

茯苓对阴虚水肿模型大鼠及其热象的影响

冯 静¹, 李玲玲¹, 崔 瑛^{1,2*}

1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450000

2. 河南呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南 郑州 450046

摘要: **目的** 观察茯苓对阴虚水肿模型大鼠的影响, 研究茯苓利尿作用特点及机制, 并评价茯苓对阴虚水肿所表现出热象的影响。 **方法** 尾 iv 阿霉素联合 ig 甲状腺片复制阴虚水肿模型大鼠, 给予茯苓水煎液或六味地黄丸干预 4 周, 观察大鼠水肿情况和一般生长状态, 检测 24 h 尿量和尿蛋白, 测量肛温, 进行冷热板实验计算热板停留时间比; 检测血清总蛋白 (total cholesterol, TP)、白蛋白 (albumin, Alb)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、肌酐 (creatinine, Cr)、环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP)、环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 水平; 测定肾组织超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性及活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平; 苏木素-伊红 (HE) 染色观察肾组织病理变化; Western blotting 检测肾脏组织 Klotho 和棕色脂肪组织中解偶联蛋白 1 (uncoupling protein 1, UCP1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助激活因子-1 α (peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 蛋白表达; qRT-PCR 检测肾脏组织 Klotho 和棕色脂肪组织中 UCP1、PGC-1 α mRNA 表达。 **结果** 茯苓可使模型大鼠水肿情况好转, 显著增加 24 h 尿量 ($P<0.05$), 减小 24 h 尿蛋白 ($P<0.05$); 显著升高血清中 TP、Alb ($P<0.05$), 降低 BUN、Cr ($P<0.05$); 显著升高肾脏 SOD 活性 ($P<0.05$), 降低 MDA、ROS 水平 ($P<0.05$); 对大鼠肛温、热板停留时间比、血清中 cAMP、cGMP 水平及 cAMP/cGMP 值无明显影响; 显著上调肾脏 Klotho mRNA 及蛋白表达 ($P<0.05$), 对棕色脂肪组织 UCP1、PGC-1 α mRNA 及蛋白表达无明显影响; 光镜下可见肾小球系膜增生改善, 系膜基质减少。 **结论** 在阴虚水肿模型大鼠上, 茯苓通过抗氧化应激改善阿霉素诱导的肾损伤而表现出利尿作用, 但茯苓对病证的热象无明显影响。

关键词: 茯苓; 利尿功效; 阿霉素; 阴虚水肿; 热证; 抗氧化应激

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)02-0586-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.02.026

Effect of *Poria cocos* on *yin* deficiency edema rats and heat syndrome

FENG Jing¹, LI Ling-ling¹, CUI Ying^{1,2}

1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

2. Co-construction of Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan & Education Ministry of P. R. China, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To observe the effect of *Poria cocos* on *yin* deficiency edema model rats, study the characteristics and mechanism of *P. cocos* diuresis, and evaluate the effect of *P. cocos* on *yin* deficiency edema. **Methods** Adriamycin was injected into tail vein and thyroxine tablets were given by gavage to replicate *yin* deficiency edema model rats. *P. cocos* decoction or Liuwei Dihuang Pills (六味地黄丸) was given by gavage for four weeks. The edema and general growth state of rats were observed, urine volume and proteinuria in 24 h were detected, anal temperature was measured, and residence time ratio of hot plate was calculated by cold-hot plate experiment. Serum total protein (TP), albumin (Alb), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr), cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) were detected. The activity of superoxide dismutase (SOD) and levels of reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) in kidney tissue were measured. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of kidney tissue. Western blotting was used to detect Klotho protein expression in kidney and uncoupling protein 1 (UCP1), peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) protein expressions in brown

收稿日期: 2022-09-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82204639)

