

# 基于肾素-血管紧张素-醛固酮系统和 AQP/cAMP/CREB 通路研究棉团铁线莲对盐水负荷大鼠的水液代谢作用

闵志强, 王伟超, 孙荣骏, 廖立, 陈林\*

成都中医药大学药学院, 中药种质资源创新与高效利用四川省重点实验室, 四川 成都 611137

**摘要:**目的 探讨棉团铁线莲 *Clematis hexapetala* 对盐水负荷大鼠模型的急性利尿和长期利尿作用及其利尿机制。方法 设置模型组、呋塞米 (10 mg/kg) 组、川木通 (20 g/kg) 组和棉团铁线莲低、中、高剂量 (5、10、20 g/kg) 组, 每组 8 只。给予药物急性及长期干预后, 测定大鼠尿量、电解质浓度; 测定血清中  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -三磷酸腺苷酶 (adenosine triphosphatase, ATPase) 活性及血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)、抗利尿激素 (antidiuretic hormone, ADH)、醛固酮 (aldosterone, ALD)、心房肽素 (atrial natriuretic peptide, ANP) 水平; 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察肾脏组织病理变化。采用网络药理学筛选棉团铁线莲活性成分和利尿靶点, 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 对核心靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。对核心成分和核心靶点进行分子对接验证, 采用 qRT-PCR、Western blotting 检测肾脏组织水通道蛋白 (aquaporin, AQP)/环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP)/环磷酸腺苷效应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB) 通路相关基因及蛋白表达。**结果** 从 TCMSP 数据库中鉴定出棉团铁线莲 7 种活性成分, 354 个靶点。从 GeneCards、OMIM 数据库中筛选出了 1 531 个疾病相关靶标, 其中交集靶点 133 个。PPI 分析揭示前 5 个核心靶标分别为前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、肾上腺素能受体  $\beta$ 1 (adrenergic receptor  $\beta$ 1, ADRB1)、过氧化物酶体增殖物激活受体  $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ , PPARA)、血管紧张素 II 1 型受体 (angiotensin II receptor type 1, AGTR1) 和 PPARG。KEGG 通路富集分析发现 cAMP 通路在棉团铁线莲利尿过程中发挥重要的作用。动物实验结果显示, 棉团铁线莲显著增加大鼠尿量和尿液中  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{K}^+$  水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 显著降低  $\text{Ca}^{2+}$  水平 ( $P < 0.05$ ), 从而增加了 NaCl 的排泄; 棉团铁线莲显著降低大鼠血清中 ADH、Ang II 和 ALD 水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 显著提高  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase 活性及 ANP 水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 从而抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS) 的激活; 棉团铁线莲显著抑制 AQP/cAMP/CREB 通路相关基因和蛋白表达 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ )。**结论** 棉团铁线莲可能通过抑制盐水负荷大鼠 AQP/cAMP/CREB 通路, 发挥急性 and 长期利尿作用。

**关键词:** 棉团铁线莲; 利尿; 肾素-血管紧张素-醛固酮系统; AQP/cAMP/CREB 通路; 灵仙皂苷; 齐墩果酸; 常春藤皂苷元  
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)07-2569-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.07.013

## Effect of *Clematis hexapetala* on water metabolism in saline-loaded rats based on renin-angiotensin-aldosterone system and AQP/cAMP/CREB pathway

MIN Zhiqiang, WANG Weichao, SUN Rongjun, LIAO Li, CHEN Lin

School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chinese Medicine Germplasm Resources Innovation and Effective Uses Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 611137, China

**Abstract: Objective** To investigate the acute and chronic diuretic effects and diuretic mechanisms of *Clematis hexapetala* in a saline-loaded rat model. **Methods** Model group, furosemide (10 mg/kg) group, *C. armandii* (20 g/kg) group, *C. hexapetala* low-, medium- and high-dose (5, 10, 20 g/kg) groups, with eight rats in each group. Urine volume and electrolyte concentration in rats were measured after acute and long-term drug intervention. The activity of  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -triphosphatase (ATPase) and levels of angiotensin II (Ang II),

收稿日期: 2025-10-20

基金项目: 第七批全国老中医药专家学术经验继承工作项目[国中医药人教函(2022)76号]; 基于古今品种差异研究威灵仙功效性能的变化(330023153); 中医药高层次人才培养工程-第四届十大名中医张廷模(600008241005)

作者简介: 闵志强, 讲师, 从事临床中药学研究。E-mail: minzq@qq.com

\*通信作者: 陈林, 博士, 教授, 从事临床中药学研究。Tel: (8628)61800076 E-mail: chenlin@cdutcm.edu.cn

antidiuretic hormone (ADH), aldosterone (ALD), atrial natriuretic peptide (ANP) in serum were measured. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe pathological changes in renal tissue. Network pharmacology was used to screen the active ingredients and diuretic targets of *C. hexapetala*, a protein-protein interaction (PPI) network was constructed to perform gene ontology (GO) functional and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis on core targets. Molecular docking validation was performed on the core components and targets, qRT-PCR and Western blotting were used to detect the expressions of genes and proteins related to aquaporin (AQP)/cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/cAMP response element binding protein (CREB) pathway in renal tissue. **Results** A total of seven active compounds and 354 potential drug targets were identified for *C. hexapetala* from TCMS database. A total of 1 531 disease-related targets were screened from GeneCards and OMIM databases, including 133 intersecting targets. PPI analysis revealed that the top 5 core targets were prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), adrenergic receptor  $\beta 1$  (ADRB1), peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPARA), angiotensin II receptor type 1 (AGTR1) and PPARG. KEGG pathway enrichment analysis revealed that cAMP pathway played an important role in the process of diuresis in *C. hexapetala*. Animal experiment results showed that *C. hexapetala* significantly increased urine output and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  levels in urine of rats ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ), significantly reduced  $\text{Ca}^{2+}$  level ( $P < 0.05$ ), thereby increasing  $\text{NaCl}$  excretion. *C. hexapetala* significantly reduced the levels of ADH, Ang II and ALD in serum of rats ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ), significantly increased  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase activity and ANP level ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ), thereby inhibiting the activation of renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS). *C. hexapetala* significantly inhibited the expressions of genes and proteins related to AQP/cAMP/CREB pathway ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ,  $0.001$ ). **Conclusion** *C. hexapetala* may exert acute and long-term diuretic effects by inhibiting AQP/cAMP/CREB pathway in saline loaded rats.

**Key words:** *Clematis hexapetala* Pall.; diuresis; renin-angiotensin-aldosterone system; AQP/cAMP/CREB pathway; clematoside; oleanolic acid; hederagenin

棉团铁线莲 *Clematis hexapetala* Pall.为毛茛科植物威灵仙的法定品种之一，主产于中国、朝鲜、蒙古等亚洲地区，具有祛风湿、通经络等功效。其主要入药部位根及根茎的水煎液在中国传统医药学中应用已久，常用于风湿痹证<sup>[1]</sup>，此外，由于古代中医药书籍记载其有“泄水”即“利水渗湿”的功效，现代临床上还常参与治疗治疗水肿<sup>[2]</sup>、痛风<sup>[3]</sup>、尿结石<sup>[4]</sup>、前列腺炎<sup>[5]</sup>等疾病。

利尿药是一类通过促进肾脏排泄水分和电解质（如  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 等）来增加尿量、减少体液潴留的药物，是水腫、肾脏异常、高血压、充血性心力衰竭和代谢异常的一线治疗选择<sup>[6]</sup>。然而，传统的利尿剂具有电解质紊乱、血小板减少、耳毒性和中性粒细胞减少等多种不良反应<sup>[7]</sup>，在临床实践中受到极大的限制<sup>[8-9]</sup>。近年来研究显示，蒙特维迪铁线莲<sup>[10]</sup>、夏至草<sup>[11]</sup>、治疝草<sup>[12]</sup>和椰子水<sup>[13]</sup>具有良好的利尿活性，且不良反应少，为开发天然植物利尿剂提供了新思路。

由于威灵仙地方品种繁多，药材基原复杂，存在基原混乱等问题。皮西萍<sup>[14]</sup>发现，山东所用威灵仙（狭叶铁线莲）具有抗利尿作用，该功效亦被现代教材或专著收载，与现代临床所发现的功效相反，致使其是否具有利尿作用存在争议。因此，本研究拟探讨棉团铁线莲对盐水负荷大鼠模型的急性利尿和长期利尿作用，采用网络药理学筛选威灵

仙活性成分和利尿靶点，构建蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interaction, PPI）网络，进行基因本体（gene ontology, GO）功能及京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG）通路分析，并通过 qRT-PCR、Western blotting 等方法验证其利尿机制。

## 1 材料

### 1.1 动物

48 只 SPF 级雄性 SD 大鼠，体质量 180~220 g，6~8 周龄，购自斯贝福（北京）生物技术有限公司，动物生产许可证号 SCXK（京）2024-0001，合格证号 SYXK（川）2020-124。大鼠饲养于聚乙烯箱中，饲养环境温度 23 °C，相对湿度 70%~80%，12 h 光照和黑暗循环，自由进食饮水。动物实验经成都中医药大学动物管理与研究委员会批准（批准号 2024088）。

### 1.2 药材

棉团铁线莲（批号 231201）购自四川利民中药饮片有限责任公司，川木通（批号 230701）购自四川秦巴本草药业有限公司，经成都中医药大学药学院闵志强讲师分别鉴定为棉团铁线莲 *C. hexapetala* Pall 的干燥根及根茎、毛茛科植物小木通 *C. armandii* Franch.干燥藤茎。

