

六味地黄汤及“补泻”药对对肾阴虚模型小鼠 HPA 轴功能及肾上腺组织形态学的影响

肖子曾¹, 杨梦琳¹, 戴冰^{2*}, 张嘉妮², 石继连¹, 肖望重², 杨连初¹, 李玉星²

(1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007)

[摘要] **目的** 观察六味地黄汤及三个“一补一泻”药对对肾阴虚模型小鼠下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴功能及肾上腺形态的影响。**方法** 将小鼠随机分为空白组、模型组和给药组(六味地黄汤组、山茱萸-牡丹皮组、熟地黄-泽泻组、山药-茯苓组)共6个试验组;连续9 d分别灌胃给予以上对应药物;第5~9天,除空白组灌胃蒸馏水外,其他各组按50 mg/kg体质量每天灌胃氢化可的松注射液,称体质量,测定环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质醇(Cor.)含量,观察肾上腺病理切片。**结果** 肾阴虚模型小鼠体质量、血浆cGMP含量降低,血浆cAMP、血清ACTH、Cor.含量升高,与空白组比较,差异有统计学意义($P<0.01$),肾上腺组织受损;与模型组比较,六味地黄汤能上调模型小鼠体质量、血浆cGMP含量,下调血浆cAMP含量、血清ACTH、Cor.含量($P<0.05$, $P<0.01$),修复受损肾上腺组织;山茱萸-牡丹皮药对能下调模型小鼠血浆cAMP、血清ACTH含量($P<0.01$),修复受损肾上腺组织。**结论** 六味地黄汤能改善肾阴虚证,其作用机制可能与其降低垂体分泌的ACTH含量、下调肾上腺分泌的Cor.含量,改善HPA轴的功能及肾上腺形态有关。其中山茱萸-牡丹皮药对是改善肾阴虚证的主要药效物质基础。

[关键词] 六味地黄汤;补泻药对;肾阴虚模型;下丘脑-垂体-肾上腺轴;熟地黄;山药;山茱萸

[中图分类号]R285.5 **[文献标识码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.03.005

Effects of Liuwei Dihuang Decoction and "Reinforcing and Reducing" Couplet Medicines on HPA Axis and Morphologic Changes of the Adrenal Cortex in Kidney Yin Deficiency Mice

XIAO Zizeng¹, YANG Menglin¹, DAI Bing^{2*}, ZHANG Jiani², SHI Jilian¹, XIAO Wangzhong², YANG Lianchu¹, LI Yuxing²

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China.

2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of Liuwei Dihuang Decoction and three "reinforcing and reducing" couplet medicines on hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis and morphologic changes of the adrenal cortex in kidney Yin deficiency mice. **Methods** The rats were randomly divided into six experimental groups: blank group, model group and medication group (Liuwei Dihuang Decoction group, Shanzhuyu-Mudanpi group, Shudihuang-Zexie group, Shanyao-Fuling group). The rats were gavaged with oral administration of corresponding medicines for 9 days. At 5~9 d, in addition to the blank group was given distilled water, the other groups were gavaged with hydrocortisone injection per day according to 50 mg/kg body weight. The contents of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cyclic guanosine monophosphate (cGMP), adrenocorticotrophic hormone (ACTH), cortisol (Cor.) were determined and adrenal gland was observed. **Results** Compared with the blank group, the body weight and plasma cGMP in kidney Yin deficiency mice models were decreased, while the plasma cAMP, serum ACTH, Cor. contents were increased, the difference was statistically significant ($P<0.01$); adrenal tissue damaged. Compared with the model group, Liuwei Dihuang Decoction group could increase the body weight and plasma cGMP content, and decrease the plasma cAMP, serum ACTH and Cor. Contents ($P<0.05$, $P<0.01$); the damaged adrenal tissues were repaired.

[收稿日期]2015-10-22

[基金项目]湖南省自然科学基金项目(13JJ3096);湖南省教育厅重点项目(15A140);康尔佳药业集团糖尿病研究所支持项目。

[作者简介]肖子曾,男,教授,硕士研究生导师,主要从事方剂的应用及疗效机理研究。

[通讯作者]*戴冰,女,教授,博士研究生导师,E-mail:db0223@163.com。

The couplet medicine of Shanzhuyu-Mudanpi could decrease plasma cAMP and serum ACTH contents, the difference was statistically significant ($P < 0.01$), the damaged adrenal tissues were repaired. **Conclusion** Liuwei Dihuang pills could improve kidney Yin deficiency syndrome, its mechanism may be related to decrease the ACTH, Cor., and improve the function of HPA and morphologic structure of the adrenal cortex. And drug pair of Shanzhuyu-Mudanpi is the main effective substance of improving kidney Yin deficiency syndrome.

