

·方药研究·

本文引用:王孙亚,周兴,宾东华,韩忠,何清湖.右归丸及其拆方对肾阳虚大鼠血清T、LH和CORT的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(9):990-993.

右归丸及其拆方对肾阳虚大鼠血清 T、LH和CORT的影响

王孙亚¹,周兴²,宾东华²,韩忠³,何清湖^{1*}

(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;3.岳阳市中医医院,岳阳414000)

〔摘要〕目的 探讨右归丸及其拆方对肾阳虚大鼠血清中睾酮(testosterone,T)、促黄体生成素(luteinizing hormone,LH)和皮质醇(cortisol,CORT)的影响。**方法** 取3月龄SPF级雄性SD大鼠50只,随机分成正常对照组、模型组、补阴药组、补阳药组、全方组,除正常对照组外,其他组均采用后腿肌内注射氢化可的松建立肾阳虚动物模型。造模成功后,补阴药组、补阳药组、全方组分别给予相应药物连续灌胃14 d,正常对照组与模型组给予等容量的生理盐水灌胃,停药后第2天,经麻醉后断头处死,心脏取血获得血清,摘除双侧睾丸。记录大鼠体质量及睾丸质量,并计算睾丸指数;用ELISA法测定血清中T、LH和CORT含量。**结果** 模型组大鼠较正常对照组大鼠体质量、睾丸指数及血清T、LH、CORT含量均降低($P<0.05$);治疗组中全方组较模型组大鼠体质量、睾丸指数及血清T、LH、CORT含量明显提升($P<0.05$),补阴药组相对补阳药组增加大鼠体质量及血清LH含量($P<0.05$),补阳药组相对补阴药提升睾丸指数及血清T含量作用较强($P<0.05$);补阴组和补阳组对血清CORT含量均无明显作用($P>0.05$)。**结论** 右归丸全方可对肾阳虚证大鼠体质量、睾丸指数、血清中的T、LH和CORT表达水平产生良性影响,右归丸方中的补阴药在提升肾阳虚大鼠体质量和增加血清中LH的含量方面调控作用较好,补阳药在增加血清中T的含量和提高睾丸指数方面调控作用较好,补阴药和补阳药对血清中CORT表达水平的调控均无明显作用。

〔关键词〕 右归丸;拆方;阴中求阳;肾阳虚;睾酮;促黄体生成素;皮质醇

〔中图分类号〕R285.5

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.09.005

Effects of Yougui Pill and Its Components on Serum T, LH, and CORT in Rats with Kidney Yang Deficiency

WANG Sunya¹, ZHOU Xing², BIN Donghua², HAN Zhong³, HE Qinghu^{1*}

(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; 3. Yueyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yueyang, Hunan 414000, China)

〔Abstract〕 Objective To explore the effect of Yougui Pill and its components on serum testosterone (T), luteinizing hormone (LH), and cortisol (CORT) in rats with kidney Yang deficiency. **Methods** A total of 50 3-month-old specific pathogen-free male Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control group, model group, Yin nourishing component group, Yang tonifying component group, and whole prescription group. All rats except those in the normal control group were intramuscularly injected with hydrocortisone in the hind legs to establish an animal model of kidney Yang deficiency. After completion of model establishment, the rats were treated for 14 consecutive days as follows: intragastric administration of corresponding medicines for the Yin nourishing component group, the Yang tonifying component group, and the whole prescription group; intragastric

〔收稿日期〕2017-09-18

〔基金项目〕国家自然科学基金(81673984);湖南省教育厅优秀青年项目(16B200);湖南中医药大学研究生创新项目(1023-0002001032);湖南中医药大学“一方研究生科研创新项目”(YF201701)。

