

甘遂醋制前后对癌性腹水模型大鼠泻水逐饮功效比较

张 桥, 曹亮亮, 楼坚伟, 张 丽*, 丁安伟

南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心/中药资源产业化与方剂与创新药物国家地方联合工程研究中心,
江苏 南京 210023

摘 要: **目的** 考察甘遂醋制前后对癌性腹水模型大鼠泻水逐饮功效的差异。**方法** 以癌性腹水模型大鼠为研究对象, 呋塞米为阳性药, 分组连续 7 d 给生、醋甘遂粉末及醇提加水提物, 考察其对大鼠尿量, 腹水量, 尿钠、钾、氯离子水平, 尿液 pH 值, 肾素-血管紧张素 II-醛固酮系统 (RAAS), 抗利尿激素 (ADH) 水平的影响。**结果** 与模型组比较, 各给药组大鼠尿量显著增加 ($P < 0.05, 0.01$); 腹水量, 尿钠、钾、氯离子水平, 尿液 pH 值显著减少 ($P < 0.01$); 血清肾素 (PRA)、血管紧张素 II (Ang II)、醛固酮 (ALD)、ADH 水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。其中生、醋甘遂粉末给药功效最为显著, 且两组间无显著性差异。**结论** 生、醋甘遂均具显著的泻水逐饮功效, 对癌性腹水模型大鼠有良好的症状改善作用。

关键词: 生甘遂; 醋甘遂; 癌性腹水; 泻水逐饮; 肾素-血管紧张素 II-醛固酮系统 (RAAS); 抗利尿激素

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)14-2492-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.14.017

Comparative study on expelling water retention with drastic purgative of crude and vinegar stir-baked *Kansui Radix* in cancerous ascites rats

ZHANG Qiao, CAO Liang-liang, LOU Jian-wei, ZHANG Li, DING An-wei

Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, and National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: **Objective** To compare the function of expelling water retention with drastic purgative of crude and vinegar stir-baked *Kansui Radix* in cancerous ascites model rats. **Methods** Furosemide was taken as positive control drug, and the cancerous ascites model rats were respectively orally administered with powder of crude and vinegar stir-baked *Kansui Radix* and their alcohol and water extract for 7 d. The amounts of urine and ascites, the levels of urinary sodium, potassium, chlorideion, and pH value, and the contents of PRA, Ang II, ALD, and ADH in serum were investigated. **Results** Compared with model group, the amount of urine of each medication administration group significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), the amount of ascites, the levels of urinary sodium, potassium, chlorideion, and pH value ($P < 0.01$), and the contents of PRA, Ang II, ALD, and ADH in serum all showed a significant decrease ($P < 0.05, 0.01$). Among them, the groups which were administered with powder of crude and vinegar stir-baked *Kansui Radix* were the most significant, and there was no significant difference between the two groups. **Conclusion** The powders of crude and vinegar stir-baked *Kansui Radix* have a remarkable effect on expelling water retention with drastic purgative, and they could improve the symptom of cancerous ascites model rats.

Key words: crude *Kansui Radix*; vinegar stir-baked *Kansui Radix*; cancerous ascites; expelling water retention with drastic purgative; renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS); antidiuretic hormone

甘遂 *Kansui Radix* 为大戟科 (Euphorbiaceae) 植物甘遂 *Euphorbia kansui* T. N. Liouex T. P. Wang 的干燥块根^[1], 其性苦、寒, 有毒, 具泻水逐饮、消肿散

结功效。中医临床历代均采用醋制法降低其毒性, 缓和其峻猛之药性。本实验室前期研究表明, 与生甘遂比较, 醋甘遂对正常大鼠肝、胃、肠的毒性降

收稿日期: 2016-01-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30973940, 81373972); 江苏省“六大人才高峰”项目 (2010-YY-009); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (ysxk-2014); 江苏高校品牌专业建设工程资助项目 (PPZY2015A070)

作者简介: 张 桥 (1990—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药炮制与质量控制研究。Tel: 15895973680 E-mail: 18700081184@163.com

***通信作者** 张 丽, 博士生导师, 教授, 从事中药炮制与质量控制研究。Tel: (025)85811509 E-mail: zhangliguanxiong@163.com

低^[2-3]。同时与癌性腹水模型大鼠比较,醋甘遂对大鼠的肝、胃、肠毒性显著降低,表现为“有故无殒”^[4]。然而,甘遂醋制前后泻水逐饮活性是否存在差异尚缺少深入研究,故本实验以癌性腹水模型大鼠为研究对象,从尿量、腹水量,尿钠、钾、氯离子水平,尿液 pH 值及肾素-血管紧张素 II-醛固酮系统(RAAS)、抗利尿激素(ADH)方面考察生、醋甘遂粉末及其醇提加水提物泻水逐饮功效的差异,以期甘遂临床的合理应用提供依据。