[**Keywords**] Liu Wei Dihuang Decoction; couplet medicines of "reinforcing and reducing"; kidney Yin deficiency models; hypothalamus-pituitary-adrenal axis; prepared Rpdx Rehmanniae; Radix Rehmanniae Preparata; Rhizoma Dioscoreae; Fructus Corni

肾阴虚证是指由于肾阴亏损,失于滋养,虚热内生所表现的证候。临床上以形体消瘦、潮热盗汗、五心烦热、咽干颧红、腰膝酸软、大便干结、小便短少为常见症候,阴虚患者通常表现为下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴功能亢进。六味地黄汤是滋补肾阴的经典名方,由三个“一补一泻”药对组成,即熟地黄-泽泻,山茱萸-牡丹皮,山药-茯苓。熟地黄重用滋阴补肾,填精益髓,伍泽泻利湿而泄肾浊,并能减熟地之滋腻;山茱萸滋补肝肾,并能涩精,牡丹皮清虚热泄肝火,并制山茱萸之温涩;山药健脾补虚,兼能固肾,伍茯苓渗泻脾湿,并助山药之健运^[1]。全方配合,补泻并用,以补为主,以泻为辅,三个“一补一泻”药对合用,共奏滋阴补肾作用。本实验从三个“一补一泻”药对角度展开研究,通过观察并记录肾阴虚模型小鼠体质量、症状,检测各给药组血浆环磷酸腺苷(cAMP)环磷酸鸟苷(cGMP)含量及HPA轴中促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质醇(Cor.)含量,观察各给药组肾上腺组织形态学改变,以期进一步研究该方改善肾阴虚证的药效物质基础及作用机制。

1 材料

1.1 动物

清洁级昆明小鼠60只,雌雄各半,体质量(20±2)g,购自湖南斯莱克景达试验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2013-0004;饲养于湖南中医药大学试验动物中心。

1.2 药物

六味地黄汤(熟地黄24g,山茱萸12g,山药12g,牡丹皮9g,泽泻9g,茯苓9g),饮片均购自湖南中医药大学第一附属医院药剂科。按六味地黄汤中各药对的比例分别称取山茱萸-牡丹皮药对、熟地黄-泽泻药对、山药-茯苓药对,各2剂,各组饮片均加6倍量水,浸泡30min后,煎煮2次,每次30min,合并2次药液后于旋转蒸发器浓缩,均得最终浓度为1.5g(生药)/mL的浓缩液。

1.3 主要试剂

氢化可的松注射液,安阳九州药业有限责任公司,批号:140820001A;ACTH放射免疫分析药盒,批号:150820;碘[125I]Cor.放射免疫分析药盒,批号:150820;以上试剂盒均由北京北方生物技术研究所提供;cAMP、cGMP酶联免疫分析试剂盒,美国R&D systems公司。

1.4 主要仪器

RE-52A旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);Modular DPP罗氏全自动生化仪(美国罗氏);centrifuge 5415R小型冷冻离心机(德国Eppendorf);Shandon325型石蜡切片机(英国Shandon公司);Motic B5显微摄像系统(麦克奥迪实业集团公司)。

2 方法

2.1 分组、给药及造模^[2-3]

取昆明小鼠60只,雌雄各半,适应性喂养7d后,随机分成空白组、模型组、六味地黄汤组、山茱萸-牡丹皮组、熟地黄-泽泻组、山药-茯苓组,每组10只小鼠。分组连续9d,各组分别灌胃给予蒸馏水、蒸馏水、六味地黄汤药液剂量为9.75g生药/(kg·d)、山茱萸-牡丹皮组药液剂量为2.73g生药/(kg·d)、熟地黄-泽泻组药液剂量为4.29g生药/(kg·d)、山药-茯苓组药液剂量为2.73g生药/(kg·d);给药剂量按照人与小鼠等效剂量系数折算法算出。第6-9天,除空白组灌胃蒸馏水外,其他各组均每天下午15:00灌胃氢化可的松注射液为50mg/kg。

