

右归丸对肾阳虚模型大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响

张文钊 田洪昭 左 军 李 冀

(黑龙江中医药大学, 哈尔滨, 150040)

摘要 目的:探讨右归丸对肾阳虚模型大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响。方法:将 60 只健康雄性 SD 大鼠随机分为右归丸组、模型组和空白组,每组 20 只。右归丸组大鼠接受肾阳虚模型制备后予右归丸灌胃给药干预;模型组大鼠接受肾阳虚模型制备后接受右归丸组同体积的 0.9% NaCl 灌胃,连续灌胃 20 d;空白组大鼠不接受造模制备,第 16 日起同右归丸组同体积的 0.9% NaCl 灌胃,连续灌胃 20 日。造模结束后每隔 4 日常规记录大鼠体重、肛温、饮水量、尿量、以及抓取激惹反应。比较 3 组大鼠促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、大鼠皮质醇(CORT)、促肾上腺皮质激素释放激素受体 1(CRHR1)的含量变化。结果:1)造模后发现接受模型制备的大鼠表现为肛温降低,饮水量及摄食量减少,体质量下降,大便溏薄,尿量增多,抓取激惹反应减弱。进行药物干预后,右归丸组大鼠的肛温、饮水量、摄食量、抓取激惹反应、体质量均高于模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),尿量减少,且大便干湿趋于正常;2)与空白组比较模型组及右归丸组肾上腺、下丘脑、垂体的脏器指数均下降($P < 0.05$),其中模型组下降的趋势更为明显,右归丸组较模型组肾上腺、下丘脑、垂体的脏器指数有所上升($P < 0.05$);3)与空白组比较,模型组及右归丸组大鼠接受造模后血清 CRF、ACTH、CORT 以及肾上腺、下丘脑、垂体的 CRHR1 含量均明显下降,经过右归丸干预后,该组别的大鼠 CRF、ACTH、CORT、CRHR1 含量均得到提升,其中 CRF、ACTH 含量接近空白组水平。4)与空白组比较,模型组及右归丸组大鼠接受造模后肾上腺、下丘脑、垂体的 CRF、ACTH、CORT 及 CRHR1 mRNA 水平均明显下降,经过右归丸干预后,该组别的大鼠 CRF、ACTH、CORT、CRHR1 mRNA 水平均得到提升。结论:右归丸可能是通过调节下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴的功能发挥温肾补阳的作用。

关键词 肾阳虚;右归丸;机制;下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴;CRF;ACTH;CORT;CRHR1

Effects of Yougui Pills on Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Cortex Axis in the Kidney-Yang Deficiency Model Rats

Zhang Wenzhao, Tian Hongzhao, Zuo Jun, Li Ji

(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Abstract Objective: To explore the effects of Yougui Pills on hypothalamus-pituitary-adrenal cortex axis in the kidney-yang deficiency model rats. **Methods:** A total of 60 healthy male SD rats were randomly divided into a Yougui Pills group, a model group and a blank group, with 20 cases in each group. After the kidney-yang deficiency model establishment, the rats of Yougui Pills group had Yougui Pills by intragastric administration; After the kidney-yang deficiency model establishment, the rats of the model group had the same volume 0.9% NaCl as Yougui Pills by intragastric administration, continuous for 20 days; The rats in the blank group did not accept model preparation, and had the same volume 0.9% NaCl as Yougui Pills by intragastric administration began with the 16th day, continuous for 20 days; After model establishment, the weight, anus temperature, water intake, urine volume, and grab irritability reaction of rats were recorded every 4 days. The content changes of corticotrophin releasing factor(CRF), adrenocorticotrophic hormone(ACTH) and cortisol(CORT) of rats, adrenocorticotrophic hormone releasing hormone receptor 1(CRHR1) among the 3 groups of rats were compared. **Results:** 1) after the model establishment, it was found that the established model rats had anal temperature reduction, drinking water and food intake decrease, weight loss, thin sloppy stool, urine volume increased, fetching irritability reaction weaken. After the pharmacological intervention, the rats of Yougui Pills group were higher than that in the model group in anal temperature, water intake, food intake, grab irritability reaction and weight. The comparison was with statistical differences($P < 0.05$) and the urine volume reduced and stool moisture returned to normal. 2) Compared with the blank group, the indexes of adrenal gland, hypothalamus and pituitary decreased in the model group and the Yougui Pills group($P < 0.05$). The model group had more obvious decreased trend. The indexes of adrenal gland, hypothalamus and pituitary increased in the Yougui Pills group compared with model group($P < 0.05$). 3) Compared with the blank group, the rats had model establishment in the model group and Yougui Pills group had the significantly reduction of serum CRF, ACTH, CORT and CRHR1 content of adrenal gland, hypothalamus