1 材料

1.1 仪器及试剂

TDZ4-WS 台式低速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);全自动酶标仪(美国 Bio-Red 公司);羧甲基纤维素钠(CMC-Na,上海久亿化学试剂有限公司);水合氯醛(Kermel);氯化钠(国药集团化学试剂有限公司);呋塞米片(上海朝晖药业有限公司,批号 H31021074);钠离子、钾离子、氯离子、肾素(PRA)、血管紧张素 II(Ang II)、醛固酮(ALD)、ADH 试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 药材

甘遂药材购自陕西省宝鸡市眉县,经南京中医药大学唐于平教授鉴定为大戟科植物甘遂 *Euphorbia kansui* T. N. Liouex T. P. Wang 的干燥块根。

1.3 动物与细胞

雄性 SD 大鼠,SPF 级,体质量(230±20)g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,动物许可证号 SCXK(浙)2014-0001。Walker-256 大鼠腹水癌细胞株(乳腺癌细胞)购自上海拜力生物科技有限公司。

2 方法

2.1 生、醋甘遂粉末及醇提加水提物的制备

2.1.1 生甘遂粉末的制备 生甘遂打粉过 4 号筛,备用。HPLC-UV、UPLC-TQ-MS 测定含大戟醇 1.689 mg/g、3-O-(2'E,4'Z)-癸二烯酰基)-20-O-乙酰基巨大戟二萜醇 30.15 μg/g、甘遂萜酯 A 15.17 μg/g。

2.1.2 醋甘遂粉末的制备 将所购甘遂生品按照《中国药典》2015 年版一部附录 II D 醋炙法加醋拌匀闷透,待醋被吸尽后,炒锅加热至 260℃左右,翻炒 9 min 至颜色加深,略有焦斑,出锅放凉。每 100 kg 甘遂用醋 30 kg。打粉过 4 号筛备用,含大戟醇 1.462 mg/g、3-O-(2'E,4'Z)-癸二烯酰基)-20-O-乙酰基巨大戟二萜醇 16.40 μg/g、甘遂萜酯 A 12.74 μg/g。

2.1.3 生、醋甘遂醇提加水提物的制备 称取适量生、醋甘遂粉末(过 4 号筛),加 10 倍量 95%乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,趁热滤过,残渣加 10 倍量的水加热回流 2 次,每次 2 h,趁热滤过,合并 4 次滤液并浓缩至浸膏。生品浸膏含大戟醇 1.562 mg/g、3-O-(2'E,4'Z)-癸二烯酰基)-20-O-乙酰基巨大戟二萜醇 21.20 μg/g、甘遂萜酯 A 8.423 μg/g;醋品浸膏含大戟醇 1.406 mg/g、3-O-(2'E,4'Z)-癸二烯酰基)-20-O-乙酰基巨大戟二萜醇 1.17 μg/g、甘遂萜酯 A 3.321 μg/g。

生、醋甘遂粉末及浸膏临用前加 0.5% CMC-Na 溶解并稀释至 34 mg/mL(均按生药量计算)。

2.2 分组、造模及给药

将 SD 大鼠置于室温、通风的清洁级动物室中,自由摄食饮水,适应 3 d 后,仿 Aston^[5]利尿筛选法筛选符合标准的大鼠,进入正式实验。取合格 SD 大鼠 56 只,按体质量随机分为 7 组,每组 8 只,分别为对照组、模型组、阳性药(呋塞米片加 0.5% CMC-Na 制成 0.42 mg/mL 的药液,剂量为 4.2 mg/kg)组、生甘遂粉末组、醋甘遂粉末组、生甘遂提取物组、醋甘遂提取物组,甘遂各药物组剂量均为 340 mg/kg(生药计)。

将冻存的 Walker-256 细胞株 37℃复苏呈液态,1 000 r/min 离心 5 min,沉淀用生理盐水悬浮至细胞密度 1.2×10^8 /mL,每只大鼠注射 1 mL,进行传代,将传代后的腹水抽出进行细胞计数,用生理盐水稀释至细胞密度 1×10^7 /mL,再给除对照组外的其余大鼠进行 ip 接种,每只大鼠 ip 1 mL,复制癌性腹水模型。造模次日开始给药。对照组、模型组 ig 给予 0.5% CMC-Na,其余各组 ig 给予相应剂量药液,给药体积 10 mL/kg,每日 1 次,连续 7 d。

