201.28± 9.87#
Inhibitor group(n=3)	5.89± 2.12	321.56± 11.87

Note: *means compared with the blank group $P<0.05$, #means compared with the model group $P<0.05$, &means compared with the inhibitor group $P<0.05$.

表4 各组大鼠尿液 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 浓度的变化($\bar{x} \pm s$)Table 4 Changes of urine Na^+ , K^+ , Cl^- concentrations in rats of each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	Na^+ (mmol/L)	K^+ (mmol/L)	Cl^- (mmol/L)
Blank group(n=3)	0.52± 0.01	1.94± 0.08	0.61± 0.01
Model group(n=3)	1.02± 0.04*	1.07± 0.03*	1.02± 0.04*
Low dose group(n=3)	0.92± 0.02**#	1.21± 0.03**#	0.89± 0.03**#
Medium dose group(n=3)	0.86± 0.02**&	1.37± 0.04**&	0.81± 0.01**&
High dose group(n=3)	0.72± 0.01**#	1.57± 0.06**#	0.75± 0.01**#
Inhibitor group(n=3)	1.01± 0.03*	1.05± 0.04*	0.99± 0.01*

Note: *means compared with the blank group $P<0.05$, #means compared with the model group $P<0.05$, &means compared with the inhibitor group $P<0.05$.

图1 各组大鼠肾脏组织HE染色结果($\times 200$)Fig.1 HE staining results of kidney tissue of rats in each group ($\times 200$)

Note: A: blank group; B: Model group; C: Inhibitor group; D: Low dose group; E: Medium dose group; F: High dose group

2.6 各组大鼠血清 ALD、ADH、CRF、ACTH、CORT 含量

与空白组相比, 经过模型制备的大鼠血清 ALD、ADH、CRF、ACTH、CORT 含量均有不同程度下调($P<0.05$), 中药干

预后, 高、中、低剂量组上述指标含量较模型组均有所上调, 其中高剂量组上调趋势最明显($P<0.05$), 而中药的作用被抑制剂组阻断($P<0.05$), 具体见表 5。

表 5 各组大鼠血清 ALD、ADH、CRF、ACTH、CORT 含量的变化($\bar{x} \pm s$)
Table 5 Changes of serum ALD, ADH, CRF, ACTH and CORT in rats of each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	CRF(μg/L)	ACTH(μg/L)	CORT(μg/L)	ALD(μg/L)	ADH(μg/L)
Blank group(n=3)	201.28± 0.97	97.57± 0.59*	212.38± 3.21	108.23± 5.39	110.23± 4.39
Model group(n=3)	95.57± 0.34*	22.39± 0.11*	116.32± 0.89*	31.28± 1.28*	21.28± 1.02*
Low dose group(n=3)	104.38± 0.51**&	31.23± 0.19**&	122.39± 0.96**&	42.23± 1.98**&	39.39± 1.87**&
Medium dose group(n=3)	117.28± 0.59**&	42.35± 0.21**&	148.39± 1.02**&	55.34± 2.76**&	54.34± 2.05**&
High dose group(n=3)	169.28± 0.66**&	58.28± 0.36**&	179.29± 2.21**&	79.38± 3.01**&	76.38± 2.98**&
Inhibitor group(n=3)	99.18± 0.36*	23.18± 0.23*	120.34± 0.92*	29.39± 1.57*	23.19± 1.18*

Note: *means compared with the blank group $P<0.05$, **means compared with the model group $P<0.05$, &means compared with the inhibitor group $P<0.05$.

2.7 各组大鼠 cAMP-PKA-AQP2 通路相关指标变化

与空白组相比, 经过模型制备的大鼠血清 cAMP、PKA 和肾脏组织 AQP-2 蛋白表达均有不同程度下调($P<0.05$), 中药干

预后, 高、中、低剂量组上述指标较模型组均有所上调($P<0.05$), 其中高剂量组上调趋势最明显, 而中药的作用被抑制剂组阻断($P<0.05$), 具体见表 6, AQP-2 蛋白表达图见图 2。