### 1.3 药品与试剂

对照品常春藤苷皂元、齐墩果酸（批号分别

为 WP25082501、WP25072412, 质量分数 $\geq 98\%$ ) 购自四川省维克奇生物科技有限公司; 灵仙新苷对照品(批号 DSTDL007201, 质量分数 $\geq 98\%$ ) 购自成都乐美天医药科技有限公司; 呋塞米(批号 2312065, 20 mg/片) 购自江苏亚邦爱普森药业有限公司;  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 试剂盒(批号分别为 20240319、20240123、20240123、20240716) 均购自南京建成生物工程研究所;  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -三磷酸腺苷酶(adenosine triphosphatase, ATPase)、血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)、心房肽素(atrial natriuretic peptide, ANP)、抗利尿激素(antidiuretic hormone, ADH)、醛固酮(aldosterone, ALD) ELISA 试剂盒(批号分别为 WK146LTH1487、WK02LT423238、WK01LT427970、WK036PX69791、WK028J8R8708) 均购自购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 水通道蛋白 1(aquaporin 1, AQP1)、AQP2、AQP3 抗体(批号分别为 H661760011、H650109010、H660117003) 购自杭州华安生物技术有限公司; 环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)、环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)、血管紧张素 II 受体 1(angiotensin II receptor 1, AGTR1) 抗体(批号分别为 P26JU01、P25JU5P、P28MY2P) 购自成都正能生物技术有限责任公司; 上皮钠离子通道(epithelial sodium channel, ENAC) 抗体、 $\beta$ -actin 抗体(批号分别为 28707-1-AP、23011924) 购自武汉三鹰生物技术有限公司;  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase 抗体(批号 PTM-6271) 购自杭州景杰生物科技股份有限公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号 A0208) 购自上海碧云天生物科技股份有限公司; 电泳液(批号 P0741) 购自上海碧云天生物科技股份有限公司; 转膜液(批号 2025G008) 购自武汉赛维尔生物科技股份有限公司; 一步聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE) 凝胶快速制备试剂盒(批号 03931600)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA, 批号 A8020) 均购自北京索莱宝科技有限公司。

#### 1.4 仪器

1260 型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司); ReadMax1200 型光吸收全波长酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司); JT-12J 型自动脱水机、JB-L5 型组织包埋机(武汉俊杰电子有限公司); LEiCA

RM2016 型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司); Nikon Eclipse E100 型正置光学显微镜(日本尼康公司); TG16-WS 型高速离心机(湖南湘鑫仪器仪表有限公司); TGL-16.5M 型低温离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); CFX96 型荧光定量 PCR 检测系统(美国 BIO-RAD 公司); TouchImagerpro 型胶片式化学发光成像仪(上海易亨特光电技术有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 高效液相色谱法测定棉团铁线莲提取物中主要成分含量

**2.1.1 对照品溶液的配制** 取对照品灵仙新苷、常春藤苷皂元、齐墩果酸适量, 用 70% 甲醇制成含灵仙新苷 0.254 mg/mL、常春藤苷皂元 1.232 mg/mL、齐墩果酸 4.190 mg/mL 的对照品贮备液; 精密吸取对照品贮备液 1 mL, 置 12 mL 量瓶中, 用 70% 甲醇定容, 摇匀, 即得混合对照品溶液。

**2.1.2 供试品溶液的配制** 棉团铁线莲粉碎过筛, 取粉末 1.0 g, 精密加入 70% 甲醇 25 mL, 称定质量, 超声 45 min, 冷却, 补足减失质量, 摇匀, 静置, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

**2.1.3 色谱条件** MicroPulite<sup>®</sup> XP tC<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相为 0.05% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱: 0~12 min, 15.0% B; 12~29 min, 15.0%~36.0% B; 29~41 min, 36.0%~68.0% B; 41~52 min, 68.0%~85.0% B; 52~60 min, 85.0%~15.0% B。检测波长 210 nm; 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10  $\mu\text{L}$ 。

**2.1.4 含量测定** 采用保留时间结合紫外吸收光谱特征进行定性分析, 利用外标法(标准曲线法) 进行定量, 测定棉团铁线莲提取物中灵仙新苷、常春藤苷皂元、齐墩果酸含量。

### 2.2 动物实验分组、造模及给药

**2.2.1 给药溶液的制备** 取棉团铁线莲饮片 100 g, 加 10 倍量水浸泡 60 min, 煮沸 60 min, 滤过; 残渣加 10 倍量水, 煮沸 60 min, 滤过; 合并 2 次滤液, 浓缩至质量浓度为 1.0 g/mL (以生药量计) 溶液。同法制备川木通提取物。呋塞米用纯水制成 10 mg/mL 的混悬液。

**2.2.2 急性利尿实验** 参照 Păltinean 等<sup>[15]</sup>的方法并加以修改。大鼠适应性喂养 1 周, 禁食不禁水 18 h 后, ig 生理盐水(25 mL/kg)<sup>[17]</sup>, 收集 2 h 内尿液, 取尿量超过 40% 水负荷的大鼠, 随机分为模型组、

呋塞米 (10 mg/kg) 组、川木通 (20 g/kg) 组和棉团铁线莲低、中、高剂量 (5、10、20 g/kg) 组, 每组 8 只。呋塞米、川木通具有良好的利尿效果<sup>[16]</sup>, 因此川木通和呋塞米作为阳性对照药。各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 模型组 ig 等体积的生理盐水。将每只大鼠置于代谢笼中, 分别在给药 30 min 后, 收集各组大鼠 1~6 h 尿量, 并测量各组大鼠的尿液 pH 值和电解质浓度。

**2.2.3 长期利尿实验** 参照 Yang 等<sup>[18]</sup>的方法并加以修改。大鼠适应性喂养 1 周, 禁食不禁水 18 h 后, ig 生理盐水 (25 mL/kg)<sup>[17]</sup>, 使动物体内水平衡, 收集 2 h 内尿液, 取尿量超过 40% 水负荷的大鼠, 随机分为模型组、呋塞米 (10 mg/kg) 组、川木通 (20 g/kg) 组和棉团铁线莲低、中、高剂量 (5、10、20 g/kg) 组, 每组 8 只。各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 模型组 ig 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续给药 7 d。将每只大鼠置于代谢笼中, 监测体质量、摄食量和饮水量变化, 每日收集各组大鼠尿液。给药结束后, 大鼠 ip 1% 水合氯醛麻醉处死, 收集血液和肾脏组织, 血液于 4 °C、2 500 r/min 离心 15 min, 分离血清, 于 -80 °C 保存。

### 2.3 大鼠尿量、电解质浓度的测定

采用刻度筒测量尿量, 按照 ELISA 试剂盒说明书测定尿液中 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>、Ca<sup>2+</sup> 水平。

### 2.4 大鼠血清生化指标检测

取“2.2.3”项下血清, 按照 ELISA 试剂盒说明书测定血清中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性及 Ang II、ADH、ALD、ANP 水平。

### 2.5 肾脏组织苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色

取“2.2.3”项下肾组织, 用冰生理盐水灌注以清除残留血液, 随后用 10% 中性缓冲福尔马林 (pH 7) 固定 24 h。经梯度乙醇脱水和二甲苯透明处理, 石蜡包埋并切片, HE 染色, 全景扫描仪完整扫描, 在 CaseViewer 软件中观察大鼠肾脏病理形态。

### 2.6 网络药理学和分子对接分析

**2.6.1 棉团铁线莲活性成分及靶点筛选** 通过 TCMSP 数据库, 以口服生物利用度 (oral bioavailability, OB)  $\geq 30\%$  和类药性 (drug-likeness, DL)  $\geq 0.18$  为筛选标准, 获取棉团铁线莲的活性成分。从 PubChem 数据库中检索成分的异构体 SMILES 并导入 Swiss Target Prediction 数据库, 将物种设置为“Homo sapiens”, 概率阈值  $> 1$  以预测

棉团铁线莲活性成分的相关靶点。

**2.6.2 疾病靶点的筛选** 以“diuretic”为关键词, 通过 GeneCards、OMIM 数据库收集相关靶点, 在此基础上, 对该靶点进一步进行高分筛选整合, Score 值越高则代表该靶点与疾病联系密切。使用 UniProt 数据库对结果进行标准化, 删除重复的靶标以获得利尿相关靶标。

**2.6.3 PPI 的富集和分析** 使用 Venny 在线网址筛选棉团铁线莲活性成分与疾病之间的重叠靶点, 并构建韦恩图。将药物-疾病交集靶点提交至 String 数据库进行分析, 将生物种类设置为“Homo sapiens”, 将置信度设置为  $> 0.40$ , 分析结果可得到蛋白互作关系。进一步使用 Cytoscape 3.9.1 软件中的 CytoNCA 插件, 计算节点的 6 个拓扑参数: 节点中心度 (betweenness centrality, BC)、紧密度中心度 (closeness centrality, CC)、度中心度 (degree centrality, DC)、局部平均连通度 (local average connectivity based method, LAC)、网络中心度 (network centrality, NC)、特征向量中心性 (eigenvector centrality, EC), 绘制得到 PPI 网络图。拓扑参数的数值越高, 表明网络中的节点越重要。