基金项目:国家自然科学基金项目(81874426)

作者简介:张文钊(1990.03—),男,博士研究生在读,研究方向:方剂配伍规律与药效物质基础研究,E-mail:zhengpeinegd@163.com

通信作者:李冀(1960.11—),男,研究生,教授,研究方向:方剂配伍规律与药效物质基础研究,E-mail:ly900311@126.com

and pituitary, after the intervention of Yougui Pills. CRF, ACTH, CORT, CRHR1 content of the rats in the group had improved. CRF and ACTH levels were close to the blank group levels. 4) Compared with the blank group, the model established rats in the model group and Yougui Pills group had the significantly mRNA levels reduction of CRF, ACTH, CORT and CRHR1 in adrenal gland, hypothalamus and pituitary. After the Yougui Pills intervention, CRF, ACTH, CORT and CRHR1 mRNA levels were improved in the group. **Conclusion:** The Yougui Pills may exert the function of warming the kidney and tonifying yang by adjusting the hypothalamus-pituitary-adrenal cortex axis.

Key Words Kidney yang deficiency; Yougui Pills; Mechanism; Hypothalamus-pituitary-adrenal cortex axis; CRF; ACTH; CORT; CRHR1

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.11.015

中医现代研究表明肾阳虚的临床症状改变与下丘脑-垂体-肾上腺轴(Hypothalamus-Pituitary-Adrenal, HPA)功能紊乱密切相关, HPA轴通过反馈调节通路参与控制包括应激反应、免疫等在内的诸多生理的反应, 肾阳虚患者体内应激反应继续性存在, 导致HPA轴过度兴奋并逐渐消耗其储备能力; 且长期的应激介导于HPA轴释放糖皮质激素, 诱发机体淋巴细胞过度凋亡, 引起免疫抑制^[1]。因此我们推测, 各种干预措施(药物、各种刺激等)如果能够明显改善HPA轴, 就可以在在一定程度上改变肾阳虚引发的临床症状。右归丸出自《景岳全书》, 基于“阴中求阳”的理论所创, 具有温补肾阳, 填精益髓之功效, 主治肾阳不足引起的诸症。本课题组已从临床角度证实右归丸有增强肾阳虚患者免疫功能的作用, 但该方增强免疫的机制有待进一步探讨。本研究拟从下丘脑-垂体-肾上腺轴与肾阳虚之间的关系着手, 利用改良的“氢化考的松肾阳虚”动物模型为载体, 探讨右归丸的科学内涵。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 选用健康雄性SD大鼠60只, 平均体质量(230 ± 20)g, 由中国上海SLAC实验动物有限责任公司提供[合格证号: SCXK(沪)2007-0005], 于实验动物中心适应性喂养5d后体质量达(300 ± 20)g进行实验研究。食物和水在整个实验过程中均由实验动物自由索取。实验经成都中医药大学动物管理制度和使用委员会批准而进行, 实验过程中动物的处理均严格按照国际道德准则和国家健康指南关于维护和使用实验动物先关条例进行。

1.1.2 药物 右归丸(浓缩丸, 北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂, 国药准字Z11021040)。右归丸混悬液制备: 将右归丸完全溶解于双蒸水中, 参照成人的体质量及计量, 根据^[2]《药理实验方法学》中换算动物剂量折算方法将右归丸配置成含药0.2439g/mL的混悬液, 备用。

