

仙茅不同炮制品对腺嘌呤致肾阳虚大鼠的作用机制分析

鞠成国, 李媛媛, 王巍*, 贾天柱, 艾雪

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁省中药炮制工程技术研究中心, 辽宁大连 116600)

[摘要] 目的:研究仙茅不同炮制品水提液对腺嘌呤所致肾阳虚大鼠的补肾壮阳作用机制。方法:以桂附地黄丸为阳性组(给药剂量 $2.466\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)比较仙茅不同炮制品水提液(给药剂量 $2.742\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)灌胃4周后对腺嘌呤所致肾阳虚大鼠血清中促甲状腺激素(TSH),雌二醇(E_2),睾酮(T),17-羟皮质类固醇(17-OHCS),三碘甲状腺原氨酸(T_3),甲状腺素(T_4),皮质醇(COR)水平的影响;采用Nash比色法测定各组大鼠肝、肾微粒体细胞色素P450 3A(CYP3A)的活性。结果:仙茅各炮制品水提液对腺嘌呤所致肾阳虚大鼠的下丘脑-垂体-靶腺轴功能均有一定程度的改善作用,各炮制品总评分排序为萸仙茅(29分)>盐仙茅(25分)>酒仙茅(23分)>生仙茅(17分)>姜仙茅(11分);仙茅各炮制品组均能不同程度上调肾阳虚状态下大鼠肝、肾微粒体CYP3A活性,其中盐仙茅和萸仙茅效果较优。结论:仙茅各炮制品均能有效治疗大鼠肾阳虚证,其中萸仙茅、盐仙茅补肾壮阳效果较为显著。

[关键词] 仙茅;炮制;腺嘌呤;补肾壮阳;细胞色素P450 3A(CYP3A);肾阳虚;下丘脑-垂体-靶腺轴

[中图分类号] R22;R28;R96;R943.1;C37 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)16-0101-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201156

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200318.1653.003.html>

[网络出版日期] 2020-3-19 10:40

Analysis on Mechanism of Adenine-induced Kidney-Yang Deficiency Rats Treated with Different Processed Products of Curculiginis Rhizoma

JU Cheng-guo, LI Yuan-yuan, WANG Wei*, JIA Tian-zhu, AI Xue

(School of Pharmacy, Chinese Materia Medica Processing Engineering Center of Liaoning Province, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To study on the mechanism of invigorating kidney and strengthening Yang of different processed products of Curculiginis Rhizoma aqueous extracts in rats with kidney-Yang deficiency induced by adenine. **Method:** Taking Guifu Dihuang pills as the positive drug group (the dosage of $2.466\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), after intragastric administration for 4 weeks, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to compare the effects of different processed products of Curculiginis Rhizoma aqueous extracts (the dosage of $2.742\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) on the levels of thyroid stimulating hormone (TSH), 17-hydroxycorticosteroids (17-OHCS), estradiol (E_2), testosterone (T), triiodothyronine (T_3), thyroxine (T_4) and cortisol (COR) in serum of rats with kidney-Yang deficiency induced by adenine. The activity of cytochrome P450 3A (CYP3A) in rat liver and kidney microsomes was determined by Nash colorimetry. **Result:** All the processed products aqueous extracts could improve the function of hypothalamus-pituitary-target gland axis in rats with kidney-Yang deficiency induced by adenine, and the total score was in the order of Euodiae Fructus juice-processed products (29 points) > salt-processed products (25 points) > rice wine-processed products (23 points) > raw products (17 points) > Zingiberis Rhizoma juice-processed products (11 points). And the different processed products of Curculiginis

[收稿日期] 20191223(004)

[基金项目] 辽宁省自然科学基金项目(20180550241);2019年全国中药特色技术传承人才培养项目(T20194828003)

[第一作者] 鞠成国,博士,副教授,从事中药炮制工艺与原理研究, Tel:0411-85890146, E-mail:jcg7092357@163.com

[通信作者] *王巍,博士,副教授,从事中药质量评价及新药开发研究, Tel:0411-85890151, E-mail:ww_101737@163.com

Rhizoma could increase CYP3A activity of liver and kidney microsomes of kidney-Yang deficiency rats, especially the Euodiae Fructus juice-processed products and salt-processed products. **Conclusion:** All the processed products of Curculiginis Rhizoma can effectively treat the syndrome of kidney-Yang deficiency in rats, among them, Euodiae Fructus juice-processed products and salt-processed products have more significant effect on invigorating kidney and strengthening Yang.