2.2 标本采集与处理

末次给药后禁食24h,于试验第10天摘眼球采血,分离血清及血浆;取血后立即摘取肾上腺,放置于装有10%甲醛的冻存管中保存待测。

2.3 指标检测

2.3.1 体质量定 于试验第1、6、10天各测量小鼠体质量1次,并记录。

2.3.2 cAMP、cGMP含量 小鼠摘眼球采血,血样放置30min后,3500r/min离心15min,取上清按试剂盒说明进行检测。

2.3.3 ACTH、Cor 含量 小鼠摘眼球采血,血样放置 30 min 后,3500 r/min 离心 15 min,取上清按试剂盒说明进行检测。

2.3.4 肾上腺病理改变观察 各组小鼠肾上腺用 10%甲醛固定,经过脱水、透明、浸蜡、包埋、切片与贴片后,用苏木素-伊红(HE)染色后,常规显微镜下观察各组织形态结构的变化。

2.4 统计方法

采用 SPSS19.0 统计软件进行统计学分析。试验数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,进行正态性及方差齐性检验,组间差异的显著性分析采用单因素方差分析或非参数检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对肾阴虚模型小鼠体质量的影响

与空白组比较,模型小鼠体质量差异有统计学意义($P<0.01$),与模型组比较,六味地黄汤组、山茱萸-牡丹皮组小鼠体质量差异有统计学意义($P<0.05$)。提示:六味地黄汤及山茱萸-牡丹皮药对能减缓肾阴虚模型小鼠体质量下降的趋势,且能使其体质量基本恢复到正常水平。而熟地黄-泽泻组、山药-茯苓组减缓肾阴虚模型小鼠体质量下降的趋势不明显($P>0.05$)。结果见表 1。

表 1 对肾阴虚模型小鼠体质量的影响 ($\bar{x}\pm s, g$)

组别	n	第 1 天	第 6 天	第 10 天
对照组	10	23.8±1.43	29.5±1.32	37.4±1.26
模型组	9	24.6±0.72	30.1±0.74	27.3±1.15**
六味地黄丸组	10	23.2±1.38	28.2±0.81	35.2±0.93 [#]
山茱萸-丹皮组	9	24.1±1.15	27.8±1.29	34.6±1.08 [#]
熟地黄-泽泻组	10	23.6±1.53	28.9±1.16	33.9±1.37
山药-茯苓组	10	23.3±1.07	27.7±1.22	32.4±1.16
F 值		0.256	0.520	5.251
P 值		0.877	0.791	<0.001

注:与空白组比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比,# $P<0.05$ 。

3.2 对肾阴虚模型小鼠血浆 cAMP、cGMP 含量、cAMP/cGMP 比值的影响

与空白组比较,模型组血浆 cAMP 含量、cGMP 含量、cAMP/cGMP 比值差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,六味地黄汤组、山茱萸-牡丹皮组的血浆 cAMP 含量、cAMP/cGMP 比值差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$);六味地黄汤组血浆 cGMP 含量也差异有统计学意义($P<0.05$),熟地黄-泽泻组、山药-茯苓组血浆 cAMP 含量、cGMP 含量、cAMP/cGMP 比值无显著性差异($P>0.05$)。提示:六

味地黄汤、山茱萸-牡丹皮药对能抑制肾阴虚模型小鼠血浆 cAMP 含量、cAMP/cGMP 比值上升的趋势,六味地黄汤还能抑制血浆 cGMP 含量下降的趋势,使其血浆 cAMP 含量、cGMP 含量、cAMP/cGMP 比值基本恢复到正常水平。结果见表 2。

表 2 对肾阴虚模型小鼠 cAMP、cGMP 含量及 cAMP/cGMP

组别	n	比值的影晌 ($\bar{x}\pm s$)		
		cAMP(nmol/L)	cGMP(nmol/L)	cAMP/cGMP
空白组	10	6.34±0.16	27.8±1.54	0.23±0.02
模型组	9	8.20±0.63**	18.3±1.09**	0.45±0.08**
六味地黄汤组	10	6.49±0.46 [#]	25.4±1.84 [#]	0.26±0.03 [#]
山茱萸-牡丹皮组	9	6.93±0.15 [#]	22.5±0.69	0.31±0.01 [#]
熟地黄-泽泻组	10	7.52±0.15** Δ	20.1±3.37**	0.38±0.06 Δ
山药-茯苓组	10	7.24±0.78* $\Delta\Delta$	21.3±1.99*	0.38±0.03*
F 值		14.929	8.773	10.591
P 值		<0.001	<0.01	<0.001

