

· 药 学 基 础 ·

## 巴戟天经不同比例甘草炮制后对腺嘌呤致肾阳虚模型大鼠 肾功能和HPG轴改善作用的比较

黎祖荣<sup>1</sup>, 郑宝玉<sup>2</sup>, 王瑞国<sup>1</sup>, 王鹏<sup>1</sup>, 黄鸣清<sup>1</sup>, 程再兴<sup>1\*</sup>, 陈红<sup>1\*</sup>

(1. 福建中医药大学药学院, 福州 350122; 2. 郑州工业应用技术学院, 郑州 450000)

**[摘要]** 目的:通过比较巴戟天生品及不同比例甘草炮制品对腺嘌呤致肾阳虚模型大鼠肾功能和下丘脑-垂体-性腺轴(HPG轴)的改善作用,以及对大鼠组织中Wnt/ $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)和转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )/Smad信号通路蛋白表达的调节作用,分析不同比例甘草炮制(甘草与巴戟天质量比分别为0:100、3:100、6:100、12:100、24:100,以下分别简称无甘草炮制品和100:3、100:6、100:12、100:24炮制品)对巴戟天补肾助阳功效的影响,阐释制巴戟天的炮制内涵。方法:巴戟天炮制品按2020年版《中华人民共和国药典》记载的制巴戟天方法进行制备。采用腺嘌呤灌胃给药复制肾阳虚大鼠模型,利用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定促卵泡激素(FSH)、黄体生成素(LH)、雌二醇( $E_2$ )、睾酮(T)水平,分光光度法测定尿素氮(BUN)和肌酐(SCr)水平,苏木素-伊红(HE)染色法评价组织病理形态变化,免疫组织化学法分析E-钙黏蛋白(E-cadherin)和 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、Wnt2b、 $\beta$ -catenin、Smad1和Smad4蛋白的表达。结果:100:6、100:12炮制品对体态的改善较好,100:12炮制品降低血清中BUN、SCr、FSH和LH水平及调整 $E_2$ /T比值的作用最优,100:6、100:12炮制品调节E-cadherin、 $\alpha$ -SMA、Wnt2b、 $\beta$ -catenin、Smad1和Smad4蛋白表达的作用较佳。结论:巴戟天经100:6、100:12比例甘草炮制后对腺嘌呤致肾阳虚模型大鼠肾功能和HPG轴有较好的改善作用,这与其能更好地调节大鼠肾脏和睾丸组织中Wnt/ $\beta$ -catenin通路及睾丸组织中TGF- $\beta_1$ /Smads通路密切相关。

**[关键词]** 巴戟天; 肾阳虚模型; 下丘脑-垂体-性腺轴(HPG轴); E-钙黏蛋白;  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白; Wnt2b;  $\beta$ -连环蛋白; 甘草

[中图分类号] R22;R28;R943.1;R96 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)19-0128-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212451 [增强出版附件] 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211215.1205.001.html>

[网络出版日期] 2021-12-16 11:44

## Effect of Morindae Officinalis Radix Processed with Different Proportions of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma on Improvement of Renal Function and HPG Axis of Kidney Yang Deficiency Model Rats Induced by Adenine

LI Zurong<sup>1</sup>, ZHENG Baoyu<sup>2</sup>, WANG Ruiguo<sup>1</sup>, WANG Peng<sup>1</sup>, HUANG Mingqing<sup>1</sup>,  
CHENG Zaixing<sup>1\*</sup>, CHEN Hong<sup>1\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China;  
2. Zhengzhou University of Industrial Technology, Zhengzhou 450000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explain the scientific connotation of Morindae Officinalis Radix (MOR) processed by Glycyrrhizae Radix et Rhizoma (Gly) by comparing the effect of raw products of MOR and

[收稿日期] 2021-10-12

[基金项目] 福建省自然科学基金项目(2016J01774, 2021J01924);福建省中药制剂与质量控制工程技术研究中心项目(X2019003-平台)

[第一作者] 黎祖荣,在读硕士,从事中药质量标准及炮制原理研究,E-mail:2295532544@qq.com

[通信作者] \*程再兴,博士,副教授,从事中药药理及中药炮制原理研究,E-mail:15300882@qq.com;

\*陈红,博士,教授,硕士生导师,从事中药质量标准及炮制原理研究,E-mail:chenhong2911@163.com

processed products of MOR with different proportions of Gly (GMOs) on the improvement of renal function and hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis, the protein expression of Wnt/ $\beta$ -catenin and transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )/Smad signal pathways in kidney Yang deficiency model rats induced by adenine. **Method:** GMOs were prepared according to method under MOR in 2020 edition of *Chinese Pharmacopoeia*. Rat model of kidney Yang deficiency was established by intragastrical administration of adenine, levels of follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol ( $E_2$ ) and testosterone (T) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Levels of urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (SCr) were measured by spectrophotometry, hematoxylin-eosin (HE) staining was used to evaluate the pathological changes of kidney, testis and epididymis. Immunohistochemistry (IHC) was used to analyze the protein expression of E-cadherin,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), Wnt2b,  $\beta$ -catenin, Smad1 and Smad4. **Result:** MOR processed with 100:6 and 100:12 proportions of Gly (short for GMO/100:6 and GMO/100:12) had the most obvious improvement on the body posture of kidney Yang deficiency model rats. GMO/100:12 had the best effect on reducing the levels of BUN, SCr, FSH, LH and the ratio of  $E_2$ /T. GMO/100:6 and GMO/100:12 had the best effect on regulating the protein expression of E-cadherin,  $\alpha$ -SMA, Wnt2b,  $\beta$ -catenin, Smad1 and Smad4. **Conclusion:** GMO/100:6 and GMO/100:12 have the a good effect on the improvement of renal function and HPG axis in kidney Yang deficiency model rats induced by adenine, which is related with the fact that they can regulate Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in renal and testicular tissue and TGF- $\beta_1$ /Smads pathway in testicular tissue.

**[Keywords]** Morindae Officinalis Radix; kidney Yang deficiency model; hypothalamic-pituitary-gonadal axis (HPG axis); E-cadherin;  $\alpha$ -smooth muscle actin; Wnt2b;  $\beta$ -catenin; Glycyrrhizae Radix et Rhizoma

巴戟天是“四大南药”及“福九味”道地药材之一,具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的功效。制巴戟天为历版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)收录的巴戟天2种炮制品之一,甘草炮制可增强其补肾助阳功效,如史辑等<sup>[1]</sup>比较了巴戟天及其不同炮制品对脾肾阳虚模型大鼠的改善作用,结果发现制巴戟天改善作用更明显。目前,巴戟天甘草炮制增效的原理及科学内涵仍未得到科学阐释,故本课题组拟通过改变甘草比例来分析甘草炮制对巴戟天物质基础和药理作用的影响。前期研究表明仅巴戟天-甘草(100:6)炮制品(以下简称“100:6炮制品”)可减少巴戟天水煎液中11个成分的总量,而其他比例均增加其总量;甘草炮制可减弱巴戟天对大鼠细胞色素P450酶(CYP)3A的抑制作用,并随着甘草比例的增加随后转为诱导作用,其中以100:6炮制品干预后大鼠CYP3A活性变化最不明显<sup>[2-3]</sup>。

肾阳虚证是中医常见证候之一,又称作元阳亏虚证、命门火衰证,在呼吸、循环、内分泌、消化等系统疾病中均有表现。为了更好地治疗肾阳虚所引起的疾病,学术界一直致力于肾阳虚证本质的研究,并建立了十余种肾阳虚证动物模型。这些模型中既有病因模型,也有病理模型,常见的造模方法为自然衰老法、惊恐伤肾法、氢化可的松法、腺嘌呤

