

右归丸补肾填精的药理作用

陈杰¹, 李晶¹, 封玉玲^{1*}, 苗加伟¹, 赖国旗²

(1. 重庆三峡医药高等专科学校 基础医学部, 重庆 万州 404120;

2. 重庆医科大学 动物实验中心, 重庆 渝中 400016)

[摘要] **目的:**以下丘脑-垂体-性腺轴为基础,探究右归丸对肾阳虚大鼠的药理作用,探讨其补肾填精的作用机制。**方法:**SD大鼠60只,采用氢化可的松建立肾阳虚模型大鼠,随机分为6组,分别为正常组、模型组、甲基睾酮($0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组、右归丸低、中、高剂量组($0.5, 1.0, 2.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),每组10只。造模后连续ig给药30 d,分别于给药第15,30天进行强迫负重游泳实验;第30天,眼球取血,放射免疫分析法检测大鼠血清睾酮(testosterone, T)、雌二醇(estradiol, E_2)的含量;采用RT-PCR法检测各组大鼠下丘脑、垂体和靶腺(睾丸)钙调蛋白(CaM) mRNA的表达。**结果:**与正常组比,模型组大鼠的负重游泳时间减少($P < 0.05$),明显升高血清中 E_2 的激素水平及降低T的激素水平($P < 0.05$),明显升高下丘脑、垂体、睾丸中CaM mRNA的表达($P < 0.05$);与模型组比,甲基睾酮组、右归丸低、中、高剂量组可明显提高肾阳虚模型大鼠的负重游泳时长($P < 0.05$),给药20 d后其体能趋于正常;给药20 d后甲基睾酮组、右归丸低、中、高剂量组可明显降低血清中 E_2 的激素水平及升高T的激素水平($P < 0.05$),明显降低下丘脑、垂体、睾丸中CaM mRNA的表达($P < 0.05$)。**结论:**右归丸可通过调节机体下丘脑-垂体-性腺轴中钙调蛋白基因表达,改善阳虚大鼠激素水平,逆转肾阳虚状态,具有补肾填精的作用。

[关键词] 右归丸; 下丘脑-垂体-性腺轴; 雌二醇; 睾酮; 钙调蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)03-0134-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015030134

Effect Study of Yougui Wan on Tonifying Kidney CHEN Jie¹, LI Jing¹, FENG Yu-ling^{1*}, MIAO Jia-wei¹, LAI Guo-qi² (1. Dept of Basic Medicine, Chongqing Three Gorges Medical College, Wanzhou 404120, China; 2. Dept of Animal Experimental Center, Chongqing Medical University, Yuzhong 400016, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the pharmacological effect and possible mechanism of Yougui Wan on Shen yang deficiency based on hypothalamus-pituitary-gonad axis. **Method:** The Shen yang deficiency model rats were induced by hydrocortisone. The 60 rats were randomly divided into six groups: the control group, the model group, the methyltestosterone group ($0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), low-, middle-and high-dose Yougui Wan groups ($0.5, 1.0, 2.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Changes of forced swimming time were tested at 15 and 30 days. Serum levels of testosterone (T) and estradiol (E_2) were analyzed by immunobiochemistry, and calmodulin (CaM) mRNA in hypothalamus-pituitary-gonad axis of rats in all groups were determined via quantitative RT-PCR technique after 30 days. **Result:** The forced swimming time decreased, blood concentration of E_2 increased, blood concentration of T decreased, and CaM mRNA levels in rat hypothalamus, pituitary and testicle increased in the model group as compared with the normal group ($P < 0.05$). All above indexes had good improvement in methyltestosterone group and all doses Yougui Wan groups as compared with the model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Yougui Wan have therapeutical effect on down-regulating the CaM mRNA levels of testical and hypothalamus, regulating the levels of E_2 and T, and improving the symptoms of Shen yang deficiency.

