

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.21.019

车前草总黄酮对大鼠膀胱和尿道平滑肌收缩反应的影响

彭璇, 李玉山*

(湖北民族学院, 湖北省恩施市学院路 39 号, 445000)

[摘要] 目的 研究车前草治疗泌尿系结石的可能机理。方法 水负荷法筛选尿量敏感大鼠 40 只, 随机分为空白对照组、阳性对照组和黄酮低、中、高剂量组, 每组 8 只。各实验组大鼠禁食不禁水 15 h 后, 给予水负荷生理盐水 30 ml/kg, 30 min 后阳性对照组给予氢氯噻嗪片 11.6 mg/kg 灌胃, 黄酮低、中、高剂量组分别给予车前草总黄酮 120、240、480 mg/kg 灌胃, 空白对照组给予等体积纯净水灌胃。第 1 天给药后压迫大鼠下腹, 使膀胱中余尿排尽, 然后置代谢笼中收集 6 h 尿液, 比较各组大鼠 1、2、4、6 h 时尿重量, 并检测尿液中 Na^+ 、 Cl^- 、 K^+ 离子的含量。连续给药 7 天后, 以乙酰胆碱和去甲肾上腺素为工具药, 比较各组大鼠膀胱及尿道平滑肌收缩反应情况。结果 与空白对照组比较, 黄酮低、中、高剂量组均可显著增加大鼠尿重量及尿液中 Na^+ 、 Cl^- 的含量 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 对 K^+ 含量无明显影响 ($P > 0.05$)。黄酮低、中、高剂量组大鼠离体膀胱平滑肌收缩率、尿道平滑肌抑制率较正常对照组和阳性对照组升高 ($P < 0.01$)。结论 车前草总黄酮利尿作用明显, 又可显著增强膀胱的排泄作用, 其利尿兼促排的作用可能是车前草治疗泌尿系结石的重要机理之一。

[关键词] 车前草总黄酮; 泌尿系结石; 利尿排石

泌尿系结石是肾、输尿管、膀胱及尿道等部位结石的统称, 是泌尿系统最常见的一种顽固性疾病^[1]。研究显示, 车前草治疗泌尿系结石临床疗效显著^[2]。车前草主要通过利尿排石的作用达到治疗泌尿系结石的效果, 而黄酮类成分是车前草发挥疗效的主要有效部位^[3-4]。当泌尿系结石被尿液带至膀胱后, 机体可通过排尿反射及时将其排出体外, 正常的排尿反射主要涉及膀胱和尿道平滑肌的协同作用^[5]。因此, 本文拟观察车前草总黄酮的利尿作用以及对膀胱和尿道平滑肌动作电位频率的影响, 从而探讨车前草治疗泌尿系结石的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 100 只, 雌雄各半, 体重 180 ~ 220 g, 由成都达硕生物科技有限公司提供, 实验动物合格证号: SCXK (111) 2008-24。实验动物饲养于湖北民族学院动物观察室, 每笼 4 只。

1.2 药品与试剂

车前草购自成都新荷花饮片有限公司, 批号: 20130704-2, 经湖北民族学院鉴定, 为车前草科植物车前草 *Plantago asiatica* L. 的干燥全草。氢氯噻嗪片 (批号: 20071123, 江苏方强制药厂); 葡萄糖对照品 (Glucose, 批号: 50-99-7, 上海研生生化试剂有限公司); 乙酰胆碱 (Ach, 批号: Y12266A)、去甲肾上腺素 (NA, 批号: Y10956A) 均为罗氏公司产品; 氯化钠 (NaCl, 批号: 20121005)、氯化钾 (KCl, 批号: 20130825)、氯化钙 (CaCl_2 , 批号: 20091130)、氯化镁 (MgCl_2 , 批号: 20120225)、磷酸二氢钠 (NaH_2PO_4 , 批号: 20141115)、碳酸氢钠 (NaHCO_3 , 批号: 20121230) 均为分析纯, 购自青岛海洋化工有限公司。台式营养液配制: 准确称取 NaCl 8.0 g、KCl 0.2 g、 CaCl_2 20.2 g、 MgCl_2 0.1 g、 NaH_2PO_4 0.05 g、 NaHCO_3 1.0 g、Glucose 1.0 g, 用纯净水定容至 1000 ml。