作者简介: 冯 静, 硕士, 讲师, 主要从事中药药性及配伍研究。E-mail: fjhatcm@163.com

*通信作者: 崔 瑛, 博士, 教授, 主要从事中药功效及药性研究。Tel: (0371)65762746 E-mail: cyexin@126.com

adipose tissue. qRT-PCR was used to detect *Klotho* mRNA expression in kidney and *UCP1*, *PGC-1 α* mRNA expressions in brown adipose tissue. **Results** *P. cocos* improved the edema of model rats, significantly increased 24 h urine volume ($P < 0.05$), decreased 24 h urine protein ($P < 0.05$). Serum TP and ALB were significantly increased ($P < 0.05$), BUN and Cr were decreased ($P < 0.05$). Activity of SOD in kidney was significantly increased ($P < 0.05$), levels of MDA and ROS were decreased ($P < 0.05$); There was no significant effect on anal temperature, hot plate retention time ratio, serum cAMP and cGMP levels and cAMP/cGMP in rats. *Klotho* mRNA and protein expressions in kidney were significantly increased ($P < 0.05$), but *UCP1* and *PGC-1 α* mRNA and protein expressions in brown adipose tissue were not significantly affected. Microscopically, glomerular mesangial hyperplasia was improved and mesangial matrix was decreased. **Conclusion** *P. cocos* can improve the kidney injury induced by doxorubicin through antioxidant stress in *yin* deficiency edema model rats, but it has no obvious effect on the thermal image of disease.

Key words: *Poria cocos* (Schw.) Wolf; diuretic effect; adriamycin; *yin* deficiency edema; heat syndrome; oxidative stress

茯苓首载于《神农本草经》，为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核，味甘、淡，性平，具有利水渗湿、健脾、宁心的功效，临床主要用于水肿尿少等病症^[1]。现代药理研究表明，茯苓具有利水、抗氧化、抗炎等多种药理作用^[2-3]。茯苓利水功效研究显示，正常人 *po* 或实验犬 *ig* 茯苓水煎剂，茯苓无明显的利尿作用^[4]。这提示茯苓的利尿作用是条件性效应，即在水负荷或水液代谢障碍时才表现出利尿作用，但目前对此作用特点尚缺乏深入研究。同时，茯苓性平，根据本课题组前期提出的平性“有性无功”的观点^[5]，推测茯苓治水肿，但对水肿之寒或热并无明显影响。

为了明确茯苓利水作用的特点及对病症寒热的影响，本研究采用尾 *iv* 阿霉素联合 *ig* 甲状腺片的方法制作阴虚水肿动物模型^[6-7]，通过考察茯苓对阿霉素肾病水肿模型的影响，阐明茯苓利水作用特点及机制；同时，通过茯苓对阴虚证所表现出热象的影响，为“有性无功”的观点提供实验支持。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只，8 周龄，体质量 (200±20) g，由北京维通利华实验动物技术有限公司提供，动物许可证号 SCXK (京) 2016-0006。动物分笼饲养于河南中医药大学动物实验室，室温 (23±2) °C，相对湿度 (55±5) %，自然光环境下大鼠自由进食饮水，笼具、垫料、饮用水等定期更换清洁。动物实验经河南中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 DWLL201903243)。

1.2 药材

茯苓 (批号 YP06-2009223，产地安徽) 购自河南张仲景大药房股份有限公司，经河南中医药大学陈随清教授鉴定为多孔菌科真菌茯苓 *P. cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核。

1.3 药品与试剂

阿霉素 (批号 2011E1) 购自深圳万乐药业有限公司；甲状腺片 (批号 37021098) 购自山东仁和制药有限公司；六味地黄丸 (批号 41022128) 购自仲景宛西制药股份有限公司；BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 20171114)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 试剂盒 (批号 20180516)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (批号 20180320)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号 20180216)、肌酐 (creatinine, Cr) 试剂盒 (批号 20171211)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 试剂盒 (批号 20180709)、血清总蛋白 (total cholesterol, TP) 试剂盒 (批号 201800724)、白蛋白 (albumin, Alb) 试剂盒 (批号 20190518) 购自南京建成生物工程研究所；环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 试剂盒 (批号 E20190112A)、环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 试剂盒 (批号 E20181201A) 购自江苏卡尔文生物技术有限公司；*Klotho* 一抗 (批号 30886-1-Ig)、解偶联蛋白 1 (uncoupling protein 1, UCP1) 一抗 (批号 14179-2-R)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助激活因子-1 α (peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 一抗 (批号 15320-1-AP)、 β -actin 一抗 (批号 1684-2-AJ)、羊抗兔二抗 (批号 IH-2101) 均购自北京博奥森生物技术有限公司；电泳缓冲液 (批号 20190909) 购自上海雅酶生物科技有限公司；蛋白 Marker (批号 708R053) 购自美国 Merck Millipore；PVDF 膜 (批号 R9JA55292) 购自北京北化精细化学公司。

