

· 基础研究 ·

白术利尿作用研究[△]

陈静, 孙云超, 冉小库, 袁颖, 窦德强*

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

[摘要] **目的:** 研究白术及其拆分组分对大鼠的利尿作用。**方法:** 采用多模式联用的方法对白术化学组分进行拆分; 通过预先胃水负荷模型, 以6 h尿量为指标考察白术及其拆分组分对水负荷大鼠利尿作用; 进一步测定红细胞和肾髓中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力、血尿素氮浓度、肾髓中碳酸酐酶水平和 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 排出量, 研究其相关机理。**结果:** 高剂量白术水煎液和白术挥发油组分对大鼠有一定的抗利尿作用; 与空白组相比, 白术水煎液及其拆分组分红细胞中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力、肾髓中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和碳酸酐酶水平无显著变化。**结论:** 白术对正常动物无利尿作用, 相反表现出一定的抗利尿作用, 且首次研究发现白术挥发油有一定的抗利尿作用。

[关键词] 白术; 拆分组分; 利尿作用

Study on Diuretic Effect of *Atractylodes Macrocephalae Rhizoma*

CHEN Jing, SUN Yunchao, RAN Xiaoku, YUAN Ying, DOU Deqiang*

(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To study the diuretic effect of the *Atractylodes macrocephalae rhizoma* and its fractions. **Methods:** Multi-mode separation methods were adopted to split the components of *Atractylodes macrocephalae rhizoma*. The indicator of urine excretion in 6 h was used to study the diuretic effect of *Atractylodes macrocephalae rhizoma* and its splitted fractions in the water loaded rats. Further, the activity of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in red cell and renal medulla, the level of carbonic anhydrase in renal medulla and the output of Na^+ , K^+ , Cl^- in urine were measured to elucidate the related mechanization. **Results:** The anti-diuretic effect was observed in the high dosage of *Atractylodes macrocephalae rhizoma* water decoction and volatile oil fraction groups. Versus the control group, the activity of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in red cell and renal medulla and the level of carbonic anhydrase in renal medulla were not significantly changed in *Atractylodes macrocephalae rhizoma* water decoction and its fractions groups. **Conclusion:** The diuretic effect of *Atractylodes macrocephalae rhizoma* was not observed, instead, the weak antidiuretic effect was presented and it is for the first time that antidiuretic effect of *Atractylodes macrocephalae rhizoma* volatile oil was found.

[Keywords] *Atractylodes macrocephalae rhizoma*; splitted fraction; diuresis

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2016.5.005

白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎, 性温, 味甘、苦, 具有健脾益气、燥湿利水、止汗、安胎的功能, 用于脾虚食少、腹胀泄泻、痰饮眩悸、水肿、自汗、胎动不安^[1]。近年来关于白术药理作用有较多报道, 如补脾作用^[2]、抑制胃肠功能作用^[3]、抗炎作用^[4]等。然而文献报道中关于白术利尿作用有一定差异, 有文献报道白术具有利尿作用^[5]; 也有文献报道白术无利

尿作用, 而在高剂量呈现一定的抗利尿作用^[6]。目前关于白术拆分组分利尿作用无相关报道。前期我们对白术的化学组分进行拆分, 并对拆分组分间的差异度及化学成分进行表征^[7-8]。本实验以消化道水负荷模型大鼠为对象, 观察大鼠6 h内排尿量, 并测定部分生化指标, 研究白术及其拆分组分的利尿作用及相关机理, 为白术药理作用研究及临床用药提供理论依据。

[△] [基金项目] 国家重点基础研究计划(973计划)(2013CB531803); 2013辽宁省高等学校创新团队课题(LT2013020)

* [通信作者] 窦德强, 博士生导师, 教授, 研究方向: 中药化学; Tel: (0411) 87406497, E-mail: deqiangdou@126.com