法、去势法等<sup>[4-5]</sup>。在肾阳虚证的相关研究中,腺嘌呤致肾阳虚模型的应用仅次于氢化可的松致肾阳虚模型,其造模方法及造模后动物表现稳定且具有临床代表性<sup>[6-7]</sup>。腺嘌呤致肾阳虚模型是通过大量摄入腺嘌呤后,诱发肾功能衰竭并影响肾组织能量代谢,肾衰后的损伤累积进而对睾丸产生影响,使模型动物呈肾阳虚表现<sup>[8]</sup>。因此,腺嘌呤致肾阳虚模型可表现下丘脑-垂体-性腺轴(HPG轴)功能抑制。本实验选择腺嘌呤致肾阳虚大鼠模型,以比较巴戟天生品及其不同比例甘草炮制品对模型大鼠HPG轴、肾功能的改善作用,探讨甘草炮制对巴戟天补肾助阳功效的影响,阐释制巴戟天的炮制原理及其科学内涵,更好地继承和发扬甘草汁炮制法。

## 1 材料

Infinite M200 Pro型多功能酶标仪(瑞士帝肯公司),Axioskop 2 plus型荧光显微镜(德国蔡司集团),UV-9600型紫外-可见分光光度计(北京瑞利分析仪器有限公司),BS210S型1/1万精密电子天平(德国赛多利斯公司),TG16W型微量高速离心机(长沙维尔康湘鹰离心机有限公司)。

巴戟天(产地四川,批号161707411)和甘草(产地内蒙古,批号200400331)饮片均购于广东康美药业股份有限公司,经福建中医药大学药学院杨成梓教授鉴定,分别为茜草科植物巴戟天 *Morinda*

*officinalis* 的干燥根和豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的干燥根及根茎,均符合2020年版《中国药典》(一部)的相关要求。促卵泡激素(FSH)、黄体生成素(LH)、雌二醇( $E_2$ )、睾酮(T)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司,批号分别为E-EL-R0391c、FGL6C35Y1A、E-EL-0155c、E-EL-0152c),尿素氮(BUN)和肌酐(SCr)试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司,批号分别为20201219、20201210),E-钙黏蛋白(E-cadherin)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)、Smad1和Smad4一抗(美国Immunoway公司,批号分别为YM3065、YT1454、YT5797、YT4324、YT4337),Wnt2b一抗和二抗试剂盒、磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.2~7.4)、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为PB04860、SA1020、AR0030、AR1022),桂附地黄丸(仲景宛西制药股份有限公司,批号20190104),腺嘌呤(上海源叶生物科技有限公司,批号Y29D8C51553),生理盐水(江西科伦药业有限公司,批号H10983065),多聚甲醛(上海麦克林生化科技有限公司,批号C10637626),中性树胶(国药集团化学试剂有限公司,批号10004160),苏木素-伊红(HE)染液套装(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号G1003),牛血清白蛋白(BSA,北京索莱宝科技有限公司,批号420E053)。

雄性SPF级SD大鼠购于上海杰思捷实验动物有限公司,体质量( $180\pm 20$ )g,合格证号SCXK(沪)2019-0002,大鼠饲养于福建中医药大学实验动物中心,在此期间大鼠自由饮水摄食,温度20~23℃,相对湿度40%~60%,通风良好。本文所涉及的动物实验经福建中医药大学动物伦理委员会批准,批准编号FJTCM IACUC 2020065。

## 2 方法

### 2.1 药物的制备

**2.1.1 甘草汁** 称取一定量甘草饮片,加10倍量水浸泡30 min,煎煮30 min,双层纱布过滤,取滤液;残渣加5倍量水煎煮30 min,双层纱布过滤,取滤液;合并滤液,常压水浴浓缩至相应体积,配制成不同生药质量浓度的甘草汁,备用。

**2.1.2 炮制品** 参照2020年版《中国药典》(一部)“巴戟天”项下制巴戟天的制备方法进行炮制。取巴戟天生品,加入放凉的沸水或制备的甘草汁,浸泡,待闷润吸尽,炒至微干,取出置于烘箱(温度60℃,时间8 h)烘干,得饮片甘草与巴戟天的质量

比分别为0:100、3:100、6:100、12:100、24:100的巴戟天炮制品,依次记为无甘草炮制品、100:3炮制品、100:6炮制品、100:12炮制品、100:24炮制品,干燥条件下密封保存,备用。

**2.1.3 水煎液** 取适量巴戟天生品或炮制品,加入10倍量水浸泡30 min,中火煎煮30 min,双层纱布过滤后再加8倍量水煎煮30 min,双层纱布过滤,合并2次滤液,常压水浴浓缩,得巴戟天生品及其炮制品水煎液(生药质量浓度 $0.2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),置于-20℃冰箱保存,备用。

**2.2 分组、造模与给药** 63只大鼠于温度20~23℃、12 h光照循环及自由饮水饮食环境下适应性饲养3 d,第4天禁食不禁水12 h后进行称重,按体质量随机分为9组,每组7只,分别为空白组、模型组、阳性药(桂附地黄丸)组、生品组、无甘草炮制品组、100:3炮制品组、100:6炮制品组、100:12炮制品组、100:24炮制品组。各药物组每天上午灌服桂附地黄丸水溶液(剂量 $0.9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )或巴戟天生品、相应比例炮制品水煎液(剂量 $1.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),空白组和模型组灌服等体积生理盐水,各药物组和模型组每天下午灌服腺嘌呤羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液(剂量 $0.15\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),空白组灌服1% CMC-Na溶液,共计21 d。给药期间观察大鼠的行为变化,每隔3 d称量1次体质量,并根据体质量调整给药剂量。

**2.3 标本采集** 第22天禁食不禁水12 h后取血,于 $4\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径6 cm),血清于-80℃保存备用。取血后在大鼠下腹部剪一“V”字形切口,取肾脏、睾丸、附睾等脏器,称重,计算脏器系数(脏器系数=脏器质量/体质量 $\times 100\%$ )。肾脏、睾丸和附睾组织用4%多聚甲醛溶液固定,低温阴凉处保存备用。

### 2.4 指标检测

**2.4.1 大鼠组织病理形态学观察** 将固定在4%多聚甲醛溶液中的肾脏、睾丸和附睾取出,用PBS冲洗,乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡包埋制成石蜡切片,依次进行脱蜡、水化、HE染色、脱水封片,光学显微镜下观察大鼠肾脏、睾丸和附睾组织病理形态学变化。

**2.4.2 大鼠血清生化指标的检测** 采用分光光度法,按照试剂盒说明书要求检测大鼠血清中BUN和SCr水平。采用ELISA试剂盒按照说明书要求检测大鼠血清中FSH、LH、 $E_2$ 、T水平,计算 $E_2/T$ 比值。

**2.4.3 大鼠肾脏和睾丸E-cadherin、 $\alpha$ -SMA、Wnt2b、 $\beta$ -catenin、Smad1和Smad4蛋白表达检测** 采用

免疫组织化学法(IHC)中的链霉亲和素-生物素复合物(SABC)法进行蛋白检测。石蜡切片常规脱蜡,置于柠檬酸钠缓冲液中,经PBS和蒸馏水洗涤干净后,将切片放入加有少量蒸馏水的湿盒中,再滴加3%过氧化氢溶液,室温孵育20 min;取出后甩干水分,吸干水珠,滴加5% BSA封闭液,放入湿盒内,室温封闭2 h;滴加相应一抗,4 °C过夜,PBS冲洗,加入二抗孵育10 min,PBS冲洗,再加入链霉素抗生物素-过氧化物酶溶液室温孵育10 min,PBS冲洗,DAB显色剂显色,显微镜下控制显色时间,经复染、脱水及透明后封片。每张图片均随机选取5个视野,分别在×10、×20、×40物镜下观察组织内蛋白分布情况。棕褐色颗粒为阳性信号,采用Image-Pro Plus 6.0进行图片数据采集,对阳性染色区域进行积分吸光度IA定量,计算IA平均值。