[Key words] Yougui Wan; hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis; estradiol; testosterone; calmodulin

[收稿日期] 20140720(004)

[基金项目] 重庆市基础与前沿研究计划项目(cstc2014jcyjA10049);重庆市卫生局医学科研项目(20121096);重庆市高等教育教学改革研究项目(132128,133309)

[第一作者] 陈杰,副教授,从事护理及病理方面研究,Tel:023-58556819,E-mail:601857979@qq.com

[通讯作者] *封玉玲,副教授,从事药理及病理方面研究,Tel:023-58556830,E-mail:mybestdorthy@hotmail.com

中医认为,肾为先天之本,五脏之阳气^[1]。对于肾阳虚的大量研究表明,运用氢化可的松建立肾阳虚模型是较为经典的造模方法,符合中医的肾阳虚证^[2]。肾阳虚的动物会出现一些未老先衰的症状如体重下降、耐力低下、性能力减弱等一系列症状^[3]。右归丸由熟地黄、炒山药、山茱萸、枸杞子、菟丝子、鹿角胶、杜仲、肉桂、当归、制附子组成^[4],是治肾阳不足、命门火衰的经典名方,具有温补肾阳,填精益髓的功用,用于畏寒肢冷,腰膝软弱,阳痿遗精或阳衰无子,或饮食减少,大便不实,或小便自遗^[5]。研究表明右归丸具有保护中枢神经系统,调节机体内分泌的功能^[6],但目前国内外对其用于治疗肾阳虚的药理作用及机制方面研究尚不多见。本研究以动物整体为对象,依托下丘脑-垂体-性腺轴对机体的调控作用进行研究,探讨右归丸补肾填精的作用机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级雄性 SD 大鼠,体重(200 ± 20) g,60 只,购自重庆医科大学实验动物中心,动物合格证号 SCXK(渝)2010-0001。

1.2 药物及试剂 右归丸(北京同仁堂有限公司,批号 Z11021040),甲基睾丸素片(天津力生制药股份有限公司,批号 H12020153),氢化可的松注射液(吉林长白山药业集团股份有限公司,批号 H22021476),大鼠睾酮(T)放射免疫试剂盒及大鼠雌二醇(E₂)放射免疫试剂盒(上海生工生物股份有限公司,分别批号为 ESK2113,KB3115),Trizol RNA 提取试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号 15596-026)。

1.3 仪器 10001-Series Thermal Cyclers 型 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),Access2 型化学发光免疫分析仪(美国 Beckman 公司),SN-69 型全自动双探头放射免疫 γ 计数仪(上海原子核研究所日环仪器一厂)。

2 方法

2.1 动物模型的建立及给药 60 只大鼠随机分为正常组、模型组、阳性药物(甲基睾丸酮)组、右归丸低、中、高剂量组,每组 10 只。除正常组注射生理盐水外,其他各组大鼠每日中午右腿按 25 mg·kg⁻¹ ih 氢化可的松,连续 4 d,建立肾阳虚大鼠模型,随后 30 d 内给予氢化可的松,同时给予对应的治疗药物,右归丸低剂量(0.5 g·kg⁻¹)、中剂量(1.0 g·kg⁻¹)、高剂量(2.5 g·kg⁻¹),阳性药物组(甲基睾丸酮片,0.5 g·kg⁻¹)。将各组药物以 0.5% 的 CMC 水溶液配置为 10 mL·kg⁻¹ 的给药剂量,ig 给药,2 次/d,

连续治疗 30 d。

2.2 负重游泳实验 所有大鼠于实验前进行一次游泳训练,其后在接受药物治疗的第 15,30 天进行负重游泳实验,尾部上 1/3 处负其体重 10% 的铅线记录大鼠游泳力竭时间。力竭标准为大鼠全部身体沉入水下 5 s 不能浮出水面。

2.3 血清激素水平的检测 第 30 天晚 ig 给药后,禁食 12 h。眼球取血,约 3.5 mL,断头处死后迅速取下丘脑、垂体、性腺(睾丸)称重,置液氮中固定,后转入 -80 °C 低温冰箱保存,用于基因检测。血清采用 SN-69 全自动双探头放射免疫 γ 计数仪,按试剂盒操作说明检测大鼠血清 E₂,T 水平。