1 材料

1.1 动物

雄性SD大鼠,体重200~220 g(辽宁长生生物技术有限公司),合格证号:SCXK(辽)2010-0001。

1.2 药物与试剂

白术于2012年11月采自浙江于潜,由辽宁中医药大学药用植物教研室王冰教授鉴定为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的根茎(批号:20121101)。称取白术药材400 g,冷水充分浸泡,煎煮2次后,合并药液过滤,浓缩为 $0.72\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的白术水煎液,4℃保存备用。白术的给药剂量按照《中华人民共和国药典》(《中国药典》)中规定的饮片成人服用量折算大鼠的给药剂量作为1倍量,同时大鼠每天按 $1\text{ mL}\cdot(100\text{ g})^{-1}$ 灌胃给药,折算白术1倍给药浓度为 $0.12\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

氢氯噻嗪(山西云鹏制药有限公司,批号:A130702);羧甲基纤维素钠(CMC-Na,天津市大茂化学试剂厂);0.9%氯化钠溶液(黑龙江科伦制药有限公司,批号:12060201-2);血红蛋白测定试剂盒(长春汇力生物技术有限公司,批号:2014013);超微量ATP酶(Na^+/K^+)测试盒(南京建成生物工程研究所,批号:20140627);ATP酶不高速测试盒(南京建成生物工程研究所,批号:20140627);考马斯亮蓝测试盒(南京建成生物工程研究所,批号:20140619);大鼠碳酸酐酶(CA)Elisa测试盒(R&D,批号:201406);尿素氮(BUN)测试盒(南京建成生物工程研究所,批号:20140629)。

1.3 仪器

代谢笼;UV-2100紫外分光光度计(长沙湘仪离心机仪器有限公司);SUNRISE型酶标仪(瑞士TECAN公司);7600-020全自动生化分析仪, Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 电极配套标准液、稀释液和比较电极液(日本株式会社日立高新技术有限公司)。

2 方法

采用Aston方法^[9-11]对大鼠进行筛选,将大鼠置于代谢笼中适应3 d,禁食不禁水18 h后,按 $2.5\text{ mL}\cdot(100\text{ g})^{-1}$ 剂量灌胃去离子水,收集2 h尿液,排尿质量大于灌胃离子水质量40%的大鼠,即为合格。

2.1 不同剂量白术水煎液对大鼠利尿作用研究

选取合格大鼠50只,分为空白对照组、阳性对

照组(氢氯噻嗪)、白术1倍剂量组、白术3倍剂量组和白术6倍剂量组,每组10只。

采用代谢笼法^[9-11],各组按规定剂量灌胃给药,连续给药9 d。末次给药前禁食不禁水24 h,各组按 $5\text{ mL}\cdot(100\text{ g})^{-1}$ 剂量灌胃0.9%氯化钠溶液,可使动物细胞外液增加,模拟水钠潴留状态。20 min后,按 $1\text{ mL}\cdot(100\text{ g})^{-1}$ 剂量灌胃给药,空白组给予同体积的水。给药后,轻压大鼠的下腹部使膀胱中尿液排尽,然后置于代谢笼内,每隔3 h收集尿液1次,共收集2次,最后一次收集前轻压大鼠的下腹部使膀胱中尿液排尽,记录给药后各组大鼠6 h内的尿量。室温控制在 $(20\pm 1)^\circ\text{C}$ 为宜。

2.2 白术拆分组分利尿作用研究

鉴于2.1项下的结果可知,白术6倍剂量水煎液有较弱的抗利尿作用,因此对白术6倍拆分组分进行利尿实验研究。选出合格大鼠80只,随机分为空白组(NO)、阳性组(PO)、白术6倍量组(WD)、白术6倍挥发油组(VOF)、白术6倍石油醚组(PEF)、白术6倍树脂醇洗组(AEF)、白术6倍树脂水洗组(WEF)和白术6倍粗多糖组(CPF),每组10只。