2.3 大体观察

给药后观察大鼠精神状态、行为活动、皮肤毛色、饮食状况、二便情况、死亡情况。

2.4 指标检测

2.4.1 对大鼠尿量,腹水量,尿钠、钾、氯离子水平及尿 pH 值的影响 第 4 天给药后,将大鼠置于代谢笼中,禁食不禁水,收集 24 h 尿液,测量尿液体积,测定尿液中钠、钾、氯离子水平及 pH 值。末次给药 1 h 后,取腹水,通过计算取腹水前后大鼠体质量的差值间接测量腹水量。

2.4.2 对大鼠血清 PRA、Ang II、ALD、ADH 水平的影响 第 7 天给药 1 h 后颈总动脉取血,静置 30 min 后,3 500 r/min 离心 10 min,取上清液备用。

血清 PRA、Ang II、ALD、ADH 测定按照试剂盒说明完成。

2.5 数据分析

实验数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 各组定量检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差 (One-Way ANOVA) 分析, 组间比较采用 LSD 检验。数据方差不齐, 不满足 t 检验条件时, 采用 Wilcoxon 秩和检验。

3 结果

3.1 对大鼠一般情况的影响

实验过程中无大鼠死亡。对照组大鼠精神状态良好, 毛发光泽, 行动敏捷, 二便正常。模型组大鼠精神萎靡, 眼神黯淡, 毛发无光泽, 耸毛, 蜷缩, 腹部胀大。各给药组大鼠眼无神, 毛色发黄, 腹部肿胀, 与模型组比较, 症状有所减轻。

3.2 对大鼠尿量及腹水量的影响

与对照组比较, 模型组大鼠尿量显著减少 ($P < 0.01$), 生成腹水。与模型组比较, 各给药组大鼠尿量均显著增加 ($P < 0.01$), 腹水量不同程度地减少 ($P < 0.05$ 、 0.01)。其中生甘遂粉末组和醋甘遂粉末组功效最为明显, 且两组间无显著性差异。实验结

果见表 1。

3.3 对大鼠尿钠、钾、氯离子及尿液 pH 值的影响

与对照组比较, 模型组大鼠尿钠、钾、氯离子水平及尿 pH 值显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组大鼠尿钠、钾、氯离子水平及尿 pH 值均显著降低 ($P < 0.01$), 其中生甘遂粉末组和醋甘遂粉末组作用最为显著, 且两组间无显著性差异。实验结果见表 2。

表 1 各组大鼠尿量及腹水量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Comparison on volume of urine and ascites of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	尿量/mL	腹水量/g
对照	—	27.19±5.46	0
模型	—	10.94±3.21 ^{###}	25.15±5.87 ^{###}
呋塞米片	4.2	21.19±5.26 ^{**}	17.76±4.72 ^{**}
生甘遂粉末	340	19.69±5.59 ^{**}	20.90±6.38 ^{**}
醋甘遂粉末	340	18.75±4.98 ^{**}	21.16±4.42 ^{**}
生甘遂提取物	340	18.38±3.66 ^{**}	23.03±4.38 [*]
醋甘遂提取物	340	16.44±4.81 ^{**}	23.44±2.63 [*]

与对照组比较: ^{###} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下同

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

表 2 各组大鼠尿钠、钾、氯离子及尿 pH 值的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Comparison on urinary sodium, potassium, chloride ion, and pH value of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	尿钠离子/(mmol·L ⁻¹)	尿钾离子/(mmol·L ⁻¹)	尿氯离子/(mmol·L ⁻¹)	尿 pH 值
对照	—	23.87±2.12	162.26±5.03	110.38±5.47	7.35±0.87
模型	—	69.64±1.01 ^{###}	296.24±4.62 ^{###}	207.88±2.58 ^{###}	9.54±0.91 ^{###}
呋塞米片	4.2	35.94±2.06 ^{**}	195.69±4.69 ^{**}	137.12±6.68 ^{**}	7.87±1.52 ^{**}
生甘遂粉末	340	41.02±2.18 ^{**}	205.91±18.99 ^{**}	150.79±9.85 ^{**}	8.05±1.43 ^{**}
醋甘遂粉末	340	42.71±2.97 ^{**}	215.43±6.06 ^{**}	162.46±3.96 ^{**}	8.15±1.45 ^{**}
生甘遂提取	340	45.34±3.41 ^{**}	229.89±2.95 ^{**}	176.31±3.65 ^{**}	9.03±1.48 ^{**}
醋甘遂提取	340	48.11±1.87 ^{**}	233.00±6.58 ^{**}	181.33±5.96 ^{**}	9.06±1.03 ^{**}