[Key words] Curculiginis Rhizoma; processing; adenine; invigorating kidney and strengthening Yang; cytochrome P450 3A (CYP3A); kidney-Yang deficiency; hypothalamus-pituitary-target gland axis

仙茅是传统的补肾壮阳中药,临床多用于肾阳不足、阳痿精冷、小便频数、腰膝冷痛、筋骨痿软等虚寒症状,显示出了一定辛热药性^[1]。近年来仙茅辛热性-效的分子生物学表达机制成为了研究热点,已有研究发现仙茅干预正常及虚寒大鼠时,可能通过对肝药酶活性的诱导作用以促进机体物质、能量代谢来表达其辛热药性,进而影响其本身及联用药物疗效的发挥^[2-3]。此外,有学者发现下丘脑-垂体-靶腺轴相关指标也可能是辛热药药性表达的特异性指标^[4]。目前,对于仙茅补肾壮阳作用的研究多集中在生仙茅及其酒炙品,有关仙茅其他炮制品的药效对比研究却鲜有报道。

基于以上考虑,本实验拟比较仙茅不同炮制品对正常及肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-靶腺轴^[5-7]上促甲状腺激素,雌二醇,睾酮,17-羟皮质类固醇,三碘甲状腺原氨酸,甲状腺素,皮质醇7个相关指标的影响,并结合各组大鼠肝、肾微粒体细胞色素P450 3A (CYP3A)的活性变化情况,从仙茅辛热药性表达的角度来探讨其补肾壮阳作用机制,筛选疗效较优的炮制品种,为进一步阐述仙茅炮制原理及其临床合理用药提供参考依据。

1 材料

Multiskan-MK3型酶标仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司],FA1004B型电子天平(上海精密科学仪器有限公司),AE240型1/10万电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),FJ-200型高速分散均质机(上海标本模型厂),TGL-16C型台式离心机(上海安亭科学仪器厂),H1650-W型微量台式高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),T6型新世纪紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)。

还原型辅酶Ⅱ(NADPH)和红霉素、腺嘌呤(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为524F0128,325B039,302C053),氯化钠注射液(山东齐都药业有限公司,批号3B15101302),桂附地黄丸(北京同仁堂股份有限公司,批号13013477),黄酒(浙江古

泉酿酒有限公司);促甲状腺激素(TSH),雌二醇(E₂),睾酮(T),17-羟皮质类固醇(17-OHCS),三碘甲状腺原氨酸(T₃),甲状腺素(T₄),皮质醇(COR)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海朗顿生物技术有限公司,批号依次为20160415JI,20160331VC,20160416SB,20160331ZR,20160406BB,20160406MU,20160328YU);考马斯亮蓝法蛋白定量试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20160512),蔗糖、乙二胺四乙酸(EDTA)和三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号分别为A819A009,XY0116B5014J,A630BA0008],食盐为市售(大连盐化集团有限公司),水为双蒸水、蒸馏水或者纯水,其他试剂均为分析纯;仙茅药材购于安国市神禾中药材饮片有限责任公司,干姜饮片购于安徽源和堂药业股份有限公司(批号20130102),制吴茱萸饮片为市售,均经辽宁中医药大学中药鉴定教研室翟延君教授鉴定,分别为石蒜科植物仙茅 *Curculigo orchoides* 的干燥根茎,姜科植物姜 *Zingiber officinale* 的干燥根茎的炮制加工品,芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* 的干燥近成熟果实的炮制加工品。

SPF级雄性SD大鼠80只,体质量180~220 g,购自辽宁长生生物技术有限公司,合格证号SCXK(辽)2015-0001。本文涉及的动物实验操作取得了辽宁中医药大学附属医院动物实验伦理委员会批准,批准号2019YS(DS)-029-01。

