

基于 NaCl 重吸收抑制作用的石韦利尿活性成分筛选

隋 怡, 滕明刚, 罗国勇, 柴慧芳, 龙 毅, 杨武德*

贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025

摘要: **目的** 建立基于抑制 NaCl 重吸收作用的利尿药物体外筛选模型, 研究 21 个从石韦中分离的化合物的利尿活性, 并通过体内实验进行验证。 **方法** 采用犬肾小管上皮细胞 MDCK 对石韦中 21 个化合物进行体外利尿活性筛选, 确定 NaCl 体外转运实验的最佳 NaCl 剂量; 将 MDCK 细胞接种于 Transwell 小室内, 设置对照组、石韦化合物 (100 $\mu\text{mol/L}$) 组、氢氯噻嗪 (100 $\mu\text{mol/L}$) 组, 给药孵育 24 h 后, 加入 NaCl 溶液 (15 mg/mL), 于 30 min、2 h、4 h 分别取 Transwell 下室培养液, 检测 Cl^- 和 Na^+ 吸光度。昆明小鼠随机分为对照组、绿原酸甲酯 (10 mg/kg) 组、山柰酚 (10 mg/kg) 组、氢氯噻嗪 (10 mg/kg) 组, 给予药物干预 5 d 后, 检测各组小鼠 5 h 内的尿量。 **结果** 与对照组比较, 加入 NaCl 30 min, 氢氯噻嗪组 MDCK 细胞 Cl^- 和 Na^+ 水平显著降低 ($P < 0.05$), 绿原酸甲酯组 MDCK 细胞 Na^+ 水平显著降低 ($P < 0.05$); 加入 NaCl 2 h, 绿原酸甲酯组 MDCK 细胞 Cl^- 水平显著降低 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 绿原酸甲酯组和氢氯噻嗪组小鼠给药后 5 h 内的总尿量显著增加 ($P < 0.05$); 氢氯噻嗪组和绿原酸甲酯组小鼠尿量峰值分别为给药后 1.5、2.5 h, 随后尿量均呈下降趋势。 **结论** 绿原酸甲酯可抑制肾小管氯化钠转运, 对小鼠具有利尿作用, 是石韦中的利尿活性成分。

关键词: 活性筛选; 利尿; 石韦; 绿原酸甲酯; 重吸收

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)04-1026-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.04.015

Screening of active components from *Pyrrosia petiolosa* based on inhibition of NaCl reabsorption

SUI Yi, TENG Ming-gang, LUO Guo-yong, CHAI Hui-fang, LONG Yi, YANG Wu-de

Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective To establish an *in vitro* screening model of diuretic drugs based on the inhibition of NaCl reabsorption, study and verify the diuretic activity of 21 compounds isolated from *Pyrrosia petiolosa*. **Methods** Canine renal tubular epithelial MDCK cell was used to screen for diuretic activity of 21 compounds isolated from *P. petiolosa* *in vitro* to determine the optimal NaCl dose for the transport experiment of NaCl; MDCK cells were inoculated into Transwell chamber, and control group; Compound from *P. petiolosa* (100 $\mu\text{mol/L}$) group and hydrochlorothiazide (100 $\mu\text{mol/L}$) group were set up, after 24 h of incubation, NaCl solution (15 mg/mL) was added, the Transwell lower chamber culture medium was respectively taken at 30 min, 2 h, and 4 h, and the Cl^- and Na^+ absorbance were measured. KM mice were randomly divided into control group, methyl chlorogenate (10 mg/kg) group, kaempferol (10 mg/kg) group, and hydrochlorothiazide (10 mg/kg) group. After drug intervention for 5 d, urine volume of mice in each group was tested within 5 h. **Results** Compared with control group, after adding NaCl for 30 min, the levels of Cl^- and Na^+ in MDCK cells of hydrochlorothiazide group were significantly reduced ($P < 0.05$), and the levels of Na^+ in MDCK cells in methyl chlorogenate group were significantly reduced ($P < 0.05$); After adding NaCl for 2 h, the level of Cl^- in MDCK cells in methyl chlorogenate group was significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with control group, the total urine output of mice in methyl chlorogenate group and hydrochlorothiazide group were significantly increased within 5 h after administration ($P < 0.05$); The peak urine output of the mice in hydrochlorothiazide group and methyl chlorogenate group were respectively 1.5 h and 2.5 h after administration, the urine output showed a downward trend. **Conclusion** Methyl chlorogenate, the diuretic active ingredient in *P. petiolosa*, could inhibit the transport of sodium chloride in the renal tubules and has a diuretic effect on mice.

