

鹿茸-山药药对的补虚作用实验研究

牛晓晖, 张海莲, 孙佳明, 李娜, 张辉*

(长春中医药大学, 长春中医药大学研发中心, 长春 130117)

[摘要] **目的:**观察鹿茸-山药药对醇提物(CRP)的补虚作用。**方法:**取48只雄性小鼠18~20g,随机分为4组,空白、模型、阳性对照组、给药组,每组12只,空白组和模型组每只给予生理盐水 $0.01\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$,阳性组给予男宝胶囊 $1.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,给药组灌胃CRP $0.9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,除空白组外,各组给药同时为每只小鼠皮下注射地塞米松 0.04 mg 。第14天给药1h后,在小鼠尾部负重铅块,在水深40cm,水温 $20\sim 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下测试负重游泳时间,肾脏、肾上腺、睾丸、附睾、胸腺、脾脏及前列腺脏器指数。通过DPPH自由基清除实验观察CRP的抗氧化能力。通过脾细胞增殖实验观察CRP的增强免疫作用。用ELISA法检测睾丸间质细胞上清液中睾酮含量。**结果:**CRP具有明显的抗疲劳作用,小鼠负重游泳时间为 443.6 s ,与模型组(266.8 s)比较有极显著性意义($P<0.01$);给药组附睾指数为 34.77 ,与空白组(16.11)比较有极显著性意义($P<0.05$)。CRP IC_{50} 为 $114\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,CRP浓度在 $1\ 600, 800, 400, 200, 100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,其脾细胞增殖率分别为 $74.13\%, 51.49\%, 41.90\%, 30.41\%, 21.31\%$ 。但无直接的促进睾丸间质细胞分泌睾酮的作用。**结论:**CRP有较好的补虚作用。

[关键词] 鹿茸; 山药; 肾阳虚; 抗氧化; 免疫

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0232-04

Effect of Cervi Cornu Pantotrichum and Dioscoreae Rhizoma Pair in Reinforcing Deficiency

NIU Xiao-hui, ZHANG Hai-lian, SUN Jia-ming, LI Na, ZHANG Hui*

(Changchun University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Research and Development Center of Changchun University of TCM, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** The Cervi Cornu Pantotrichum and Dioscoreae Rhizoma pair (CRP) has been

[收稿日期] 20120826(003)

[基金项目] 鹿茸种质种苗研究 国家科技部重大药物创制(2009ZX09308-002)

[第一作者] 牛晓晖,在读博士,讲师,从事中药新药研究与开发,Tel:13351540501

[通讯作者] *张辉, Tel:13578688080; Fax:0431-86172080; E-mail: zhanghui_8080@163.com

[5] 郭翠平,董秀兰,闵连秋. 缺血预处理对局灶性脑缺血再灌注大鼠乳酸脱氢酶和肌酸激酶的影响[J]. 中国脑血管病杂志,2007,4(8):374.

[6] 王键,胡建鹏,李净,等. 脑络欣通对脑缺血再灌注大鼠 Fas、Fas-L 蛋白表达、脑水肿及神经体征的影响[J]. 中华中医药杂志,2005,20(2):87.

[7] 张洪,童萼塘,梅元武,等. 大鼠脑缺血再灌注时检测血中脑细胞胞浆酶的意义[J]. 卒中与神经疾病,2000,7(1):17.

[8] Tagliari B, Zamin L L, Salbego C G, et al. Homocysteine increases neuronal damage in hippocampal slices receiving oxygen and glucose deprivation [J]. Metab Brain Dis, 2006, 21(4):273.

[9] Fernandez L D, Martinez Orgado J, Nunez E, et al. Characterization of the neuro-protective effect of the cannabinoid agonist WIN 55212 in an *in vitro* model of hypoxic ischemic brain damage in newborn rats [J]. Pediatr Res, 2006,60(2):169.

[10] 赵淑敏,孔祥玉,周健,等. 黄芩茎叶总黄酮预处理对缺血再灌注大鼠心肌细胞超微结构的影响[J]. 承德医学院学报,2005,22(3):185.

[11] 陈萌,赵淑敏,李涵,等. 黄芩茎叶总黄酮预处理对缺血再灌注脑梗死体积和脂质过氧化损伤的影响[J]. 解剖学杂志,2010,33(4):495.