1.4 仪器

IVC-II 型大鼠独立送风隔离笼具、大鼠代谢笼 (苏州冯氏实验动物设备有限公司)；M800-4AL 型全自动生化分析仪 (深圳雷杜生命科技有限公司)；

S3M812R 型凝胶成像和化学发光图像分析系统(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); SDS PAGE 凝胶电泳及转膜电泳仪、Real-Time PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司); LRB003 型冷热板动物行为示差检测仪(北京圆融科技有限公司); RM2016 型病理切片机(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 茯苓水煎液的制备

茯苓饮片加 10 倍量蒸馏水浸泡 30 min, 煎煮 30 min, 4 层纱布滤过, 收集滤液; 第 2 次加 8 倍量蒸馏水煎煮 30 min, 4 层纱布滤过后收集滤液。将 2 次滤液合并, 于旋转蒸发仪中低温旋蒸, 浓缩成含生药 2 g/mL 的茯苓水提液。经 HPLC 分析, 水煎液中未检测出三萜类成分, 主要成分为多糖类。采用苯酚-硫酸法^[8]测定茯苓中水煎液中多糖质量分数为 0.21%。

2.2 阴虚水肿模型的建立

40 只大鼠适应性喂养 7 d 后, 随机选取 8 只为对照组, 其余 32 只大鼠分别于第 1 天和第 8 天尾 iv 阿霉素 4.5、3.0 mg/kg, 同时连续 ig 甲状腺片(150 mg/kg) 21 d。造模完成后收集大鼠 24 h 尿液, 检测尿蛋白。与对照组相比, 24 h 尿蛋白升高有统计学意义者视为造模成功^[6-7]。32 只大鼠造模后 24 h 尿蛋白均出现显著升高, 纳入后续研究。

2.3 分组与给药

除对照组外, 32 只造模成功大鼠随机分为模型组、六味地黄丸(0.6 g/kg)组和茯苓高、低剂量(18、12 g/kg)组, 每组 8 只。各给药组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续 28 d。

2.4 大鼠肛温及冷热趋向的测定

给药 28 d 后测量大鼠肛温, 并在冷热板动物行为示差检测仪上进行大鼠冷热趋向的测定。设置冷热板自动温控系统的不同温度区, 低温板 20 °C、高温板 39 °C。摄像跟踪软件观察、记录 10 min 内冷热温区活动情况、热板停留时间, 并计算热板停留时间比。

热板停留时间比 = 高温区停留时间/总观测时间

2.5 大鼠 24 h 尿量和尿蛋白含量测定

给药 28 d 后分别将大鼠置于代谢笼, 收集 24 h 尿液, 记录尿量, 并检测大鼠 24 h 尿蛋白。

2.6 大鼠血清相关生化指标检测

大鼠麻醉后腹主动脉采血, 3500 r/min 离心 10 min, 收集上层血清, 按试剂盒说明书测定 TP、Alb、

BUN、Cr、cAMP、cGMP 水平。

2.7 肾组织氧化应激损伤检测

取各组大鼠肾组织适量, 置于 0 °C 冰浴中研磨匀浆, 3500 r/min 离心, 取上清, 按试剂盒说明书测定 SOD 活性及 ROS、MDA 水平。

2.8 苏木素-伊红(HE)染色观察肾脏组织病理

各组大鼠肾脏组织经 10% 甲醛溶液固定后, 常规方法脱水、透明、浸蜡并包埋, 切片机连续切片(5 μm), 切片经展片、捞片和烘片后, 进行 HE 染色, 于显微镜下观察肾脏组织病理变化。

2.9 Western blotting 检测棕色脂肪组织 UCP1、PGC-1α 及肾脏 Klotho 蛋白表达

分别取各组大鼠肩胛区棕色脂肪组织和肾脏, 加入裂解液处理, 提取蛋白, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 于脱脂牛奶中封闭 1 h, 用 TBST 缓冲液漂洗 3 次, 加入相应一抗, 4 °C 孵育过夜; 用 TBST 缓冲液漂洗 3 次, 加入二抗, 4 °C 孵育 2 h, 显影、定影后, 采用凝胶成像系统扫描, 并对蛋白条带灰度值进行分析。