Key words: activity screening; diuretic; *Pyrrosia petiolosa* (Christ) Ching; methyl chlorogenate; reabsorption

收稿日期: 2020-10-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81660647); 大学生创新创业训练计划项目 (201910662004)

作者简介: 隋 怡 (1990—), 女, 硕士, 助理实验师, 从事中药药理和中药毒理学研究。E-mail: 836017075@qq.com

*通信作者: 杨武德 (1968—), 男, 教授。E-mail: 2994771096@qq.com

利尿药是一类能够促进机体水分排出从而使尿量增加的药物,临床上常用于治疗水肿、高血压等^[1]。石韦为水龙骨科植物庐山石韦 *Pyrrosia shearerii* (Bak.) Ching、石韦 *P. lingua* (Thunb.) Farwell 或有柄石韦 *P. petiolosa* (Christ) Ching 的干燥叶,具有利尿通淋、清肺止咳、凉血止血的功效,主治热淋、血淋、石淋等症^[2]。课题组前期从石韦中提取并分离出里白烯、 β -谷甾醇、绿原酸、芒果苷、异芒果苷、槲皮素、异槲皮素、蔗糖等 21 个化合物^[3],但其利尿通淋的活性成分尚不明确。传统的利尿药物筛选方法多为体内实验,实验周期长且不适用于批量化合物的筛选。本研究采用 Transwell 小室模拟肾小管,建立 Transwell 小室内外 NaCl 浓度差,探究具有抑制 NaCl 转运作用的化合物,从而筛选出具有抑制肾小管细胞转运 NaCl 作用的化合物;并通过体内实验验证化合物的利尿作用,为石韦利尿通淋的机制奠定基础。

1 材料

1.1 细胞

犬肾小管上皮细胞 MDCK 购自中国科学院上海细胞库。

1.2 动物

清洁级成年雄性昆明种小鼠,体质量 18~22 g,购自重庆腾鑫有限公司,合格证号 SCXK(辽)2015-0001。于温度 22~25 ℃、相对湿度 50%~60% 下,自由进食饮水。动物实验遵循贵州中医药大学有关实验动物管理和使用的规定,均符合 3R 原则。

1.3 药材

黔产有柄石韦(批号 20160625)由龙里县湾滩河镇弯寨石头村李红提供,经贵州中医药大学药教研室周汉华教授鉴定为水龙骨科植物有柄石韦 *P. petiolosa* (Christ) Ching 的干燥叶。

1.4 药品与试剂

氢氯噻嗪片剂(批号 20180324,规格 25 mg/片)购自常州制药厂有限公司;NaCl(批号 20150928)购自天津市富宇精细化工有限公司; Cl^- 、 Na^+ 检测试剂盒(批号分别为 20190628、20190625)购自南京建成生物工程研究所;胎牛血清(货号 11011-8611)购自浙江天杭生物科技股份有限公司;DMEM 高糖培养基(货号 C11995500BT)购自美国 Gibco 公司;磷酸盐缓冲液(货号 02-024-1ACS)、青霉素-链霉素溶液(货号 03-031-1B)、胰酶(货号 03-050-1B),均购自以色列 BI 公司。

1.5 仪器

双人超净工作台(苏州净化设备有限公司);CO₂ 培养箱(日本三洋电器股份有限公司);倒置相差显微镜(日本尼康);自动酶标读仪(美国 Bio-Tek 公司);Millicell-ERS-2 型细胞电阻仪(美国 Millipore 公司)。