表 6 各组大鼠 cAMP、PKA、AQP-2 的变化($\bar{x} \pm s$)
Table 6 Changes of cAMP, PKA and AQP-2 in rats of each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	cAMP(pg/L)	PKA(pg/L)	AQP-2/internal reference IOD ratio
Blank group(n=3)	29.39± 0.57	35.38± 9.29*	39.46± 1.36
Model group(n=3)	1.28± 0.11*	9.28± 2.12*	3.54± 0.35*
Low dose group(n=3)	8.29± 0.19**&	13.28± 2.67**&	7.25± 1.23**&
Medium dose group(n=3)	15.38± 0.21**&	17.29± 2.98**&	15.23± 3.23**&
High dose group(n=3)	18.28± 0.28**&	22.38± 3.28**&	19.29± 5.32**&
Inhibitor group(n=3)	1.58± 0.09*	10.29± 1.98*	4.01± 0.22*

Note: *means compared with the blank group $P<0.05$, **means compared with the model group $P<0.05$, &means compared with the inhibitor group $P<0.05$.

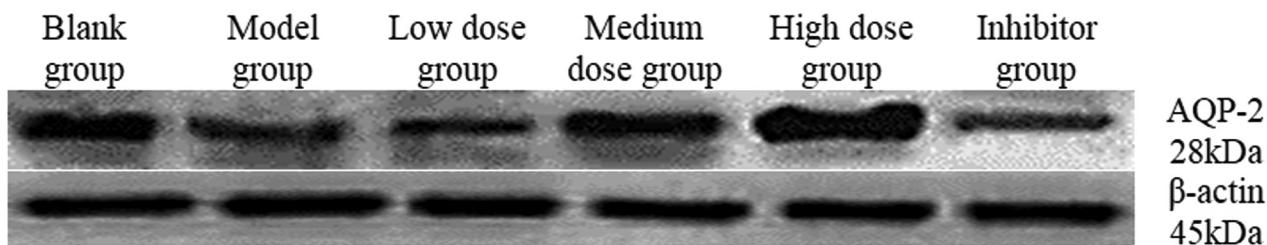


图 2 各组肾脏组织 AQP-2 蛋白表达检测结果
Fig.2 Detection results of AQP-2 protein expression in renal tissues of each group

3 讨论

《黄帝内经》云:肾藏精,可化气生血,肾又主一身阴阳,是先天之本,肾与精、气、血、阴、阳等重要生命物质都有密切关系^[1]。肾阳亏虚,日久气化不利,水液代谢紊乱而产生一系列疾病,甚者影响生命安全。针对肾阳虚的病因病机,本研究总结出温补肾阳方进行温补肾阳,包含补骨脂、仙灵脾、金樱子、菟丝子,其中补骨脂有补肾助阳之功^[8],仙灵脾又名淫羊藿,具有除湿祛风、壮阳补肾、强筋健骨之效^[9],金樱子可固精缩尿^[10],菟丝

子可补肾益精^[11,12],整方共奏温补肾阳之功^[13]。

本研究对模型鼠的一般情况进行观察,结果发现造模后大鼠体重明显下降,肛温降低,尿量明显增多,且在日常抓取中,经过模型制备的大鼠激惹反应明显削弱,上述症状与文献资料^[14,15]一致,提示本研究造模成功。经过温补肾阳方灌胃后大鼠精神、饮食、体重逐渐改善,多尿症状得到纠正,24 h 尿蛋白亦有明显减少,这说明温补肾阳方可明显纠正肾阳虚导致的一系列临床症状,并具有一定的剂量依赖性。本研究利用 HE 染色对各组大鼠肾脏组织的病理进行观察,结果发现肾阳虚模型大

鼠肾脏出现明显肿胀,肾小球数量明显减少,肾小管萎缩严重,并且可见大量上皮细胞受破坏及炎性浸润征象,经过温补肾阳方干预后大鼠肾脏病理得到不同程度的改善,并具有一定的剂量依赖性,可见温补肾阳方具有明显的肾脏保护效应。