1.3 主要仪器

DXL-S 型代谢笼 (北京佳源兴业科技有限公

* 通讯作者: hbmy_liys@126.com, 13886798556

司), H1650-W 型低温离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), HH-6 型恒温水浴锅 (江苏省金坛市环宇科学仪器厂), BL-420E + 生物信号处理采集系统、FT-100 肌肉张力传感器、HW400E 恒温平滑肌槽 (成都泰盟生物科技有限公司), BS-200S-WEI 型电子天平 (北京赛多利斯天平有限公司)。

1.4 车前草总黄酮样品制备

取车前草药材 50 g, 加 10 倍量 70% 的乙醇, 采用玻璃回流装置回流 2 次, 每次 2 h, 收集醇提液, 浓缩至生药 1 g/ml 浓度的溶液, 取大孔树脂, 湿法装柱, 调节径高比为 1: 7, 以 2 BV/h 的速度上柱吸附, 最大上样量为 1.8 BV, 水洗至 Molish 反应阴性, 用 2 BV 10% 乙醇溶液除杂后, 加 3 BV 70% 乙醇溶液洗脱树脂柱, 收集洗脱液, 浓缩, 干燥即得总黄酮有效部位 (黄酮含量以芦丁计为 9.39 mg/g, 出膏率为 2.01%), 冷藏备用。

1.5 动物分组及处理方法

取 SD 大鼠预先置于代谢笼中 1~2 日适应环境, 水负荷法^[6]筛选尿量敏感大鼠, 以 25 ml/kg 剂量灌胃纯净水, 观察自由饮水条件尿量是否稳定。收集 2 h 内尿量, 凡尿量达到所灌入量的 40% 以上的动物可用于实验。将筛选出的 40 只大鼠按体重分层采用随机数字表法分为空白对照组、阳性对照组和黄酮低、中、高剂量组, 每组 8 只。各实验组大鼠禁食不禁水 15 h 后, 给予水负荷生理盐水 30 ml/kg, 30 min 后, 大鼠按 1 ml/100 g 灌胃给药: 阳性对照组给予氢氯噻嗪片 11.6 mg/kg, 黄酮低、中、高剂量组分别给予车前草总黄酮 120、240、480 mg/kg, 空白对照组给予等体积纯净水。第 1 天给药后压迫大鼠下腹, 使膀胱中余尿排尽, 然后置代谢笼中收集 6 h 尿液。连续给药 7 天, 末次给药后, 处死大鼠, 分离膀胱和尿道, 除去周围脂肪、结缔组织和前列腺, 取近心端尿道, 从中线纵切成等长的条片, 约 10 mm。取膀胱体纵切得 10 mm × 1 mm 的条片, 备用。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 尿重量的测定 分别于第 1 天给药后 1、2、4、6 h 采集各组大鼠尿液, 以各组大鼠尿重量

为量化指标。

1.6.2 尿液 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 含量测定 按试剂盒操作说明测定各组大鼠尿液中 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 含量。

1.6.3 膀胱及尿道平滑肌动作电位频率的测定

取尿道及膀胱平滑肌各 150 mg 条片悬于含 5 ml 37℃ 台式液的浴槽中, 通以氧气, 调节静息负荷, 离体平滑肌等张收缩曲线通过连有生物信号采集处理系统的肌肉张力换能器记录到显示频。Ach 及 NA 为工具药, 作为受试药作用强度的参照。1) 测定对膀胱平滑肌的作用时, 将肌条悬于浴槽静息 15 min 后加入浓度为 10 μg 的 Ach, 待收缩反应达最大且至稳态时冲洗 3 次, 静置 15 min 后, 用注射器向浴槽中缓慢加入 1 ml 浓度为 120 mg/ml 的车前草总黄酮样品, 观察药物对膀胱平滑肌的收缩作用。以 Ach 收缩作用的幅度为 100%, 计算药物收缩作用幅度占 Ach 收缩作用幅度的平均百分率 (收缩率)。2) 测定对尿道平滑肌的作用时, 将肌条悬于浴槽静息 15 min 后加入浓度为 50 μg 的 NA, 待收缩反应达最大且至稳态时, 用注射器向浴槽中缓慢加入 1 ml 浓度为 120 mg/ml 的总黄酮样品, 观察药物舒张尿道平滑肌作用。以 NA 收缩作用的幅度为 100%, 计算药物抑制作用的幅度占 NA 收缩作用幅度的平均百分率 (抑制率)。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间采用单因素方差分析, 方差齐者组间进行 LSD 检验, 方差不齐者进行 Tamhane's T^2 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间点尿重量比较