**2.6.4 GO 功能及 KEGG 通路富集分析** 将交集靶点基因导入 Metascape 平台, 选择 OFFICIAL\_GENE\_SYMBOL, Homo sapiens, Gene List 等参数, 通过数据库的 Gene Functional Classification 功能进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 以  $P < 0.05$  作为筛选标准, 并借助微生信网站进行可视化处理。

**2.6.5 分子对接** 在 TCMSP 数据库下载核心成分的 MOL2 格式, 并通过 Open Babel 3.1.1 转化成 PDB 格式。从 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org>) 中获得核心靶点的蛋白晶体结构, 利用 PyMOL 软件去水、清除原配体并保存为 PDB 格式。运用 AutoDock Tools 软件对核心成分进行调整电荷、选择扭转键等处理, 对核心靶点采用加氢等处理, 最终以 PDBQT 格式导入 AutoDock Vina 中进行分子对接。

### 2.7 qRT-PCR 检测大鼠肾脏相关基因表达

取“2.2.3”项下肾组织, 将肾脏磨碎和均质后, 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。以  $\beta$ -actin 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算基因相对表达量。

### 2.8 Western blotting 检测大鼠肾脏相关蛋白表达

取“2.2.3”项下肾组织, 加入 RIPA 裂解缓冲液匀浆提取总蛋白, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	上游引物序列 (5'-3')	下游引物序列 (5'-3')
AQP1	CACCTGCTGGCCATTGACTA	TGGTTTGAGAAGTTGCGGGT
AQP2	GCCACCTCCTTGGGATCTATTT	GGGGAACAGCAGGTAGTTGT
AQP3	AGATGCTCCACATCCGCTAC	AACCACAGCCGAACATCACA
AQP4	AAACCCAGAAAGACAGCACC	GGGAGGTCCACACTTACAGC
AQP6	TTGCTTCCATGGACAGTCGG	CAGCCAGTGAAGTAGATCCCA
AQP7	GAGGGTAGGACACAAGGTCCA	TAGCTGCCAAGCCTTTCTCC
cAMP	AGGACCCAGATACTCCCAA	TCCCCATACTGCTTCAC
CREB	GAGCAGACAACCAGCAGAG	GTTACAGTGGGAGCAGATGAC
AGTR1	ATGTGGACTGAACCGACTTT	TGGCTTTGCTTTGTCTTGT
ENAC	TGTCCTTGTATGGGGTCAA	CCTTCCCTTCTCATTCTCA
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase	AGCAGGGAATGAAGAACAAG	AGTAGGGGAAGGCACAGAA
β-actin	GATGACGATATCGTCTGCGCTC	GTCAGGATGCCTCTCTTGCT

定蛋白浓度。蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% BSA 于室温封闭 1 h, 分别加入 AQP1 (1 : 2 000)、AQP2 (1 : 1 000)、AQP3 (1 : 1 000)、AGTR1 (1 : 1 000)、ENAC (1 : 1 000)、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase (1 : 1 000)、cAMP (1 : 1 000)、CREB (1 : 1 000) 和 β-actin (1 : 3 000) 抗体, 4 ℃ 孵育过夜; 洗涤后, 加入 HRP 标记的二抗 (1 : 5 000), 室温孵育 1 h; 洗涤后, 加入 ECL 化学发光试剂显影, 使用 ImageLab 软件进行定量分析<sup>[19]</sup>。

### 2.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism 6 软件进行统计分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用单因素方差分析 (ANOVA) 和 Tukey's 检验比较各组间差异。

## 3 结果

### 3.1 棉团铁线莲提取物的成分分析

采用高效液相色谱法对棉团铁线莲提取物中的主要成分进行分析, 如图 1 所示。以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得到线性回归方程分别为灵仙新苷  $Y=1.43X+5.054$ ,  $R^2=0.998$ , 线性范围为 0.015~2.200 mg/mL; 常春藤苷皂元  $Y=4.062X+3.781$ ,  $R^2=0.999$ , 线性范围为 0.015~2.200 mg/mL; 齐墩果酸  $Y=8.15X+2.598$ ,  $R^2=0.998$ , 线性范围为 0.015~2.200 mg/mL。结果显示, 棉团铁线莲提取物中含灵仙新苷 502.3 μg/mL、常春藤苷皂元 35.7 μg/mL、齐墩果酸 49.1 μg/mL。根据药液浓缩比例换算至单位生药质量后, 棉团铁线莲提取物含灵仙新苷 1.256 0 mg/g、常春藤苷皂元 0.089 3 mg/g、齐墩果酸 0.122 8 mg/g。

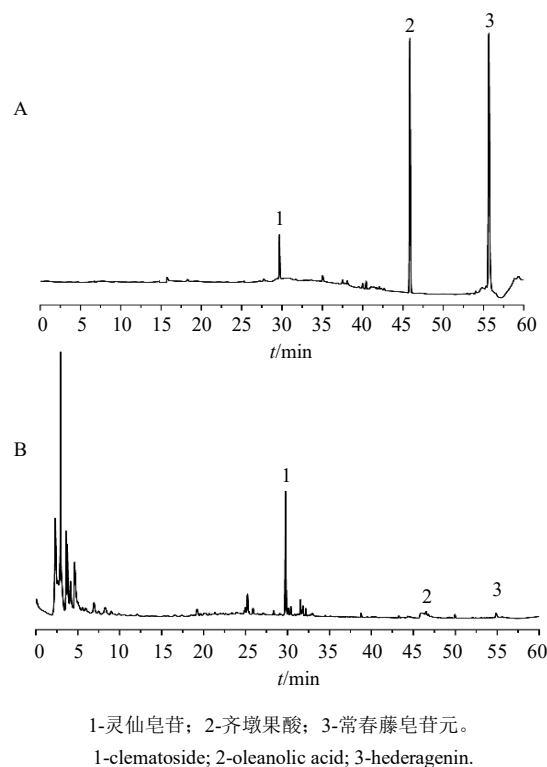
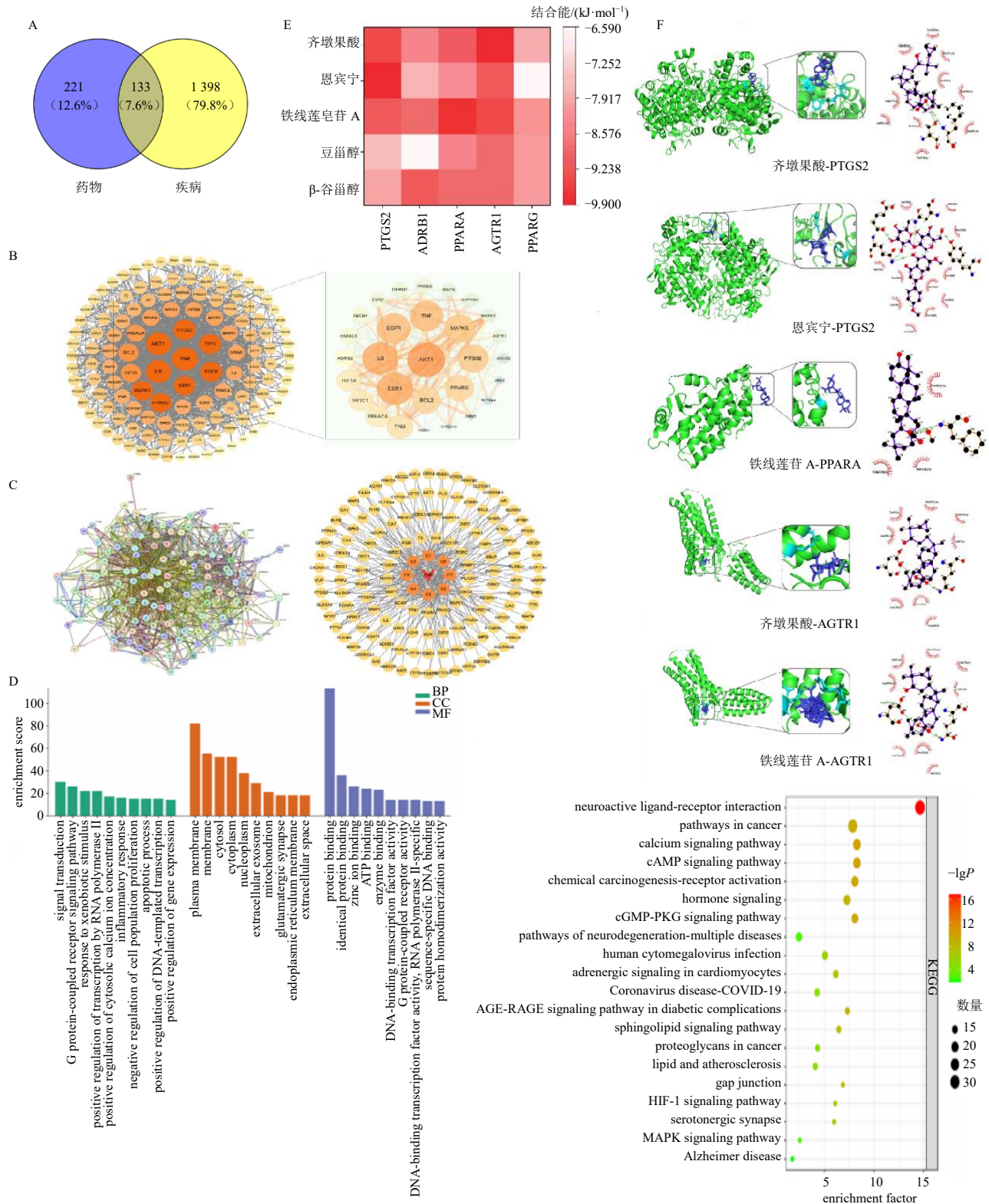


图 1 混合对照品溶液 (A) 和棉团铁线莲提取物 (B) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference standard solution (A) and *C. hexapetala* extract (B)

### 3.2 网络药理学和分子对接结果

**3.2.1 棉团铁线莲活性成分、作用靶点及利尿相关靶点收集** 通过 TCMSp 数据库共收集棉团铁线莲活性成分 7 种, 去除重复后, 共获得 354 个药物靶点。通过 Drugbank、GeneCards 数据库共获得与利尿相关的基因 1 531 个。活性成分靶点与利尿相关基因取交集后获得 133 个潜在靶点 (图 2-A)。



A-药物-疾病韦恩图; B-PPI网络; C-“药物-成分-靶点”网络; D-GO功能与KEGG通路富集分析; E-分子对接结合能热图; F-关键分子对接模式示意图。

A-Venn diagram of drug-disease; B-PPI network; C-“drug-component-target” network; D-GO function and KEGG pathway enrichment analysis; E-heatmap of molecular docking scores; F-schematic diagram of key molecular docking poses.