1.1.3 试剂与仪器 苯甲基磺酰氟(Phenylmethanesulfonyl fluoride PMSF, 美国, 批号: W98923), Trizol试剂(美国Invitrogen公司, 批号: 828392), 聚丙烯酰胺凝胶(中国碧云天公司, 批号: 392-32), RPMI 1640和胎牛血清(美国Thermo公司, 批号: 16000-044)。大鼠促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)Elisa试剂盒(南京森贝伽生物科技有限公司, 批号: FA021572), 大鼠促肾上腺皮质激素(ACTH)ELISA试剂盒(南京森贝伽生物科技有限公司, 批号: FA02106B), 大鼠皮质醇(CORT)ELISA试剂盒(南京森贝伽生物科技有限公司, 批号: YM-S2070), 单克隆大鼠促肾上腺皮质激素释放激素受体1(CRHR1)抗体(Abcam公司, 美国, 批号: ab150561)。高速冷冻离心机, 转膜仪, 凝胶成像系统, 聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)扩增仪(美国ABI公司, 型号ProFlex), 切片机(美国RMC公司, 型号PowerTome-PC), 酶标仪(美国Thermo lab-system公司, 型号Multiskan FC), 脱色摇床(美国Thermo lab-system公司, 型号MaxQ8000)及PL203型电子天平(瑞士METTLER TOLEDO, 型号PL203), 全自动生化分析仪(日本日立公司, 型号: 7180型)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 肾阳虚模型制备方法: 大鼠接受改良邝安堃式^[3]肾阳虚模型制备, 大鼠每日接受25mg/kg氢化可的松肌肉注射, 连续注射15d。将40只造模成功大鼠按照随机数字表法随机分为右归丸组、模型组, 每组20只, 其余20只为空白对照组。

1.2.2 干预方法 右归丸组大鼠接受肾阳虚模型制备后予右归丸混悬液灌胃给药干预, 连续灌胃20d, 1次/d, 2mL/(200g·次)。模型组大鼠接受肾阳虚模型制备后接受右归丸组同体积的0.9% NaCl溶液灌胃, 连续灌胃20d。空白组不接受造模制备, 第16天起同右归丸组同体积的0.9% NaCl溶液灌胃, 连续灌胃20d。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 大鼠一般症状 造模结束后每隔4 d常规记录大鼠体质量、肛温、饮水量、尿量、以及抓取激惹反应。

1.2.3.2 取材 将各组大鼠按照0.3 mL/kg的比例腹腔注射10%水合氯醛麻醉后,进行腹主动脉采血,迅速离心后取上清液。随后于冰上迅速分离下丘脑、垂体及肾上腺储存于-80℃超低温冰箱中保存备用。同时参照宝森方法计算脏器指数。

1.2.3.3 酶联免疫吸附试验(ELISA)法 将收集的辅助动脉血在4℃条件下进行9 000 r/min离心5 min后,使用高压枪头吸取离心后的上清液,送至检验中心,应用全自动生化分析仪检测CRF、ACTH、CORT浓度。使用酶联免疫吸附试验(ELISA)进行检测,包被、封闭酶标反应孔、洗涤、加入待检测样品、加入酶标抗体、加入底物液、终止反应等过程均严格按照说明书进行,试剂盒由广州达安基因股份有限公司提供,OPD显色后采用492 nm波长,TMB反应产物检测需要450 nm波长。检测时一定要首先进行空白孔系统调零,用测定标本孔的吸收值与一组阴性标本测定孔平均值的比值(P/N)表示。

1.3.5 蛋白质印迹(western blotting)法 取收集的组织200 mg,加入1 mL含蛋白酶抑制剂(PMSF)裂解缓冲液于冰上进行匀浆,4℃,15 000 r/min离心5 min,取上清液,100 μL分装后-80℃备用。根据DAB方法对所提蛋白液进行浓度测定。以100 μL蛋白液中加入25 μL的上样缓冲液于100℃金属浴中变性。按照,每泳道上样量为50 μg蛋白,计算上样量。电泳(4%浓缩胶,12%分离胶,120 V,50 mA,1.5 h)结束后将凝胶取出,用PVDF膜转印,遵循胶在负极,膜在正极的原则,50 V,100 mA,2 h。5%脱脂奶粉液的封闭2 h,TBS洗3次,5 min/次,分别加入5%脱脂奶粉按1:1 000稀释的抗CRHR1和β-actin抗体(1:1 000),4℃孵育过夜,TBS洗3次,5 min/次,加入碱性磷酸酶标记山羊抗兔IgG(1:2 000)室温2 h,TBS洗3次,5 min/次。将滤膜放入配好的显色液中显色15~30 min,计算机扫描图像,并由生物图像分析系统(Bio-Rad公司,美国,Model Gel Doc 2000)分析处理。