表 1 示, 与空白对照组比较, 阳性对照组和黄酮低、中、高剂量组在 1、2、4、6 h 均可显著增加尿重量, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与阳性对照组比较, 黄酮低、中、高剂量组 1、2、4、6 h 尿重量减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 黄酮低、中、高剂量组组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠不同时间点尿重量比较 (g , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	1 h	2 h	4 h	6 h
空白对照组	8	2.75 $\pm$ 0.71	3.42 $\pm$ 0.54	4.69 $\pm$ 0.48	5.32 $\pm$ 0.65
阳性对照组	8	4.45 $\pm$ 1.09*	7.96 $\pm$ 1.38**	8.97 $\pm$ 1.49**	9.68 $\pm$ 1.48**
黄酮低剂量组	8	3.22 $\pm$ 0.47** Δ	5.98 $\pm$ 0.69** $\Delta\Delta$	6.48 $\pm$ 0.65** $\Delta\Delta$	7.23 $\pm$ 0.63** $\Delta\Delta$
黄酮中剂量组	8	3.31 $\pm$ 1.17** Δ	6.14 $\pm$ 1.07** $\Delta\Delta$	6.64 $\pm$ 1.22** $\Delta\Delta$	7.14 $\pm$ 1.08** $\Delta\Delta$
黄酮高剂量组	8	3.37 $\pm$ 1.29** Δ	6.35 $\pm$ 0.85** Δ	6.79 $\pm$ 0.98** $\Delta\Delta$	7.42 $\pm$ 0.95** $\Delta\Delta$

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与阳性对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.2 各组大鼠尿液中 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 含量比较

表 2 示, 与空白对照组比较, 阳性对照组尿液中 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 含量显著增加 ($P < 0.01$); 黄酮低、中、高剂量组大鼠尿液中 Na^+ 、 Cl^- 含量增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 对 K^+ 含量无明显影响

表 2 各组大鼠尿液中 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 含量比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Na^+	K^+	Cl^-
空白对照组	8	7.75 $\pm$ 0.63	9.73 $\pm$ 1.41	29.41 $\pm$ 1.08
阳性对照组	8	17.29 $\pm$ 1.78 **	19.27 $\pm$ 0.88 **	37.93 $\pm$ 5.69 **
黄酮低剂量组	8	8.12 $\pm$ 0.51 * $\Delta\Delta$	9.79 $\pm$ 0.22 $\Delta\Delta$	34.35 $\pm$ 1.13 * Δ
黄酮中剂量组	8	10.59 $\pm$ 1.15 ** $\Delta\Delta$	9.81 $\pm$ 1.10 $\Delta\Delta$	34.03 $\pm$ 2.18 * Δ
黄酮高剂量组	8	10.97 $\pm$ 1.08 ** $\Delta\Delta$	9.85 $\pm$ 0.54 $\Delta\Delta$	34.85 $\pm$ 1.78 * Δ

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与阳性对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

($P > 0.05$)。与阳性对照组比较, 黄酮低、中、高剂量组大鼠尿液中 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 含量减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而各剂量组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠膀胱平滑肌、尿道平滑肌收缩反应比较

表 3 示, 与空白对照组比较, 阳性对照组大鼠膀胱平滑肌收缩率、尿道平滑肌抑制率无明显变化 ($P > 0.05$); 而黄酮低、中、高剂量组大鼠膀胱平滑肌收缩率、尿道平滑肌抑制率明显高于空白对照组和阳性对照组 ($P < 0.01$), 各剂量组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组大鼠膀胱平滑肌、尿道平滑肌动作电位频率见图 1、图 2。