[责任编辑 聂淑琴]

used for kidney-yang deficiency for thousands years. But there is no material about its pharmacological activity. We studied the strengthening yang activity of CRP with kidney-yang deficiency mice model. **Method:** Forty-eight mice were randomly divided into experimental group, control group, positive control group and model group. The control group and model group mice were given normal saline $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ by gavage, the positive control group mice were given nanbao capsule $1.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, experimental group mice were given CRP $0.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. The mice were injected subcutaneously with dexamethasone 0.04 mg except control group mice. After the last administration on the 14th day, several organ indexes of loaded-swimming mice were observed. The antioxidant capacity of CRP was determined by DPPH. The levels of testosterone in Leydig cell was determined by the method of ELISA. **Result:** The mice with CRP could swim for longer time than model mice, epididymis indexes was also higher ($P < 0.05$). The IC_{50} of CRP was $114 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and the proliferation rate of spleen cells was 74.13%, 51.49%, 41.90%, 30.41%, 21.31% in CRP-treated groups corresponding to CRP concentrations of 1 600, 800, 400, 200, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** It is concluded that CRP can be used for reinforcing deficiency.

[**Key words**] Cervi Cornu Pantotrichum; Dioscoreae Rhizoma; kidney-yang deficiency; antioxidation; immune

鹿茸-山药药对源于《普济方》卷二一九,有补肾壮阳、健脾益精的功效,主治虚弱、阳事不举、面色不明、小便频数、饮食不思等症。此药对从古至今应用广泛,但是对其现代研究甚少。本课题组对鹿茸-山药药对醇提物(CRP)的补虚作用进行了研究。

1 材料

1.1 药品与试剂 鹿茸 *Cervi Cornu Pantotrichum*, 购于吉林省长春市同仁堂药店(批号 20090523),经长春中医药大学邓明鲁教授鉴定为鹿科动物梅花鹿 *Cervus nippon temminck* 雄鹿未骨化的密生茸毛幼角。山药 *Dioscorea opposita* Thunb. 购自长春市同仁堂药店(批号 20090812),经长春中医药大学邓明鲁教授鉴定为薯蓣科山药。男宝胶囊(天津力生制药股份有限公司,批号 0903007),地塞米松磷酸钠注射液(天津药业集团新郑股份有限公司,批号 0905132),戊酸雌二醇片(法国 Eelpharm Lille S. A. S,批号 14A 12),黄体酮注射液(浙江仙琚制药股份有限公司,批号 090711),青霉素钠(华兆制药股份有限公司,批号 D09040612)。1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、维生素 C(VC)、维生素 E(VE)(为 Sigma 产品),乙醇(北京化工厂),小鼠睾酮(T)酶联免疫检测试剂盒(美国 Assay 公司),WST-1 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(北京东方德教育科技有限公司),人绒毛膜促性腺激素(HCG,宁波激素二厂)。

1.2 仪器 1/万电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),紫外-可见分光光度计(美国 Varian 公司),Model 680 型酶标仪(日本 TAKARA 公司),HERAEUS HERAcCell 150 二氧化碳培养箱(日本三洋公司);倒置显微镜(日本奥林巴斯公司),超净工

作台(YZ-875 苏州净化设备厂),超纯水器由长春中医药大学研发中心提供。

1.3 动物 昆明种小鼠,18~20 g,雄性,清洁级,许可证号 SCXX-(吉)2009-0001;Wistar 大鼠,雄性,200-280 g,清洁级,许可证号 SCXX-(吉)2009-0005,由长春生物制品研究所供给。

2 方法

2.1 鹿茸-山药药对醇提物(CRP)的制备 取鹿茸 10 g 及山药 30 g 加入 10 倍量的 60% 乙醇,超声提取 3 次,每次 1 h,滤过,合并滤液,在水浴浓缩至干膏,出膏率为 2.67%。

2.2 肾阳虚小鼠负重游泳实验^[1] 取 48 只雄性小鼠 18~20 g,随机分为 4 组,空白、模型、阳性组、给药组,每组 12 只,空白组和模型组每只给予生理盐水 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,阳性组给予男宝胶囊 $1.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,给药组灌胃 CRP $0.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,除空白组外,各组给药同时为每只小鼠皮下注射地塞米松 0.04 mg 。第 14 天给药 1 h 后,在小鼠尾部负重 1 g 的铅块,在水深 40 cm,水温 20~22 °C 条件下测试负重游泳时间。