2.2.1 白术化学组分拆分 参照文献^[7-8],通过多模式(溶剂分配、大孔树脂)联用的化学成分拆分方法,对白术中化学拆分组分进行稳定、有效制备,得到挥发油组分、石油醚组分、树脂醇洗组分、树脂水洗组分和粗糖组分。并通过HPLC等法对各组分代表性成分进行分析,结果表明挥发油组分主要为苍术酮、萜及倍半萜类成分;石油醚组分主要为白术内酯类成分;树脂醇洗组分主要为一些聚炔类化合物;树脂水洗组分含有5-羟甲基糠醛和小分子糖等化合物;粗糖组分主要成分为低聚果糖。

2.2.2 白术拆分组分对大鼠利尿作用研究 按其文献中白术各拆分收率,用0.5%的CMC-Na混悬液将白术各拆分组分混悬至相应浓度即可^[7]。各组按规定剂量灌胃给药,连续给药9 d。第9天给药前禁食不禁水24 h,按照2.1项下进行实验。

2.2.3 红细胞和肾髓中 Na^+/K^+ -ATP酶活力测定 末次给药后,取血, $3000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,取下层红细胞200 μL ,0.9%氯化钠溶液吹洗3次,加入800 μL 双蒸水,37℃水浴1 h,制备溶血液,备用。红细胞 Na^+/K^+ -ATP酶活性的测定根据血红蛋白测

定试剂盒(叠氮高铁法)和超微量 ATP 酶($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)测试盒使用说明,分别测定血红蛋白含量和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性。

将大鼠处死后,解剖,取整个右肾内髓部分,用 0.9% 氯化钠溶液匀浆处理得 2% 肾髓组织液,3000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,吸取上清液。根据考马斯亮蓝测定试剂盒和不高速 ATP 酶测试盒使用说明,分别测定 2% 组织液总蛋白含量和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性。

2.2.4 尿液中 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 排出量测定 采集 6 h 内尿液,离心,得上清液,待测。采用日立 7600 全自动生化仪的电解质分析模块,用所配标准液定标,测定各配质控品,结果处于质控数值范围内。通过离子选择电极法(ISE)测定 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 浓度,再通过换算得到各组大鼠的 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 排出量。

2.2.5 血尿素氮含量测定 末次给药后,取血,室温静置 30 min,3000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,制备血清,按照尿素氮试剂盒说明书操作步骤测定尿素氮。

2.2.6 碳酸酐酶的测定 将大鼠处死后,解剖,取左肾的髓部,用 0.9% 氯化钠溶液洗净,吸干水分称重,按照 1:9 加入 0.9% 氯化钠溶液,于组织匀浆机制作匀浆,3000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,吸取上清液, -20°C 保存,待测 CA。按照 CA Elisa 试剂盒说明书

操作步骤进行测定。

2.3 统计方法

将各组数据,通过 SPSS17.0 软件统计,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示;多组数据比较时,采用单因素方差分析进行比较,先进行正态性和方差齐性检验,检测同时满足正态性和方差齐性,用 LSD 检验;检测不同时满足正态性和方差齐性,用 Dunnett T3 检验。

3 结果

3.1 不同剂量白术水煎液对大鼠利尿作用结果

由表 1 知,与空白对照组相比,白术 1、3 倍剂量组无统计学差异($P > 0.05$),而白术 6 倍剂量组在 0~3 h 内尿量显著性降低($P < 0.05$),该结果提示白术 6 倍水煎液有一定的抗利尿作用。

3.2 白术拆分组对大鼠利尿作用结果

由表 2 可知,与空白对照组相比,白术 6 倍挥发油组在 0~3h 及 6 h 内总尿量均显著降低($P < 0.01$);该结果提示白术 6 倍挥发油组分对大鼠有一定抗利尿作用;其余各白术 6 倍拆分组在 0~3、3~6 h 及总尿量均无统计学差异($P > 0.05$)。