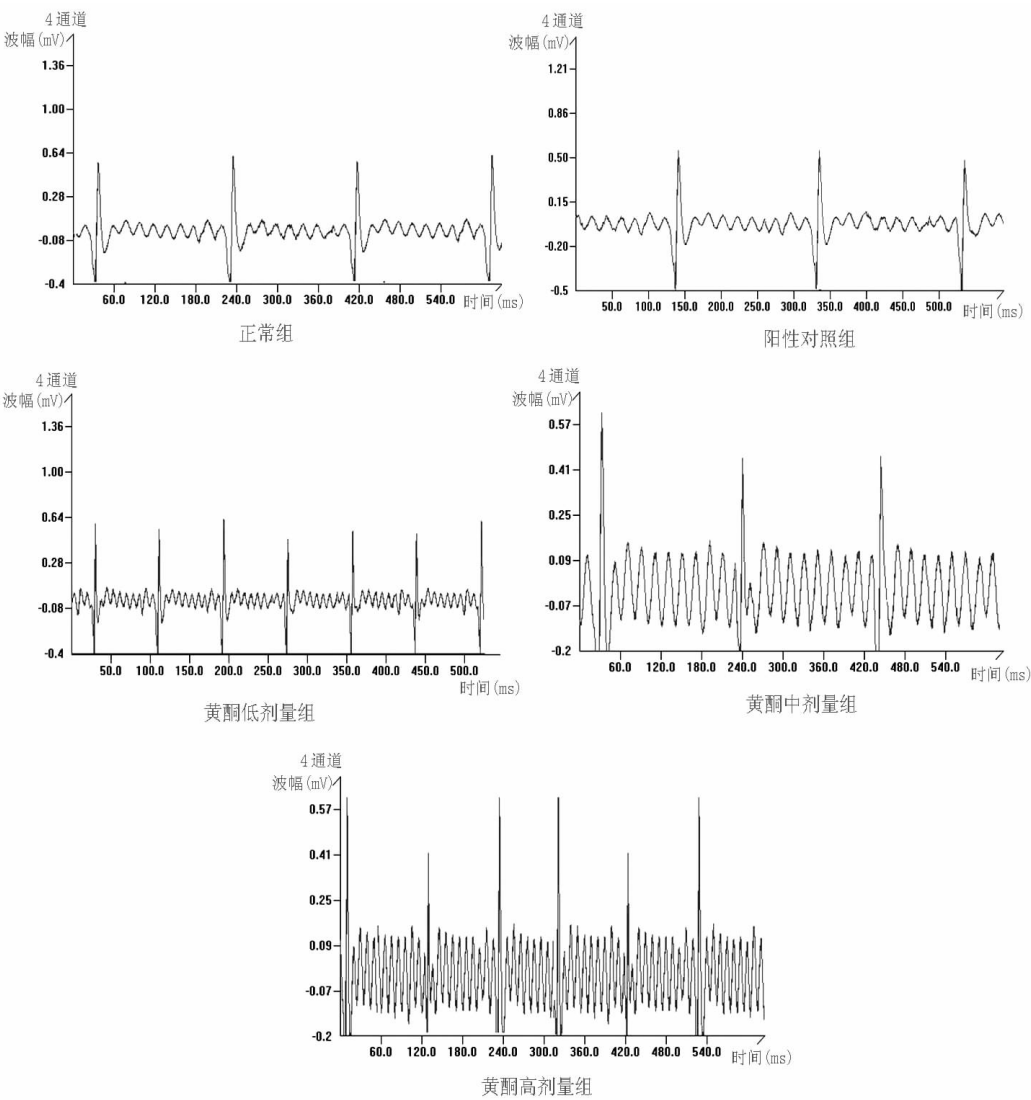


图 1 各组大鼠膀胱平滑肌动作电位频率图

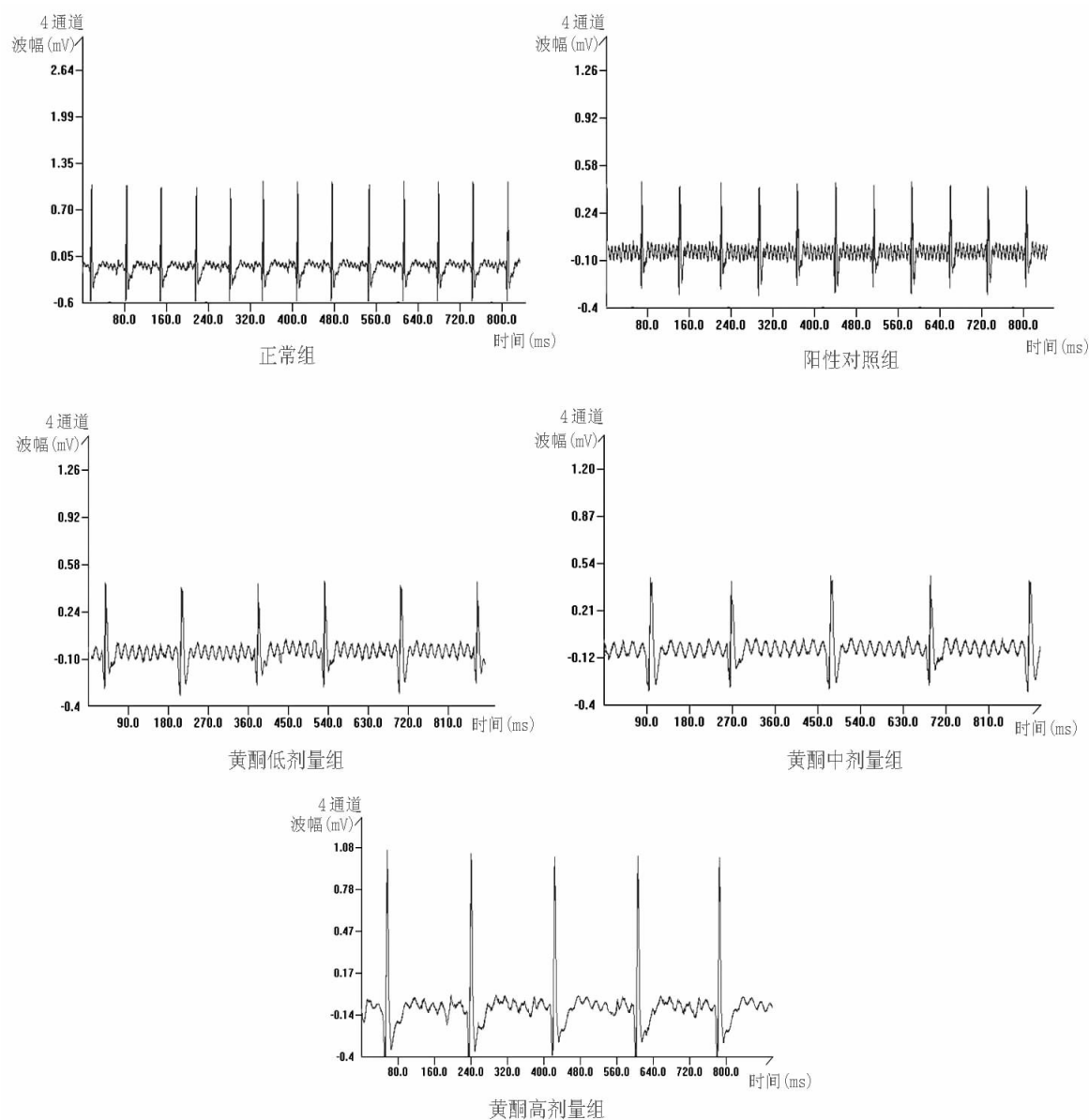


图2 各组大鼠尿道平滑肌动作电位频率图

表3 各组大鼠膀胱平滑肌收缩率、尿道平滑肌抑制率比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	膀胱平滑肌收缩率	尿道平滑肌抑制率
空白对照组	8	6.65 ± 1.78	1.27 ± 1.14
阳性对照组	8	7.44 ± 1.16	1.45 ± 0.98
黄酮低剂量组	8	17.79 ± 1.35 ^{*△}	13.41 ± 2.11 ^{*△}
黄酮中剂量组	8	18.08 ± 2.15 ^{*△}	13.57 ± 1.42 ^{*△}
黄酮高剂量组	8	17.93 ± 1.71 ^{*△}	14.39 ± 2.77 ^{*△}

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与阳性对照组比较, $\Delta P < 0.01$

3 讨论

车前草为车前科植物车前或大车前的干燥全草, 始载于《神农本草经》。车前草味甘, 性寒无毒, 具有清热解毒、祛痰利尿之功效, 用于治疗水

肿尿少、暑湿泻痢、痰多咳嗽、热毒痛肿等症^[7]。氢氯噻嗪片利尿机理主要是影响肾脏对尿液的稀释与浓缩过程, 临床一般用于水肿、高血压病等的治疗, 常见的副作用为水、电解质紊乱, 尤以低钾血症较易发生, 与噻嗪类利尿药排钾作用有关, 长期缺钾可损伤肾小管, 严重失钾可引起肾小管上皮的空泡变化, 以及引起严重快速性心率失常等异位心率^[8]。因此, 中草药利尿作用的临床应用具有一定优势。