2 方法

2.1 石韦中化合物的分离

课题组前期从黔产有柄石韦中提取并分离的 21 个化合物见表 1,质量分数均大于 96%^[2]。

表 1 从有柄石韦中分离的化合物信息

Table 1 Information of compounds from *P. petiolosa*

序号	化合物名称
1	里白烯
2	22-羟基何伯烷
3	β -谷甾醇
4	坝巴酸
5	cycloeucalenone
6	泽屋萜
7	dryocrassol
8	hopan-28,22-olide
9	齐墩果酸
10	22,28-epoxyhopane
11	cyclohopenol
12	cycloeucalenol
13	木栓酮
14	(23E)-cycloart-23-ene-3 β ,25-diol
15	(23E)-cycloart-23,25-ene-3 β -ol
16	cyclolaudenol
17	11-羧基- β -乙酰乳香酸
18	绿原酸甲酯
19	2',3'-dihydroxy propylpentadecanoate
20	山柰酚
21	β -胡萝卜素

2.2 MDCK 细胞的培养

MDCK 细胞用含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的 DMEM 高糖培养基,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

2.3 药物的配制

NaCl 溶于 DMEM 培养基,分别配制成质量浓度为 12、15、18、21、24、27、30、33、36 mg/mL 的溶液。表 1 中的化合物分别溶于 DMEM 培养基,配制成 100 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液。

2.4 NaCl 体外转运实验剂量的筛选

取处于对数生长期的 MDCK 细胞,接种于 96 孔板。设置对照组和 9 个质量浓度(12、15、18、21、24、27、30、33、36 mg/mL) NaCl 组,各组分别加入相应溶液,对照组加入生理盐水,培养 8 h,

MTT 法检测细胞存活率, 确定 NaCl 体外转运实验的最佳 NaCl 质量浓度。

2.5 石韦中分离的化合物对 NaCl 体外转运的影响

取处于对数生长期的 MDCK 细胞, 以 $4 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 Transwell 小室内, 下室加入 1 mL 培养基以适应细胞正常生长。细胞贴壁后, 于 37°C 测定各孔细胞的电阻值^[4]。取跨膜电阻值 $\geq 300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 的 MDCK 细胞, 设置对照组、石韦中分离的不同化合物 ($100 \mu\text{mol/L}$) 组、氢氯噻嗪 ($100 \mu\text{mol/L}$) 组, 各给药组加入相应药物, 对照组加入不含药物的培养基, 于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。弃去 Transwell 小室内液体, 加入 NaCl (15 mg/mL) 溶液继续培养, 分别于 30 min、2 h 和 4 h 吸取 $50 \mu\text{L}$ 下室中的液体, 按照试剂盒说明书检测 Cl^- 、 Na^+ 的吸光度。

2.6 石韦中分离的化合物对小鼠的利尿作用

将小鼠随机分为对照组、绿原酸甲酯 (10 mg/kg) 组、山柰酚 (10 mg/kg) 组、氢氯噻嗪 (10 mg/kg) 组, 每组 7 只。各给药组小鼠 ig 相应药物 ($20 \mu\text{L/g}$), 对照组 ig 等体积生理盐水, 1 次/d, 连续 5 d。给药结束后, 各组小鼠 ip 1 mL 生理盐水, 立即放入提前垫好 3 层滤纸的代谢笼中, 每 30 分钟称定滤纸质量并更换, 连续记录 5 h 内滤纸质量, 并计算 5 h 内小鼠尿量。

2.7 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 18.0 统计软件进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 NaCl 体外转运实验剂量的筛选

如图 1 所示, NaCl 抑制 MDCK 细胞活力, 呈剂量相关性。NaCl 的质量浓度高于 15 mg/mL , MDCK 细胞存活率均低于 50%。因此, 选择 15 mg/mL NaCl 进行后续实验, 孵育时间为 4 h 以内, 该条件下既能使 MDCK 细胞两侧维持一定的 NaCl 质量浓度梯度, 又不影响细胞活力。

3.2 石韦分离的化合物对 Cl^- 和 Na^+ 体外转运的影响

如表 2 所示, 与对照组比较, 加入 NaCl 30 min, 坝巴酸、(23E)-cycloart-23-ene-3 β ,25-diol 和氢氯噻嗪组 MDCK 细胞 Cl^- 水平显著降低 ($P < 0.05$), Cl^- 跨细胞转运受到抑制; 加入 NaCl 2 h, 绿原酸甲酯组 MDCK 细胞 Cl^- 水平显著降低 ($P < 0.05$), Cl^- 跨细胞转运受到抑制。