3.4 对大鼠血清 PRA、Ang II、ALD、ADH 水平的影响

与对照组比较, 模型组大鼠血清中 PRA、Ang II、ALD、ADH 水平均显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组大鼠血清 PRA、Ang II、ALD、ADH 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。其中生甘遂粉末组和醋甘遂粉末组作用最为显著, 且两组间无显著性差异。实验结果见表 3。

4 讨论

癌性腹水又称恶性腹腔积液, 属于中医“臌胀”范畴。《灵枢·水胀》曰: “鼓胀如何? 腹胀, 身皆

大, 大与肤胀等也。”临床以腹大胀满, 皮急如鼓为主要特征, 为中医四大顽证之一。患者大量生成的腹水可压迫肾脏致少尿症状, 使体液电解质紊乱, 尿液酸碱失衡。肾的球旁细胞感受钠量减少的刺激, 致入球小动脉压力感受器分泌肾素增加, 催化血管紧张素原生成血管紧张素 I、II^[6], 刺激肾上腺皮质球状带分泌 ALD, 致肾脏集合管对水的通透性增强^[6-8], 细胞外液容量增多, 引起下丘脑视上核和室旁核神经细胞分泌 ADH 增多, 远曲小管和集合管重吸收水分增多^[8], 尿量排出减少, 水液停留体内而加重水肿。腹水往往引起各种并发症, 如肾

表 3 各组大鼠血清 PRA、Ang II、ALD、ADH 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 3 Comparison on PRA, Ang II, ALD, and ADH in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	PRA/(ng·L ⁻¹)	Ang II/(ng·L ⁻¹)	ALD/(ng·L ⁻¹)	ADH/(ng·L ⁻¹)
对照	—	107.19±12.49	134.74±10.16	153.18±7.50	5.62±1.06
模型	—	151.78±9.19 ^{##}	225.62±9.14 ^{##}	259.88±19.34 ^{##}	11.55±0.54 ^{##}
呋塞米片	4.2	125.16±10.19 ^{**}	159.11±9.66 ^{**}	176.15±7.53 ^{**}	7.20±0.99 ^{**}
生甘遂粉末	340	130.82±8.40 ^{**}	165.23±6.27 ^{**}	191.85±4.39 ^{**}	8.72±1.19 ^{**}
醋甘遂粉末	340	132.75±7.48 ^{**}	173.26±7.89 ^{**}	200.97±4.38 ^{**}	8.98±0.73 ^{**}
生甘遂提取物	340	136.26±6.28 [*]	180.01±6.74 ^{**}	204.37±3.71 ^{**}	9.95±1.05 ^{**}
醋甘遂提取物	340	138.69±7.20 [*]	185.89±4.15 [*]	214.64±16.16 [*]	10.29±0.32 ^{**}

衰竭、肝肾综合征等,严重影响患者生活质量和增加死亡率,其现代治疗常采用服用利尿剂、补充白蛋白、排放腹水、腹水回输、TIPS(经颈静脉肝内门体分流)技术等手段,但不良反应多,远期疗效不理想。

甘遂泻水逐饮作用峻猛,可使体内滞留水液随二便排出,治疗腹水效果显著。但其具明确的肝、胃肠毒性,对皮肤、黏膜亦具有严重的刺激作用,易引起黏膜炎症、充血^[9],剂量不当时易产生腹泻、脱水、昏迷等中毒症状。中医历来采用醋制以降低甘遂毒性,缓和其峻猛之效,可显著缓解药物对黏膜的强烈刺激^[10],减轻恶心、呕吐等副反应。但目前对生、醋甘遂药效的比较鲜有报道,醋制降低毒性的同时泻水逐饮功效如何变化亦不明确。甘遂醋制前后药效差异研究的缺失,使得近代医生因不知其醋制减毒后是否仍有斩夺之功,多慑于其毒性,畏其峻利而弃用,限制了甘遂的临床应用。