本实验证明, 车前草总黄酮利尿作用明显, 主要表现在其可明显增加实验动物的尿重量以及尿液中 Na^+ 、 Cl^- 的含量, 但几乎不增加 K^+ 的排泄量, 与阳性药氢氯噻嗪片相比, 车前草总黄酮利尿作用

较弱,但对 K^+ 的保护作用显著。对大鼠离体膀胱平滑肌和尿道平滑肌作用研究显示,车前草总黄酮具有明显收缩大鼠离体膀胱平滑肌、舒张离体尿道平滑肌作用,这与机体自身的排尿反射机理一致,即车前草总黄酮可增强机体膀胱的排泄功能而有助于泌尿系结石的排出。因此,车前草治疗泌尿系结石的作用机理至少包括“利尿”与“促排”两方面的作用,一方面通过增加尿量,将泌尿系统的结石或有助于结石形成的一些离子或其他影响因素“冲刷”至膀胱;另一方面增强膀胱对这些物质的及时清除,达到治疗泌尿系结石的效果。实验研究中还提示,与阳性药氢氯噻嗪片相比,车前草总黄酮保钾作用显著,二者或可配伍用于泌尿系结石或水肿、高血压病等的治疗,具体应用有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 叶章群,邓耀良. 泌尿系结石 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 35.
- [2] 黄琼瑶,万威,余韵,等. 欧车前的研究进展 [J]. 医药导报, 2013, 6(9): 767-769.
- [3] 黄河胜,马传庚,陈志武. 黄酮类化合物药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(10): 589-592.
- [4] 王玮,王琳. 黄酮类化合物的研究进展 [J]. 沈阳医学院学报, 2002, 4(2): 115-119.
- [5] 张志雄. 生理学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2011: 280-296.
- [6] 凌科,张建民,关晶,等. 止遗合剂对水负荷肾虚大鼠排尿次数及排尿量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 16(11): 184-186.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 64.
- [8] 李文艳. 氢氯噻嗪对大鼠的利尿作用的研究 [J]. 现代电生理学杂志, 2012, 19(1): 25-29.

Impact of Total Flavonoids of *Plantago Asiatica* L. on Contraction Response of Bladder and Urethral Smooth Muscles in Rats

PENG Xuan, LI Yushan

(Hubei University for Nationalities, Enshi, Hubei Province 445000)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of plantago asiatica L. treating urinary calculus. **Methods** Forty urine volume sensitive rats were selected by water load method and randomized into blank control group, positive control group, low-dose, middle-dose and high-dose flavonoids groups, 8 rats in each group. Rats in every group were given water but fasting. After 15 hours, all rats were given water load normal saline 30ml/kg. After 30 minutes, positive control group were given hydrochlorothiazide tablets 11.6 mg/kg by gavage; flavonoids low, middle and high dose groups were given total flavonoids of plantago asiatica L. 120, 240, 480 mg/kg by gavage. Blank control group were given isovolumetric pure water by gavage. On the first day, after administration, pressed lower abdomen to exhaust residual urine in bladder, put rats in metabolic cages, collected 6h urine, compare urine weight at 1, 2, 4, 6 h; and detected the contents of urine Na^+ , Cl^- , and K^+ . After 7 days of continuous administration, taking acetylcholine and noradrenaline as tool drug, compared the contraction response of bladder and urethral smooth muscles. **Results** Compared with control group, urine weight and content of urine Na^+ and Cl^- in flavonoids low, middle and high dose groups increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$); there was little impact on K^+ content ($P > 0.05$). Contraction rate of in vitro bladder smooth muscles and inhibition rate of urethral smooth muscles in flavonoids low, middle and high dose groups were higher than those in control group and positive control group ($P < 0.01$). **Conclusion** Total flavonoids of plantago asiatica L. have obvious diuretic effect and could enhance bladder excretion function. Its diuretic and excretive effect might be one of the important mechanisms of plantago asiatica L. treating urinary calculus.

Keywords total flavonoids of plantago asiatica L.; urinary calculus; diuresis and removing urinary calculus

收稿日期: 2015-01-30; 修回日期: 2015-05-07

[编辑: 邓媛]