**2.5 统计学分析** 采用mELISA 1.0.0.6软件进行ELISA试剂盒标准曲线绘制及数据处理;采用GraphPad Prism 6.0进行统计学分析,实验数据均以

$\bar{x}\pm s$ 表示;采用单因素方差分析或非配对t检验进行组间比较, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对一般情况及体质量的影响** 实验期间空白组大鼠无明显异常表现,体态丰满,体毛紧密有光泽,反应灵敏,精神状态良好,尿量与排便正常,体质量逐步增加;模型组大鼠出现明显的皮肉松弛、畏寒、弓背蜷缩等现象,体毛发枯变疏且无光泽,有的毛发泛黄,食量降低,出现多尿、溏便等情况,甚至阴囊收缩,精神萎靡,反应迟钝,活动明显减少,体质量从第6天开始较空白组显著减低( $P<0.01$ )。各药物组较模型组大鼠上述变化均有不同程度的改善,身形虽也略显消瘦,出现少许蜷缩现象,但多尿及溏便情况好转,反应比较活泼,体毛较有光泽,尤以附桂地黄丸组、100:6和100:12炮制品组的体态改善情况较明显,体质量变化基本介于空白组和模型组之间,但仅少数变化具有统计学意义。实验数据见表1。

表1 巴戟天生品及其炮制品对肾虚大鼠体质量的影响( $\bar{x}\pm s, n=7$ )

Table 1 Effect of raw and processed products of Morindae Officinalis Radix on body weight of kidney Yang deficiency rats ( $\bar{x}\pm s, n=7$ ) g

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	第0天	第3天	第6天	第9天	第12天	第15天	第18天	第22天
空白组		232.5±5.1	249.4±8.8	274.5±7.8	275.0±6.8	286.3±3.8	292.3±10.6	302.7±11.1	320.2±10.0
模型组		228.0±6.1	241.8±9.8	248.8±8.3 <sup>2)</sup>	246.9±8.9 <sup>2)</sup>	254.5±9.5 <sup>2)</sup>	254.8±15.9 <sup>2)</sup>	270.7±11.2 <sup>2)</sup>	275.1±10.7 <sup>2)</sup>
桂附地黄丸组	0.9	228.3±9.8	243.9±9.2	246.6±12.0	243.3±11.2	256.8±8.6	267.7±13.2	281.0±11.1	292.7±5.0
生品组	1.2	228.9±3.6	244.3±9.9	258.4±10.4	256.0±10.5	266.1±7.3	278.6±8.3 <sup>4)</sup>	287.4±10.1 <sup>3)</sup>	300.2±11.8 <sup>4)</sup>
无甘草炮制品组	1.2	228.4±4.4	244.7±11.8	255.6±14.9	252.3±15.7	260.9±21.0	269.3±22.7	277.7±19.9	290.3±19.0
100:3炮制品组	1.2	228.0±7.4	242.9±10.5	254.5±7.1	245.6±14.6	260.3±8.8	271.3±15.5 <sup>3)</sup>	279.6±18.9	285.7±25.0
100:6炮制品组	1.2	226.9±8.2	243.7±7.67	256.3±14.9	246.7±16.2	261.5±13.7	264.8±18.3	275.5±18.0	299.0±19.9 <sup>3)</sup>
100:12炮制品组	1.2	226.4±7.6	243.6±14.6	248.0±11.7	243.0±13.7	254.5±11.5	264.3±15.4	273.7±14.1	283.7±14.3
100:24炮制品组	1.2	226.7±7.6	242.0±11.5	254.4±8.2	248.7±9.6	255.4±11.8	263.6±12.1	267.6±20.0 <sup>5)</sup>	282.3±26.6

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ ;与生品组比较<sup>5)</sup> $P<0.05$ ,<sup>6)</sup> $P<0.01$ ;与无甘草炮制品组比较<sup>7)</sup> $P<0.05$ ,<sup>8)</sup> $P<0.01$ ;与100:6炮制品组比较<sup>9)</sup> $P<0.05$ ,<sup>10)</sup> $P<0.01$ (表2-表6同)

**3.2 对大鼠脏器系数的影响** 与空白组比较,模型组肾脏系数和睾丸系数显著增加( $P<0.01$ ),附睾系数虽也增加,但差异无统计学意义。与模型组比较,除100:3、100:24炮制品组外,其余给药组的肾脏系数均明显减小( $P<0.05, P<0.01$ );各给药组的睾丸系数减小但差异无统计学意义;除100:3炮制品组外,其余给药组的附睾系数均明显减小( $P<0.05, P<0.01$ )。给予巴戟天生品及其炮制品的组间比较均无统计学意义。见表2。

**3.3 对肾脏组织病理形态学的影响**<sup>[9]</sup> 由图1可知,空白组大鼠肾脏组织的结构清晰完整,肾小球形

态饱满、大小正常、结构完整,肾小管管腔大小正常,上皮细胞形态完整;模型组大鼠的肾组织结构被破坏,肾小球萎缩,形态不规则或呈分叶状,导致肾小囊腔变大,近曲小管肥大,远曲小管不规则,且肾小管中有大量的咖啡色结晶沉淀,肾间质空隙变大,存在大量的炎性细胞;桂附地黄丸组小鼠肾组织结构比较完整,肾小球的形态比较饱满,炎性细胞少量分布,肾小管中有少量的咖啡色晶体聚集,肾小管上皮细胞排列比较整齐,肾间质间隙略增大,整体被破坏的程度较轻;生品组、无甘草炮制品组的肾小球萎缩,有大量炎性细胞充斥,肾小管

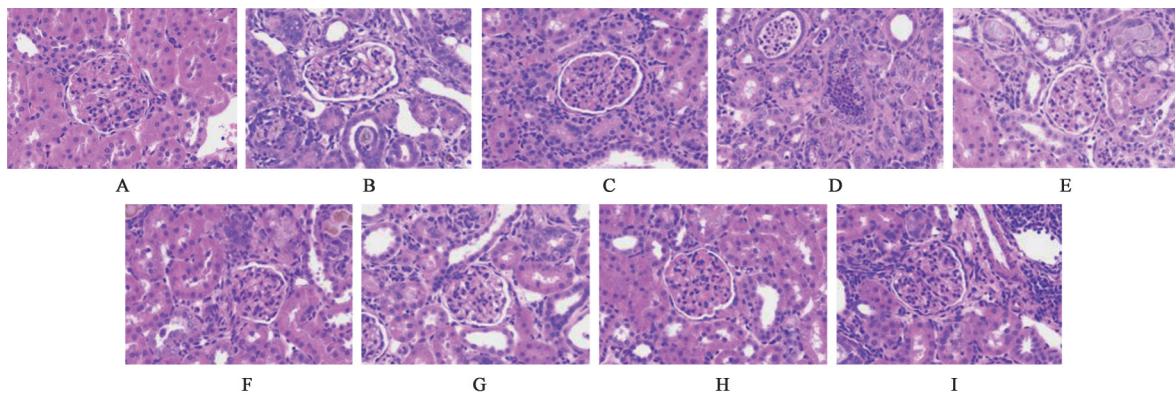
表2 巴戟天生品及其炮制品对肾虚模型大鼠脏器系数的影响( $\bar{x}\pm s, n=7$ )

Table 2 Effect of raw and processed products of Morindae Officinalis Radix on organ coefficient of kidney Yang deficiency rats ( $\bar{x}\pm s, n=7$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	肾脏系数	睾丸系数	附睾系数
空白组		0.67±0.04	0.92±0.34	0.19±0.03
模型组		2.02±0.44 <sup>2)</sup>	1.17±0.10 <sup>2)</sup>	0.21±0.02
桂附地黄丸组	0.9	1.55±0.23 <sup>4)</sup>	1.01±0.12	0.17±0.02 <sup>4)</sup>
生品组	1.2	1.58±0.21 <sup>4)</sup>	1.06±0.06	0.18±0.02 <sup>3)</sup>
无甘草炮制品组	1.2	1.58±0.16 <sup>4)</sup>	0.94±0.34	0.18±0.02 <sup>3)</sup>
100:3炮制品组	1.2	1.83±0.28	1.17±0.10	0.19±0.02
100:6炮制品组	1.2	1.56±0.20 <sup>4)</sup>	1.08±0.08	0.17±0.02 <sup>3)</sup>
100:12炮制品组	1.2	1.69±0.19 <sup>3)</sup>	1.10±0.09	0.18±0.01 <sup>3)</sup>
100:24炮制品组	1.2	1.73±0.42	1.08±0.26	0.15±0.04 <sup>4)</sup>