注:与空白组比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与六味地黄汤组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与山茱萸-牡丹皮组比较,▲ $P<0.05$ 。

3.3 对肾阴虚模型小鼠 ACTH、Cor. 含量的影响

与空白组比较,模型组血清 ACTH 含量、Cor. 含量差异有统计学意义($P<0.01$),山茱萸-牡丹皮组血清 ACTH 含量差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,六味地黄汤组血清 ACTH 含量、Cor. 含量差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$),山茱萸-牡丹皮组血清 ACTH 含量差异有统计学意义($P<0.01$),熟地黄-泽泻组、山药-茯苓组血清 ACTH、Cor. 含量无显著性差异($P>0.05$)。提示:六味地黄汤能明显减缓肾阴虚模型小鼠血清 ACTH、Cor. 浓度上升的趋势,且能使其血清 ACTH、Cor. 浓度基本恢复到正常水平;山茱萸-牡丹皮药对能减缓肾阴虚模型小鼠血清 ACTH 浓度上升的趋势。结果见表 3。

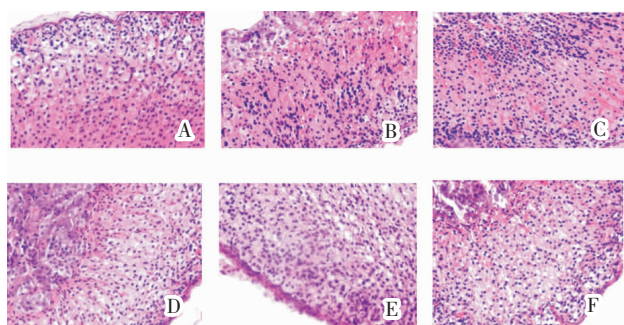
表 3 对肾阴虚模型小鼠 ACTH、Cor. 含量的影响 ($\bar{x}\pm s, ng/mL$)

组别	n	ACTH	Cor.
空白组	10	305±24.1	715±96.9
模型组	9	451±16.4**	835±31.7**
六味地黄汤组	10	331±16.4 [#]	736±47.2 [#]
山茱萸-牡丹皮组	9	365±35.5** [#]	759±30.3
熟地黄-泽泻组	10	406±27.9** $\Delta\Delta$	809±52.6*
山药-茯苓组	10	424±31.8** $\Delta\Delta$	823±22.7*
F 值		27.226	5.640
P 值		<0.001	<0.01

注:与空白组比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与六味地黄汤组比较, $\Delta P<0.01$;与山茱萸-牡丹皮组比较,▲ $P<0.05$ 。

3.4 对肾阴虚模型小鼠肾上腺组织形态的影响

与空白组比较,模型组肾上腺皮质变薄,球状带、束状带变窄、结构不清,细胞排列不规则,体积缩小,细胞质呈空泡状,细胞间隙变宽,局部有坏死及炎性浸润;六味地黄汤组、山茱萸-牡丹皮组球状带、束状带、网状带结构清晰,细胞排列有序,偶见炎性浸润,其中以六味地黄汤组组织形态最接近空白组;熟地黄-泽泻组、山药-茯苓组球状带、束状带、网状带结构不清晰,细胞排列不规则、间隙变宽,局部有水肿、坏死及炎性浸润;提示:模型小鼠肾上腺组织受损,六味地黄汤、山茱萸-牡丹皮药对能修复肾阴虚模型小鼠受损肾上腺组织,熟地黄-泽泻药对、山药-茯苓药对不能修复肾阴虚模型小鼠受损肾上腺组织。见图1A-F。



注:A-F分别为空白组、肾阴虚模型组、六味地黄汤组、山茱萸-牡丹皮组、熟地黄-泽泻组、山药-茯苓组

图1 各组小鼠肾上腺组织形态学光镜图(HE,×400)

4 讨论

目前皮质激素造模法是应用为广泛,且较为公认的肾阴虚模型之一即用短程大剂量皮质激素使动物体内皮质激素突然升高,造成动物体质量下降、烦躁、易激惹、拱背扎堆、毛发枯槁易脱落、大便干结、饮食增多^[2-3]、血浆cAMP含量升高^[4]等肾阴亏损症状;本研究所造皮质激素模型组小鼠也出现了与上述相符的体质量下降、血浆cAMP含量升高等症状,但还发现该模型小鼠的血浆cAMP/cGMP比值也升高。