2.10 qRT-PCR 检测棕色脂肪组织 UCP1、PGC-1α 及肾脏 Klotho mRNA 表达

分别取各组大鼠肩胛区棕色脂肪组织和肾脏, 按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'-3')
<i>β-actin</i>	F: TCAGGTCATCACTATCGGCAAT R: AAAGAAAGGGTGTAACGCA
<i>Klotho</i>	F: TTTGCCCTATTTCACCGAAG R: CCTGACTGGGAGAGTTGAGC
<i>UCP1</i>	F: GAAGGTCGGTGTGAACGG ATT R: TTGGTGTACATGGACATCGCA
<i>PGC-1α</i>	F: AAGTGTGGAAGTCTCTGGAAGT R: GGGTTATCTTGGTTGGCTTTATG

2.11 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计学分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 大鼠一般情况观察

与对照组比较, 造模后的大鼠普遍出现不同程度的四肢及睾丸部位水肿、尿少、食量下降、腹泻、活动减少、体重减轻等阿霉素肾病的表现, 同时伴有精神萎靡、暴躁、易激怒、肛温升高等热象(阴

虚证) 临床表现; 给予六味地黄丸和茯苓后, 大鼠水肿情况日益好转, 体质量逐渐增加, 大便形态恢复正常; 六味地黄丸组大鼠躁动不安、肛温升高等内热表现有所改善, 而茯苓高、低剂量组大鼠此类症状改善不明显。

3.2 茯苓水煎液对阴虚水肿模型大鼠 24 h 尿蛋白和尿量的影响

如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠 24 h 尿蛋白显著升高 ($P<0.01$), 24 h 尿量显著减少 ($P<0.01$); 与模型组比较, 六味地黄丸组和茯苓高剂量组 24 h 尿蛋白显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), 24 h 尿量显著增加 ($P<0.05$ 、 0.01), 茯苓低剂量组 24 h 尿量显著增加 ($P<0.05$)。

3.3 茯苓水煎液对阴虚水肿模型大鼠血清生化指标的影响

如表 3 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 Alb、TP 显著降低 ($P<0.01$), Cr、BUN 显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠血清

中 Alb、TP 显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), Cr、BUN 显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.4 茯苓水煎液对阴虚水肿模型大鼠肾脏氧化应激损伤的影响

如表 4 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠肾脏

表 2 茯苓水煎液对阴虚水肿模型大鼠 24 h 尿蛋白和尿量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of *P. cocos* decoction on 24 h urinary protein and urine volume in *yin* deficiency edema model rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	24 h 尿蛋白/(mg·kg ⁻¹)	24 h 尿量/mL
对照	—	5.88±0.93	52.21±5.47
模型	—	80.90±17.03**	13.73±1.94**
六味地黄丸	0.6	43.33±6.24 ^{##}	45.82±5.38 ^{##}
茯苓	18	62.84±4.67 [#]	41.20±5.17 [#]
	12	71.59±8.69	39.85±5.33 [#]

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$

^{##} $P<0.01$, 下表同

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group, same as below tables

表 3 茯苓水煎液对阴虚水肿模型大鼠血清生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of *P. cocos* decoction on biochemical indicators in serum of *yin* deficiency edema model rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Alb/(g·L ⁻¹)	TP/(g·L ⁻¹)	Cr/(μmol·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	29.11±3.84	68.77±11.04	56.78±7.40	5.94±0.95
模型	—	18.92±2.19**	34.37±4.41**	100.70±14.33**	12.94±1.58 ^{##}
六味地黄丸	0.6	27.12±2.11 ^{##}	56.39±7.72 ^{##}	61.31±8.32 ^{##}	6.99±0.71 ^{##}
茯苓	18	22.81±3.33 [#]	47.41±8.62 [#]	78.91±7.65 [#]	8.16±1.05 [#]
	12	21.62±2.92 [#]	43.69±8.86 [#]	82.88±7.59 [#]	9.31±1.45 [#]

表 4 茯苓水煎液对阴虚水肿模型大鼠肾脏氧化应激的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of *P. cocos* decoction on oxidative stress in kidney of *yin* deficiency edema model rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(μmol·g ⁻¹)	ROS/(U·mg ⁻¹)
对照	—	165.96±33.83	6.78±1.82	196.21±12.59
模型	—	77.92±19.68**	11.48±2.83**	301.39±21.38**
六味地黄丸	0.6	156.98±32.03 ^{##}	7.22±1.71 [#]	221.02±14.23 [#]
茯苓	18	147.89±26.62 ^{##}	8.08±1.44 [#]	249.13±29.36 [#]
	12	118.11±20.75 [#]	9.20±1.12 [#]	249.13±29.36 [#]