表 1 不同剂量白术水煎液对大鼠利尿作用结果($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

分组	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	3 h	3~6 h	总量
空白对照组		7.40 $\pm$ 2.11	3.59 $\pm$ 0.97	10.99 $\pm$ 2.93
阳性对照组	8.33 $\times 10^{-3}$	9.59 $\pm$ 1.79 **	2.67 $\pm$ 0.69	12.26 $\pm$ 2.12
白术 1 倍剂量组	1.20	6.46 $\pm$ 1.95	3.80 $\pm$ 0.94	10.26 $\pm$ 2.74
白术 3 倍剂量组	3.60	7.22 $\pm$ 1.87	3.91 $\pm$ 1.16	11.13 $\pm$ 2.23
白术 6 倍剂量组	7.20	5.73 $\pm$ 1.30 *	3.96 $\pm$ 1.47	9.82 $\pm$ 2.12

注:与空白对照相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;下同。

表 2 白术拆分组对大鼠利尿作用结果($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

分组	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	3 h	3~6 h	总量
空白对照组(NO)		7.86 $\pm$ 2.12	2.80 $\pm$ 1.02	10.66 $\pm$ 2.31
阳性对照组(PO)	8.33 $\times 10^{-3}$	10.48 $\pm$ 1.39 **	2.52 $\pm$ 1.08	13.00 $\pm$ 1.43 *
白术 6 倍剂量组(WD)	7.20	5.65 $\pm$ 1.74 *	2.57 $\pm$ 0.83	8.22 $\pm$ 2.33 *
白术 6 倍石油醚组(PEF)	6.18 $\times 10^{-2}$	8.10 $\pm$ 0.98	2.87 $\pm$ 0.88	10.97 $\pm$ 1.47
白术 6 倍挥发油组(VOF)	6.22 $\times 10^{-2}$	5.84 $\pm$ 1.67 *	2.81 $\pm$ 1.39	8.65 $\pm$ 2.29 *
白术 6 倍树脂醇洗组(AEF)	1.47 $\times 10^{-2}$	7.25 $\pm$ 2.20	2.94 $\pm$ 0.98	10.19 $\pm$ 2.21
白术 6 倍树脂水洗组(WEF)	2.35	7.17 $\pm$ 2.16	2.85 $\pm$ 0.58	10.02 $\pm$ 2.42
白术 6 倍粗多糖组(CPF)	2.64	7.15 $\pm$ 2.03	2.72 $\pm$ 0.79	9.87 $\pm$ 2.59

3.3 白术拆分组对红细胞和肾髓中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力的影响

由图1知,与空白对照相组比,白术及其各拆分组中大鼠的红细胞和肾髓中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力无统计学差异($P > 0.05$)。

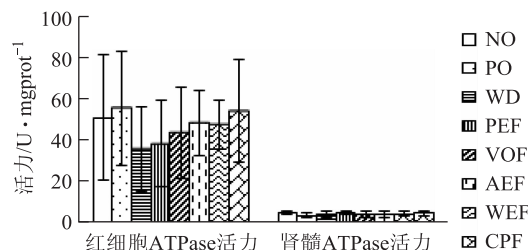


图1 白术拆分组对红细胞和肾髓 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力的影响

3.4 白术拆分组对大鼠尿液6 h内 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 排出量的影响

由图2知,与空白对照组相比,在白术6倍粗多糖组显著增加($P < 0.05$),白术6倍剂量组显著增加($P < 0.01$);在 Na^+ 排量上,白术6倍挥发油组显著增加($P < 0.05$),白术6倍剂量组、白术6倍树脂水洗组和白术6倍粗多糖组显著增加($P < 0.01$);在 Cl^- 排量上,白术石油醚组、白术6倍树脂水洗组和白术6倍粗多糖组显著增加($P < 0.05$),白术6倍剂量组显著增加($P < 0.01$);在 Na^+/K^+ 上,白术6倍挥发油组显著增加($P < 0.05$)。