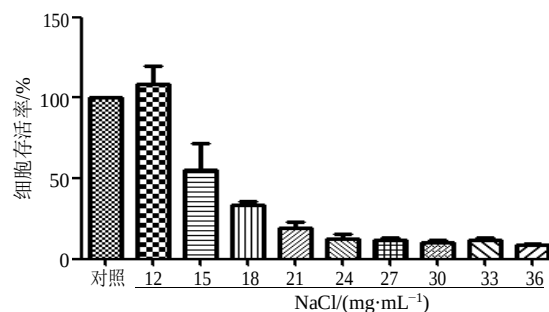


图 1 不同质量浓度的 NaCl 对 MDCK 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of different concentrations of NaCl on MDCK cell viability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

与对照组比较, 加入 NaCl 30 min, 绿原酸甲酯、氢氯噻嗪组 MDCK 细胞 Na^+ 水平显著降低 ($P < 0.05$), Na^+ 跨细胞转运受到抑制; 加入 NaCl 4 h, 各组 MDCK 细胞 Na^+ 水平均无明显差异。

3.3 石韦中分离的绿原酸甲酯和山柰酚对小鼠的利尿作用

如表 3 所示, 与对照组比较, 给药后第 3 小时内, 绿原酸甲酯和氢氯噻嗪组小鼠尿量显著增加 ($P < 0.05$), 2 组无显著性差异; 绿原酸甲酯和氢氯噻嗪组小鼠给药后 5 h 内的总尿量显著增加 ($P < 0.05$)。如图 2 所示, 氢氯噻嗪组小鼠尿量在给药后 1.5 h 达到峰值, 随后尿量呈下降趋势; 绿原酸甲酯组小鼠尿量在给药后 2.5 h 达到峰值, 随后尿量呈下降趋势; 山柰酚组小鼠尿量在给药后 2 h 达到峰值。

4 讨论

尿液的生成和排出包括肾小球滤过和肾小管重吸收 2 个过程。重吸收是指肾小管上皮细胞将小管液原尿中的水分和某些溶质, 部分或全部转运至血液。肾小球滤过的原尿中 99% 的水被重吸收^[5-7]。目前大多数利尿药物如碳酸酐酶抑制剂、 Na^+ - Cl^- 协同转运体抑制剂、 Na^+ - K^+ - 2Cl^- 协同转运体抑制剂、阻断肾小管上皮 Na^+ 通道药物、盐皮质激素受体阻断剂等均通过影响原尿重吸收从而发挥利尿作用^[8-10], 其中以噻嗪类药物为代表的 Na^+ - Cl^- 协同转运体抑制剂和以呋塞米为代表的 Na^+ - K^+ - 2Cl^- 协同转运体抑制剂临床应用广泛^[11-12]。因此, 抑制肾小管 NaCl 的转运为影响利尿药物活性的重要机制。本研究采用接种 MDCK 细胞的 Transwell 小室模拟肾小管, 筛选具有抑制肾小管 NaCl 转运作用的化合物。