1.3.6 聚合酶链式反应(RT-PCR)法 取收集的组织200 mg加入1 mL Trizol匀浆,震荡30 s后加入氯仿0.2 mL,剧烈摇动30 s,室温下放置3 min后置于4℃,12 000 r/min离心15 min。轻吸上层无色水相

至另一试管后加入0.5 mL的异丙醇,室温下放置10 min。加入75%乙醇1 mL,震荡10 s后置于4℃,7 500 r/min离心5 min,摒弃上清液,小心吸取残留乙醇,并开盖干燥5 min,加入20 μL纯化乙醇溶解RNA。采用RNA逆转录试剂盒检测CRF、ACTH、CORT、CRHR1的基因表达水平。取5 μL产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像所得DNA条带采用凝胶成像系统进行分析,读取条带ID值。用于扩增的引物序列如下:β-actin mRNA正向序列:5, - actggcattgtgatggactc-3,反向序列:5, - acgcactgtg-gcataga-3,; CRF mRNA正向序列:5, - ccagcaacct-cagccgattc-3,;反向序列:5, - aaaaagtttagccgcagcctg-3,; ACTH mRNA正向序列:5, - atcaactaaccattgatata-3,;反向序列:5, - agtttcattgattatttt-3,; CORT mRNA正向序列:5, - atagtagaagaatgtctctg-3,;反向序列:5, - aaactactggatgagtttca-3,; CRHR1 mRNA正向序列:5, - agacttgcctgcgcaggggc-3,;反向序列:5, - agc-cagagcctgccggtggg-3。

1.3 统计学方法 采用SPSS 16.0统计软件进行数据分析,所有结果均选择3个或3个以上数据,各实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用t检验和单因素方差分析对实验数据进行方差比较和组间比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般症状比较 造模后发现接受模型制备的大鼠表现为肛温降低,饮水量及摄食量减少,体质量下降,大便溏薄,尿量增多,抓取激惹反应减弱。进行药物干预后,右归丸组大鼠的肛温、饮水量、摄食量、抓取激惹反应、体质量均高于模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),尿量减少,且大便干湿趋于正常。见图1~5。

2.2 对肾阳虚证大鼠脏器指数的影响 与空白组比较模型组及右归丸组肾上腺、下丘脑、垂体的脏器指数均下降($P < 0.05$),其中模型组下降的趋势更为明显,右归丸组较模型组肾上腺、下丘脑、垂体的脏器指数有所上升($P < 0.05$)。见图6。