图2 网络药理学与分子对接结果分析

Fig. 2 Results of network pharmacology and molecular docking

**3.2.2 棉团铁线莲活性成分-利尿相关靶点 PPI 网络分析** 将活性成分与利尿的交集靶点导入 String 平台, 下载 PPI 的 TSV 数据文件, 导入 Cytoscape 3.9.1 软件 (132 个节点, 1 250 条边), 然后通过 Centiscape 中 (BC>144.59, CC>0.003 7, DC>18.939) 构建活性成分-利尿相关靶点相互作用网络 (29 个节点, 244 条边), 见图 2-B。根据置信度阈值 1, 取度值排名前 5 的靶点作为利尿的核心靶点, 分别为前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、肾上腺素能受体  $\beta 1$  (adrenergic receptor  $\beta 1$ , ADRB1)、过氧化物酶体增殖物激活受体  $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ , PPARA)、血管紧张素 II 1 型受体 (angiotensin II receptor type 1, AGTR1) 和 PPARG。

**3.2.3 “药物-成分-靶点”网络构建** 将活性成分及获取的核心靶点, 导入 Excel 表格中建立相互对应关系, 运用 Cytoscape 3.9.1 软件构建“药物-成分-靶点”网络 (图 2-C), 共有 137 个节点, 303 条边。

**3.2.4 GO 功能富集分析** GO 富集分析选取生物学过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 中可信度前 10 位的条目进行注释, 见图 2-D。分析结果显示 GO 功能富集中, 在 BP 上主要涉及了对细胞内外信号分子的传递与响应过程、G 蛋白

偶联受体介导的细胞信号传导途径有关; CC 主要分布在质膜、膜、细胞质上, MF 则体现在合蛋白质结合、同源蛋白结合等方面。

**3.2.5 KEGG 通路富集分析** 取  $P$  值前 20 条信号通路, 如图 2-D 所示, KEGG 富集与利尿相关的通路分别为丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路、肾上腺素能信号传导、环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP)-蛋白激酶 G (protein kinase G, PKG) 信号通路、cAMP 信号通路、激素信号传导等。

**3.2.6 分子对接结果** 将核心成分与核心靶点进行分子对接, 结果见图 2-E、F, 铁线莲皂苷 A、恩比宁、 $\beta$ -谷甾醇、豆固醇、齐墩果酸与核心靶点 PTGS2、ADRB1、PPARA、AGTR1、PPARG 的结合能均小于  $-5.0$  kcal/mol ( $1$  kcal/mol =  $4.182$  kJ/mol), 表明核心成分与核心靶点具有良好的结合能力。其中齐墩果酸与 AGTR1、恩比宁与 TNF、铁线莲皂苷 A 与 PPARA、铁线莲皂苷 A 与 AGTR1 结合最优。

**3.3 棉团铁线莲对大鼠急性利尿的影响**

在给药后 1~6 h 连续测量各组大鼠的尿量及电解质 ( $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ ) 的浓度。如表 2~6 所示, 与模型组比较, 给药后 1~6 h 呋塞米组尿量显著增加 ( $P<0.01$ ), 给药后 4 h 川木通组和棉团铁线莲低剂量组尿量显著减少 ( $P<0.05$ ), 给药后

表 2 棉团铁线莲对大鼠 1~6 h 尿量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Effect of *C. hexapetala* on 1—6 h urinary volume in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/ ( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	尿量/( $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ )					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
模型	—	4.32±2.01	9.17±3.12	13.04±1.41	13.24±1.52	14.43±1.82	15.23±2.51
呋塞米	0.010	10.83±5.32**	23.42±6.04**	27.57±2.11**	30.02±1.53**	30.82±1.53**	31.13±1.21**
川木通	20	6.03±3.12	12.27±4.02	15.93±3.61	18.12±1.11*	18.91±1.61	20.02±1.31
棉团铁线莲	5	4.71±4.11	9.31±4.11	14.72±3.41	18.08±1.32*	19.52±1.22	21.14±1.44
	10	4.54±2.81	11.08±4.19	14.17±3.42	18.04±1.72*	20.36±1.32*	22.18±1.42**
	20	4.93±3.32	9.56±4.17	14.44±4.11	18.83±1.71*	21.24±1.11*	24.06±1.53**

与模型组比较: \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  \*\*\* $P<0.001$ , 下表同。

\* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  \*\*\* $P<0.001$  vs model group, same as below tables.

表 3 棉团铁线莲对大鼠连续 6 h 尿液中  $\text{Na}^+$  水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 3 Effect of *C. hexapetala* on  $\text{Na}^+$  level in urine of rats over six consecutive hours ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/ ( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	$\text{Na}^+$ /( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
模型	—	146.07±8.14	151.67±5.06	143.27±9.91	148.09±5.28	144.98±3.51	119.16±3.08
呋塞米	0.010	223.69±12.32**	213.27±6.94**	225.24±8.04**	238.31±8.36**	228.20±2.66**	235.98±3.74**
川木通	20	161.01±5.18	170.49±13.32	179.82±11.03*	188.22±1.76**	137.51±7.92*	151.67±6.81*
棉团铁线莲	5	152.13±1.76	169.87±1.44	147.16±3.08	162.56±2.98	127.24±8.36	117.29±4.52
	10	174.22±4.96*	159.61±3.96*	166.91±4.74*	153.69±4.84	139.69±5.84	126.62±4.08
	20	182.47±5.52*	181.84±3.42*	180.29±1.98*	178.11±9.46**	175.93±4.62*	174.69±2.86*

表4 棉团铁线莲对大鼠连续6h尿液中K<sup>+</sup>水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 4 Effect of *C. hexapetala* on K<sup>+</sup> level in urine of rats over six consecutive hours ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/ (g·kg <sup>-1</sup> )	K <sup>+</sup> /(mmol·L <sup>-1</sup> )					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
模型	—	126.94±6.71	125.83±5.57	121.44±10.26	129.04±2.96	127.81±7.83	135.77±3.27
呋塞米	0.010	199.41±7.81**	191.58±13.41**	204.80±6.45**	209.72±7.88**	204.61±9.62**	190.28±4.91**
川木通	20	151.43±9.92*	136.09±8.43	157.82±5.39**	173.24±9.02**	135.94±8.25	153.49±11.71
棉团铁线莲	5	138.06±8.55	125.76±5.63	123.51±2.27	129.98±9.01	138.63±3.11	141.47±1.24
	10	151.97±5.99*	135.75±8.84	139.23±8.71	141.39±11.84	133.75±4.33	146.53±14.84
	20	152.14±14.41*	150.61±1.47*	152.66±2.06*	154.42±7.96*	154.17±5.26*	164.96±6.71*

表5 棉团铁线莲对大鼠连续6h尿液中Cl<sup>-</sup>水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 5 Effect of *C. hexapetala* on Cl<sup>-</sup> level in urine of rats over six consecutive hours ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/ (g·kg <sup>-1</sup> )	Cl <sup>-</sup> /(mmol·L <sup>-1</sup> )					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
模型	—	99.84±10.87	89.33±6.25	99.62±3.17	86.61±9.61	105.21±8.73	89.81±3.41
呋塞米	0.010	169.25±7.36**	156.54±6.63**	164.54±6.26**	163.09±9.62**	167.18±7.71**	173.92±6.93**
川木通	20	110.25±9.14	110.17±5.16**	108.61±5.44	107.80±10.32*	112.53±11.83	107.57±4.66*
棉团铁线莲	5	103.49±4.02	109.53±4.79**	106.03±2.78	105.34±3.85	112.73±4.27	113.81±7.24*
	10	117.58±7.31	120.06±4.38**	114.56±7.76*	122.54±6.42**	115.47±6.73	122.37±4.03**
	20	136.93±4.45**	128.59±3.03**	129.02±5.18**	140.04±6.61**	141.29±8.22**	127.84±8.79**