2.4 下丘脑-垂体-性腺轴钙调蛋白的基因表达检测 引物设计,从 GeneBank 中查出大鼠钙调蛋白(CaM)基因和 β-actin 的 mRNA 序列,利用美国 PE 公司引物设计软件 Primer Express 设计转移性引物,大鼠 CaM 上游引物 5'-GATAAGGACGGCAA TGGCTACA-3',下游引物 5'-CGATGTCTGCTTCCT GATCAT-3',扩增片段为 115 bp;β-actin(内参)上游引物 5'-CCTGTGGCATCCATGAAACTAC-3',下游引物 5'-CTTCTGCATCCTGTCAGCGAT-3',扩增片段为 134 bp。取冻存组织(下丘脑、垂体、睾丸)约 10 mg,组织匀浆后按 Trizol 试剂盒说明书操作,提取总 RNA。逆转录:cDNA 的合成,在 50 μL 取 2 μL RNA,加入逆转录反应体系(TaqMan Buffer 5 μL,1.25 U·μL⁻¹ Reverse Transcriptase 1.25 μL,0.4 U·μL⁻¹ Rnase Inhibitor 1 μL,dNTP mixture 10 μL,5.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 11 μL,2.5 μmol·L⁻¹ Oligod 2.5 μL,总 RNA 5 μL)中。震荡混匀,于 25 °C 孵育 10 min,48 °C 逆转录 30 min,95 °C 逆转录反应灭火 5 min。PCR 扩增:取逆转录产物 5 μL,加入 20 μL 扩增反应体系(SYBR PCR Buffer 2.5 μL,MgCl₂ 3 μL,dNTP mixture 2 μL,AmpliTaq Gold 0.125 μL,各上下游引物 0.5 μL)中,95 °C,变性 5 min,50 °C 退火 2 min,72 °C 延伸 5 min,进行 36 个循环。PCR 产物分析,根据各组 PCR 产物的 Ct 值,计算每一样品和其内参对照相应含量。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对肾阳虚大鼠强迫游泳时间的影响 与正常组比较,模型组强迫游泳时间明显缩短($P < 0.05$);各给药组大鼠第 15 天及第 30 天强迫游泳时间均长

于模型组,模型组与甲基睾酮组及右归丸低、中、高剂量组间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 右归丸对肾阳虚大鼠强迫游泳时间的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	第 15 天/s	第 30 天/s
正常	-	382 ± 13	397 ± 18
模型	-	168 ± 17 ¹⁾	143 ± 21 ¹⁾
甲基睾酮	0.5	301 ± 17 ²⁾	257 ± 9 ²⁾
右归丸	0.5	212 ± 21 ²⁾	264 ± 12 ²⁾
	1.0	267 ± 15 ²⁾	293 ± 10 ²⁾
	2.5	315 ± 14 ²⁾	342 ± 16 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 ~ 5 同)。

3.2 对肾阳虚大鼠血清激素水平的影响 模型组大鼠血清中 E_2 激素水平明显高于正常组($P < 0.05$);甲基睾酮组和右归丸低、中、高剂量组血清中 E_2 激素水平均明显低于模型组($P < 0.05$)。同时,模型组大鼠血清 T 水平明显低于正常组($P < 0.05$);甲基睾酮组和右归丸低、中、高剂量组血清中 T 水平均明显高于模型组($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 右归丸对肾阳虚大鼠血清激素水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	$E_2/ng \cdot L^{-1}$	T/ $ng \cdot L^{-1}$
正常	-	0.66 ± 0.20	236.68 ± 28.23
模型	-	1.53 ± 0.19 ¹⁾	99.53 ± 31.15 ¹⁾
甲基睾酮	0.5	1.27 ± 0.13 ²⁾	264.89 ± 23.74 ²⁾
右归丸	0.5	1.04 ± 0.16 ²⁾	156.34 ± 19.33 ²⁾
	1.0	0.87 ± 0.16 ²⁾	198.78 ± 21.52 ²⁾
	2.5	0.72 ± 0.11 ²⁾	225.53 ± 29.65 ²⁾

3.3 对下丘脑-垂体-性腺轴 CaM mRNA 的表达的影响

3.3.1 对下丘脑 CaM mRNA 表达的影响 模型组下丘脑 CaM mRNA 表达量明显高于正常组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。甲基睾酮组和右归丸低、中、高剂量组 CaM mRNA 表达量均明显高于模型组 CaM mRNA 的表达,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3,图 1A。