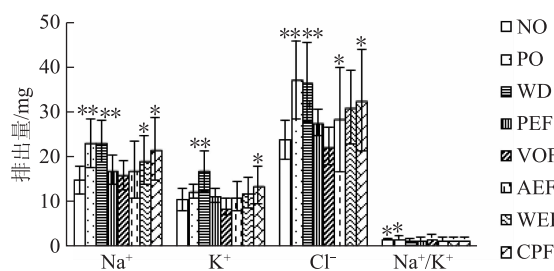


图2 白术拆分组对大鼠尿液6 h内 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 排出量的影响

3.5 白术拆分组对血清中尿素氮的影响

由图3知,与空白对照组相比,白术及其各拆分组对大鼠血液中尿素氮含量无统计学差异($P > 0.05$),该结果提示白术及其拆分组对大鼠肾小球滤过功能无明显影响。

3.6 白术拆分组对肾髓中 CA 水平的影响

由图4知,与空白对照相组比,白术及各拆分

组中大鼠肾髓中碳酸酐酶浓度无统计学差异($P > 0.05$)。

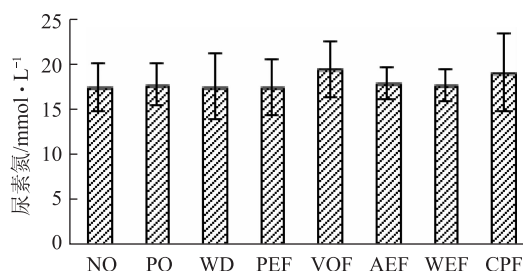


图3 白术及其拆分组对血清中尿素氮的影响

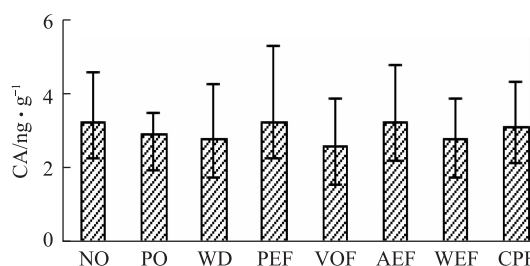


图4 白术拆分组对大鼠 CA 水平的影响

4 讨论

白术为常用中药,素有“十方九用”、“南术北参”之称。作者以大鼠为实验对象,研究表明连续灌胃给药时,相当于生药 $1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (相当于临床成人用药1倍量)和 $3.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 白术水煎液组中大鼠排尿量无显著变化,而相当于生药 $7.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 白术水煎液组中大鼠尿量显著降低。该结果提示高剂量白术($7.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)对正常大鼠有一定的抗利尿作用。该结果进一步证实了施文荣等^[6]报道的白术低、高剂量水煎液连续给药时对小鼠有一定的抗利尿作用。我们进一步研究了白术高剂量($7.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)下各拆分组的利尿作用,以探究白术利尿作用的有效物质。结果尚未证实如陈敏珠等^[5]报道的白术利尿作用的有效成分可能为两部分,一部分为脂溶性的挥发油,一部分为水溶性的有机物,相反作者发现白术挥发油对正常大鼠有一定的抗利尿作用。

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶是对细胞内外钠和钾离子进行交换的酶,对维持细胞内 Na^+ 、 K^+ 浓度的相对恒定、保持细胞内外环境适当的渗透压平衡等具有重要意义。红细胞 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力和肾髓 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力测定结果研究表明白术及其拆分组对 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力没有显著影响,提示白术并非通过抑制 Na^+ 与 K^+ 交换从而影响细胞内外渗透压产生抗利尿作用。尿液的形成包括肾小球滤过、