表6 棉团铁线莲对大鼠连续6h尿液中Ca<sup>2+</sup>水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 6 Effect of *C. hexapetala* on Ca<sup>2+</sup> level in urine of rats over six consecutive hours ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/ (g·kg <sup>-1</sup> )	Ca <sup>2+</sup> /(mmol·L <sup>-1</sup> )					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
模型	—	0.89±0.12	0.86±0.14	0.85±0.15	0.84±0.12	0.97±0.15	0.87±0.17
呋塞米	0.010	1.36±0.09**	1.34±0.16**	1.36±0.21**	1.49±0.15**	1.37±0.15**	1.59±0.16**
川木通	20	0.81±0.12	0.70±0.13	0.73±0.13	0.77±0.17	0.83±0.11	0.84±0.16
棉团铁线莲	5	0.82±0.21	0.88±0.37	0.93±0.13	0.87±0.06	1.01±0.05	0.96±0.18
	10	0.77±0.17	0.78±0.18	0.75±0.09	0.84±0.12	0.83±0.13	0.83±0.13
	20	0.66±0.18*	0.66±0.14*	0.65±0.16*	0.66±0.18*	0.72±0.12*	0.65±0.16*

4~6 h 棉团铁线莲中、高剂量组 (10、20 mg/kg) 尿量显著增加 ( $P < 0.05, 0.01$ )。此外,与模型组比较,棉团铁线莲高剂量组尿液中 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>水平显著升高 ( $P < 0.05, 0.01$ ), Ca<sup>2+</sup>水平显著降低 ( $P < 0.05$ ),与利尿剂呋塞米作用一致。

### 3.4 棉团铁线莲对大鼠长期利尿的影响

为了评估棉团铁线莲的长期利尿作用,连续给

药 6 d,每天测量各组大鼠的尿量和尿液电解质浓度。如表 7~11 所示,与模型组比较,1~6 d 呋塞米组和棉团铁线莲中、高剂量组大鼠尿量显著增加 ( $P < 0.05, 0.01$ )。此外,与模型组比较,棉团铁线莲高剂量组大鼠尿液中 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>水平显著升高 ( $P < 0.05, 0.01$ ), Ca<sup>2+</sup>水平显著降低 ( $P < 0.05$ ),与呋塞米作用一致。

表7 棉团铁线莲对大鼠连续6d尿量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 7 Effect of *C. hexapetala* on urinary volume in rats over six consecutive days ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/ (g·kg <sup>-1</sup> )	尿量/(mL·kg <sup>-1</sup> )					
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
模型	—	1.32±0.23	1.36±0.43	1.59±0.27	1.43±0.39	1.58±0.32	1.76±0.24
呋塞米	0.010	4.22±0.43**	3.57±0.43**	3.17±0.13**	3.28±0.16**	3.35±0.23**	4.11±0.51**
川木通	20	2.85±0.27**	2.66±0.28**	2.31±0.45*	2.41±0.46*	2.89±0.17**	2.39±0.41
棉团铁线莲	5	2.74±0.39**	2.69±0.42**	2.11±0.43	2.23±0.27*	2.43±0.28*	2.33±0.18
	10	2.96±0.32**	2.48±0.22**	2.25±0.25*	2.45±0.23*	2.65±0.11**	2.54±0.47*
	20	3.10±0.24**	2.92±0.49**	2.61±0.40**	2.75±0.15**	2.82±0.21**	2.63±0.21**

表 8 棉团铁线莲对大鼠连续 6 d 尿液中 Na<sup>+</sup>水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 8 Effect of *C. hexapetala* on Na<sup>+</sup> level in rats over six consecutive days ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/ (g·kg <sup>-1</sup> )	Na <sup>+</sup> /(mmol·L <sup>-1</sup> )					
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
模型	—	146.07±8.14	151.67±5.06	143.27±9.91	148.09±5.79	144.98±3.52	119.16±3.08
呋塞米	0.010	223.69±2.32**	213.27±6.94**	225.24±8.04**	238.31±8.36**	228.22±2.66**	235.98±3.74**
川木通	20	161.02±5.18*	170.49±3.32	179.82±11.03	188.22±1.76	137.51±7.92	151.67±6.82
棉团铁线莲	5	152.13±1.76	169.87±2.44*	147.16±3.08	162.56±12.98*	127.24±8.36	117.29±14.52
	10	174.22±4.96	159.62±3.96*	166.91±14.74*	153.69±4.84*	139.69±5.84	126.62±14.08
	20	182.47±5.53*	181.84±3.42**	180.29±1.98**	178.11±9.35*	175.93±4.62*	174.69±2.86*

表 9 棉团铁线莲对大鼠连续 6 d 尿液中 K<sup>+</sup>水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 9 Effect of *C. hexapetala* on K<sup>+</sup> level in rats over six consecutive days ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/ (g·kg <sup>-1</sup> )	K <sup>+</sup> /(mmol·L <sup>-1</sup> )					
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
模型	—	104.43±14.37	77.75±10.04	100.11±12.51	96.43±16.65	107.72±8.71	96.50±2.48
呋塞米	0.010	167.21±14.72**	134.63±3.03**	145.72±2.38**	166.19±13.91**	165.83±11.09**	169.91±1.23**
川木通	20	145.73±14.42	103.52±18.81	109.23±7.76	124.54±13.85	127.37±16.83	129.36±12.71
棉团铁线莲	5	146.75±15.18*	100.89±8.33	110.63±2.51	120.42±10.13	141.11±2.94*	142.17±14.12*
	10	119.22±10.19*	115.24±13.35*	119.63±2.57	129.24±11.43	137.47±12.27*	139.63±5.16*
	20	147.25±5.46*	121.96±14.69*	124.88±16.32*	145.82±6.39**	151.62±5.63**	145.88±9.39**

表 10 棉团铁线莲对大鼠连续 6 d 尿液中 Cl<sup>-</sup>水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 10 Effect of *C. hexapetala* on Cl<sup>-</sup> level in rats over six consecutive days ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/ (g·kg <sup>-1</sup> )	Cl <sup>-</sup> /(mmol·L <sup>-1</sup> )					
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
模型	—	93.79±6.75	92.44±3.95	95.53±5.37	77.46±11.95	113.39±5.70	98.50±12.82
呋塞米	0.010	183.23±12.19**	181.07±11.69**	187.05±2.69**	220.74±16.11**	199.98±2.72**	223.07±18.49**
川木通	20	137.16±6.44*	108.26±14.29	100.58±19.80	141.52±14.53**	124.34±15.91	125.03±22.43
棉团铁线莲	5	130.68±18.03*	119.06±26.44	118.19±4.89	127.85±8.85*	134.96±2.93	125.35±12.16
	10	136.19±25.78*	132.21±5.71*	126.52±7.81*	138.92±14.39**	150.53±19.44*	143.49±7.24*
	20	144.65±2.82**	143.83±6.23**	145.37±9.98**	144.25±7.88**	160.87±12.57**	152.46±12.19**

表 11 棉团铁线莲对大鼠连续 6 d 尿液中 Ca<sup>2+</sup>水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 11 Effect of *C. hexapetala* on Ca<sup>2+</sup> level in urine of rats over six consecutive days ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/ (g·kg <sup>-1</sup> )	Ca <sup>2+</sup> /(mmol·L <sup>-1</sup> )					
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
模型	—	1.25±0.87	1.21±0.07	1.07±0.06	1.14±0.11	1.37±0.12	1.18±0.14
呋塞米	0.010	2.28±0.27**	2.02±0.19**	1.94±0.24**	2.34±0.21**	2.03±0.14**	2.38±0.18**
川木通	20	1.50±0.03	1.35±0.21	1.15±0.16	1.09±0.17	1.30±0.24	1.09±0.17
棉团铁线莲	5	1.55±0.10	1.41±0.16	1.35±0.12	1.48±0.16	1.56±0.11	1.39±0.23
	10	1.24±0.15	1.17±0.02	1.22±0.16	1.27±0.14	1.37±0.12	1.22±0.13
	20	0.98±0.03*	0.96±0.08*	0.99±0.11*	1.13±0.07	1.09±0.18*	1.05±0.11*

### 3.5 棉团铁线莲对大鼠血清中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性和 Ang II、ADH、ALD、ANP 水平的影响

为了研究棉团铁线莲是否通过抑制肾脏钠重吸收或肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS) 发挥利尿作用, 采用 ELISA 检测大鼠血清中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性及 Ang II、ADH、ALD、ANP 水平。结果如表 12 所示, 与模型组比较, 棉团铁线莲中、高剂量组大

鼠血清中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性和 ANP 水平显著升高 ( $P < 0.05, 0.01$ ), ADH、ALD、Ang II 水平显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ); 棉团铁线莲低剂量组 ALD、Ang II 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 呋塞米组 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性显著升高 ( $P < 0.01$ ), ADH、ALD 水平显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ); 川木通组 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性显著升高 ( $P < 0.05$ ), ALD、Ang II 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 棉团铁线莲低剂量组 ALD、Ang II

表 12 棉团铁线莲对大鼠血清中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性和 Ang II、ADH、ALD、ANP 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 12 Effect of *C. hexapetala* on activity of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and levels Ang II, ADH, ALD, ANP in serum of rats

( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	ADH/(ng·mL <sup>-1</sup> )	ALD/(pg·mL <sup>-1</sup> )	Ang II/(pg·mL <sup>-1</sup> )	ANP/(pg·mL <sup>-1</sup> )	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase/(U·mL <sup>-1</sup> )
模型	—	15.59±3.02	124.06±17.08	233.46±42.44	106.21±16.86	87.55±8.67
呋塞米	0.010	11.63±1.46**	107.04±16.51*	222.07±39.59	99.64±14.53	171.38±11.11**
川木通	20	18.09±2.52	91.72±9.73**	157.11±39.44**	102.79±19.25	126.32±8.27*
棉团铁线莲	5	14.48±3.34	96.07±18.57**	102.17±31.91**	112.55±15.46	92.36±7.47
	10	12.77±2.25*	92.83±13.38**	80.66±31.42**	123.45±17.61*	121.23±6.91*
	20	12.24±1.94*	90.52±12.26**	57.60±11.35**	132.32±13.97**	141.29±5.72**

水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。以上结果表明棉团铁线莲能抑制 RAAS 并释放 ANP, 而呋塞米仅能降低盐负荷大鼠的 ADH 和 ALD 水平。

### 3.6 棉团铁线莲对大鼠肾脏形态学的影响

如图 3 所示, 模型组大鼠的肾小球结构清晰, 细胞规则、结构完整, 可见轻微的炎性细胞浸润, 胞质大泡样, 无明显病理变化。与模型组相比, 呋塞米组和川木通组存在轻微炎症细胞浸润, 细胞排列紊乱, 肿胀呈椭圆形。棉团铁线莲各剂量组肾实质完整, 肾小球数量稳定在 13~16 个, 肾小球毛细血管祥舒展、基底膜厚度均匀; 肾小管管腔直径均匀扩张至 30~35 μm, 管腔形态规则, 上皮细胞形态正常、排列有序, 胞质呈生理性大泡样, 每高倍

视野下炎性细胞浸润数 < 1 个, 肾实质结构完整, 未出现肾小管退化性改变或肾小球病理损伤。表明棉团铁线莲对肾脏无毒性作用, 安全性较好。

### 3.7 棉团铁线莲对大鼠肾组织 AQP/cAMP/CREB 通路相关基因表达的影响

网络药理学预测结果显示, 棉团铁线莲可能通过作用于 AMP/CREB 通路发挥利尿作用。采用 qRT-PCR 检测各组大鼠肾脏 AQP/cAMP/CREB 通路相关基因表达, 结果如图 4 所示, 与模型组比较, 各给药组大鼠肾组织 *AQP1*、*AQP2*、*AQP3*、*AQP4*、*AQP6*、*AQP7*、*Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase*、*ENaC*、*AGTR1*、*cAMP* 和 *CREB* mRNA 表达水平均显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。

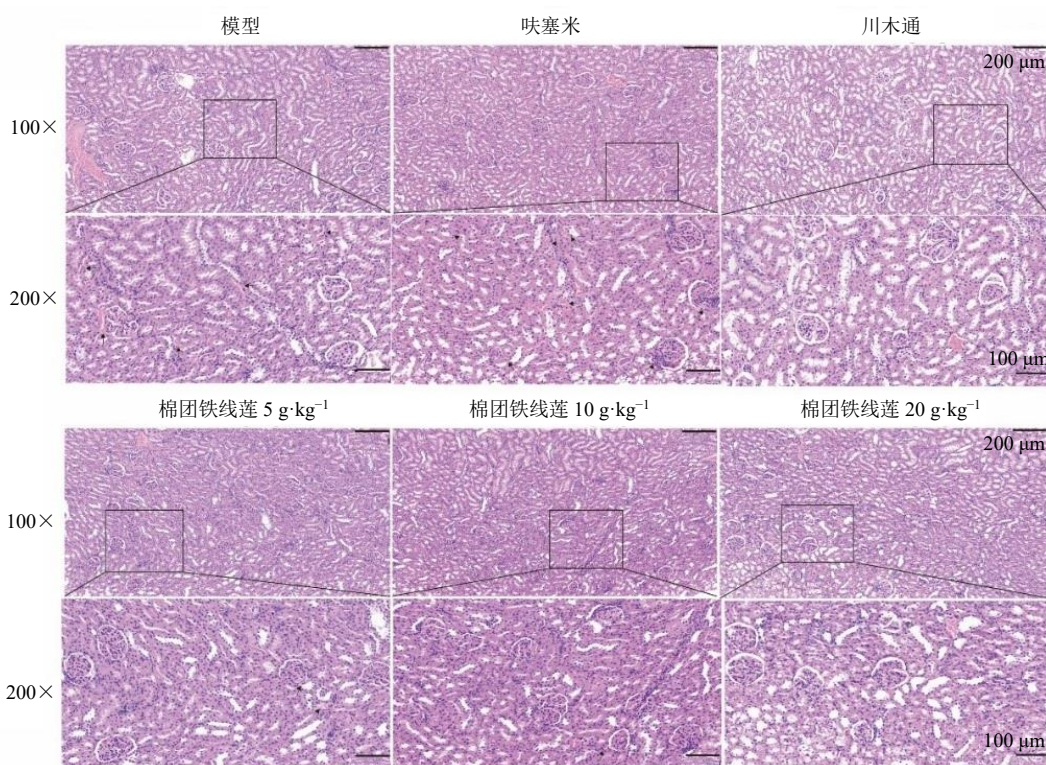
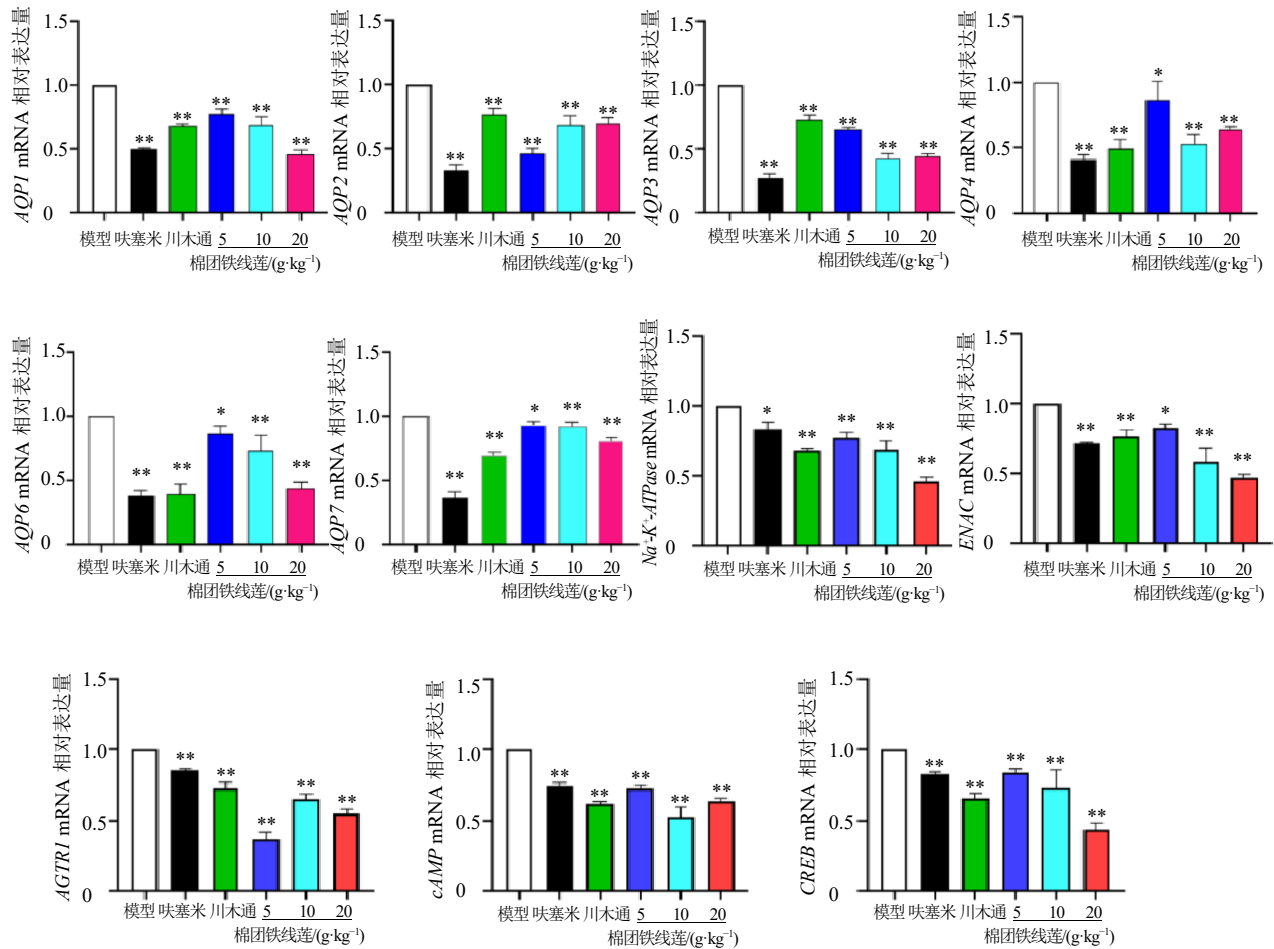


图 3 棉团铁线莲对大鼠肾脏组织病理变化的影响 (HE 染色)

Fig. 3 Effect of *C. hexapetala* on pathological changes of kidney tissue in rats (HE staining)



与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ , 图5同。

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group, same as Fig. 5.