细胞排列紊乱,近曲小管肥大,并且有大量咖啡色晶体聚集,其破坏程度与模型组相似;100:3、100:6、100:12炮制品组肾组织形态虽有所破坏,但肾小球结构完整、饱满,炎性细胞较少或基本没有,仅少

量的咖啡色晶体沉淀,肾小管上皮细胞排列较规则;100:24炮制品组肾组织形态亦有所破坏,肾小球结构亦完整饱满,但聚集的炎性细胞较多。提示巴戟天甘草炮制品可改善肾虚大鼠肾脏病变情况。



注:A.空白组;B.模型组;C.桂附地黄丸组;D.生品组;E.无甘草炮制品组;F.100:3炮制品组;G.100:6炮制品组;H.100:12炮制品组;I.100:24炮制品组(图2-图3同)

图1 巴戟天生品及其炮制品对肾虚大鼠肾脏组织病理形态学的影响(HE,×400)

Fig. 1 Effect of raw and processed products of Morindae Officinalis Radix on pathomorphology of renal tissue of kidney Yang deficiency model rats (HE,×400)

**3.4 对睾丸组织病理形态学的影响** 由图2可知,空白组大鼠睾丸组织中生精小管发达,管圈壁厚,形态饱满,曲细精管形态正常,细胞层数多,各级生精细胞排列紧密,生精小管内充斥着大量正常的精子细胞,呈现粉色,各级生精细胞排列整齐;模型组大鼠睾丸组织中生精小管壁变薄,低倍镜下能明显看到曲细精管变细,生精小管内细胞层数明显减少,细胞排列疏散,初级精母细胞和次级精母细胞数均减少,并伴随有精母细胞死亡脱落,管腔内还有大量脱落的精子细胞;桂附地黄丸组大鼠睾丸组织中生精小管情况与空白组相似,但有精子细胞脱落的情况;生品组、无甘草炮制品组、100:3炮制品组和100:24炮制品组的生精小管壁变薄,细胞层数

少,有次级精母细胞和精子脱落;100:6、100:12炮制品组生精小管壁较厚,细胞层数较多,精母细胞数量增加;同时,100:6炮制品组亦存在精子细胞脱落情况,但整体情况较模型组明显改善。

**3.5 对附睾组织病理形态学的影响** 空白组附睾管腔内充满正常精子;模型组大鼠附睾管腔空虚,正常精子数量减少,且有大量脱落的生精细胞;桂附地黄丸组附睾管腔空虚,但正常精子数较模型组增多,生精细胞脱落情况有所好转;生品组、无甘草炮制品组的管腔空虚,有大量的精母细胞、精子细胞脱落;巴戟天各甘草炮制品组整体情况较模型组有所改善,管腔内可见密集的精子,但仍有细胞脱落现象。见图3。

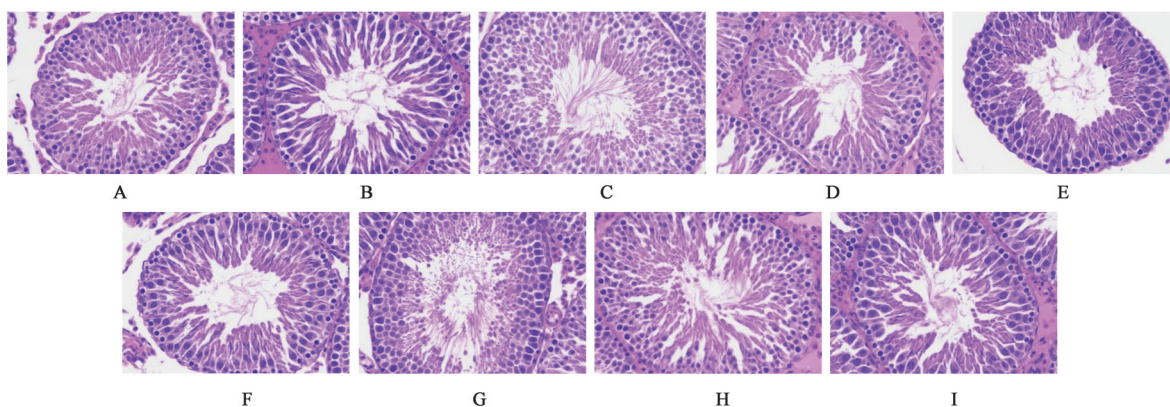


图2 巴戟天生品及其炮制品对肾阳虚大鼠睾丸组织病理形态学的影响(HE,×400)

Fig. 2 Effect of raw and processed products of Morindae Officinalis Radix on pathomorphology of testicular tissue of kidney Yang deficiency model rats (HE,×400)

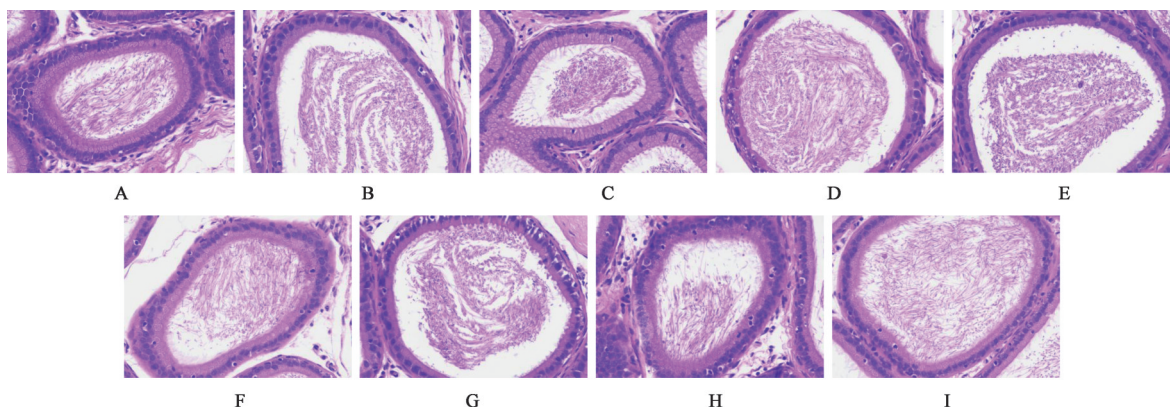


图3 巴戟天生品及其炮制品对肾阳虚大鼠附睾组织病理形态学的影响(HE,×400)

Fig. 3 Effect of raw and processed products of Morindae Officinalis Radix on pathomorphology of epididymis tissue of kidney Yang deficiency model rats (HE,×400)

3.6 对血清中BUN和SCr的影响 BUN和SCr是评价慢性肾病进展与分期的主要指标,亦是检验慢性肾衰竭治疗效果的重要指标<sup>[9]</sup>。造模后大鼠血清

中BUN和SCr均升高,药物干预后二者均降低,且以100:12炮制品组的降低作用最显著。具体的实验数据见表3。

表3 巴戟天生品及其炮制品对肾阳虚大鼠血清中BUN、SCr、FSH和LH水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=7$ )