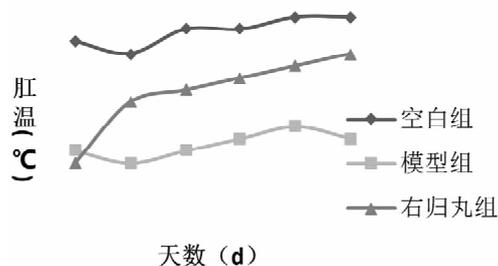


图1 3组大鼠肛温比较

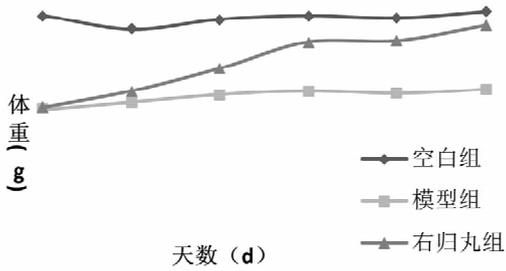


图2 3组大鼠体质量比较

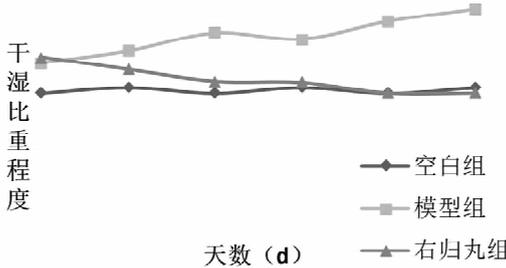


图3 3组大鼠大便干湿程度比较

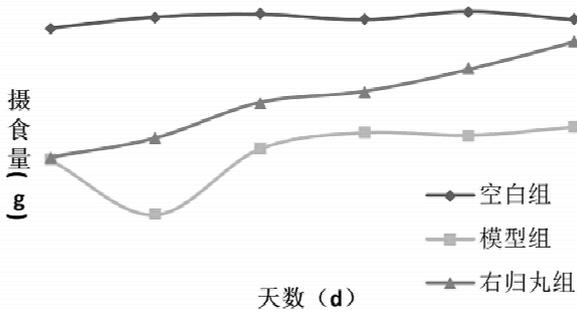


图4 3组大鼠摄食量比较

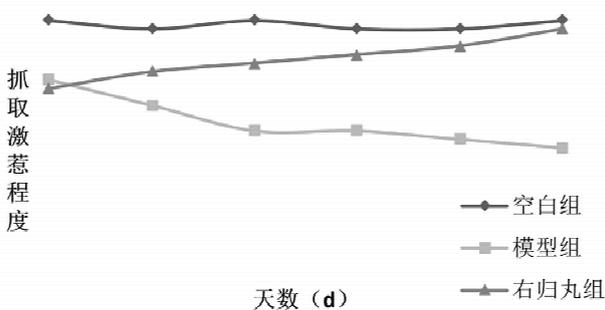


图5 3组大鼠激惹反应比较

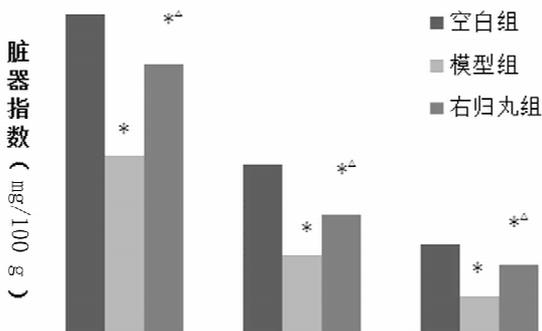


图6 3组大鼠脏器指数比较

注:与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2.3 血清 CRF、ACTH、CORT 含量的变化 与空白组比较,模型组及右归丸组大鼠接受造模后血清 CRF、ACTH、CORT 以及肾上腺、下丘脑、垂体的 CRHR1 含量均明显下降,经过右归丸干预后,该组别的大鼠 CRF、ACTH、CORT、CRHR1 含量均得到提升,其中 CRF、ACTH 含量接近空白组水平。见表 1,图 7。

表 1 3 组大鼠血清 CRF、ACTH、CORT 含量的变化 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$)

组别	CRF($\mu\text{g/L}$)	ACTH($\mu\text{g/L}$)	CORT($\mu\text{g/L}$)
空白组	200.89 \pm 0.93	98.65 \pm 0.71	201.65 \pm 2.40
模型组	114.31 \pm 0.31 *	43.69 \pm 0.08 *	131.92 \pm 1.76 *
右归丸组	195.92 \pm 0.41 * Δ	95.91 \pm 0.20 * Δ	167.28 \pm 1.31 * Δ