2 方法

2.1 仙茅各炮制品的制备

2.1.1 生仙茅 取仙茅药材,除去杂质,加0.45倍量水浸泡闷润23 h,切成6 mm小段,晾干备用。

2.1.2 酒仙茅 取生仙茅,加10%黄酒拌匀、闷润,待黄酒被吸尽,文火炒干,取出放凉。

2.1.3 姜仙茅 称取干姜约40 g,加适量水煎煮0.5 h,煎汁约40 g;姜渣再加水煮0.5 h,煎汁约20 g;合并汁液加热浓缩至40 g,离心(1 500 r·min⁻¹,时间

15 min,离心半径100 mm),取上清液,得姜汁^[8],备用。取生仙茅,加10%姜汁拌匀、闷润,待姜汁被吸尽,文火炒干,取出放凉。

2.1.4 黄仙茅 取制吴茱萸约40 g,加适量水煎煮0.5 h,熬汁约40 g;吴茱萸渣再加水煮0.5 h,熬汁约20 g;合并汁液加热浓缩至40 g,得吴茱萸汁^[8]。取生仙茅,加10%吴茱萸汁拌匀、闷润,待吴茱萸汁被吸尽,文火炒干,取出放凉。

2.1.5 盐仙茅^[9] 取生仙茅,用淡盐水漂约0.5 h,沥干,蒸至上气,取出,干燥。每100 kg生仙茅用食盐1 kg。

2.2 供试药液的制备^[10] 取仙茅各炮制品适量,加10倍量水浸泡0.5 h,回流提取3次,提取时间分别为1.5, 1, 1 h。纱布滤过,合并滤液,水浴浓缩至274.2 g·L⁻¹(以生药量计)。

2.3 阳性药的制备^[10-11] 取桂附地黄丸适量,加水配制成246.6 g·L⁻¹的药液。

2.4 动物分组、造模及给药 SD大鼠于室温25 °C,相对湿度30%~50%,12 h光照/12 h黑暗循环环境下适应性饲养1周,之后随机分为8组,即空白组、模型组、生仙茅组、酒仙茅组、黄仙茅组、姜仙茅组、盐仙茅组以及阳性药组(桂附地黄丸组),每组10只。每天上午,除空白组外,其他各组大鼠按250 mg·kg⁻¹灌胃给予腺嘌呤混悬液(临用前用蒸馏水配制)^[12-14],空白组灌胃等量生理盐水。从造模第15天开始,给药组每天下午按10 mL·kg⁻¹灌胃给予相应药液,空白组及模型组灌胃给予等体积生理盐水,连续28 d。

2.5 血清下丘脑-垂体-靶腺轴相关指标检测 第43天取血(取血前禁食不禁水24 h),大鼠用10%乙醚麻醉,腹主动脉取血,5 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径90 mm,下同),取血清,置于-20 °C冰箱保存,待测。采用ELISA试剂盒检测,并严格按照试剂盒使用说明书操作。取血大鼠乙醚麻醉后迅速取出肝脏及肾脏,备用。

2.6 大鼠肝、肾微粒体CYP3A活性的测定

2.6.1 大鼠肝、肾微粒体的制备^[15] 取新鲜的大鼠肝脏、肾脏,在4 °C下进行实验操作。将肝脏、肾脏剪成小块,精密称取组织0.8 g,用1.15%氯化钾漂洗,滤纸吸干,在6倍量匀浆液(0.25 mol·L⁻¹蔗糖,10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl,1 mmol·L⁻¹ EDTA,pH 7.4)中匀浆。匀浆液先以3 000 r·min⁻¹离心20 min,弃去沉淀,上清液中缓慢加入50%聚乙二醇至上清液终体积分数8.5%,离心20 min(5 000 r·min⁻¹,下同),

弃去上清液,沉淀部分使用150 mmol·L⁻¹氯化钾缓冲液(包括150 mmol·L⁻¹ KCl,10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl,1 mmol·L⁻¹ EDTA,pH 7.4)漂洗,加入聚乙二醇至漂洗液终体积分数8.5%,离心20 min,弃去上清液,沉淀即为大鼠肝脏、肾脏的微粒体组分,二者用匀浆液2 mL悬浮后均分装两管,于-80 °C冰箱保存,一部分用于微粒体蛋白浓度的测定,一部分用于肝、肾微粒体CYP3A活性的检测。