〔作者简介〕王孙亚,男,在读硕士研究生,主要从事中西医结合男性疾病研究。

〔通讯作者〕* 何清湖,男,教授,博士研究生导师,E-mail:hqh1111@tom.com。

administration of an equal amount of normal saline for the normal control group and the model group. On the second day of medicine discontinuation, the rats were anesthetized and decapitated; serum was collected by cardiac puncture, and both testes were also collected. Body weight and testis weight of the rats were recorded, and testicular index was calculated. ELISA was used to determine the levels of T, LH, and CORT. **Results** Compared with the normal control group, the model group had significantly reduced body weight, testicular index, and serum levels of T, LH, and CORT ($P<0.05$). The whole prescription group had significantly increased body weight, testicular index, and serum levels of T, LH, and CORT compared with the model group ($P<0.05$). Compared with the Yang tonifying component group, the Yin nourishing component group had significantly greater increases in body weight and serum LH level ($P<0.05$), but significantly less increases in testicular index and serum T level ($P<0.05$). Neither of the above two groups showed a significant change in serum CORT level ($P>0.05$). **Conclusion** The whole prescription of Yougui Pill has favorable effects on body weight, testicular index, and serum levels of T, LH, and CORT in rats with kidney Yang deficiency; Yin nourishing component in the prescription reveals good effects in increasing body weight and serum LH level, and Yang tonifying component reveals good effects in increasing testicular index and serum T level; neither of the above components has an obvious effect in regulating the level of serum CORT.

[**Keywords**] Yougui Pill; separated prescription; reinforcing Yang from Yin; kidney Yang deficiency; testosterone; luteinizing hormone; cortisol

右归丸来源于明代张景岳的《景岳全书》,为“阴中求阳”治法的代表方剂,功能“益火之源,以培右肾之元阳”,故以“右归”为名。右归丸是临床上常用于治疗肾阳虚证的方药,且疗效显著。研究证实,肾阳虚会引起垂体下丘脑-垂体功能降低,从而使多条靶腺轴的多种因子发生变化^[1-3]。垂体-靶腺轴的因子指标是研究肾阳虚证的金指标,其中睾酮(testosterone,T)、促黄体生成素(luteinizing hormone,LH)和皮质醇(cortisol,CORT)是肾阳虚各阶段共有的关键指标,能准确的反映肾阳虚证垂体-靶腺轴的功能状态^[4]。本研究采用经典氢化可的松注射液肌注2周造成大鼠肾阳虚模型,观察右归丸及其拆方对肾阳虚大鼠 T、LH 和 CORT 的表达的影响,探讨右归丸及其拆方对肾阳虚证垂体-靶腺轴的功能调节作用。现将其结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠,3~4 月龄,体质量(200±20)g,50 只。购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2013-0004,由湖南中医药大学实验动物中心代购。大鼠均自由饮水、进食。饲养室温 18~22℃,每日更换垫料保持干燥清洁环境。光照:白天/晚上各 12 h。

1.2 药物与试剂

参照《景岳全书》原文,右归丸全方组:熟地黄、山药、山茱萸、枸杞子、当归、菟丝子、鹿角胶、杜仲、肉桂、附子^[5],各药组成比例为 8:4:3:4:3:4:4:2:4。补阴药组:熟地黄、山药、山茱萸、枸杞子、当归。补阳药组:菟丝子、鹿角胶、杜仲、肉桂和附子,按上述分

类及用药比例在湖南中医药大学第一附属医院门诊中药房购买,低温冰箱保存。每 7 天取相应中药量,实验室洁净水中浸泡 30 min 后在陶瓷中药锅中煎煮,首煎水量超过药物 4 cm,时间为 45 min,二煎水量超过药物 2 cm,时间为 30 min,将首煎和二煎药液混合并摇匀,将其浓缩制成含生药浓度为 1 g/mL 的药液,置于 4℃冰箱保存备用^[6]。

氢化可的松注射液(上海现代哈森药业,规格 2 mL:10 mg/支,国药准字:H41021930)

1.3 主要仪器

Elx800 型酶标仪:北京伟科仪器有限公司;Elx50 型洗板机:北京文德设备有限公司;FA1104 型电子分析天平:上海精密科学仪器有限公司;TC-3K 电子天平,深圳市华恒科技有限公司;KD2258 型轮转石蜡切片机:上海仁器仪器;DT5-1 型低速台式离心机:上海仁器仪器;T ELISA 试剂盒,湖南新世纪集团,批号:ABE20723;LH ELISA 试剂盒,湖南瑞智科技有限公司,批号:20160513;CORT ELISA 试剂盒,湖南瑞智科技有限公司,批号:KGT003。真空采血管:上海仁器仪器。