Table 3 Effect of raw and processed products of Morindae Officinalis Radix on serum levels of BUN, SCr, FSH and LH of kidney Yang deficiency model rats ( $\bar{x}\pm s, n=7$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	BUN/mmol·L <sup>-1</sup>	SCr/ $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>	FSH/mg·L <sup>-1</sup>	LH/IU·L <sup>-1</sup>
空白组		11.20±1.15	31.52±3.48	0.36±0.03	3.21±1.52
模型组		19.85±3.19 <sup>2)</sup>	117.60±32.67 <sup>2)</sup>	1.18±0.20 <sup>2)</sup>	10.54±1.94 <sup>2)</sup>
桂附地黄丸组	0.9	14.14±1.19 <sup>4)</sup>	87.50±19.13 <sup>3)</sup>	0.91±0.15 <sup>4)</sup>	2.90±1.00 <sup>4)</sup>
生品组	1.2	15.37±0.87 <sup>4)</sup>	99.08±15.77	0.96±0.14 <sup>3)</sup>	4.42±1.19 <sup>4)</sup>
无甘草炮制品组	1.2	15.29±1.46 <sup>4)</sup>	99.10±24.68	1.05±0.20	4.18±1.17 <sup>4)</sup>
100:3炮制品组	1.2	15.50±1.38 <sup>4)</sup>	109.46±24.68	1.09±0.22	4.01±1.44 <sup>4)</sup>
100:6炮制品组	1.2	15.62±1.38 <sup>4)</sup>	93.89±14.99	1.00±0.04	3.54±1.38 <sup>4)</sup>
100:12炮制品组	1.2	14.50±1.69 <sup>4)</sup>	66.12±10.68 <sup>4,6,8,9)</sup>	0.71±0.11 <sup>4,6,8,10)</sup>	3.44±1.38 <sup>4)</sup>
100:24炮制品组	1.2	14.85±2.46 <sup>4)</sup>	79.03±13.34 <sup>4)</sup>	0.93±0.22 <sup>3)</sup>	6.19±1.15 <sup>4,5,7,10)</sup>

3.7 对血清中FSH和LH的影响 FSH和LH是评价HPG轴功能的主要指标<sup>[6]</sup>。由表3可知,造模后

大鼠血清中FSH、LH水平均升高,药物干预后二者均降低,尤其100:12、100:24炮制品组FSH水平及

100:6、100:12炮制品组 LH 水平降低较为明显;在各巴戟天给药组中,100:12炮制品组降低 FSH 和 LH 的作用最显著。

**3.8 对血清中 E<sub>2</sub> 和 T 的影响** E<sub>2</sub> 与 T 及比值是肾阳虚证评价的客观指标<sup>[5]</sup>。由表 4 可知,造模后大鼠血浆中 E<sub>2</sub> 水平升高、T 水平降低, E<sub>2</sub>/T 比值升高;药物干预后 E<sub>2</sub> 水平平均降低、T 水平平均升高,尤其是 E<sub>2</sub>/T 比值显著降低 ( $P < 0.01$ );在各巴戟天给药组中,以 100:12 炮制品组降低 E<sub>2</sub>/T 比值的作用最显著。

**3.9 对肾脏组织 E-cadherin 和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达的影响** E-cadherin 蛋白是肾小管上皮细胞的标志物,  $\alpha$ -SMA 蛋白是肾小管间充质标志物, 被作为预测肾脏纤维化进展的靶标<sup>[10]</sup>。由表 5 可知,造模后大鼠肾组织中 E-cadherin 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.01$ ), 而  $\alpha$ -SMA 蛋白表达显著增加 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 桂附地黄丸和巴戟天甘草炮制品均可显著增加 E-cadherin 蛋白表达、显著减少  $\alpha$ -SMA 蛋白表达 ( $P < 0.01$ ), 巴戟天生品和无甘草炮制品仅可显著减少  $\alpha$ -SMA 蛋白表达 ( $P < 0.01$ )。在所有巴戟天

表 4 巴戟天生品及其炮制品对肾阳虚大鼠血清中 E<sub>2</sub> 和 T 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

Table 4 Effect of raw and processed products of Morindae Officinalis Radix on E<sub>2</sub> and T levels in serum of kidney Yang deficiency model rats ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	E <sub>2</sub> /ng·L <sup>-1</sup>	T/ $\mu$ g·L <sup>-1</sup>	E <sub>2</sub> /T
空白组		5.23±1.56	2.24±0.88	2.5±0.63
模型组		10.94±1.12 <sup>2)</sup>	0.46±0.10 <sup>2)</sup>	24.5±3.64 <sup>2)</sup>
桂附地黄丸组	0.9	8.17±2.23	2.28±0.57 <sup>4)</sup>	3.9±0.70 <sup>4)</sup>
生品组	1.2	8.56±2.73	1.19±0.48 <sup>3)</sup>	6.9±1.18 <sup>4)</sup>
无甘草炮制品组	1.2	9.44±2.89	1.44±0.53 <sup>4)</sup>	7.0±1.86 <sup>4)</sup>
100:3 炮制品组	1.2	8.66±2.32	1.43±0.42 <sup>4)</sup>	6.2±1.23 <sup>4,9)</sup>
100:6 炮制品组	1.2	9.31±2.22	1.02±0.29	8.9±2.88 <sup>4)</sup>
100:12 炮制品组	1.2	7.90±2.27 <sup>3)</sup>	1.59±0.48 <sup>4)</sup>	4.7±1.08 <sup>4,10)</sup>
100:24 炮制品组	1.2	9.03±3.30	0.74±0.34 <sup>7)</sup>	12.3±3.81 <sup>4,6,8,9)</sup>

给药组中,100:12 炮制品组增加 E-cadherin 蛋白表达的作用最佳,100:6 炮制品组减少  $\alpha$ -SMA 蛋白表达的作用最优。相关的 IHC 结果见增强出版附加材料。

表 5 巴戟天生品及其炮制品对肾阳虚大鼠肾组织 E-cadherin、 $\alpha$ -SMA、Wnt2b 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

Table 5 Effect of raw and processed products of Morindae Officinalis Radix on E-cadherin,  $\alpha$ -SMA, Wnt2b and  $\beta$ -catenin expression in renal tissue of kidney Yang deficiency model rats ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	E-cadherin	$\alpha$ -SMA	Wnt2b	$\beta$ -catenin
空白组		0.116±0.010	0.084±0.014	0.058±0.009	0.009±0.003
模型组		0.024±0.008 <sup>2)</sup>	0.212±0.021 <sup>2)</sup>	0.165±0.011 <sup>2)</sup>	0.111±0.039 <sup>2)</sup>
桂附地黄丸组	0.9	0.097±0.019 <sup>4)</sup>	0.105±0.016 <sup>4)</sup>	0.088±0.012 <sup>4)</sup>	0.038±0.009 <sup>4)</sup>
生品组	1.2	0.031±0.004	0.131±0.010 <sup>4)</sup>	0.113±0.025 <sup>4)</sup>	0.065±0.006 <sup>4)</sup>
无甘草炮制品组	1.2	0.028±0.012	0.136±0.008 <sup>4)</sup>	0.102±0.016 <sup>4)</sup>	0.073±0.006 <sup>4)</sup>
100:3 炮制品组	1.2	0.063±0.010 <sup>4,6,8,9)</sup>	0.131±0.020 <sup>4,10)</sup>	0.078±0.013 <sup>4,6,8,10)</sup>	0.056±0.008 <sup>4,7)</sup>
100:6 炮制品组	1.2	0.077±0.009 <sup>4,6,8)</sup>	0.106±0.006 <sup>4,6,8)</sup>	0.046±0.007 <sup>4,6,8)</sup>	0.043±0.004 <sup>4,5,8)</sup>
100:12 炮制品组	1.2	0.091±0.010 <sup>4,6,8,9)</sup>	0.129±0.016 <sup>4,9)</sup>	0.048±0.010 <sup>4,6,8)</sup>	0.040±0.009 <sup>4,6,8)</sup>
100:24 炮制品组	1.2	0.052±0.010 <sup>4,6,8,10)</sup>	0.153±0.018 <sup>4,5,10)</sup>	0.077±0.014 <sup>4,6,8,10)</sup>	0.053±0.009 <sup>4,7)</sup>

**3.10 对肾脏组织 Wnt2b 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达的影响** Wnt/ $\beta$ -catenin 通路是肾脏疾病发生发展的重要信号传导途径之一,在肾间质纤维化中发挥着重要的作用<sup>[11]</sup>。由表 5 可知,与空白组比较,模型组大鼠肾组织中 Wnt2b 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达显著增加 ( $P < 0.01$ ); 干预后各药物组 Wnt2b 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达均显著减少 ( $P < 0.01$ ); 在不同的巴戟天给药组中,以 100:6、100:12 炮制品组减少二者表达的作用较显著。IHC 结果见增强出版附加材料。