注:与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

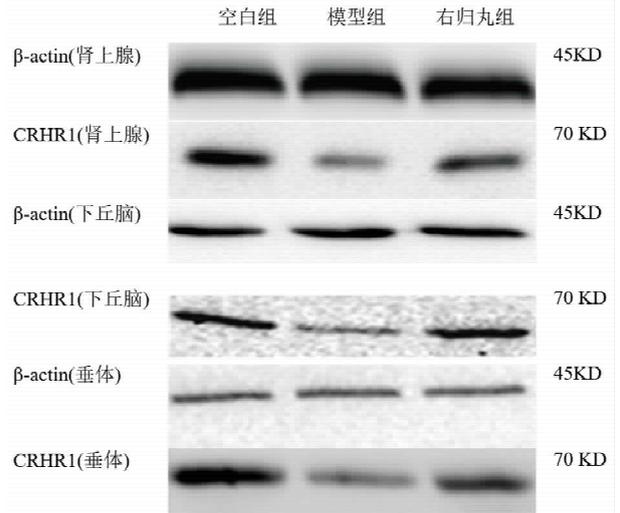


图7 3组大鼠 CRHR1 表达变化

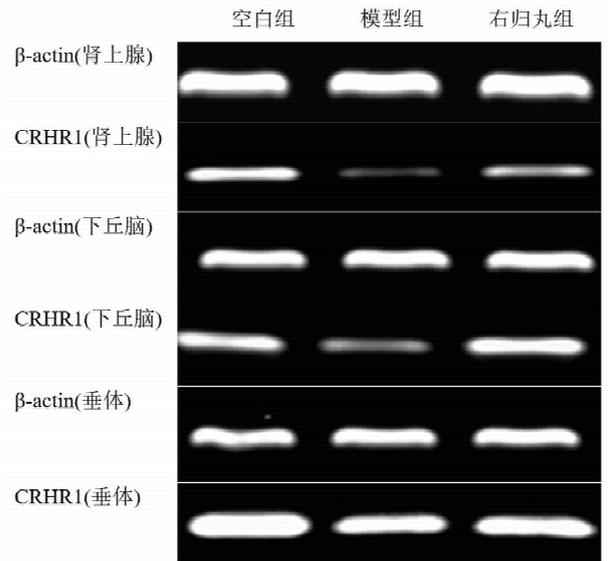


图8 3组大鼠3部位 CRHR1, β -actin 水平比较

2.5 CRF、ACTH、CORT 及 CRHR1 mRNA 水平的变化 与空白组比较,模型组及右归丸组大鼠接受造

模后肾上腺、下丘脑、垂体的 CRF、ACTH、CORT 及 CRHR1 mRNA 水平均明显下降,经过右归丸干预后,该组别的大鼠 CRF、ACTH、CORT、CRHR1mRNA 水平均得到提升。见图 8。

3 讨论

肾乃脏腑阴阳之本,亦是人体生长、发育、生殖之源,是生命活动之根本故为“先天之本”。一身之阳气由肾主导,肾阳虚即肾脏阳气虚衰,是肾脏阳气衰竭表现的症候,火衰其本则阳虚之证迭出。通过国内外大量文献^[5-6],我们可知邝安堃于 60 年代首创的肾阳虚模型可以理想的模拟机体肾阳虚所发生的病理性改变。而基于中医脏腑辨证依据,我们所确定的肛温、体质量、饮食及抓取激惹反应等变化可以准确的体现中医关于肾阳虚证的变化,可作为造模成功与否的一个标准。本文结果显示:接受模型制备的大鼠均出现一系列符合肾阳虚证的症状,这和徐文聘^[4]等近期研究结果相符合。且经过右归丸干预后大鼠症状出现改善,进一步证实了本研究模型制作成功。

肾阳虚的现代医学本质一直是各医家讨论的热点话题,沈自尹^[7]通过研究证实 HPA 轴发生功能紊乱是肾阳虚证的共同点。闵建新^[8]等通过对肾阳虚模型大鼠 HPA 轴进行免疫组化形态学观察后发现肾阳虚时大鼠肾上腺皮质组织的 CRF 阳性纤维数量明显减少,肾上腺束状带明显变薄,上述报道和本研究发现氢化可的松长期肌肉注射的大鼠肾上腺、甲状腺、垂体的脏器指数均发生明显变化具有一致性。

国际上屡屡有学者想要探索促进 HPA 轴恢复的方法,但均以失败告终。Markow ska^[9]等通过上调 ACTH 的水平抑制大鼠肾上腺皮质细胞过度凋亡,增加了肾上腺皮质组织内皮质酮和醛固酮的含量,但是对大鼠外周血清中皮质酮和醛固酮的含量并没有产生任何改善作用。Gomez-Gil^[10]等对抑郁症患者使用丁螺旋酮后发现其血浆中 ACTH 浓度增加,认为丁螺旋酮可能可以通过促进 ACTH 的分泌而改善抑郁症患者 HPA 的抑制状况,但 Gomez-Gil 并未从 HPA 轴的其他环节进行进一步深入研究。