组织中 SOD 活性显著降低 ($P<0.01$), MDA、ROS 水平显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组 SOD 活性显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), MDA、ROS 水平显著降低 ($P<0.05$)。

3.5 茯苓水煎液对阴虚水肿模型大鼠肛温及冷热趋向的影响

如表 5 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠热板停留时间比显著下降 ($P<0.05$), 肛温显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 六味地黄丸组大鼠热板停留时间比显著增加 ($P<0.05$), 肛温显著降低 ($P<$

表 5 茯苓水煎液对阴虚水肿模型大鼠肛温及冷热趋向的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 Effect of *P. cocos* decoction on anal temperature and cold-hot tendency in *yin* deficiency edema model rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	热板停留时间比/%	肛温/℃
对照	—	47.25±3.52	37.11±0.26
模型	—	40.28±3.64*	37.84±1.72**
六味地黄丸	0.6	46.08±4.15 [#]	37.29±0.86 [#]
茯苓	18	42.95±4.27	37.77±1.47
	12	41.05±3.18	37.81±0.95

0.05); 茯苓高、低剂量组大鼠肛温、热板停留时间比无明显变化。

3.6 茯苓水煎液对阴虚水肿模型大鼠血清中 cAMP 和 cGMP 水平的影响

如表 6 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 cAMP 水平显著升高 ($P<0.05$), cGMP 水平显

著降低 ($P<0.01$), cAMP/cGMP 值显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 六味地黄丸组 cAMP 水平显著降低 ($P<0.01$), cGMP 水平显著升高 ($P<0.05$), cAMP/cGMP 值显著降低 ($P<0.05$); 茯苓高、低剂量组 cAMP、cGMP 水平及 cAMP/cGMP 值无显著变化。

表 6 茯苓水煎液对阴虚水肿模型大鼠血清中 cAMP 和 cGMP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Effect of *P. cocos* decoction on cAMP and cGMP levels in serum of *yin* deficiency edema model rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	cAMP/(nmol·L ⁻¹)	cGMP/(nmol·L ⁻¹)	cAMP/cGMP
对照	—	27.97±8.67	13.87±3.31	2.02±0.64
模型	—	35.87±9.52*	8.04±2.31**	4.46±0.49**
六味地黄丸	0.6	26.97±7.19 [#]	12.96±4.08 [#]	2.08±0.13 [#]
茯苓	18	38.25±7.50	7.04±2.99	5.43±0.28
	12	36.76±9.10	8.15±3.33	4.51±0.36

3.7 茯苓水煎液对阴虚水肿模型大鼠棕色脂肪组织 UCP1、PGC-1α 及肾脏 Klotho 蛋白表达的影响

如图 1 和表 7 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠棕色脂肪组织 UCP1 和 PGC-1α 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.01$), 肾脏 Klotho 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 六味地黄丸组棕色脂肪组织 UCP1 和 PGC-1α 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), 肾脏 Klotho 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$); 茯苓高、低剂量组棕色脂肪组织 UCP1 和 PGC-1α 蛋白表达无明显变化, 肾脏 Klotho 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$)。

3.8 茯苓水煎液对阴虚水肿模型大鼠棕色脂肪组织 UCP1、PGC-1α 及肾脏 Klotho mRNA 表达的影响

如表 8 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠棕色

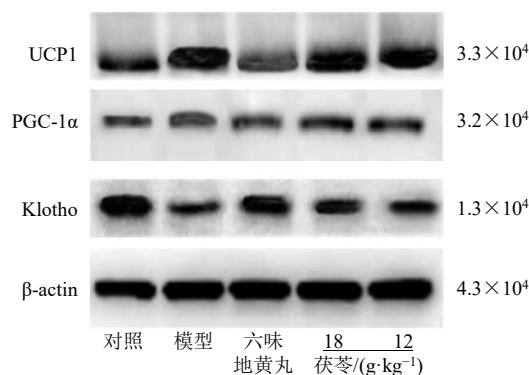


图 1 茯苓水煎液对阴虚水肿模型大鼠棕色脂肪组织 UCP1、PGC-1α 及肾脏 Klotho 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of *P. cocos* decoction on UCP1, PGC-1α protein expressions in brown adipose tissue and Klotho protein expression in kidney of *yin* deficiency edema model rats