1.4 造模与分组

氢化可的松注射液充分混匀,2.5 mg/100 g 后肢肌内注射 14 d 的方法造肾阳虚模型^[7]。造模完成后,收集 24 h 尿液,4℃,2 000 r/min 离心 5 min,取上清液,-20℃冰箱冷冻保存,采用 ELISA 法检测尿 17-OHCS 含量。参考童峻峰^[8]、苟小军等^[9]的方法,统计正常对照组 10 只大鼠尿 17-OHCS 含量为 43.78 μg/L,以此为切点值,结合大鼠的生理状况:畏寒喜暖、四肢发凉、小便清长、大便稀溏、活动力降低、消瘦的肾阳虚证症状,凡是造模后大鼠尿 17-

OHCS 含量低于该切点值且具有肾阳虚证症状作为造模成功依据。查随机数字表,从 50 只大鼠抽取 10 只为正常对照组大鼠,其余大鼠造肾阳虚证模型。依据上述指标判断模型建立后,40 只造模大鼠全部符合纳入标准,按体质量大小查随机数字表分为 4 组:右归丸补阴药组、右归丸补阳药组、右归丸全方组及模型组。

1.5 干预

于造模成功后的第 2 天开始分别给予不同组对应干预,连续灌胃 28 d(药量按体表面积折算为成人用量的 5 倍,即灌胃量为 10 g/kg)^[10]。给药对照组、模型组等容量生理盐水灌胃,连续灌胃 28 d。给药后第 29 天,以乌拉坦(湖南中医药大学实验室中心提供)1 000 mg/kg 麻醉大鼠,断头处死,采用心脏取血法取血清,摘除双侧睾丸进行指标检测。

1.6 观察指标

1.6.1 大鼠体质量及睾丸指数测定 大鼠麻醉后天平称质量,处死后用手术剪剪开两侧下腹部腹膜,剥离附睾组织,取出双侧睾丸并称质量,计算睾丸指数(睾丸指数=睾丸质量/体质量×100%)。

1.6.2 血清中 T、LH 和 CORT 含量的 ELISA 法测定

心脏取血法取血,将采血管室温放置 2 h,4 ℃离心机离心 15 min(转速 1 200 r/min),采用移液器收集血清于 EP 管中,将 EP 管放入真空袋中,贴上标签,置于-20 ℃冰箱保存待检;采用 ELISA 法,依据 ELISA 试剂说明书操作,检测血清中 T、LH 和 CORT 含量。

1.7 统计学方法

用 SPSS 19.0 软件处理数据。各组数据均以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,多组间均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较方差齐者采用 LSD 检验,方差不齐者采用 *Dunnnett's* 法进行处理,计数资料组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 右归丸及其拆方组对肾阳虚大鼠体质量及睾丸指数的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠体质量和睾丸指数均降低($P < 0.05$)。干预后,与模型组比较,各治疗组大鼠体质量均有提升($P < 0.05$),其中,全方组效果最为明显,接近于正常对照组($P > 0.05$),补阴组与补阳组比较,补阴组更为明显($P < 0.05$)。干预后,与模型组比较,各治疗组大鼠睾丸指数均有提升($P <$

0.05),其中,全方组提升显著,高于正常对照组($P < 0.05$);补阴组与补阳组比较,补阳组睾丸指数提升更为明显($P < 0.05$)。各组间左侧睾丸指数与右侧睾丸指数差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表 1。

表 1 各组大鼠体质量及睾丸指数 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	体质量/g	左侧睾丸指数/%	右侧睾丸指数/%
正常对照组	347.35±16.25	8.13±0.82	8.21±0.46
模型组	260.17±13.33*	6.24±0.53*	6.31±0.67*
补阴组	328.13±12.54** [△]	7.24±0.41** [△]	7.03±0.29** [△]
补阳组	293.38±10.23**	10.12±0.52**	10.18±0.36**
全方组	349.15±14.17*	10.38±0.36**	10.34±0.42**
F 值	25.30	92.53	90.0
P 值	0.00	0.00	0.00