2.6.2 大鼠肝、肾微粒体蛋白浓度的测定^[16] 采用考马斯亮蓝试剂盒对肝、肾微粒体蛋白浓度进行定量分析,并严格按照试剂盒说明书操作。蛋白含量以每克组织含微粒体蛋白计。

2.6.3 大鼠肝、肾微粒体CYP3A活性检测 采用Nash比色法。精密吸取37%甲醛溶液2.8 mL,置于1 L量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度,得1 g·L⁻¹甲醛贮备液。精密吸取该准备液10 mL,置于1 L量瓶中,用水稀释至刻度线,得10 mg·L⁻¹甲醛对照品稀释液。分别精密吸取该稀释液0,0.125,0.25,0.75,1,1.25,2 mL于5 mL具塞试管中,加入双蒸水稀释至3 mL,摇匀,加入Nash试剂1.35 mL,于60 °C水浴60 min,冰水浴冷却至室温,离心25 min,取上清液,用紫外分光光度计于412 nm处测定吸光度A,以不加甲醛的试样作为空白对照。分别以具塞试管中甲醛质量(μg)为横坐标,A为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y=0.013 1X-0.000 3(r=0.999 6)$,线性范围1.25~20 μg^[17-19]。

在4 mL反应体系中,依次加入双蒸水,已知浓度的微粒体蛋白0.5 mg,磷酸盐缓冲液(pH 7.4,终浓度450 mmol·L⁻¹),氯化镁(终浓度10 mmol·L⁻¹),红霉素(终浓度1 mmol·L⁻¹)和NADPH(终浓度为0.4 mmol·L⁻¹),加入NADPH后反应立即启动。37 °C水浴反应30 min,立即加入25%硫酸锌溶液0.2 mL终止反应,加入饱和氢氧化钡溶液0.2 mL,摇匀后静置3 min,离心20 min,取上清液3 mL,加Nash试剂1.35 mL,60 °C水浴60 min,冰水浴冷却至室温,离心25 min,取上清液,于412 nm处测定A,以不加微粒体蛋白的试样作为空白对照,依据甲醛标准曲线计算Hantzsch反应产物甲醛的生成量,进而推算酶活性^[20-21],CYP3A活性大小用μmol·min⁻¹·g⁻¹(以蛋白量计)表示^[22]。

2.7 统计学处理 实验数据应用SPSS 17.0软件进行处理。采用单因素方差分析和最小显著性差异法(LSD)检验进行统计学分析,实验数据用 $\bar{x}\pm s$

表示, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

3 结果

3.1 仙茅各炮制品对肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴功能的影响 与空白组相比,模型组大鼠血清 TSH, T_3 和 T_4 水平均显著降低 ($P < 0.01$), 表明肾阳虚状态下大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴的功能受到了明显的抑制。与模型组相比,生仙茅组大鼠血清 TSH 水平有升高趋势但无显著性差异,其余给药组均显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$);生仙茅组、盐仙茅组及桂附地黄丸组大鼠血清 T_3 水平显著升高 ($P <$

$0.05, P < 0.01$), 其余给药组有升高趋势但无显著性差异;各给药组大鼠血清 T_4 水平显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与生仙茅组比较,黄仙茅组大鼠血清 TSH 水平显著升高 ($P < 0.05$), 其余给药组有升高趋势但无显著性差异;盐仙茅组大鼠血清 T_3 水平显著升高 ($P < 0.05$), 其余给药组有降低趋势但差异不明显;各给药组大鼠血清 T_4 水平有升高趋势但无显著差异。说明仙茅各炮制品均能在不同程度上改善肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴的功能,且盐仙茅和黄仙茅组效果较显著。见表1。