表 7 茯苓水煎液对阴虚水肿模型大鼠棕色脂肪组织 UCP1、PGC-1α 及肾脏 Klotho 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 7 Effect of *P. cocos* decoction on UCP1, PGC-1α protein expressions in brown adipose tissue and Klotho protein expression in kidney of *yin* deficiency edema model rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量		
		UCP1	PGC-1α	Klotho
对照	—	1.16±0.09	1.29±0.04	1.27±0.12
模型	—	1.62±0.06**	1.54±0.04**	0.65±0.03**
六味地黄丸	0.6	1.31±0.07 [#]	1.36±0.08 [#]	1.08±0.08 [#]
茯苓	18	1.69±0.10	1.71±0.05	0.86±0.05 [#]
	12	1.49±0.11	1.49±0.12	0.79±0.07 [#]

表 8 茯苓水煎液对阴虚水肿模型大鼠棕色脂肪组织 UCP1、PGC-1α 及肾脏 Klotho mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 8 Effect of *P. cocos* decoction on UCP1, PGC-1α mRNA expressions in brown adipose tissue and Klotho mRNA expression in kidney of *yin* deficiency edema model rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量		
		UCP1	PGC-1α	Klotho
对照	—	0.98±0.03	1.00±0.06	1.18±0.08
模型	—	1.43±0.06**	1.28±0.11**	0.55±0.09**
六味地黄丸	0.6	1.21±0.04 [#]	1.09±0.05 [#]	0.94±0.09 [#]
茯苓	18	1.68±0.10	1.36±0.08	0.81±0.05 [#]
	12	1.33±0.11	1.23±0.06	0.79±0.09 [#]

脂肪组织 *UCP1* 和 *PGC-1 α* mRNA 表达水平均显著升高 ($P<0.01$), 肾脏 *Klotho* mRNA 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 六味地黄丸组大鼠棕色脂肪组织 *UCP1* 和 *PGC-1 α* mRNA 表达水平均显著降低 ($P<0.01$), 肾脏 *Klotho* mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.01$); 茯苓高、低剂量组大鼠棕色脂肪组织 *UCP1* 和 *PGC-1 α* mRNA 表达水平无明显变化, 肾脏 *Klotho* mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.05$)。

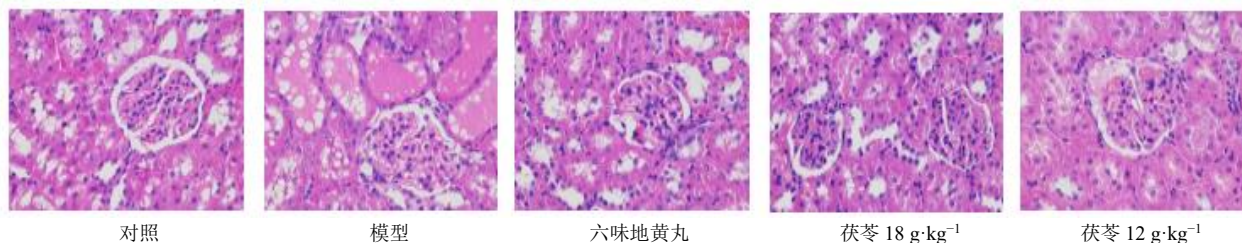


图 2 茯苓水煎液对阴虚水肿模型大鼠肾组织病理变化的影响 (HE, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of *P. cocos* decoction on pathological changes of kidney tissue in *yin* deficiency edema model rats (HE, $\times 400$)

4 讨论

茯苓性平, 是中医临床常用的利水渗湿药。本研究通过考察茯苓对阴虚水肿模型大鼠的影响, 阐明茯苓利水作用特点及机制, 并对其平性的作用进行初步评价。阿霉素水肿模型是目前较为经典的肾病水肿动物模型^[9]。阿霉素是一种含醌的蒽环类抗肿瘤抗生素, 具有肾毒性, 氧化应激是阿霉素诱发肾脏损伤的重要途径^[10-11]。阿霉素在体内转化产生的大量 ROS, 从而诱导肾小球上皮细胞发生脂质过氧化反应, 破坏肾小球基底膜滤过屏障, 肾功能受损, 过多的血液蛋白质渗入尿液, 血浆胶体渗透压下降, 水分子从血管腔内进入组织间隙, 从而引发水肿^[12-13]。结果显示, 茯苓可改善模型大鼠水肿情况, 显著降低 24 h 尿蛋白, 升高血清 TP, 表现出利水作用; 同时显著降低血清 BUN、Cr, 改善肾功能; 显著降低肾脏 ROS、MDA 水平, 提高抗氧化酶 SOD 活性, 保护细胞不受过氧化物的损伤, 提示茯苓的利水作用与抗氧化应激从而改善阿霉素诱导的肾损伤密切相关。