Na^+ 、 Cl^- 是细胞外液的重要电解质, K^+ 是细胞内液的电解质成分, Na^+ 、 K^+ 与 Cl^- 共同调控体液的渗透压及酸碱平衡^[16,17],肾阳虚模型鼠电解质紊乱类型表现为 Na^+ 、 Cl^- 均明显升高, K^+ 浓度下降,温补肾阳方干预后大鼠 Na^+ 、 Cl^- 均下降, K^+ 浓度上调,提示温补肾阳方可纠正肾阳虚模型鼠机体电解质紊乱。ALD、ADH是调节电解质、机体血容量的重要激素,其中ALD可通过调节肾脏对 Na^+ 重吸收功能而介导机体的水盐代谢,通过保钠排钾功能维持机体的体液容量及渗透压水平,当ALD水平下降时 Na^+ 重吸收减少,排出增多,导致尿量增多^[18]。ADH可促进肾小管对水的重吸收,避免水分大量外流,具有显著的抗利尿作用,ADH的含量决定缩尿作用^[19-21]。本研究发现模型鼠血清ALD、ADH明显减少,经过中药干预后ALD、ADH明显升高,可见温补肾阳方可通过调节激素水平而实现缩尿作用。下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA轴)功能紊乱是肾阳虚病的基础^[22],下丘脑激素CRH在维持HPA轴功能完整性中作用重大^[23,24],ACTH是调节皮质激素分泌的重要因子,对肾上腺皮质的发育及机能有刺激效应^[25,26],CORT是糖皮质激素,是肾上腺维持正常功能、形态的重要指标。文献^[27]研究显示CRF、ACTH、CORT可通过调节HPA轴的稳态而实现调节水液代谢的目的。本研究发现模型大鼠血清CRF、ACTH、CORT均有不同程度下调,提示肾阳虚发生时大鼠HPA轴功能受损,经过温补肾阳方干预后CRF、ACTH、CORT水平上调,提示温补肾阳方有修复HPA轴的作用。

文献显示^[4]cAMP-PKA-AQP2通路与肾阳虚多尿症关系密切,cAMP活化后可激活相应蛋白激酶PKA^[28],由此释放大量的促酶活性物质,在经过一定的生物活化效应后促使小泡被膜上的水通道蛋白AQP2与集合管细胞的管腔膜相嵌合。AQP2是尿液调节生成的重要蛋白,AQP2大量嵌合至管腔膜后导致细胞膜通透性增加,当肾髓质集合管内外存在明显的渗透浓度差时,即可促进集合管对水液进行大量的重吸收^[29]。因此,当cAMP-PKA-AQP2通路被抑制时,集合管对水的重吸收能力被削弱,从而导致尿液大量排出^[30]。本研究发现模型鼠cAMP、AQP2、PKA表达均下降,由此可见肾阳虚发生时,影响了cAMP-PKA-AQP2通路活性,从而影响了集合管对水的重吸收能力,经过温补肾阳方干预后,cAMP-PKA-AQP2通路活性被激活,从而提高了集合管对水的重吸收能力,改善了多尿症状,而温补肾阳方这一作用可被H-89所抑制,这进一步说明了温补肾阳方改善肾阳虚确实通过cAMP-PKA-AQP2通路实现。

综上,温补肾阳方明显减少了肾阳虚模型大鼠的尿量,这说明温补肾阳方确有缩尿作用,发挥缩尿作用可能是增加了血清中ADH、ALD含量,激活了cAMP-PKA-AQP2通路活性,由此改善了机体的电解质代谢水平。

参考文献(References)