表1 仙茅各炮制品对肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of different processed products of Curculiginis Rhizoma on hypothalamus-pituitary-thyroid axis function of kidney-Yang deficiency rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TSH/mIU·L ⁻¹	T ₃ /ng·L ⁻¹	T ₄ /μg·L ⁻¹
空白	-	4.25±0.98	2 688±563	50.27±12.34
模型	-	2.82±0.97 ²⁾	1 555±716 ²⁾	30.25±16.72 ²⁾
桂附地黄丸	2.466	3.81±0.92 ³⁾	2 128±411 ³⁾	46.38±12.34 ⁴⁾
生仙茅	2.742	3.17±0.71	2 170±619 ³⁾	45.74±15.13 ³⁾
酒仙茅	2.742	4.16±0.51 ⁴⁾	1 891±398	51.94±6.78 ⁴⁾
黄仙茅	2.742	4.56±0.84 ^{4,5)}	1 900±202	53.73±5.32 ⁴⁾
姜仙茅	2.742	3.78±0.58 ³⁾	1 740±470	44.75±9.44 ³⁾
盐仙茅	2.742	3.95±0.79 ⁴⁾	2 429±360 ^{4,5)}	54.44±7.66 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与生仙茅组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$ (表2,3,5同)。

3.2 仙茅各炮制品对肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴功能的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清 17-OHCS 和 COR 水平显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 表明肾阳虚状态下大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的功能受到了明显的抑制。与模型组相比,各给药组大鼠血清 17-OHCS 和 COR 水平显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与生仙茅组相比,其他仙茅炮制品组大鼠血清 17-OHCS 和 COR 水平有升高趋势但无显著性差异。说明仙茅各炮制品均能在不同程度上改善肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的功能,且黄仙茅组效果最好,其余仙茅炮制品组作用效果相近且均优于桂附地黄丸组。见表2。

3.3 仙茅各炮制品对肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-性腺轴功能的影响 与空白组相比,模型组大鼠血清 T 显著降低 ($P < 0.01$), E_2 水平显著升高 ($P < 0.01$), 表明肾阳虚状态下大鼠下丘脑-垂体-性腺轴的功能受到了明显的抑制。与模型组相比,各给药组大鼠血清 T 水平显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), 桂附地黄丸组、生仙茅组、酒仙茅组、盐仙茅组大鼠血清 E_2 水平显著降低 ($P < 0.01$)。与生仙茅组相比,黄仙茅组大

表2 仙茅各炮制品对肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of different processed products of Curculiginis Rhizoma on hypothalamus-pituitary-adrenal axis function of kidney-Yang deficiency rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	17-OHCS/nmol·L ⁻¹	COR/μg·L ⁻¹
空白	-	10.79±3.28	99.31±16.13
模型	-	7.14±2.70 ²⁾	70.59±26.47 ¹⁾
桂附地黄丸	2.466	10.37±2.05 ³⁾	97.67±30.89 ³⁾
生仙茅	2.742	10.98±3.62 ³⁾	97.47±29.38 ³⁾
酒仙茅	2.742	11.58±2.33 ⁴⁾	106.88±14.97 ⁴⁾
黄仙茅	2.742	12.06±1.85 ⁴⁾	114.25±14.26 ⁴⁾
姜仙茅	2.742	11.11±1.88 ⁴⁾	102.78±19.84 ⁴⁾
盐仙茅	2.742	11.54±2.18 ⁴⁾	108.21±31.45 ⁴⁾

鼠血清 T 水平显著升高 ($P < 0.05$), 姜仙茅组大鼠血清 E_2 水平显著升高 ($P < 0.05$); 盐仙茅组、姜仙茅组大鼠血清 T/ E_2 水平显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 其余仙茅炮制品组呈降低趋势但差异不明显。综上所述,仙茅各炮制品能在不同程度上改善肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-性腺轴的功能。见表3。