研究表明, *Klotho* 与氧化应激有密切关系^[14-15]。*Klotho* 是 1997 年新发现的衰老相关基因, 位于人类第 13 号染色体上。*Klotho* 高表达可以显著降低 ROS 的产生, 进而减缓细胞或机体的氧化应激。*Klotho* 的分布具有组织特异性, 肾脏是 *Klotho* 基因和蛋白表达水平最高的器官^[16]。*Klotho* 与肾功能有着密切

3.9 茯苓水煎液对阴虚水肿模型大鼠肾组织病理变化的影响

如图 2 所示, 对照组肾组织无明显形态学异常; 与对照组比较, 模型组肾小球体积增大, 囊腔扩张, 球系膜基质增生, 有较多蛋白管型, 间质血明显管充血, 部分上皮细胞萎缩、坏死; 与模型组比较, 各给药组肾小球囊腔增大不明显, 球系膜增生、局灶性肾小球硬化有不同程度改善; 蛋白管型减少, 间质血管充血改善, 上皮细胞萎缩、坏死较少。

的关系, 肾损伤往往伴有 *Klotho* 表达下降; 而 *Klotho* 蛋白表达水平提高能减少 ROS 的产生, 从而抑制肾脏细胞氧化应激反应^[17], 发挥肾脏保护作用。结果表明, 茯苓可逆转阿霉素导致的大鼠肾脏 *Klotho* 表达降低。因此推测, 茯苓可通过改善阿霉素诱导的肾损伤而发挥利水作用, 其机制与上调 *Klotho* 表达而降低氧化应激水平有关。

根据传统中医认识, 茯苓性平。“平性”属四气内容中不可或缺的一部分, 平性药性虽然客观且独立存在, 但不能对疾病的寒热起到干预作用, 有其名而无其用, 即平性药性“有性无功”^[5,18]。因此理论推测茯苓对机体的寒热变化无明显影响。为了证实这种推测, 本研究评价了茯苓对阴虚水肿大鼠所表现出热象的影响, 阳性药物选择具有滋阴降火作用的六味地黄丸。中医认为“阴虚则热”, 故阴虚水肿属于热证类型水肿, 大鼠在水肿的同时伴有暴躁、易激怒、体温升高等热证表现。结合现代药理对寒热药性研究的结果, 寒凉性药物会引起降低组织耗氧和产热体温降低, 并表现出趋热性^[19-22], 同时伴有 cAMP 降低、cGMP 升高、cAMP/cGMP 值降低^[21-25]; 温热性药物则反之。而棕色脂肪组织中 *UCP1*、*PGC-1 α* 基因和蛋白表达差异可能是中药寒热药性影响机体能量代谢的分子机制^[26-27]。在寒冷或特定药物的干预下, 交感神经兴奋, 刺激 β -肾上腺素能受体, 直接活化与脂肪分化相关的重要转

录因子 PGC-1 α , 促白色脂肪棕色化, 使 UCP1 表达增加, 维持机体能量代谢平衡^[28]。本研究结果显示, 茯苓对模型大鼠肛温、热板停留时间比、血清中 cAMP、cGMP 水平及 cAMP/cGMP 值、棕色脂肪组织中 UCP1、PGC-1 α 表达无明显影响, 表明从生理、生化指标及分子机制水平茯苓对病证热象均未表现出明显的影响。因此认为, 茯苓对阴虚水肿之热象无明显治疗作用。