- [1] 侯雅静,陈家旭.从肾阳虚探讨多尿、少尿的形成机理[J].中医杂志,2017,58(9): 741-744
- [2] 高莹,郭兆安.夜尿增多的中医病因病机与治疗[J].中国中西医结合肾病杂志,2019,20(12): 1119-1120
- [3] Fu Y, Yang J, Fan S, et al. Selection and validation of optimal endogenous reference genes for analysis of quantitative PCR in four tissues pathologically associated with Kidney-yang deficiency syndrome following influenza A infection[J]. Exp Ther Med, 2020, 20(6): 244
- [4] 何嘉娜,王博林,姬丽婷,等.从"V2R-cAMP-PKA-AQP2"通路探讨肾气丸上调NRK细胞AQP2表达的作用机制[J].中华中医药杂志,2019,34(6): 2412-2416
- [5] 赵敏,徐安莉,周艳艳,等.温补肾阳法对肾阳虚肺纤维化大鼠肺内CTGF表达的影响[J].中国老年学杂志,2015,35(2): 421-424
- [6] 张洪亮.温补肾阳方治疗高血压病(2级)肾阳虚证的临床疗效评价研究[D].山东:山东中医药大学,2012
- [7] 秦文艳,陈贺,朱竟赫,等.不同氯化可的松小鼠肾阳虚模型制备方法对比研究[J].实验动物科学,2017,34(4): 11-14
- [8] 鲁亚奇,张晓,王金全,等.补骨脂化学成分及药理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(3): 180-189
- [9] 岑洁,王怡.温补肾阳法治疗慢性肾衰竭--肉桂、附子和仙灵脾的应用比较[J].上海中医药杂志,2007,41(12): 20-22
- [10] 陈倩,李娜,张雨林,等.金樱子的研究进展[J].中医药导报,2018,24(19): 106-110
- [11] 连彩艳,王晓艳,张书琦,等.基于网络药理学的菟丝子主要活性成分作用机制研究[J].中医学报,2020,35(6): 1278-1287
- [12] 王焕江,赵金娟,刘金贤,等.菟丝子的药理作用及其开发前景[J].中医学报,2012,40(6): 123-125
- [13] 卢德赵,沃兴德,唐利华,等.温补肾阳药对肾上腺切除的肾阳虚大鼠肝线粒体蛋白质组的影响[J].中华中医药学刊,2008,26(4): 744-747
- [14] 马超,叶鸿博,林喆,等.4种肾阳虚模型的评价[J].吉林中医药,2019,39(4): 508-511
- [15] 张琰,邓树泳,马娜,等.肾阳虚动物模型的现代研究进展[J].中国老年学杂志,2014,34(3): 838-841
- [16] Bohnert BN, Essigke D, Janessa A, et al. Experimental nephrotic syndrome leads to proteolytic activation of the epithelial Na^+ channel in the mouse kidney [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2021, 321(4): F480-F493
- [17] 邹海森,辛雪,孙伟,等.肾阳虚生化指标的现代研究进展[J].现代生物医学进展,2015,15(30): 5989-5993
- [18] Zhao M, Qu H, Wang R, et al. Efficacy and safety of dual vs single renin-angiotensin-aldosterone system blockade in chronic kidney disease: An updated meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Medicine (Baltimore), 2021, 100(35): e26544
- [19] Isshiki M, Sakuma I, Hayashino Y, et al. Effects of dapagliflozin on renin-angiotensin-aldosterone system under renin-angiotensin system inhibitor administration[J]. Endocr J, 2020, 67(11): 1127-1138
- [20] Yang L, Frindt G, Xu Y, et al. Aldosterone-dependent and -independent regulation of Na^+ and K^+ excretion and ENaC in mouse kidneys[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2020, 319(2): F323-F334
- [21] Bakris GL, Woods SD, Alvarez PJ, et al. Hyperkalemia Management in Older Adults with Diabetic Kidney Disease Receiving Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibitors: A Post Hoc Analysis of the AMETHYST-DN Clinical Trial[J]. Kidney Med, 2021, 3(3): 360-367.e1

(下转第 1608 页)