本实验室前期研究发现,醋甘遂粉末及其醇提加水提物在 340 mg/kg(按生药量计算)剂量下对癌性腹水模型大鼠泻水逐饮功效显著^[11],故本实验选用该剂量。本实验中,各给药组较模型组大鼠有不同程度腹水量减少,尿量增加的趋势,尿中钠、钾、氯离子水平和尿液 pH 值均趋于正常,血清 PRA、AngII、ALD、ADH 水平也有不同程度的降低。提示生、醋甘遂粉末及提取物均具有一定的利尿作用,可不同程度抑制腹水产生,减轻机体电解质紊乱、体液酸碱失衡的症状,并对 RAAS 及 ALD 有一定调节作用。可见,生、醋甘遂粉末及其提取物均有显著的泻水逐饮之效,对癌性腹水大鼠模型均有良好的治疗改善作用。其中生、醋甘遂粉末组效果最佳,且两组间无显著性差异,推测甘遂醋制毒性显著降低的同时,其泻水逐饮功效得以保留,

表现为“减毒存效”,也从一定层面上验证了甘遂临床用药多醋制的合理性。

甘遂主要含巨大戟烷型二萜、假白榄烷型二萜及三萜等成分^[12],其中巨大戟烷型二萜类和含有 8-烯-7-酮结构的三萜类成分为其主要毒性成分^[13]。甘遂醋制后萜类成分水平降低^[14-15],并产生新的成分^[16],同时其泻水逐饮功效得以保留^[11],推测可能与其毒性成分在醋制过程中结构发生转化有关。后续将在本实验基础上深入考察生、醋甘遂的成分差异,以期揭示甘遂醋制“减毒存效”的内在本质,为甘遂临床安全、有效应用提供依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 王文晓,高 兰,张 丽,等. 醋炙减弱甘遂醋酸乙酯部位对小鼠胃肠黏膜通透性影响的研究 [J]. 中草药, 2014, 45(22): 3289-3294.
- [3] 高 兰,颜晓静,李征军,等. 醋炙降低甘遂对小鼠胃肠道氧化损伤作用机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10): 257-260.
- [4] 曹亮亮,王文晓,张 丽,等. 基于“有故无殒”思想的醋甘遂毒性研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(16): 3249-3255.
- [5] Aston R. A rat diuretic screening procedure [J]. Toxicology, 1959, 1(3): 277-282.
- [6] 张俊杰,林庚庭,滕 飞,等. 桃核参术汤对肝纤维化过程中肾素-血管紧张素系统的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(4): 930-933.
- [7] 许 瑞,陶伟伟,段金廛,等. 基于对小鼠利尿与泻下作用探讨京大戟与甘草配伍禁忌的理论依据 [J]. 中草药, 2014, 45(14): 2056-2059.
- [8] 文小敏,李云鹏,武凯歌,等. 三仁汤对脾胃湿热证大鼠血清醛固酮、血浆抗利尿激素影响的研究 [J]. 新中医, 2010, 42(5): 98-99.
- [9] 易剑锋,叶葵葵,潘海邦,等. 醋甘遂、复方大承气汤、

- 生长抑素联合治疗麻痹性肠梗阻 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(10): 182-186.
- [10] 刁义平. 生甘遂和醋甘遂提取物急性毒性和刺激性实验研究 [J]. 药物不良反应杂志, 2007, 9(4): 243-246.
- [11] 曹亮亮, 王文晓, 张 丽, 等. 醋甘遂不同提取部位对癌性腹水大鼠泻水逐饮功效比较研究 [J]. 中草药, 2015, 46(17): 2593-2598.
- [12] 王立岩. 甘遂的化学成分及其生物活性的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2003.
- [13] Zhang L, Gao L, Li Z, *et al.* Bio-Guided Isolation of the cytotoxic terpenoids from the roots of *Euphorbia kansui* against human normal cell lines LO2 and GES-1 [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(9): 11247-11259.
- [14] Yan X, Zhang L, Guo J, *et al.* Processing of kansui roots stir-baked with vinegar reduces kansui-induced hepatocyte cytotoxicity by decreasing the contents of toxic terpenoids and regulating the cell apoptosis pathway [J]. *Molecules*, 2014, 19(6): 7237-7254.
- [15] 李征军, 李 媛, 高 兰, 等. 甘遂不同炮制品中二萜类成分的变化研究 [J]. 中成药, 2011, 33(12): 2122-2125.
- [16] 石典花, 孙立立, 张 军. 甘遂醋炙前后石油醚部位的 GC-MS 分析 [J]. 中国药房, 2013, 24(43): 4070-4072.