肾小管和集合管的重吸收及分泌。笔者对血中尿素氮浓度测定结果表明白术及其拆分组分对肾小球的滤过率无显著影响。碳酸酐酶主要作用为 $\text{H}^+ - \text{Na}^+$ 交换,碳酸酐酶抑制时 H^+ 排出量减少, Na^+ 量排出量增多而产生利尿作用。肾髓碳酸酐酶浓度检测结果表明白术及其拆分组分对碳酸酐酶浓度无显著影响。同时我们对各组大鼠 6 h 内 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 排出量进行了检测,鉴于白术及其拆分组分对大鼠 6 h 内尿量作用结果显示白术 6 倍剂量组和挥发油组呈现抗利尿作用,因此我们主要讨论白术 6 倍剂量组和挥发油组 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 排出量与空白对照组和阳性对照组的差别。氢氯噻嗪为 $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ 同向转运抑制剂,主要作用于远曲小管近端的 $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ 同向转运体,减少 Na^+ 、 Cl^- 的重吸收,主要的利尿机制为增加尿钠、钾、氯等离子排泄,这一点在本实验结果中也得到证实。白术 6 倍剂量对 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 排出量显著增加,与氢氯噻嗪相比,其白术 6 倍量对 K^+ 排出量作用更强。挥发油组分对 Na^+ 排出量显著增加,而 K^+ 、 Cl^- 排出量无明显影响,与氢氯噻嗪相比,在 Na^+/K^+ 比值上作用更强。由此我们可知白术 6 倍量和挥发油与氢氯噻嗪对大鼠 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 排出量具有一定相似性,都能促进电解质的排泄,且挥发油能显著增加 Na^+/K^+ 比值,但白术水煎液和挥发油组分药理作用表现为抗利尿作用而非利尿作用;这可能与白术药理作用较多有关,虽对机体电解质具有一定促进作用,但并非通过促进电解质排泄产生利尿或抗利尿作用。以上结果我们可推断白术的抗利尿作用并非通过影响 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的活性、尿液的生成和电解质的排泄而实现,可能是通过调节消化液的分泌、胃肠运动、消化道水的吸收、粪便排泄等其他间接途径实现的。

综上所述,本文首次对白术各拆分组分的利尿作用研究,尚未证实白术的利尿作用,相反得出白术对正常大鼠有一定的抗利尿作用,且首次研究发现白术挥发油有一定的抗利尿作用;白术抗利尿作用的相关机制尚不明确,有待进一步研究。

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,2015:103-104.
- [2] 李伟,文红梅,崔小兵,等. 白术健脾有效成分研究[J]. 南京中医药大学学报,2006,22(6):366-367.
- [3] 张奕强,许实波. 白术内酯系列物的胃肠抑制作用[J]. 中药材,1999,22(12):636-640.
- [4] 黄玉燕,丁昕宇,孙伟,等. 白术水煎剂外用对致炎小鼠血清 $\text{TNF-}\alpha$ 含量的影响[J]. 北京中医药大学学报,2005,28(6):57-58.
- [5] 陈敏珠,张毅. 白术的利尿作用[J]. 生理学报,1961,24(3):227-237.
- [6] 施文荣,刘艳,陈玲,等. 白术燥湿利水作用的研究[J]. 福建中医学院学报,2007,17(3):29-31.
- [7] 李玲辉,冉小库,徐煜彬,等. 白术组分拆分及组间差异度评价方法的建立[J]. 分析化学,2014,42(3):343-348.
- [8] Zhe Lin, Yan Fang Liu, Yang Qu, et al: Characterisation of oligosaccharides from Baizhu by HILIC-MS[J]. J Natural Product Research,2015,29(13):1194-1200.
- [9] 王艳宏,王秋红,夏永刚,等. 麻黄化学拆分组分的性味药理学评价[J]. 中国中医药科技,2011,18(6):489-491.
- [10] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2001:1123-1124.
- [11] 李森,谢人明,孙文基. 茯苓、猪苓、黄芪利尿作用比较[J]. 中药材,2010,33(2):264-267.

(收稿日期 2015-07-05)