**3.11 对睾丸组织中 Wnt2b 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达的影响** Wnt2b 和  $\beta$ -catenin 可参与调节睾丸屏障蛋白的分布及形态,与精子的形成存在密切联系,在肾

阳虚证动物睾丸组织中异常表达<sup>[12-13]</sup>。由表 6 可知,与空白组比较,模型组大鼠睾丸组织中 Wnt2b 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.01$ ), 大部分药物干预后可增加 Wnt2b 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达,其中桂附地黄丸组和 100:6、100:12、100:24 炮制品组的增加均具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。在所有巴戟天给药组中,以 100:6、100:12 炮制品组增加  $\beta$ -catenin 和 Wnt2b 蛋白表达的作用较显著。IHC 结果见增强出版附加材料。

**3.12 对睾丸组织中 Smad1 和 Smad4 蛋白表达的影响** Smad 可直接或间接参与精子的生成与发育过程,在肾阳虚证大鼠睾丸组织中异常表达<sup>[14-15]</sup>。由

表6 巴戟天生品及其炮制品对肾阳虚大鼠睾丸中Wnt2b、 $\beta$ -catenin、Smad1和Smad4蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=7$ )

Table 6 Effect of raw and processed products of Morindae Officinalis Radix on Wnt2b,  $\beta$ -catenin, Smad1 and Smad4 protein expression in testicular tissue of kidney Yang deficiency model rats ( $\bar{x}\pm s, n=7$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Wnt2b	$\beta$ -catenin	Smad1	Smad4
空白组		0.066±0.006	0.045±0.007	0.005±0.002	0.022±0.004
模型组		0.013±0.002 <sup>2)</sup>	0.014±0.003 <sup>2)</sup>	0.024±0.003 <sup>2)</sup>	0.007±0.003 <sup>2)</sup>
桂附地黄丸组	0.9	0.031±0.009 <sup>4)</sup>	0.031±0.008 <sup>4)</sup>	0.008±0.003 <sup>4)</sup>	0.013±0.004 <sup>3)</sup>
生品组	1.2	0.021±0.006	0.013±0.003	0.018±0.006 <sup>3)</sup>	0.007±0.003
无甘草炮制品组	1.2	0.019±0.006	0.016±0.004	0.019±0.003 <sup>3)</sup>	0.012±0.004 <sup>3)</sup>
100:3炮制品组	1.2	0.028±0.006 <sup>7,10)</sup>	0.017±0.003 <sup>10)</sup>	0.018±0.003 <sup>4,10)</sup>	0.015±0.005 <sup>4,6,9)</sup>
100:6炮制品组	1.2	0.031±0.006 <sup>4,5,8)</sup>	0.034±0.005 <sup>4,6,8)</sup>	0.007±0.003 <sup>4,6,8)</sup>	0.021±0.004 <sup>4,6,8)</sup>
100:12炮制品组	1.2	0.028±0.006 <sup>4,7)</sup>	0.037±0.004 <sup>4,6,8)</sup>	0.011±0.005 <sup>4,6,8)</sup>	0.029±0.007 <sup>4,6,8,10)</sup>
100:24炮制品组	1.2	0.024±0.011 <sup>4)</sup>	0.030±0.004 <sup>4,6,8)</sup>	0.015±0.004 <sup>4,10)</sup>	0.022±0.003 <sup>4,6,8)</sup>

表6可知,与空白组比较,模型组大鼠睾丸组织中Smad1蛋白表达显著升高、Smad4蛋白表达显著降低( $P<0.01$ )。药物干预后Smad1蛋白表达降低,Smad4蛋白表达升高;与模型组比较,除生品组Smad4蛋白表达差异无统计学意义外,其余给药组Smad1和Smad4蛋白表达的变化均有统计学意义( $P<0.05, P<0.01$ );在各巴戟天给药组中,100:6炮制品组减少Smad1蛋白表达的作用最显著,100:12炮制品增加Smad4蛋白表达的作用最显著。IHC结果见增强出版附加材料。

#### 4 讨论

随着对肾阳虚证研究的深入,已经形成了相对统一的评价标准,主要包括对动物行为学特征的宏观描述和对血清中E<sub>2</sub>、T等微观指标的检测<sup>[6,16]</sup>。其中宏观描述主要包括观察实验动物的拱背、竖毛、蜷缩、挤靠等外在表现。肾阳虚大鼠主要表现出皮毛色泽暗淡、精神萎靡、阴囊皱缩、饮食减少、小便频数、大便稀溏等症状<sup>[5-6,17]</sup>。由于腺嘌呤诱导的肾阳虚模型主要是通过肾衰后的损伤累积进而对睾丸产生影响,从而表现出HPG轴受抑制,故在微观指标方面主要为血清中BUN、SCr、FSH和LH水平升高,T含量大幅降低,同时也会出现E<sub>2</sub>与T比值的失衡<sup>[4-6,17-19]</sup>。

本文研究发现,灌服150 mg·kg<sup>-1</sup>腺嘌呤21 d可使大鼠表现出明显的肾阳虚行为学特征,体质量明显减轻,血清中BUN、SCr、FSH和LH水平增加,T含量降低,E<sub>2</sub>/T比值增加,说明成功复制了腺嘌呤致肾阳虚大鼠模型,这与文献<sup>[1,20-21]</sup>的研究结果一致。经巴戟天生品及不同比例甘草炮制品干预后,大鼠行为学特征和血清中BUN、SCr、LH、T的水平均得到了改善,E<sub>2</sub>/T比值失衡亦得以调整,尤其以

100:6、100:12炮制品对体态的改善较明显,100:12炮制品降低血清中BUN、SCr、FSH和LH水平及调整E<sub>2</sub>/T比值的作用最优。同时,本文还从脏器系数和病理形态学角度观察了巴戟天生品及不同比例甘草炮制品对腺嘌呤致肾阳虚模型大鼠肾脏、睾丸和附睾的影响,发现腺嘌呤造模可致大鼠肾脏系数和睾丸系数显著增加,而附睾系数增加则不明显,肾脏、睾丸和附睾的病理形态学均发生了明显变化,给予巴戟天生品及不同比例甘草炮制品干预后,睾丸系数的改善不明显,但大部分组别大鼠的肾脏系数和附睾系数明显减小,肾脏、睾丸和附睾的病理形态学变化也较模型组明显减轻。综上分析,巴戟天生品及不同比例甘草炮制品均可改善腺嘌呤致肾阳虚模型大鼠的肾阳虚症状,不同程度地减轻腺嘌呤对大鼠肾功能的损伤和对HPG轴的抑制作用,且对腺嘌呤造模引起的大鼠睾丸和附睾组织损伤亦有一定程度的保护作用,呈现出良好的补肾助阳功效,其中以100:6、100:12炮制品的补肾助阳功效最佳。

腺嘌呤导致大鼠出现肾阳虚证的同时伴有慢性肾功能的衰竭,而肾间质纤维化是所有慢性肾脏疾病进展为慢性肾衰竭的共同通路和主要组织学改变<sup>[22-25]</sup>。肾小管上皮细胞转化在病理情况下会促进肾小管间质的纤维化。E-cadherin蛋白是与肾小球裂隙膜相互联系的黏附分子之一,其表达异常在肾小管上皮细胞转化过程中发挥着重要作用<sup>[26]</sup>。E-cadherin蛋白表达下调是肾小管上皮细胞转化的第一步,是肾间质纤维化的始动环节<sup>[27]</sup>。此时,肾小管间充质标志物 $\alpha$ -SMA蛋白表达则会增加,这不仅预示着上皮细胞发生了形态上的转化,且具有迁移、浸润和收缩功能<sup>[17,28]</sup>。本文研究发现腺嘌呤致