表3 仙茅各炮制品对肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-性腺轴功能的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of different processed products of Curculiginis Rhizoma on hypothalamus-pituitary-gonadal axis function of kidney-Yang deficiency rats($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	T/nmol·L ⁻¹	E ₂ /ng·L ⁻¹	T/E ₂
空白	-	35.79±5.82	161.1±28.2	0.229±0.059
模型	-	22.69±3.55 ²⁾	260.1±46.7 ²⁾	0.091±0.042 ²⁾
桂附地黄丸	2.466	29.57±1.43 ³⁾	203.1±56.8 ⁴⁾	0.141±0.022 ³⁾
生仙茅	2.742	30.50±2.84 ³⁾	187.0±47.4 ⁴⁾	0.202±0.084 ⁴⁾
酒仙茅	2.742	32.12±2.69 ⁴⁾	206.2±18.9 ⁴⁾	0.161±0.035 ⁴⁾
黄仙茅	2.742	34.80±1.80 ^{4,5)}	234.1±16.0	0.150±0.016 ³⁾
姜仙茅	2.742	28.66±5.50 ³⁾	249.3±44.4 ⁵⁾	0.121±0.033 ^{3,6)}
盐仙茅	2.742	28.48±6.34 ³⁾	199.2±25.7 ⁴⁾	0.142±0.043 ^{3,5)}

3.4 仙茅各炮制品作用机制评价指标的总评分

依据各组作用机制评价指标的单因素方差分析结果,为各炮制品的作用进行评分,评分规则为各组指标水平最接近空白组者计5分,次之者计4分,接下来依次递减1分,总评分高者为优,见表4。结果显示各炮制品总评分排序为黄仙茅(29分)>盐仙茅(25分)>酒仙茅(23分)>生仙茅(17分)>姜仙茅(11分)。

3.5 仙茅各炮制品对大鼠肝、肾微粒体CYP3A活性的影响

与空白组比较,模型组大鼠肝、肾微粒体CYP3A活性均显著降低($P<0.01$)。表明肾阳虚状态下大鼠肝、肾微粒体CYP3A活性均受到显著抑制。与模型组比较,桂附地黄丸组、黄仙茅组、盐仙茅组大鼠肝微粒体CYP3A活性显著升高($P<0.05, P<0.01$);酒仙茅组、黄仙茅组、盐仙茅组大鼠肾微粒体CYP3A活性显著升高($P<0.01$),其余给药组有升

表4 仙茅各炮制品作用机制评价指标的总评分

Table 4 Total scores of evaluation indexes for mechanism of different processed products of Curculiginis Rhizoma 分

组别	评分							总评分
	TSH	T ₃	T ₄	17-OHCS	COR	T	E ₂	
生仙茅	1	4	2	1	1	3	5	17
酒仙茅	4	2	3	4	3	4	3	23
黄仙茅	5	3	4	5	5	5	2	29
姜仙茅	2	1	1	2	2	2	1	11
盐仙茅	3	5	5	3	4	1	4	25

高趋势但无显著性差异。与生仙茅组相比,黄仙茅组、盐仙茅组大鼠肝微粒体CYP3A活性显著升高($P<0.05, P<0.01$);盐仙茅组大鼠肾微粒体CYP3A活性显著升高($P<0.01$),其余炮制品组则均无显著性差异。说明各给药组均能不同程度上调肾阳虚大鼠肝、肾微粒体的CYP3A活性。见表5。

表5 仙茅各炮制品对肾阳虚大鼠肝、肾微粒体CYP3A活性的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 5 Effect of different processed products of Curculiginis Rhizoma on CYP3A activity of liver and kidney microsomes of kidney-Yang deficiency rats($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肝微粒体蛋白/mg·g ⁻¹	肝微粒体活性/ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$	肾微粒体蛋白/mg·g ⁻¹	肾微粒体活性/ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$
空白	-	12.402±2.838	7.027±0.507	4.629±1.694	4.076±0.725
模型	-	15.529±2.007	6.014±0.389 ²⁾	2.166±0.552	2.974±0.235 ²⁾
桂附地黄丸	2.466	15.798±1.136	6.594±0.419 ³⁾	3.978±0.884	3.252±0.145
生仙茅	2.742	12.345±1.726	5.961±0.212	4.209±0.380	3.165±0.145
酒仙茅	2.742	14.732±2.265	6.120±0.283	2.943±0.828	3.705±0.575 ⁴⁾
黄仙茅	2.742	13.079±2.154	6.491±0.298 ^{3,5)}	4.018±0.578	3.878±0.369 ⁴⁾
姜仙茅	2.742	10.555±2.894	6.302±0.239	2.797±0.660	3.384±0.268
盐仙茅	2.742	13.624±3.464	6.719±0.489 ^{4,6)}	4.828±0.557	4.093±0.441 ^{4,6)}