图4 棉团铁线莲对大鼠肾组织 AQP1、AQP2、AQP3、AQP4、AQP6、AQP7、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase、ENaC、AGTR1、cAMP 和 CREB mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 4 Effect of *C. hexapetala* on mRNA expressions of AQP1, AQP2, AQP3, AQP4, AQP6, AQP7, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, ENaC, AGTR1, cAMP and CREB in kidney tissue of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

### 3.8 棉团铁线莲对大鼠肾组织 AQP/cAMP/CREB 通路相关蛋白表达的影响

采用 Western blotting 检测各组大鼠肾脏 AQP/cAMP/CREB 通路相关蛋白表达, 结果如图 5 所示, 与模型组比较, 棉团铁线莲高剂量组大鼠肾组织 AQP1、AQP2、AQP3、AGTR1、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase、ENaC、cAMP 和 CREB 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ); 棉团铁线莲中剂量组大鼠肾组织 AQP2、AQP3、AGTR1、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 和 cAMP 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ); 棉团铁线莲低剂量组大鼠肾组织 AQP2、AQP3、AGTR1 和 cAMP 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ); 呋塞米组大鼠肾组织 AQP1、AQP2 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 川木通组大鼠

肾组织 AQP2、AGTR1、cAMP 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ )。表明棉团铁线莲通过抑制 AQP/cAMP/CREB 通路发挥利尿作用。

### 4 讨论

棉团铁线莲作为威灵仙法定品种之一, 一直被作为祛风湿的重要中药, 传统上常用于风湿痹证。此外, 现代常用中药复方利尿药中也含有棉团铁线莲, 临床用于治疗水肿、痛风等疾病, 但目前仍缺乏单独应用棉团铁线莲利尿作用和潜在分子机制的相关报道。本研究结果显示, 与模型组比较, 在急性或长期治疗下, 棉团铁线莲提取物可以有效地增加大鼠尿量。尿量的增加虽不比经典利尿剂呋塞米治疗显著, 但是相较于模型组排尿明显, 特别是棉团铁线莲高剂量组。

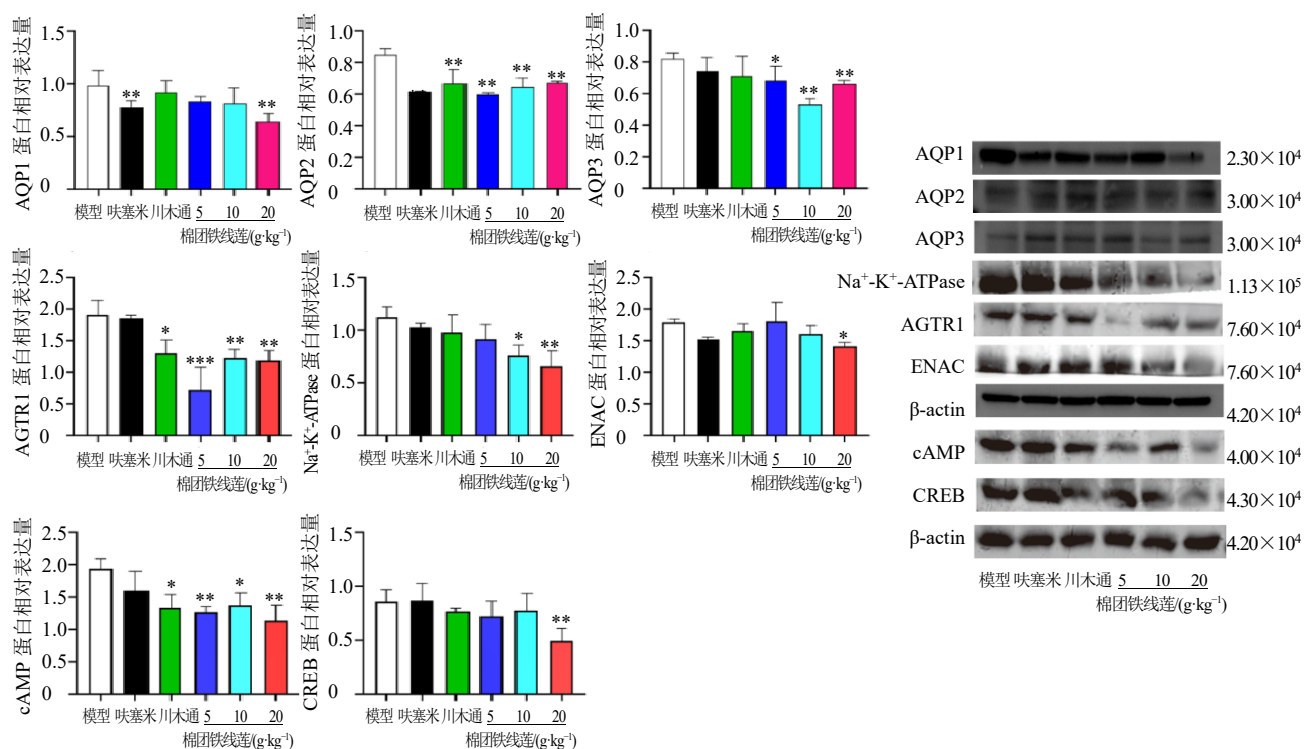


图5 棉团铁线莲对大鼠肾组织 AQP1、AQP2、AQP3、AGTR1、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase、ENAC、cAMP 和 CREB 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 5 Effect of *C. hexapetala* on protein expressions of AQP1, AQP2, AQP3, AGTR1, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, ENAC, cAMP and CREB in kidney tissue of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>和Ca<sup>2+</sup>是位于细胞外和细胞内液体中的主要电解质，在维持体液稳态中起调节作用，Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 是连接和调控这 4 种关键电解质动态平衡的分子枢纽，其活性直接决定了细胞内外离子梯度、跨膜电位、细胞体积以及整体的体液分布<sup>[20-21]</sup>。在本研究中，与模型组比较，棉团铁线莲可显著升高大鼠尿液中Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>浓度，并显著降低尿液Ca<sup>2+</sup>浓度，但其作用强度仍弱于速尿阳性对照组。值得注意的是，棉团铁线莲低、中剂量组对上述指标无明显影响。此外，棉团铁线莲可以显著增加大鼠血清Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase水平，特别是棉团铁线莲高剂量组。尿电解质和尿酸碱性改变，可能是由于Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>排泄增加和再摄取增加引起的ANP、ALD、ADH和Ang II浓度升高所致，以及肾脏对Cl<sup>-</sup>的再摄取减少。

Ang II、ADH和ALD是由RAAS释放的3种激素，RAAS通过调节肾单位的功能在维持电解质平衡以及控制液体体内稳态中起主导作用<sup>[22-24]</sup>。此外，ANP、ALD、ADH和Ang II是RAAS中调节机体水分子和电解质平衡的4个主要介质<sup>[20,25-26]</sup>。ANP属于血管扩张剂，是一种从哺乳动物心房释放

的激素，ANP可以增加肾小球通透性和滤过率，并拮抗RAAS激活作用，并阻断Ang II和ALD的释放和作用，可调节体液、电解质和血压的稳态平衡<sup>[23,27]</sup>。ALD促进肾脏对Na<sup>+</sup>和H<sub>2</sub>O的重吸收，导致尿液的减少<sup>[28]</sup>，并受肾素和Ang的调节，Ang可被肾素催化转化为Ang I。随后，一些酶作用于Ang I，导致Ang II和ALD的连续合成<sup>[26]</sup>。Ang II还可以增强近端小管对钠的重吸收并刺激ADH的释放。因此，血清中肾素、Ang II、ALD和ADH的水平呈正相关。本研究结果显示，与模型组比较，棉团铁线莲组显著降低了大鼠血清ALD、ADH和Ang II水平，同时显著提高ANP水平，这可能与其肾小球滤过率升高、RAAS活性降低有关。

在中医理论中，肾脏是负责体内水液代谢的主要器官，现代医学也将肾脏确定为体内液体代谢的中心环节。肾脏和体内的AQP蛋白密切相关，AQP是一族高选择性跨膜通道，主要转运水穿过细胞，一些促进低相对分子质量的溶质。8种AQP亚型(AQP1、2、3、4、6、7、8和11)主要在肾脏中表达<sup>[29-31]</sup>。其中AQP1、2、3在原尿重吸收中起主要作用。因此，AQPs的轻微变化可以显著影响尿

量的变化,这是由于尿液中99%以上的水被重吸收<sup>[32]</sup>。本研究中,与模型组比较,棉团铁线莲显著降低大鼠血清AQP1、AQP2和AQP3的排泄量,抑制AQP1、AQP2和AQP3的mRNA和蛋白表达。这表明棉团铁线莲通过调节大鼠AQP1、AQP2和AQP3的表达而具有利尿作用。cAMP/PKA通路是受体G蛋白和cAMP/PKA信号通路的一部分,在介导细胞对各种刺激的反应中起重要作用<sup>[33]</sup>。cAMP作为细胞中的第二信使,在上游GPCR的调节下被激活<sup>[34]</sup>。研究证实cAMP/PKA/CREB通路参与AQPs表达的调控<sup>[35]</sup>,参与水液代谢调节,激活cAMP可使AQP1、AQP2、AQP3的表达上调,从而达到水液代谢的作用<sup>[36]</sup>。cAMP/PKA通路是PTGS2表达的关键调控者,PTGS2催化生成的前列腺素E<sub>2</sub>通过EP2/EP4受体激活Gs蛋白,增加cAMP,活化PKA,调控水盐转运<sup>[37]</sup>。ADRB1是cAMP/PKA通路的典型激活受体,通过Gs蛋白偶联激活腺苷酸环化酶,同时受PKA负反馈调节<sup>[38]</sup>。PPARA与cAMP/PKA通路存在双向调控,PKA可直接磷酸化PPARA抑制其活性,同时PPARA通过调控靶基因影响cAMP水平。Ang II通过AGTR1抑制腺苷酸环化酶,降低cAMP水平,抑制PKA活性,解除PKA对钠氢交换体3的抑制,增强肾小管对水钠的重吸收<sup>[39]</sup>。cAMP/PKA通路通过多种机制调控PPARG表达和活性,而PPARG也可影响cAMP信号通路,两者共同参与代谢和炎症调控<sup>[40]</sup>。