茯苓是临床常用的利水渗湿药物, 《中药学》教材称茯苓“可用于寒热虚实各种水肿”^[29-30]。本研究结果表明, 对于热证水肿, 茯苓可利水治水肿, 但不能解决阴虚之“热”; 而对于寒证水肿, 推测茯苓可利水治水肿, 但不能解决“寒”。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 187.
- [2] 马艳春, 范楚晨, 冯天甜, 等. 茯苓的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中医学报, 2021, 49(12): 108-111.
- [3] 邓桃妹, 彭代银, 俞年军, 等. 茯苓化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2703-2717.
- [4] 王琍文, 苏成业. 泽泻、猪苓、茯苓、桂枝及其复方五苓散的利尿作用 [J]. 大连医科大学学报, 1965(1): 40-46.
- [5] 李玲玲, 崔瑛. 平性的悖论与平性中药药味物质的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(2): 426-428.
- [6] 徐文峰, 何泽云, 唐群, 等. 阴虚水肿证大鼠模型的建立及猪苓汤的干预作用 [J]. 中医学报, 2018, 33(9): 1686-1689.
- [7] 徐文峰, 范元硕, 何泽云, 等. 阴虚证、水肿证、阴虚水肿证中医动物模型的造模方法及评价 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2018, 16(19): 51-53.
- [8] 康玉姿, 王维皓. 近红外漫反射法测定茯苓中水溶性多糖及碱溶性多糖 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(24): 80-83.
- [9] 贺升升, 李爱平, 张王宁, 等. 阿霉素肾病模型及其病理机制研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(22): 5426-5434.
- [10] Fan H Y, Yang M Y, Qi D, et al. Salvianolic acid A as a multifunctional agent ameliorates doxorubicin-induced nephropathy in rats [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 12273.
- [11] 黄梦兰, 马瑞莺, 肖宇, 等. 慢性肾脏病合并认知障碍大鼠模型的研究 [J]. 右江民族医学院学报, 2021, 43(5): 579-583.
- [12] Soltani Hekmat A, Chenari A, Alipanah H, et al. Protective effect of alamandine on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats [J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2021, 22(1): 31.
- [13] Wang M M, Ke Y Y, Li Y G, et al. The nephroprotective effects and mechanisms of rehmapicrogenin include ROS inhibition via an oestrogen-like pathway both *in vivo* and *in vitro* [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 138: 111305.
- [14] Franco M L, Beyerstedt S, Rangel É B. Klotho and mesenchymal stem cells: A review on cell and gene therapy for chronic kidney disease and acute kidney disease [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 14(1): 11.
- [15] Kale A, Sankrityayan H, Anders H J, et al. Klotho in kidney diseases: A crosstalk between the renin-angiotensin system and endoplasmic reticulum stress [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2021, 51(11): 250-257.
- [16] Zhou H, Pu S, Zhou H, et al. Klotho as potential autophagy regulator and therapeutic target [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 755-766.
- [17] 王呈, 刘丽秋. 阿托伐他汀对阿霉素肾病大鼠氧化应激及 klotho 蛋白表达的影响 [J]. 青岛大学学报: 医学版, 2021, 57(3): 450-454.
- [18] Liu L L, Wang Y N, Tan C, et al. Substance basis of warm nature of *Poria cocos* [J]. *Chin Herb Med*, 2020, 12(3): 316-325.
- [19] 赵兴业. 中药寒热药性生理生化评价指标的初步研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2007.
- [20] 周灿平, 赵艳玲, 王伽伯, 等. 基于动物温度趋向行为学评价初步建立中药寒热体质病理模型 [J]. 中医杂志, 2010, 51(10): 937-940.
- [21] 乐娜, 侯燕, 张建军, 等. 霍山石斛不同提取物对肾阴虚证和肾阳虚证小鼠温度趋向性、环核苷酸及甲状腺激素的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(2): 705-710.
- [22] 夏元枢, 魏国辉, 王振国, 等. 中药寒热药性研究方法综述 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(2): 990-992.
- [23] 吴国学, 李玉洁, 龚曼. 左归丸降低肾阴虚大鼠血清 cAMP/cGMP 比值与其抗氧化作用的关联性研究 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(7): 2831-2835.
- [24] 张慧玲, 邱鹏, 王花欣, 等. 小鼠虚热证模型和虚寒证模型的生物学表达特征研究 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(3): 1516-1520.
- [25] 王子晨. 外来新资源阿萨伊、玛咖中药寒热药性探析及实验研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [26] 王玥. 中药寒热量化评价细胞平台的构建—寒药银对肿瘤细胞的抑制作用观察 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
- [27] 周炜炜. UCP1/PGC-1 α 通路中药寒热药性相关的分子基础研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2018.
- [28] 杨玉娇, 王朋倩, 张淼, 等. 寒性与热性中药对小鼠棕色脂肪组织中产热调节蛋白 UCP1 基因和蛋白表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(4): 1679-1681.
- [29] 崔瑛, 张一听. 中药学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2020: 150.
- [30] 钟赣生. 中药学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 162.

[责任编辑 李亚楠]