肾阳虚大鼠 E-cadherin 蛋白表达显著降低,  $\alpha$ -SMA 蛋白显著升高, 说明大鼠的肾功能严重受损, 向肾纤维化转化。给予巴戟天生品及不同比例甘草炮制品干预后, 巴戟天生品和无甘草炮制品未能上调 E-cadherin 蛋白的表达, 但能下调  $\alpha$ -SMA 蛋白的表达; 而甘草炮制品既能上调 E-cadherin 蛋白表达, 又能下调  $\alpha$ -SMA 的表达, 且以 100:6 炮制品对这 2 种蛋白的综合调节作用最佳, 说明该炮制品对大鼠肾功能损伤和向肾纤维化转化有较好的防治作用。

Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在机体的生长发育进程中承担着重要角色, 能调控细胞分化、组织修复、器官发育等<sup>[29-30]</sup>。肾脏发育时该信号通路为活化状态, 发育成熟后其转为低表达或沉默状态<sup>[31-32]</sup>。当肾脏受到损害时, Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路可被重新激活, 呈现出异常高表达, 成为促进肾组织纤维化的重要信号通路<sup>[33-34]</sup>。体内绝大多数  $\beta$ -catenin 蛋白在细胞膜处与 E-cadherin 蛋白形成复合体, 以维持同型细胞的黏附、防止细胞迁移<sup>[27, 35]</sup>。而当肾脏损伤出现纤维化时, E-cadherin 蛋白的表达会降低, 进而促进 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的过度激活, 诱导并加重肾间质纤维化<sup>[36-37]</sup>。本文研究结果发现, 采用腺嘌呤造模后大鼠 E-cadherin 蛋白表达显著降低, 而 Wnt2b 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达增加, 说明大鼠肾脏中 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路被异常激活, 将会促进肾纤维化的发生发展, 这与魏丹丹等<sup>[38]</sup>的研究结果一致。巴戟天生品及其炮制品均可减少模型大鼠 Wnt2b 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达, 且以 100:6、100:12 炮制品的作用较优。说明巴戟天可抑制腺嘌呤造模过程中过度激活的 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路, 防止大鼠肾功能损伤后向肾纤维化的转化, 且经甘草炮制后可增强该作用。

睾丸的  $\beta$ -catenin 信号和雄性动物的不育及精子发育息息相关, 可精细地调节精子的发生过程, 过度激活或完全缺失都可导致雄性不育和损害精子<sup>[39-40]</sup>。在支持细胞和生精细胞中  $\beta$ -catenin 蛋白表达量较高, 当睾丸内  $\beta$ -catenin 蛋白表达量降低时, 会导致支持细胞与生精细胞之间正常的黏附连接破坏, 生精细胞无法正常地分化、成熟, 精子的生成将出现异常<sup>[41-42]</sup>。当睾丸组织中转化生长因子- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )/Smad 通路被激活时, TGF- $\beta$  家族中重要的内转录分子骨形成蛋白 (BMPs) 将参与反应, 即 TGF- $\beta$  与 BMPs II 受体结合, 引起 BMPs I 磷酸化, 并将信号传递给细胞内的 Smad (Smad1、Smad5 和 Smad8) 蛋白, 使 Smad 分子从细胞膜上脱离, 在细胞

质中与 Smad4 结合后再进入细胞核内, 诱导一系列的 TGF- $\beta_1$ /Smad 通路靶基因效应<sup>[43-45]</sup>。其中 Smad1 主要在睾丸的各级生精细胞中表达, Smad4 则在睾丸间质细胞中表达, 二者与精子的生成、发育、成熟及整个睾丸的功能密切相关<sup>[46]</sup>。因此, 研究睾丸中 Wnt/ $\beta$ -catenin 和 TGF- $\beta_1$ /Smads 通路变化可明确药物对肾阳虚动物模型改善作用的部分机制。本文研究结果发现, 腺嘌呤造模可引起大鼠睾丸组织中 Wnt2b 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达减少、Smad1 蛋白表达增加、Smad4 蛋白表达减少, 且巴戟天甘草炮制品改善上述蛋白表达的作用优于生品和无甘草炮制品, 提示巴戟天经甘草炮制后具有更好的补肾助阳功效, 可为制巴戟天炮制原理的阐释提供有力支撑。

巴戟天采用甘草汁炮制始于明清时代并沿用至今<sup>[47]</sup>。制巴戟天饮片也被历版《中国药典》收录, 并自 1977 年版后将制巴戟天炮制过程中巴戟天饮片与甘草饮片的质量比确定为 100:6。巴戟天经甘草炮制后化学成分和功效均发生了较大改变, 如有利于巴戟天多糖类成分的溶出, 总蒽醌和游离蒽醌的含量均增加 (尤其是茜草素型蒽醌), 环烯醚萜苷和寡糖含量亦有所增加<sup>[48-52]</sup>, 脾肾双补作用更为突出<sup>[1]</sup>。本文研究结果进一步表明, 巴戟天的 100:6、100:12 炮制品改善腺嘌呤致肾阳虚模型大鼠肾功能损伤和 HPG 轴抑制作用优于生品、无甘草炮制品及其他比例的甘草炮制品, 有更为突出的补肾助阳功效。这可能是因为巴戟天经 100:6 和 100:12 甘草炮制后, 通过调节化学成分的溶出, 调整了巴戟天水煎液的化学组分结构特征<sup>[53]</sup>, 进而更好地调节大鼠肾脏和睾丸组织中 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路、睾丸组织中 TGF- $\beta_1$ /Smads 通路, 减轻腺嘌呤对大鼠肾脏的损伤和 HPG 轴的抑制作用, 并调节体内激素等的分泌, 从而呈现出更好的补肾助阳功效。然而, 本文未能进一步研究不同比例甘草炮制对巴戟天水煎液化学组分结构特征的影响和调节 Wnt/ $\beta$ -catenin、TGF- $\beta_1$ /Smads 通路的物质基础, 后期将从巴戟天经不同比例甘草炮制后主要活性成分的变化规律、药动学特征、谱效关系等角度进行探究, 从而更好地阐明制巴戟天的炮制原理。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 史辑, 景海漪, 黄玉秋, 等. 巴戟天及其不同炮制品对脾肾阳虚模型大鼠的改善作用比较[J]. 中国药房, 2016, 27(13): 1756-1758.