综上,本研究通过网络药理学筛选出棉团铁线莲治疗利尿的主要活性成分、靶点及关键信号通路,并结合动物实验,验证药效及潜在机制。结果显示,棉团铁线莲通过抑制盐水负荷大鼠AQP、RAAS和cAMP/PKA通路及ANP水平的上调,发挥急性和长期利尿作用。然而,本研究仍存在活性成分的体内代谢过程分析缺失、不同给药途径对比缺乏等局限性,后续将结合转录组、代谢组等多组学技术、体外验证等方法,深入解析所有威灵仙法定品种,推动实验证据到临床应用的转化。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 吴青业,鞠学鹏,关业枝,等.威灵仙水煎液对佐剂性关节炎模型小鼠的作用及机理研究[J].中药药理与临床,2011,27(1):68-70.
- [2] 李良.林毅教授治疗乳腺癌术后上肢淋巴水肿经验[J].四川中医,2009,27(11):11-13.

- [3] 临证药王歌诀.威灵仙——治疗痛风之王[J].中国中医药现代远程教育,2013,11(17):78.
- [4] 陈红梅,单宝杰.重用棉团铁线莲治疗泌尿系结石有良效[J].基层医学论坛,2007(23):1107.
- [5] 刘云波,郭宏志,曾明月,等.曾庆琪教授运用棉团铁线莲治疗男科病的经验[J].浙江中医药大学学报,2017,41(2):150-152.
- [6] Cechinell-Zanchett C C, Bolda Mariano L N, Boeing T, et al. Diuretic and renal protective effect of kaempferol 3-O-alpha-l-rhamnoside (afzelin) in normotensive and hypertensive rats [J]. *J Nat Prod*, 2020, 83(6): 1980-1989.
- [7] Wu Z L, Ren H, Lai W Y, et al. Scleroderma of *Poria cocos* exerts its diuretic effect via suppression of renal aquaporin-2 expression in rats with chronic heart failure [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(1): 563-571.
- [8] Li M, Zhao Y, Zhang S, et al. A thienopyridine, CB-20, exerts diuretic activity by inhibiting urea transporters [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(1): 65-72.
- [9] Younis W, Alamgeer, Schini-Kerth V B, et al. Role of the NO/cGMP pathway and renin-angiotensin system in the hypotensive and diuretic effects of aqueous soluble fraction from *Crataegus songarica* K. Koch [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 249: 112400.
- [10] Alvarez M E, María A O M, Villegas O, et al. Evaluation of diuretic activity of the constituents of *Clematis montevicensis* Spreng. (Ranunculaceae) in rats [J]. *Phytother Res*, 2003, 17(8): 958-960.
- [11] He J W, Yang L. Diuretic effect of *Lagopsis supina* fraction in saline-loaded rats is mediated through inhibition of aquaporin and renin-angiotensin-aldosterone systems and up-regulation of atriopeptin [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 139: 111554.
- [12] Hakim E M, Sivak K V, Kaukhova I E. Evaluation of the diuretic effect of crude ethanol and saponin-rich extracts of *Herniaria glabra* L. in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 273: 113942.
- [13] Wei J, Zhao M, Meng K, Xia G, Pan Y, Li C, Zhang W. The diuretic effects of coconut water by suppressing aquaporin and renin-angiotensin-aldosterone system in saline-loaded rats [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 930506.
- [14] 皮西萍.威灵仙的藥理研究[J].青岛医学院学报,1957(1):9-13.
- [15] Páltinean R, Mocan A, Vlase L, et al. Evaluation of polyphenolic content, antioxidant and diuretic activities of six *Fumaria* Species [J]. *Molecules*, 2017, 22(4): 639.
- [16] 叶潇,朱萱萱,刘婷,等.川木通对大鼠利尿作用及其物质基础研究[J].中国中药杂志,2019,44(9):1889-1894.

- [17] Siddiqui W A, Shahzad M, Shabbir A, *et al.* Evaluation of anti-urolithiatic and diuretic activities of watermelon (*Citrullus lanatus*) using *in vivo* and *in vitro* experiments [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 1212-1221.
- [18] Yang L, He Z W, He J W. The chemical profiling of aqueous soluble fraction from *Lagopsis supina* and its diuretic effects via suppression of AQP and RAAS pathways in saline-loaded rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 272: 113951.
- [19] He J W, Zeng L B, Wei R R, *et al.* *Lagopsis supina* exerts its diuretic effect via inhibition of aquaporin-1, 2 and 3 expression in a rat model of traumatic blood stasis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 231: 446-452.
- [20] Kumar K, Sharma S, Vashishtha V, *et al.* *Terminalia arjuna* Bark extract improves diuresis and attenuates acute hypobaric hypoxia induced cerebral vascular leakage [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 180: 43-53.
- [21] Terry J. The major electrolytes: Sodium, potassium, and chloride [J]. *J Intraven Nurs*, 1994, 17(5): 240-247.
- [22] Atlas S A. The renin-angiotensin aldosterone system: Pathophysiological role and pharmacologic inhibition [J]. *J Manag Care Pharm*, 2007, 13(8 Suppl B): 9-20.
- [23] Cogan P D M G. Atrial natriuretic peptide [J]. *Kidney Int*, 1990, 37(4): 1148-1160.
- [24] Remuzzi G, Perico N, Macia M, *et al.* The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease [J]. *Kidney Int Suppl*, 2005(99): S57-S65.
- [25] Yu J G, Guo J M, Zhu K Y, *et al.* How impaired efficacy happened between Gancao and Yuanhua: Compounds, targets and pathways [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 3828.
- [26] Lou J W, Cao L L, Zhang Q, *et al.* The toxicity and efficacy evaluation of different fractions of Kansui fry-baked with vinegar on Walker-256 tumor-bearing malignant ascites effusion rats and normal rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 219: 257-268.
- [27] Theilig F, Wu Q Y. ANP-induced signaling cascade and its implications in renal pathophysiology [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2015, 308(10): F1047-F1055.
- [28] Kuiper J J, Boomsma F, van Buren H, *et al.* Components of the renin-angiotensin-aldosterone system in plasma and ascites in hepatic cirrhosis [J]. *Eur J Clin Invest*, 2008, 38(12): 939-944.
- [29] Nielsen S, Frøkiaer J, Marples D, *et al.* Aquaporins in the kidney: From molecules to medicine [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82(1): 205-244.
- [30] Zelenina M, Zelenin S, Aperia A. Water channels (aquaporins) and their role for postnatal adaptation [J]. *Pediatr Res*, 2005, 57(5 Pt 2): 47R-53R.
- [31] Parreira K S, Debaix H, Cnops Y, *et al.* Expression patterns of the aquaporin gene family during renal development: Influence of genetic variability [J]. *Pflugers Arch*, 2009, 458(4): 745-759.
- [32] Chakraborty M, Kamath J V, Bhattacharjee A. Potential interaction of green tea extract with hydrochlorothiazide on diuretic activity in rats [J]. *Int Sch Res Notices*, 2014, 2014: 273908.
- [33] Raghunandan R, Ingram V M. Hyperphosphorylation of the cytoskeletal protein Tau by the MAP-kinase PK40erk2: Regulation by prior phosphorylation with cAMP-dependent protein kinase A [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 215(3): 1056-1066.
- [34] Anton S E, Kayser C, Maiellaro I, *et al.* Receptor-associated independent cAMP nanodomains mediate spatiotemporal specificity of GPCR signaling [J]. *Cell*, 2022, 185(7): 1130-1142.
- [35] Wu Z Y, Yao Y, Hu R, *et al.* Cyclic adenosine monophosphate-protein kinase A signal pathway may be involved in pulmonary aquaporin-5 expression in ischemia/reperfusion rats following deep hypothermia cardiac arrest [J]. *Genet Mol Res*, 2016, doi: 10.4238/gmr.15017377.
- [36] Chao G Q, Zhang S. Aquaporins 1, 3 and 8 expression and cytokines in irritable bowel syndrome rats' colon via cAMP-PKA pathway [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(8): 4117-4123.
- [37] Gao M, Cao R, Du S N, *et al.* Disruption of prostaglandin E2 receptor EP4 impairs urinary concentration via decreasing aquaporin 2 in renal collecting ducts [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(27): 8397-8402.
- [38] Su M F, Paknejad N, Zhu L, *et al.* Structures of  $\beta(1)$ -adrenergic receptor in complex with Gs and ligands of different efficacies [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 4095.
- [39] Crajoinas R O, Polidoro J Z, Carneiro de Moraes C P A, *et al.* Angiotensin II counteracts the effects of cAMP/PKA on NHE3 activity and phosphorylation in proximal tubule cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2016, 311(5): C768-C776.
- [40] London E, Bloyd M, Stratakis C A. PKA functions in metabolism and resistance to obesity: Lessons from mouse and human studies [J]. *J Endocrinol*, 2020, 246(3): R51-R64.