注:与正常对照组相比 * $P < 0.05$;与模型组相比 # $P < 0.05$;补阴组与补阳组相比 $\Delta P < 0.05$ 。

2.2 右归丸及其拆方组对肾阳虚大鼠血清中 T、LH 和 CORT 含量的影响

与正常对照组比较,模型组血清中 T、LH 和 CORT 含量均减少($P < 0.05$)。与模型组比较,各用药组血清 T 浓度均有提升($P < 0.05$),其中,全方组效果最好,补阴组与补阳组比较,补阳组优于补阴组($P < 0.05$)。与模型组比较,各用药组血清 LH 含量均有提升($P < 0.05$),其中,补阴组效果最好,全方组次之,补阴组与补阳组比较,补阴药优于补阳组($P < 0.05$)。与模型组比较,补阴药组与补阳药组均对提升 CORT 水平无明显效果($P > 0.05$),全方组虽能提升 CORT 水平,仍低于正常对照组水平($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠血清中 T、LH 和 CORT 含量的比较

组别	T	LH	CORT
正常对照组	69.55±9.50	28.87±1.61	43.79±5.07
模型组	34.38±5.71*	18.17±6.51*	13.42±4.11*
补阴组	53.43±7.89** [△]	25.06±4.79** [△]	13.64±3.14*
补阳组	58.99±7.85**	22.38±1.43**	13.09±3.54*
全方组	61.71±10.79**	24.08±2.72**	20.06±4.12**
F 值	10.62	23.15	62.93
P 值	0.00	0.00	0.00

注:与正常对照组相比 * $P < 0.05$;与模型组相比 # $P < 0.05$;补阴组与补阳组相比 $\Delta P < 0.05$ 。

3 讨论

中医学认为肾为先天之本,以其能藏先天之精,主生殖,为人体生命之本源。肾精化肾气,肾气分阴阳,肾之阴阳互根互资,协调全身五脏六腑之阴阳,故为一身阴阳之本。肾阳为一身阳气之本,五脏之阳

气非此不能发。但人体由于先天禀赋不足,年老体弱,过度损耗,后天失养等因素造成肾阳亏虚,其温煦、推动等功能减退,脏腑机能衰弱,导致人体新陈代谢减缓,机体产热不足,出现面色苍白、形寒肢冷、腰膝酸痛、小便不利、舌淡苔白、脉沉细等症状。肾阳虚证与诸多疾病联系紧密,涉及全身脏腑组织,尤其以人体下丘脑-垂体-靶腺轴最为密切。

研究表明,肾阳虚证与神经内分泌功能改变密切相关^[11-12],是机体多系统器官功能改变的综合表现。下丘脑-垂体-靶腺轴是人体神经内分泌系统的枢纽,具备维护人体内环境稳定、反应外界刺激以及提高机体对环境适应力等功用。下丘脑-垂体-靶腺轴的功能障碍和功能低下是肾阳虚证的基础^[13-14],肾阳虚会引起下丘脑-垂体-靶腺不同环节、不同程度的功能紊乱^[15],反映这几个轴功能改变的指标是肾阳虚证较为特异的指标^[16]。研究证明 T、LH 和 CORT 在肾阳虚的不同阶段的都可作为关键指标,选用 T、LH 和 CORT 作为实验指标,以尽量避免因环境、个体因素造成的肾阳虚阶段差异对实验的影响^[17]。

“阴中求阳”理论是张仲景依据其对命门学说的认知上所提出,认为命门水火(肾阴肾阳)宜补不宜泻。并在此基础上提出了“善补阳者必于阴中求阳,则阳得阴助而生化无穷;善补阴者必于阳中求阴,则阴得阳升而化源不竭”命门水火的调补原则,并创制了左归丸及右归丸^[18]。右归丸方中以大量滋阴药物配以少量补阳药物,切合阴中求阳之意,使阳得阴助,生化无穷。