3.3.2 对垂体 CaM mRNA 表达的影响 模型组 CaM mRNA 的表达明显低于正常组($P < 0.05$);甲基睾酮组 CaM mRNA 的表达明显高于模型组($P < 0.05$);右归丸中、高剂量组 CaM mRNA 表达同样均

高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$),但右归丸低剂量组 CaM mRNA 与模型组无明显差异。见表 4,图 1B。

表 3 右归丸对肾阳虚大鼠下丘脑 CaM mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	CaM	β -actin	CaM/ β -actin
正常	-	21.17 ± 0.28	19.43 ± 0.45	1.20 ± 0.06
模型	-	12.44 ± 0.34 ¹⁾	17.09 ± 0.31 ¹⁾	0.84 ± 0.04 ¹⁾
甲基睾酮	0.5	16.32 ± 0.37 ²⁾	18.15 ± 0.29 ²⁾	0.94 ± 0.04 ²⁾
右归丸	0.5	17.72 ± 0.26 ²⁾	18.63 ± 0.23 ²⁾	0.97 ± 0.03 ²⁾
	1.0	21.09 ± 0.38 ²⁾	19.35 ± 0.32 ²⁾	1.08 ± 0.05 ²⁾
	2.5	23.43 ± 0.26 ²⁾	19.87 ± 0.44 ²⁾	1.24 ± 0.05 ²⁾

表 4 右归丸对肾阳虚大鼠垂体 CaM mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	CaM	β -actin	CaM/ β -actin
正常	-	20.36 ± 0.17	17.78 ± 0.41	1.215 ± 0.038
模型	-	12.78 ± 0.33 ¹⁾	17.55 ± 0.25	0.787 ± 0.037
甲基睾酮	0.5	17.87 ± 0.30 ²⁾	18.76 ± 0.26	0.903 ± 0.051
右归丸	0.5	15.41 ± 0.28	18.93 ± 0.34	0.814 ± 0.036
	1.0	18.87 ± 0.36 ²⁾	17.84 ± 0.29	1.106 ± 0.043
	2.5	19.24 ± 0.43 ²⁾	18.62 ± 0.38	1.132 ± 0.029

3.3.3 对睾丸 CaM mRNA 表达的影响 模型组 CaM mRNA 的表达明显低于正常组($P < 0.05$);甲基睾酮组和右归丸中、高剂量组 CaM mRNA 的表达明显高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。右归丸低剂量组与模型组 CaM mRNA 的表达无明显差异。见表 5,图 1C。

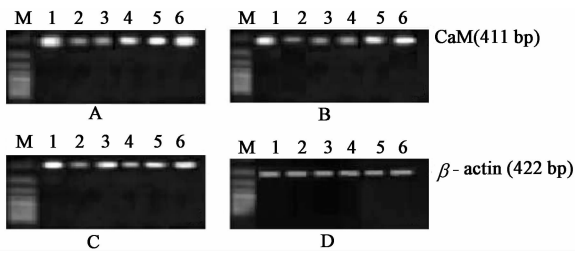
4 讨论

右归丸临床上广泛用于男性功能障碍及女性肾衰晚期闭经、不孕等治疗。对其拆方分析表明附子、肉桂、鹿角胶填补肾中之元阳,温里驱寒;当归养血和血^[7];熟地黄、山茱萸、枸杞子、山药滋阴益肾,养肝补脾,填精益髓;菟丝子、杜仲补肝肾,健腰膝^[8]。该方以诸药合用,肝脾肾阴阳兼顾,但以温肾阳为主,妙在阴中求阳,使元阳得以归元。

现代研究表明,肾虚涉及神经、内分泌、免疫

表 5 右归丸对肾虚大鼠睾丸 CaM mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 5 Effects of Yougui Wan on CaM mRNA in testicle of rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	CaM	β -actin	CaM/ β -actin
正常	-	21.53 ± 0.46	19.01 ± 0.27	1.202 ± 0.036
模型	-	14.38 ± 0.29 ¹⁾	18.45 ± 0.25	0.819 ± 0.042 ¹⁾
甲基睾酮	0.5	20.42 ± 0.32 ²⁾	18.76 ± 0.42	1.138 ± 0.047 ²⁾
右归丸	0.5	16.66 ± 0.45	18.92 ± 0.36	0.941 ± 0.040
	1.0	18.78 ± 0.31 ²⁾	18.40 ± 0.34	1.076 ± 0.024 ²⁾
	2.5	20.35 ± 0.44 ²⁾	18.23 ± 0.26	1.163 ± 0.034 ²⁾