NaCl 体外转运实验结果显示, 与对照组比较,

表 2 不同时间点从石韦中分离的化合物对 Cl^- 和 Na^+ 体外转运的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of compounds from *P. petiolaris* on transport of Cl^- and Na^+ in vitro at different times ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Cl^- 吸光度		Na^+ 吸光度	
		30 min	2 h	30 min	4 h
对照	—	0.560±0.038	0.336±0.013	0.454±0.022	0.425±0.016
里白烯	100	0.701±0.086	0.265±0.034	0.437±0.020	0.508±0.076
22-羟基何伯烷	100	0.592±0.027	0.403±0.084	0.432±0.040	0.380±0.051
β -谷甾醇	100	0.816±0.023	0.317±0.059	0.373±0.007	0.394±0.049
坝巴酸	100	0.369±0.022*	0.408±0.038	0.434±0.039	0.525±0.137
cycloeucalenone	100	0.652±0.043	0.309±0.031	0.519±0.018	0.472±0.022
泽屋萜	100	0.748±0.018	0.310±0.014	0.440±0.099	0.538±0.025
dryocrassol	100	0.489±0.033	0.307±0.111	0.394±0.044	0.528±0.098
hopan-28,22-olide	100	0.496±0.005	0.296±0.035	0.471±0.070	0.524±0.072
齐墩果酸	100	0.487±0.130	0.286±0.015	0.379±0.057	0.625±0.034
22,28-epoxyhopane	100	0.539±0.022	0.346±0.011	0.406±0.014	0.618±0.082
cyclohopanol	100	0.504±0.031	0.304±0.046	0.396±0.063	0.588±0.025
cycloeucalenol	100	0.605±0.005	0.304±0.053	0.453±0.007	0.466±0.152
木栓酮	100	0.716±0.017	0.330±0.013	0.396±0.053	0.404±0.003
(23E)-cycloart-23-ene-3 β ,25-diol	100	0.341±0.029*	0.336±0.013	0.515±0.041	0.412±0.003
(23E)-cycloart-23,25-ene-3 β -ol	100	0.524±0.006	0.324±0.006	0.462±0.047	0.434±0.007
cyclolaudenol	100	0.530±0.077	0.338±0.010	0.509±0.046	0.452±0.031
11-羧基- β -乙酰乳香酸	100	0.593±0.018	0.338±0.009	0.425±0.023	0.417±0.084
绿原酸甲酯	100	0.542±0.056	0.221±0.020*	0.310±0.013*	0.420±0.068
2',3'-dihydroxy propylpentadecanoate	100	0.533±0.004	0.272±0.013	0.428±0.009	0.388±0.027
山柰酚	100	0.563±0.017	0.324±0.082	0.424±0.006	0.457±0.028
β -胡萝卜素	100	0.465±0.081	0.298±0.012	0.402±0.065	0.445±0.051
氢氯噻嗪	100	0.321±0.074*	0.331±0.027	0.349±0.004*	0.459±0.042

与同时时间对照组比较: * $P < 0.05$, 下表同

* $P < 0.05$ vs control group at the same time, same as below table

表 3 石韦中分离的绿原酸甲酯和山柰酚对小鼠的利尿作用 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

Table 3 Diuretic effects of methyl chlorogenate and kaempferol from *P. petiolaris* on mice ($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	尿量/g						5 h 内总尿量/g
		0.5 h 内	第 1 小时内	第 2 小时内	第 3 小时内	第 4 小时内	第 5 小时内	
对照	—	0.17±0.05	0.36±0.06	0.37±0.04	0.26±0.05	0.34±0.05	0.19±0.07	1.51±0.12
绿原酸甲酯	10	0.16±0.06	0.44±0.08	0.49±0.07	0.49±0.07*	0.20±0.04	0.23±0.05	1.84±0.07*
山柰酚	10	0.14±0.07	0.41±0.12	0.49±0.07	0.36±0.05	0.17±0.07	0.16±0.06	1.59±0.11
氢氯噻嗪	10	0.27±0.06	0.51±0.10	0.49±0.03	0.49±0.07*	0.34±0.06	0.13±0.04	1.96±0.09*

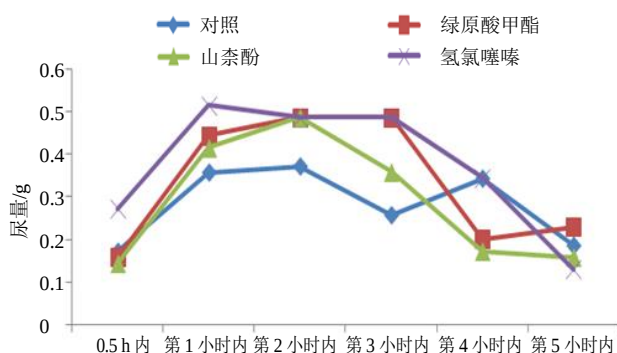


图 2 石韦中分离的绿原酸甲酯和山柰酚对小鼠的利尿作用 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

Fig. 2 Diuretic effects of methyl chlorogenate and kaempferol from *P. petiolaris* on mice ($\bar{x} \pm s, n=7$)

加入 NaCl 30 min, 氢氯噻嗪组和绿原酸甲酯组 MDCK 细胞 Cl^- 和 Na^+ 转运被明显抑制, 坝巴酸组和(23E)-cycloart-23-ene-3 β ,25-diol 组 MDCK 细胞 Cl^- 转运被明显抑制; 加入 NaCl 2 h, 绿原酸甲酯组 MDCK 细胞 Cl^- 转运被明显抑制。表明坝巴酸、(23E)-cycloart-23-ene-3 β ,25-diol 和绿原酸甲酯是石韦中具有抑制 Na^+ 和 Cl^- 转运活性的化合物。