既往对右归丸的研究多集中于右归丸全方,而对右归丸拆方研究很少。本实验采用经典的氢化可的松法复制“肾阳虚”证动物模型,造模结束后,检测尿 17-OHCS 表达水平,造模组尿 17-OHCS 表达水平明显降低($P<0.05$),造模方法可靠。通过分析肾阳虚证关键指标 T、LH 和 CORT 的表达水平差异,观察右归丸及其拆方对肾阳虚大鼠的不同影响。本实验研究结果显示,与正常对照组比较,肾阳虚造模大鼠生长速度缓慢,睾丸指数降低,血清中 T、LH 和 CORT 表达减少。治疗后右归丸方中的补阴药在提升肾阳虚大鼠体质量和增加血清中 LH 的含量方面调控作用较好,补阳药在增加血清中 T 的含量和提高睾丸指数方面调控作用较好,补阴药和补阳药对血清中 CORT 表达水平的调控均无明显作用。而右归丸全方可使各项指标趋向正常,且效果相对单一

补阴或补阳更好,说明运用“阴中求阳”理论可更为有效地改善肾阳虚证。

参考文献:

- [1] 姚建平,金国琴,戴薇薇,等.右归丸对自然衰老大鼠海马 5-HT、NE 含量与 HPA 轴活性作用的实验研究[J].中国中医基础医学杂志,2011,17(2):177-178.
- [2] 陆惠,丁青.右归丸现代药理研究新进展[J].湖南中医药大学学报,2012,32(6):71-73.
- [3] 王秀凤,李静,张磊,等.基于因子分析的肾阳虚证动物模型垂体-靶腺轴关键指标的评价[J].中国中西医结合杂志,2013,33(6):825-829.
- [4] 王秀凤,胡翊健,王建红,等.基于因子分析的正常、肾阳虚状态大鼠垂体-靶腺轴激素相关性研究[J].时珍国医国药,2011,22(4):990-992.
- [5] 于润桥,危荃,王建红,等.基于粗糙集理论的右归丸配伍研究[J].辽宁中医药大学学报,2007,10(2):3-5.
- [6] 刘朝圣,曾顺.天蚕壮阳散对肾阳虚证小鼠附睾精子膜 GPC 含量的影响[J].中国民间疗法,2010,13(9):58-59.
- [7] 杜江,李楠,王和鸣.肾虚模型造模方法及相关指标[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(50):9433-9436.
- [8] 童骏峰,徐志伟,杨元宵,等.腺嘌呤与氢化可的松所致大鼠肾阳虚证模型比较研究[J].中华中医药杂志,2015,30(11):3901-3904.
- [9] 苟小军,韩宝侠,王朝廷,等.肾阳虚证造模方法考察[J].吉林中医药,2009,29(9):814-815.
- [10] 龙泳伶,李政木.金匱肾气丸及其拆方对肾阳虚雌鼠卵巢功能的影响[J].中国中西医结合杂志,2013,33(7):967-971.
- [11] 许兰芝,蒋淑君.肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴内分泌及钙调蛋白基因表达与淫羊藿总黄酮的干预[J].中国临床康复,2006,11(10):138-139.
- [12] 操红缨,吴清和,黄萍,等.缩泉丸对肾阳虚多尿大鼠内分泌及免疫功能的影响[J].中药新药与临床药理,2009,20(4):323-326.
- [13] 林英,王卫东,叶山东,等.中老年男性下丘脑-垂体-肾上腺轴激素水平改变与生活质量关系的研究[J].中国临床保健杂志,2013,16(2):136-138.
- [14] 俞瑾.肾主生殖与生命网络研究中的启示[J].中国中西医结合杂志,2000,20(6):409-411.
- [15] 欧阳轶强,邹移海,张薇,等.对大鼠他巴唑肾阳虚证动物模型下丘脑-垂体-靶腺轴几项指标的考察[J].中医药学刊,2006,24(9):1658-1660.
- [16] 张新民,段元丽,沈自尹,等.三类中药复方对侧脑室内注射 IL-1 大鼠下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴反应状态的影响[J].中医杂志,2002,43(1):59-62.
- [17] 陈英华,欧阳轶强,孙琪,等.肾阳虚证动物模型规范化研究中诊断指标选择的初步探讨[J].中国中医基础医学杂志,2003,9(10):26-30.
- [18] 韩忠.基于“阴中求阳”理论的右归丸对肾阳虚大鼠 T、LH 和 CORT 影响的实验研究[D].长沙:湖南中医药大学,2017.