中药复方是中医学发挥临床疗效的应用形式,配伍是中药复方的灵魂。本方由熟地黄、附子(炮附片)、肉桂、山药、山茱萸(酒炙)、菟丝子、鹿角胶、枸杞子、当归、杜仲(盐炒)组成,方中以附子、肉桂、鹿角胶为君药,温补肾阳,填精补髓。臣以熟地黄、枸杞子、山茱萸、山药滋阴益肾,养肝补脾,阴中求阳。

佐以菟丝子、杜仲补益肝肾,强筋壮骨;当归补血养肝,诸药配合,共奏温补肾阳,填精补髓之功。现代药理研究显示^[11]:熟地黄、山茱萸提取物可有效的抑制皮质酮损伤性大鼠脑组织神经元的凋亡,山药提取物可以升高去甲肾上腺素的含量而达到改变 HPA 轴形态的目的;杜仲提取物可以调节去卵巢骨质疏松模型大鼠的 HPA 轴形态而改善症状;当归提取物能够降低氢化可的松造成“阳虚”小鼠的淋巴细胞凋亡率,提高其机体免疫力,负反馈于 HPA 轴,改善其病理变化。本研究使用右归丸作为干预手段后,发现大鼠的 CRF、ACTH、CORT、CRHR1 含量均得到提升,从 HPA 轴的下丘脑、垂体、肾上腺环节均可实现,提示右归丸具有改善肾阳虚 HPA 轴功能的作用,揭示了右归丸的现代内涵。

综上所述,我们认为 HPA 轴功能紊乱是肾阳虚的关键,右归丸通过改善下丘脑、垂体、肾上腺轴等环节的平衡,进一步体现了中医治疗的整体观。另外考虑中医药对机体多靶点、多途径性,右归丸整体调节机制仍处于不断探索中,待进一步扩宽及深入。

参考文献

- [1] 王文健,沈自尹,张新民,等. 补肾法对老年男性下丘脑-垂体-性腺轴作用的临床和实验研究[J]. 中医杂志,1986,27(4):32.
- [2] 宋洪涛,张汝华,郭涛. 中药药物动力学研究概况与展望[J]. 西北药学杂志,1998,13(3):125-127.
- [3] 邝安堃. 某些助阳药对于大剂量皮质激素所致耗竭现象的影响[J]. 中华内科杂志,1993,12(2):113.
- [4] 徐文聘,王欣,王琛,等. 从下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴探讨附子肉桂在肾气丸中补肾阳的作用[J]. 浙江中医药大学学报,2014,38(7):831-836,841.
- [5] 李亚,王通,王广飞,等. 牡蛎肽对肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴调节作用的研究[J]. 食品工业科技,2019,40(12):291-294.
- [6] 马晓宇,姜梦如,穆祥,等. 温肾益精散对肾阳虚模型大鼠生长性能的影响[J]. 中国兽医科学,2018,48(9):1187-1195.
- [7] 沈自尹. 中西医结合肾本质研究回顾[J]. 中国中西医结合杂志,2012,32(3):304-306.
- [8] 伍庆华,王建红,刘海云,等. 肾阳虚大鼠垂体-甲状腺轴与垂体-性腺轴相关性研究[J]. 江苏中医药,2007,39(3):56-57.
- [9] Markow ska A, M acchi C, N ussdorfer GG et al. Effects of pneumadin (PNM) on the adrenal glands. 5. Potent stimulating action of PNM on adrenocortical growth of dexamethasoneadm inistered rats[J]. HistolH istopathol,1996,11(3):583-585.
- [10] GomezGilE, Navines R, Martinez De Osaba MJ, et al. Hormonal responses to the 5-HT agonist buspirone in remitted endogenous depressive patients after longterm imipramine treatment[J]. Psychoneuroendocrinology,2010,35(4):481-489.
- [11] 赵新永,金国琴,顾翠英,等. 左归丸和右归丸对皮质酮所致大鼠海马神经细胞病理模型学习记忆相关信号转导蛋白表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2010,8(12):1983-1987.