4 讨论

4.1 模型与指标分析 腺嘌呤诱导的肾阳虚模型机制是腺嘌呤毒性代谢产物导致肾功能衰竭^[23],影

响肾组织能量代谢,进而出现系列的阳虚表现。经相关研究证明^[12-13],采用腺嘌呤复制肾阳虚模型较氢化可的松所致模型的症状主证及客观指标更为

明显,较雄性大鼠去势也更为安全简便,故本实验选用腺嘌呤诱导肾阳虚模型。

现代药理学研究发现,肾阳虚与神经内分泌免疫系统有关,下丘脑-垂体-靶腺轴的功能障碍和低下是肾阳虚证的基础^[24]。靶腺轴主要包括甲状腺轴、肾上腺轴、性腺轴,这3个轴中的一个或几个出现功能低下均可能引起肾阳虚证。本研究发现仙茅各炮制品对肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-靶腺轴指标均有改善作用,但改善程度各异,且对相关指标各有侧重。细胞色素P450酶系(CYP450)在药物代谢过程中发挥核心作用,其中CYP3A是人体肝脏及小肠含量最多的亚型,临床上经CYP3A代谢的药物约60%,CYP3A活性的改变会影响药物体内代谢水平,进而影响药物效应的表达。有研究发现辛热药可通过对药物代谢酶CYP3A的诱导作用来表达其药性,机体虚寒状态是其药性表达的生物学基础且作用机制与CYP3A水平密切相关^[25-26]。本研究发现仙茅各炮制品能不同程度上调肾阳虚状态下降低的大鼠肝、肾微粒体CYP3A活性,且盐仙茅效果最佳。

4.2 仙茅各炮制品的作用比较 本实验选用了下丘脑-垂体-靶腺轴上7个生化指标,并结合各组大鼠肝、肾微粒体CYP3A活性变化的情况,从仙茅辛热药性表达的角度来探讨其补肾壮阳作用机制。结果发现仙茅各炮制品对肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-靶腺轴功能的改善和上调大鼠肝、肾微粒体CYP3A活性可能是其补肾壮阳作用的分子生物学机制之一,且萸仙茅补肾壮阳作用最佳,盐仙茅、酒仙茅次之,但姜仙茅尚不如生仙茅补肾壮阳作用好,笔者推测可能是因为干姜为大热之品,以其为辅料炮制同为辛热药性的仙茅,可能会使仙茅辛热药性增强过猛,进而上升为对机体有损伤的燥性。

仙茅古代炮制方法有酒炒、酒拌蒸、酒浸、乌豆汁制、米泔制等,现代炮制方法以酒炙法应用为主,采用热性的黄酒来炮制仙茅可以起到“热者益热”的作用,符合“从制”这一传统炮制理论。本研究在酒炙仙茅的基础上,依据“从制”的传统炮制理论,将同为热性的吴茱萸和干姜作为仙茅炮制辅料来制备萸仙茅和姜仙茅,并参考2005年版《贵州省中药饮片炮制规范》,依据“反制”的传统炮制理论,从缓和药性、引药下行入肾的角度将盐作为辅料制备盐仙茅。萸仙茅总体评分要高于其他炮制品种,可能是因为吴茱萸主入肝经,而肝与肾关系密切,肝血不足和肾精亏损常可相互影响,而肝肾藏泄失职

亦可引起生殖系统紊乱,故临床上常用养肝补肾法治之^[27-28]，“养肝又益肾”双管齐下可能是萸仙茅补肾壮阳作用尤为突出的原因。盐仙茅总体评分较高,可能是因为盐制引药下行入肾经,增强了仙茅补肾壮阳作用,另外淡盐水对仙茅植物细胞形成了渗透压,提高了细胞液中有效成分的煎出率,也可能是增效的原因之一。

[参考文献]