HPA轴是由下丘脑、垂体与肾上腺组成的维持人体基本生命活动的重要的神经内分泌功能轴之一,下丘脑室旁核分泌促肾上腺皮质激素释放激素,经垂体门脉系统到达腺垂体,与ACTH细胞膜上的CRH受体-1结合,促进腺垂体分泌ACTH并作用于肾上腺皮质细胞,促进肾上腺皮质的增生,并促进束状带合成和分泌Cor.,参与机体的代谢、免疫以及

生长发育过程,对于维持机体的内稳态起着重要的作用^[5]。内分泌系统功能障碍是虚证的重要表现之一,阴虚患者通常表现为HPA轴功能亢进,即表现为下丘脑分泌促肾上腺皮质激素释放激素、垂体分泌ACTH增加,进而刺激肾上腺皮质释放Cor.,使血中Cor.水平明显升高^[6]。因此通过降低HPA轴中垂体分泌的ACTH、下调肾上腺分泌的Cor.,以及改善HPA轴功能及肾上腺组织形态,可改善肾阴虚证。故六味地黄汤改善肾阴虚证的作用机制之一可能与其降低垂体分泌的ACTH、下调肾上腺分泌的Cor.,改善HPA轴功能及肾上腺组织形态有关。

本研究发现山茱萸-牡丹皮药对能修复受损肾上腺组织,降低血清ACTH含量,改善肾阴虚证;王喜军等^[7]研究发现马钱子苷、莫诺苷、獐牙菜苷(均来源于山茱萸)是六味地黄汤改善肾阴虚证的主要药效成分,本课题组前期研究发现阴虚大鼠予六味地黄丸灌胃后这些有效成分血清浓度较高^[8-9],即大鼠对这些成分吸收较好,这表明以上成分有益于阴虚病症的改善,因此推测山茱萸-牡丹皮药对是该方改善肾阴虚证的主要药效物质基础。研究还发现山茱萸-牡丹皮药对改善肾阴虚证的作用略弱于六味地黄汤全方,而熟地黄-泽泻药对、山药-茯苓药对改善肾阴虚证的作用均不明显,但这两个药对与山茱萸-牡丹皮药对合用后组成的全方改善肾阴虚证的效果优于单用山茱萸-牡丹皮药对,这充分体现了方剂中药对配伍的协同增效作用。

参考文献:

- [1] 马 坤.六味地黄丸与左归丸在补阴方面的临床应用[J]. 吉林中医药,2011,31(03):260-261,276.
- [2] 陈 奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,2011:1 028.
- [3] 夏炳江,童培建,孙 燕,等.地塞米松致骨质疏松肾阴虚型病证结合模型构建与评价的试验研究[J].中国骨伤,2014,27(08):673-679.
- [4] 戴 冰,杨赛男,肖子曾,等.2型糖尿病肾阴虚证大鼠模型的建立及其稳定性评价[J]. 湖南中医药大学学报,2012,32(12):5-7.
- [5] 侯秀娟,朱跃兰,郑 琴.下丘脑-垂体-肾上腺轴在类风湿关节炎伴发抑郁症中的变化 [J]. 长春中医药大学学报,2012,28(02):200-201.
- [6] 夏炳江,童培建,孙燕,等.骨质疏松肾阴虚型小鼠病证结合模型建立的试验研究[J].中国中医急症,2013,22(07):1 083-1 086.
- [7] 王喜军,张 宁,孙 晖,等.六味地黄汤血中移行成分对氢化可的松致大鼠肾虚动物模型的保护作用 [J]. 中国试验方剂学杂志,2008,14(02):33-3.
- [8] 戴 冰,刘 磊,肖子曾,等.RP-HPLC测定口服六味地黄汤后正常及阴虚大鼠血清芍药苷含量[J].中国中医药科技,2008,15(01):46-47.
- [9] 戴 冰,邹双华,刘 磊,等.六味地黄汤对糖皮质激素阴虚大鼠血清中马钱苷浓度的影响 [J]. 湖南中医药大学学报,2007,27(02):35-36,39.

(本文编辑 杨 瑛)