- [ 2 ] 蔡真真. 从CYP3A酶和HPLC特征性图谱研究炮制中辅料甘草对药物的影响[D]. 福州:福建中医药大学, 2016.
- [ 3 ] 程再兴, 蔡真真, 林丽虹, 等. 3味中药经不同比例甘草炮制后对氨苯砜在大鼠体内药代动力学的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(8):148-155.
- [ 4 ] 马娜, 王建红, 闵建新, 等. 肾虚大鼠垂体-靶腺轴功能动态变化的研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(9):2123-2125.
- [ 5 ] 陈颖颖, 罗静, 徐愿, 等. 肾虚动物模型造模方法评价及进展[J]. 中华中医药学刊, 2018, 31(11):2697-2700.
- [ 6 ] 唐维我, 张会永, 李芹, 等. 肾虚证动物模型造模方法及模型评价[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2021, 23(4):1317-1324.
- [ 7 ] 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.
- [ 8 ] 黄馨慧, 王晓珊, 刘舒凌, 等. 蛤蚧生品及不同炮制品对腺嘌呤致肾虚模型小鼠的改善作用比较[J]. 中国药房, 2020, 31(13):1608-1612.
- [ 9 ] 王巧花. 基于Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路研究桃核承气汤对慢性肾衰竭大鼠的作用机制[D]. 福州:福建中医药大学, 2021.
- [ 10 ] 张琳琪, 吕雁, 刘红亮, 等. 益肾化瘀方对单侧输尿管结扎大鼠肾组织中 $\alpha$ -SMA、E-cadherin表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(6):1966-1969.
- [ 11 ] 李姗姗, 孙倩, 周荣, 等. 中医药调控Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路防治肾间质纤维化研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(3):275-282.
- [ 12 ] 傅文婷, 江惠华, 钟兴明, 等. Wnt信号通路与男性不育相关性的研究进展[J]. 中国医药导报, 2019, 16(4):72-74.
- [ 13 ] KERR G E, YOUNG J C, HORVAY K, et al. Regulated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling sustains adult spermatogenesis in mice [J]. Biol Reprod, 2014, 90(1):3.
- [ 14 ] 黄昕彤. 基于TGF- $\beta$ /Smad信号通路探讨甲减阳虚证模型大鼠肾损伤的发病机制及右归丸干预作用[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2020.
- [ 15 ] 樊金卿. 补肾生精方对腺嘌呤诱导的肾虚型少弱精大鼠模型作用机制的实验研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2017.
- [ 16 ] 操红缨, 吴清和, 黄萍, 等. 缩泉丸对肾阳虚多尿大鼠肾脏病理的影响[J]. 中国现代药物应用, 2009, (14):59-60.
- [ 17 ] 李威, 王顺谱, 杨风云, 等. 肾虚证动物模型建立方法及评定标准研究进展[J]. 江西中医药, 2021, 52(8):74-76.
- [ 18 ] 鞠成国, 李媛媛, 王巍, 等. 仙茅不同炮制品对腺嘌呤致肾阳虚大鼠的作用机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(16):101-107.
- [ 19 ] ZENG Y J, LI T N, ZHANG X R, et al. Effects of Haima Duobian pill in a rat model of kidney Yang deficiency syndrome [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021:6696234.
- [ 20 ] 张希, 廖宇娇, 杨卓, 等. 覆盆子盐制前后对肾阳虚多尿大鼠肾脏改善作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(2):140-142, 276.
- [ 21 ] 方萍, 苏洁, 陈炜, 等. 无比山药丸对腺嘌呤致肾阳虚模型大鼠肾脏病变的影响[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(3):11-15.
- [ 22 ] RHYU D Y, YANG Y Q, HA H, et al. Role of reactive oxygen species in TGF- $\beta$ 1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells [J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(3):667-675.
- [ 23 ] WANG Y P, ZHOU C J, LIU Y H. Wnt signaling in kidney development and disease [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2018, 153:181-207.
- [ 24 ] HUMPHREYS B D. Mechanisms of renal fibrosis [J]. Annu Rev Physiol, 2018, 80:309-326.
- [ 25 ] 张洋, 黄学宽, 沈清, 等. 复肾功方对慢性肾衰竭大鼠Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(24):89-95.
- [ 26 ] 孙蔚楠, 朱清, 阎磊, 等. 利格列汀对体外高糖诱导后人肾小管上皮细胞E-cadherin、 $\alpha$ -SMA表达的影响及机制[J]. 山东医药, 2016, 56(21):33-35.
- [ 27 ] 王玉浔, 安雅臣, 蒋艳茹, 等. 肾康注射液对腹膜纤维化小鼠E-cadherin和 $\alpha$ -SMA动态表达的影响[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(2):195-202.
- [ 28 ] 张巍, 赵晨光, 温文斌, 等. 内脂素对糖尿病肾病大鼠肾组织TGF- $\beta$ 、 $\alpha$ -SMA与E-钙黏素蛋白表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2020, 21(6):519-521.
- [ 29 ] LIU B, QIAO J, HU J X, et al. Leptin promotes endothelial dysfunction in chronic kidney disease by modulating the MTA1-mediated Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [J]. Mol Cell Biochem, 2020, 473(1/2):155-166.
- [ 30 ] HOI S, TSUCHIYA H, ITABA N, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signal inhibitor IC-2-derived small-molecule compounds suppress TGF- $\beta$ -induced fibrogenic response of renal epithelial cells by inhibiting SMAD2/3 signalling [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2020, 47(6):940-946.

- [31] 宋卫国,彭璘,武雯雯,等. 基于 Wnt/ $\beta$ -catenin 调控 EMT 探讨益肾化癆方对糖尿病肾病大鼠肾小球足细胞损伤的干预机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(10):44-50.
- [32] IMAMURA M, MOON J S, CHUNG K P, et al. RIPK3 promotes kidney fibrosis via AKT-dependent ATP citrate lyase[J]. JCI Insight, 2018, 3(3):e94979.
- [33] 刘武,丁宁,姜赫,等. miRNA-139 调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路探讨建中补肾消癆汤抗肾间质纤维化机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(4):47-55.
- [34] YIU W H, LI Y, LOK S W Y, et al. Protective role of kallistatin in renal fibrosis via modulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling [J]. Clin Sci, 2021, 135 (3) : 429-446.
- [35] ZHANG Q, XIAO X H, ZHENG J, et al. Qishen Yiqi dripping pill protects against diabetic nephropathy by inhibiting the Wnt/ $\beta$ -catenin and transforming growth factor- $\beta$ /Smad signaling pathways in rats [J]. Front Physiol, 2021, 11:613324.
- [36] 付旭,李均,阳小敏,等. 黄芪丹参颗粒药对干预肾纤维化 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的实验研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(1):104-108.
- [37] HE W C, KANG Y S, DAI C S, et al. Blockade of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling by paricalcitol ameliorates proteinuria and kidney injury [J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(1):90-103.
- [38] 魏丹丹,李闪闪,王永杰,等. 下瘀血汤通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 和 TGF- $\beta_1$ /Smad 信号串联干预肾纤维化大鼠的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(10):8-14.
- [39] PULKINEN K, MURUGAN S, VAINIO S. Wnt signaling in kidney development and disease [J]. Organogenesis, 2008, 4(2):55-59.
- [40] 李耀洋,尚立芝,孙河龙,等. 左归丸对去势骨质疏松模型大鼠 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(6):15-22.
- [41] 张巍,康懿鹏,陈清瑞,等. 巴戟天对微波损伤的雄鼠辜丸生精功能的影响[J]. 解剖学研究, 2010, 32(5):338-340,357.
- [42] 肖凤霞,林励. 巴戟天补肾壮阳作用的初步研究[J]. 食品与药品, 2006, 8(5):45-46.
- [43] 丁平,梁英娇,刘瑾,等. 巴戟天寡糖对小鼠精子生成作用的研究[J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(19):1467-1470.
- [44] CHEN D L, LI N, LIN L, et al. Confocal mirco-Raman spectroscopic analysis of the antioxidant protection mechanism of the oligosaccharides extracted from *Morinda officinalis* on human sperm DNA [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 153(1):119-124.
- [45] 张亚萍,游琛,韦玉娜,等. 基于 TGF- $\beta_1$ /Smads 信号通路探讨当归芍药散对卵巢储备功能低下模型大鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(21):47-54.
- [46] 王寅,张巧艳. 巴戟天雌激素样作用的实验研究[J]. 时珍国医医药, 2011, 22(3):527-528.
- [47] 况艳,周灿,廖莎,等. 巴戟天炮制方法初探[J]. 西部中医药, 2014, 27(7):138-140.
- [48] 史辑,崔妮,景海漪,等. 炮制对巴戟天中茜草素型蒽醌类成分的影响[J]. 中成药, 2015, 37(6):1289-1292.
- [49] 景海漪,史辑,崔妮,等. 不同炮制方法对巴戟天中寡糖类成分和水晶兰苷含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(17):20-23.
- [50] 景海漪,崔妮,史辑,等. 巴戟天及其不同炮制品蒽醌含量比较研究[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(1):21-24.
- [51] 周灿,杨梓懿,许李,等. 不同炮制去心法对巴戟天多糖含量的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2011, 31(1):49-51.
- [52] HAO Q X, ZHOU J, ZHOU L, et al. Prediction the contents of fructose, glucose, sucrose, fructo-oligosaccharides and iridoid glycosides in *Morinda Officinalis Radix* using near-infrared spectroscopy[J]. Spectrochim Acta A, 2020, 234:118275.
- [53] 顾俊菲,封亮,张明华,等. 中药组分结构特征对多成分/组分药代动力学影响的新探索[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(14):2782-2786.

[责任编辑 刘德文]