- [1] 高学敏. 中药学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2002:519-520.
- [2] 薛春苗,张冰,刘小青,等. 附子、肉桂、仙茅对正常大鼠药物代谢酶CYP3A和GST活性的影响[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(12): 2823-2826.
- [3] 薛春苗,张冰,金锐,等. 仙茅对正常/虚寒大鼠孕烷X受体及其介导的药物代谢酶CYP3A和转运蛋白P-gp的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(7): 2144-2147.
- [4] 刘欣,张冰,刘小青,等. 辛热药和苦寒药对阳虚大鼠的不同药性生物学表达特征研究[J]. 中草药, 2013, 44(10): 1295-1298.
- [5] 邹海森,辛雪,孙伟,等. 肾阳虚生化指标的现代研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(30): 5989-5993.
- [6] 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.
- [7] 马娜,王建红,闵建新,等. 肾阳虚大鼠垂体-靶腺轴功能动态变化的研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(9): 2123-2125.
- [8] 贾天柱. 中药炮制学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2008:225-227.
- [9] 贵州省食品药品监督管理局. 贵州省中药饮片炮制规范[M]. 贵阳:贵州科技出版社, 2005:69
- [10] 魏伟,吴希美,李元建. 药理实验方法学[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社, 2010:71.
- [11] 吴依娜,尹西拳,孔秀娟,等. 地黄丸类方对肾阳虚大鼠免疫功能的影响[J]. 广东药学院学报, 2015, 31(5): 629-632.
- [12] 张琰,邓树泳,马娜,等. 肾阳虚动物模型的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(3): 838-841
- [13] 肖静,何立群,高建东,等. 腺嘌呤与氢化可的松大鼠肾阳虚模型造模方法比较[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(3): 77-80.
- [14] 李蕊,刘曼丽,田心,等. 不同剂量腺嘌呤诱导肾阳虚不育大鼠模型实验研究[J]. 安徽中医学院学报, 2010, 29(2): 41-44.

- [15] 王莉娥, 杨明学, 谢广云. 一种用聚乙二醇制备微粒体的方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1995, 22(5):462-464.
- [16] 薛春苗, 张冰, 金锐, 等. 仙茅体内代谢过程与药物代谢酶 CYP3A 的相关性研究[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(4):916-919.
- [17] 朱曼, 王睿, 张永青, 等. 大鼠肝微粒体细胞色素 P450 酶系检测方法学研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(5):500-503.
- [18] 沈聪文, 郑艳明, 李慧勇, 等. 食品纸包装中甲醛的检测——乙酰丙酮紫外分光光度法[J]. 河北化工, 2009, 32(2):63, 76.
- [19] 张熠, 陈炳耀, 廖柏祥, 等. 紫外分光光度法测定涂料中甲醛含量的研究[J]. 建材发展导向, 2012, 10(20):60-62.
- [20] ROBERTS B J, SHOAF S E, SONG B J. Rapid changes in cytochrome P4502E1 (CYP2E1) activity and other P450 isozymes following ethanol withdraw in rats[J]. *Biochem Pharmacol*, 1995, 49(11):1665-1673.
- [21] LIN S W, JEAN W C, PENG F C, et al. Cytochrome P-4503A1 catalyzes the formation of MA1 from territrema in liver microsomes of 7-week-old female Wistar rats [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2003, 66(5):453-467.
- [22] 孙美芳, 徐德祥, 魏伟, 等. 乙醇对小鼠肝脏微粒体红霉素 N-脱甲基酶活性的影响[J]. 疾病控制杂志, 2004, 8(2):102-105.
- [23] 王海燕. 肾脏病学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1996:967-982.
- [24] 伍庆华, 王建红, 祁风义. 肾虚与下丘脑-垂体-靶腺轴研究概述[J]. 江西中医学院学报, 2006, 18(6):73-74.
- [25] 李敏, 张冰, 刘小青, 等. 辛热药仙茅调控药物代谢酶 CYP3A 的药性表达研究[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(11):745-748.
- [26] 薛春苗, 张冰, 刘小青, 等. 附子、肉桂、仙茅对正常大鼠药物代谢酶 CYP3A 和 GST 活性的影响[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(12):2823-2826.
- [27] 王耀光. “肝肾同源”论初探[J]. 中医杂志, 2008, 49(1):5-7.
- [28] 李瀚旻. “肝肾同源”的理论体系[J]. 中医药管理杂志, 2007, 15(3):203-206.

[责任编辑 刘德文]