A. 下丘脑 CaM mRNA 的表达; B. 垂体 CaM mRNA 的表达; C. 睾丸 CaM mRNA 的表达; D. β -actin mRNA 的表达

图 1 右归丸对肾虚大鼠下丘脑-垂体-性腺轴 CaMmRNA 的影响
Fig. 1 Effects of Yougui Wan on hypothalamic-pituitary-gonadal axis CaM mRNA of rats

系统等诸系统组织器官多功能的变化,是多器官与多系统相互作用影响的综合表现^[9]。其中下丘脑-垂体-性腺轴功能的异常改变直接影响着机体神经、内分泌的调节。因此逆转其功能紊乱的状态,可以从根本上调节血清中激素如 E₂, T 等的表达,从而引起肾上腺皮质、垂体、甲状腺、性腺等器官的组织形态,使其功能相互协调^[10]。研究表明 CaM 是一种多功能调节蛋白,主要分布与脑及内分泌器官,并对下丘脑-垂体-性腺轴的分泌功能密切相关。CaM 可以作用于下丘脑-垂体-性腺轴的不同环节、不同层次,直接导致不同激素的改变,因而 CaM mRNA 在各个器官、组织中的协调表达对机体神经内分泌作用具有明显的调控作用^[11]。

综上所述,本研究显示右归丸可显著改善肾虚大鼠的体能状态,且随着给药剂量及给药时间的延长,治疗作用更加凸显。右归丸对肾虚大鼠血清中 E₂ 及 T 的激素水平分析,协调机体血清激素水平,通过逆转抑制性激素 E₂ 的水平,及改善调节性激素 T 的水平,综合改善肾虚状态;且体内状

态与肾虚大鼠血清 E₂ 及 T 的激素水平的表达呈明显的相关性。下丘脑及睾丸 CaM mRNA 的表达,从总体上控制体内激素的协调表达,但对垂体 CaM mRNA 的表达仅在高剂量组有所表现,这也提示其作用较慢,可能有更为复杂的调节过程。以上结果表明,右归丸可通过调节肾虚大鼠的下丘脑垂体性腺轴 CaM 的表达,调控肾虚大鼠 E₂ 及 T 激素水平的表达,改变病理状态。但关于 CaM 介导的信号转导途径及其主要化学成分与有效成分的相关性,有待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 沈自尹. 肾虚证的定位研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1997, 17(1): 50-52.
- [2] 卢文丽, 方肇勤. 阳虚证动物模型诊断指标与评析[J]. 中医药杂志, 2005, 39(4): 42-46.
- [3] Siraux V, De Backer D, Yalavatti G, et al. Relative adrenal insufficiency in patients with septic shock: comparison of low dose and conventional corticotrophin tests[J]. Crit Care Med, 2005, 33(11): 2479-2497.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 264.
- [5] 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): 71-74.
- [6] 王义周, 刘妍, 王蕾, 等. 左归丸与右归丸的药理研究进展[J]. 浙江中医药大学学报, 2010, 27(1): 116-118.
- [7] Chen Xiao-peng, Li Wei, Xiao Xue-Feng, et al. Physicochemical and pharmacological studies on Radix Angelica saneness[J]. Chin J Nat Med, 2013, 11(6): 577-581.
- [8] 赵丽颖, 夏天, 宋文嘉, 等. 右归丸的现代研究进展[J]. 吉林中医药, 2012, 32(4): 425-427.
- [9] Fukumoto K, Nakahara K, Katayama T, et al. Synergistic action of gastrin and Ghrelin on gastric acid secretion in rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 37(4): 60-63.
- [10] 蒋淑君, 崔存德, 许兰芝, 等. 肾虚大鼠下丘脑垂体性腺轴钙调蛋白的基因表达及补肾中药的调节作用[J]. 中国临床康复, 2011, 8(24): 50-52.
- [11] Zayzafoon M. Calcium calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation[J]. Cell Biochem, 2006, 7(1): 56-70.

[责任编辑 周冰冰]