课题组前期对 21 个石韦化合物与 Na^+ - Cl^- 协同转运体激活的上游大分子^[13-15]进行分子对接, 发现山柰酚和绿原酸甲酯与赖氨酸蛋白激酶 1(with no lysinekinase1, WNK1) 具有良好的结合活性。因此, 结合 NaCl 体外转运实验结果, 考察山柰酚

和绿原酸甲酯对小鼠的利尿作用,结果显示,绿原酸甲酯对小鼠具有显著的利尿作用,起效峰值在给药后 3 h,且其 5 h 内的利尿作用与氢氯噻嗪无明显差异;山柰酚对小鼠具有一定的利尿作用,但其尿量与对照组比较无明显差异,其尿量峰值在给药后 2 h,与 NaCl 体外转运实验结果一致。

综上,绿原酸甲酯具有良好的体内和体外利尿活性,与氢氯噻嗪疗效相当,是石韦的利尿活性成分,其利尿机制与抑制肾小管上皮细胞 NaCl 的重吸收作用有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 许瑞,陶伟伟,段金殿,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.
- [2] 王亚茹,杨武德.黔产有柄石韦对大鼠利尿作用的初步研究[J].时珍国医国药,2017,28(11):2583-2585.
- [3] 陈飞,罗国勇,杨武德.黔产有柄石韦利尿通淋有效部位化学成分研究[J].中药材,2019,42(12):2822-2826.
- [4] 冉峥,郭艳丽,王丽凤,等.黄诺马苔在 MDCK 单层细胞模型上的转运机制分析[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(15):155-160.
- [5] Sakolish C, Chen Z W, Dalaijamts C, et al. Predicting tubular reabsorption with a human kidney proximal tubule tissue-on-a-chip and physiologically-based modeling[J]. *Toxicol In Vitro*, 2020, 63: 104752.
- [6] 张瑞,孙硕,陈艾东.利尿药联合其他药物抗高血压的临床新进展[J].医学理论与实践,2018,31(22):3347-3349.
- [7] Cheng C J, Rodan A R, Huang C L. Emerging targets of diuretic therapy[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2017, 102(3): 420-435.
- [8] Bernard J, Song L H, Henderson B, et al. Association between daily water intake and 24-hour urine volume among adolescents with kidney stones[J]. *Urology*, 2020, 140: 150-154.
- [9] Penton D, Czogalla J, Wengi A, et al. Extracellular K⁺ rapidly controls NaCl cotransporter phosphorylation in the native distal convoluted tubule by Cl⁻-dependent and independent mechanisms[J]. *J Physiol*, 2016, 594(21): 6319-6331.
- [10] Landau D, Kher K K. Gentamicin-induced Bartter-like syndrome[J]. *Pediatr Nephrol*, 1997, 11(6): 737-740.
- [11] Terker A S, Zhang C, McCormick J A, et al. Potassium modulates electrolyte balance and blood pressure through effects on distal cell voltage and chloride[J]. *Cell Metab*, 2015, 21(1): 39-50.
- [12] Louis-Dit-Picard H, Barc J, Trujillano D, et al. KLHL3 mutations cause familial hyperkalemic hypertension by impairing ion transport in the distal nephron[J]. *Nat Genet*, 2012, 44(4): 456-460.
- [13] Shibata S, Arroyo J P, Castañeda-Bueno M, et al. Angiotensin II signaling via protein kinase C phosphorylates Kelch-like 3, preventing WNK4 degradation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(43): 15556-15561.
- [14] Terker A S, Zhang C, Erspamer K J, et al. Unique chloride-sensing properties of WNK4 permit the distal nephron to modulate potassium homeostasis[J]. *Kidney Int*, 2016, 89(1): 127-134.
- [15] Yang C L, Zhu X, Wang Z, et al. Mechanisms of WNK₁ and WNK4 interaction in the regulation of thiazide-sensitive NaCl cotransport[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(5): 1379-1387.

[责任编辑 李亚楠]