- effect by downregulating miR-124 and releasing inhibition of the MAPK14 and Gria3 signaling pathways [J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(5): 837-845
- [10] Fang Y, Qiu Q, Zhang S, et al. Changes in miRNA-132 and miR-124 levels in non-treated and citalopram-treated patients with depression [J]. *Affect Disord*, 2018, 227: 745-751
- [11] Ennab W, Mustafa S, Wei Q, et al. Resveratrol Protects against Restraint Stress Effects on Stomach and Spleen in Adult Male Mice [J]. *Animals (Basel)*, 2019, 9(10): 736
- [12] Moreno-Martínez S, Tendilla-Beltrán H, Sandoval V, et al. Chronic restraint stress induces anxiety-like behavior and re-modeling of dendritic spines in the central nucleus of the amygdala [J]. *Behav Brain Res*, 2022, 416: 113523
- [13] Zhang WH, Liu WZ, He Y, et al. Chronic Stress Causes Projection-Specific Adaptation of Amygdala Neurons via Small-Conductance Calcium-Activated Potassium Channel Downregulation [J]. *Biol Psychiatry*, 2019, 85(10): 812-828
- [14] Liu WZ, Zhang WH, Zheng ZH, et al. Identification of a prefrontal cortex-to-amygdala pathway for chronic stress-induced anxiety [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2221
- [15] Fernández-Calle R, Vicente-Rodríguez M, Gramage E, Pita J, et al. Pleiotrophin regulates microglia-mediated neuroinflammation [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 46
- [16] 贾晶晶, 石天尧, 周文霞. 束缚应激与单程长时应激致小鼠焦虑障碍的应激参数比较与优化 [J]. 国际药学研究杂志, 2019, 46(02): 109-115
- [17] 黄海涛, 王龙锦, 熊健. 帕罗西汀在广泛性焦虑症治疗中的效果观察[J]. 当代医学, 2019, 25(03): 86-88
- [18] Chuffa LGA, Carvalho RF, Justulin LA, et al. A meta-analysis of microRNA networks regulated by melatonin in cancer: Portrait of potential candidates for breast cancer treatment[J]. *J Pineal Res*, 2020, 69(4): e12693
- [19] Coutinho de Almeida R, Ramos YFM, Mahfouz A, et al. RNA sequencing data integration reveals an miRNA interactome of osteoarthritis cartilage[J]. *Ann Rheum Dis*, 2019, 78(2): 270-277
- [20] Kumari A, Singh P, Baghel MS, et al. Social isolation mediated anxiety like behavior is associated with enhanced expression and regulation of BDNF in the female mouse brain [J]. *Physiol Behav*, 2016, 158: 34-42
- [21] Martinetz S. MicroRNA's impact on neurotransmitter and neuropeptide systems: small but mighty mediators of anxiety [J]. *Pflugers Arch*, 2016, 468(6): 1061-1069
- [22] Ragu Varman D, Marimuthu G, Rajan KE. Environmental enrichment upregulates micro-RNA-183 and alters acetylcholinesterase splice variants to reduce anxiety-like behavior in the little Indian field mouse (*Mus booduga*)[J]. *Neurosci Res*, 2013, 91(3): 426-35
- [23] Epifanova E, Babaev A, Newman AG, et al. Role of Zeb2/Sip1 in neuronal development[J]. *Brain Res*, 2019, 1705: 24-31
- [24] Yang S, Toledo EM, Rosmaninho P, et al. A Zeb2-miR-200c loop controls midbrain dopaminergic neuron neurogenesis and migration [J]. *Commun Biol*, 2018, 1: 75
- [25] Meng J, Ding T, Chen Y, et al. LncRNA-Meg3 promotes Nlrp3-mediated microglial inflammation by targeting miR-7a-5p[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 90: 107141

(上接第 1619 页)

- [22] 张文钊, 田洪昭, 左军, 等. 右归丸对肾阳虚模型大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响[J]. *世界中医药*, 2019, 14(11): 2893-289
- [23] Fischer TW, Bergmann A, Kruse N, et al. New effects of caffeine on corticotropin-releasing hormone (CRH)-induced stress along the intrafollicular classical hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis (CRH-R1/2, IP3-R, ACTH, MC-R2) and the neurogenic non-HPA axis (substance P, p75NTR and TrkA) in ex vivo human male androgenetic scalp hair follicles [J]. *Br J Dermatol*, 2021, 184(1): 96-110
- [24] Toorie AM, Cyr NE, Steger JS, et al. The Nutrient and Energy Sensor Sirt1 Regulates the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis by Altering the Production of the Prohormone Convertase 2 (PC2) Essential in the Maturation of Corticotropin-releasing Hormone (CRH) from Its Prohormone in Male Rats[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(11): 5844-5859
- [25] Shrivastava S, Chen B, Dworkin LD, et al. Relapse of Nephrotic Syndrome after Adrenocorticotrophic Hormone-Induced Remission:

- Implications of Adrenocorticotrophic Hormone Antibodies [J]. *Am J Nephrol*, 2020, 51(5): 390-394
- [26] Melau C, Riis ML, Nielsen JE, et al. The effects of selected inhibitors on human fetal adrenal steroidogenesis differs under basal and ACTH-stimulated conditions[J]. *BMC Med*, 2021, 19(1): 204
- [27] 刘浩龙, 王家典, 卢鑒, 等. 右归丸“阴中求阳”配伍对肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的作用 [J]. *环球中医药*, 2017, 10(9): 1050-1053
- [28] Sun Y, Liu Z, Cao X, et al. Activation of P-TEFb by cAMP-PKA signaling in autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. *Sci Adv*, 2019, 5(6): eaaw3593
- [29] Wang R, Wu ST, Yang X, et al. Pcdl10-Stk24/25 complex controls kidney water reabsorption by regulating Aqp2 membrane targeting[J]. *JCI Insight*, 2021, 6(12): e142838
- [30] Oshikawa-Hori S, Yokota-Ikeda N, Sonoda H, et al. Reduced urinary release of AQP1- and AQP2-bearing extracellular vesicles in patients with advanced chronic kidney disease [J]. *Physiol Rep*, 2021, 9(17): e15005