2.3 对大鼠脏器指数的影响 取体重 200~280 g 的雄性大鼠 36 只,随机分为 3 组,正常对照组、阳性对照组、给药组。分组后开始给药,连续 14 d。给药剂量为:阳性组给予男宝胶囊 $0.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、给药组给予 CRP $0.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,最后,取血、胸腺、脾脏、肾上腺、肾、前列腺、睾丸、附睾、称其质量。按照公式计算脏器指数

$$\text{脏器指数} = \text{脏器质量}(\text{mg}) / \text{体重}(\text{g}) \times 10$$

2.4 DPPH 自由基清除实验 在试管中依次加入 $26.40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH 溶液 2.0 mL 与 60% 甲醇 2.0

mL, 总体积为 4.0 mL, 混匀, 30 min 后, 用比色皿在 517 nm 处测定 A 值, 记为 A₀; 在另一个试管中加入 26.40 mg·L⁻¹ 的 DPPH 溶液 2.0 mL 与 2.0 mL 供试液, 混匀, 30 min 后, 用比色皿在 517 nm 处测定值记为 A₁; 在另一个试管中加入 60% 甲醇 2.0 mL 和供试液 2.0 mL, 测定值记为 A₂。计算 DPPH 自由基清除率。

$$\text{清除率} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$$

2.5 脾细胞增殖实验

2.5.1 脾细胞的制备 无菌取出小鼠脾脏, 放入盛有 RPMI-1640 培养液的平皿中, 用弯剪剪碎, 经 4 层纱布过滤, RPMI-1640 培养液洗 1 遍, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液配成 2 × 10⁶/mL 细胞悬液。

2.5.2 对小鼠脾细胞的直接增殖作用 将小鼠脾细胞悬液点于 96 孔培养板上, 每孔 100 μL, 阳性孔再加入 5 mg·L⁻¹ ConA 100 μL, 给药孔加入每个比例的鹿茸-山药药对不同浓度 100 μL, 各做 4 个复孔, 放入 37 °C, 5% CO₂ 孵箱中培养 66 h 左右, 加入 WST-1 20 μL/孔, 继续培养 2 h, 在酶标仪上以 450 nm 测定各孔 A。并计算增殖率。

$$\text{增殖率} = (A \text{ 实验孔} - A \text{ 对照孔}) / A \text{ 对照孔} \times 100\%$$

2.6 对睾丸间质细胞分泌睾酮的影响^[5] 将小鼠脱臼处死, 无菌取睾丸, 脱荚膜, 将睾丸内容物溶于 0.5% 胶原酶 I 消化 10 min (37 °C, 100 r·min⁻¹), 过滤, 离心, 将细胞用 DMEM-F12 培养液配成 1 × 10⁶/mL, 点板, 培养 4 h 后, 甩板, 加入质量浓度为 500, 250, 125 mg·L⁻¹ 的 CRP 样品, 20 h 后用睾酮 ELISA 试剂盒测各孔睾酮含量。

2.7 数据统计方法 应用 SPSS 18.0 软件对实验数据进行处理。所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间比较用 t 检验。P < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 阳虚小鼠负重游泳实验 结果表明 CRP 可明显延长肾虚小鼠的游泳时间, 效果优于阳性药男宝胶囊。见表 1。

表 1 CRP 对阳虚小鼠游泳时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	负重游泳时间/s
空白	-	1 403 ± 646
模型	-	266 ± 41 ¹⁾
男宝	1.3	647 ± 370 ²⁾
CRP	0.9	443 ± 113 ³⁾

注: 与空白组比较¹⁾ P < 0.01; 与模型组比较²⁾ P < 0.05, ³⁾ P < 0.01。

3.2 对大鼠脏器指数的影响 结果表明, CRP 可提高附睾前列腺指数, 而对胸腺、脾、睾丸等脏器指数无影响, 说明其具有促性激素样作用。

表 2 CRP 对雄性大鼠脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	脏器指数/mg·g ⁻¹		
		前列腺	附睾	肾上腺
空白	-	8.25 ± 5.26	16.11 ± 4.39	1.72 ± 0.35
男宝	0.9	9.92 ± 4.44	20.08 ± 2.20 ¹⁾	2.23 ± 0.52 ¹⁾
CRP	0.6	14.12 ± 3.11 ²⁾	34.77 ± 4.14 ²⁾	2.86 ± 3.01

注: 与空白组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01。

3.3 DPPH 自由基清除实验

3.3.1 各供试液的 DPPH 清除率曲线 在测定范围内, VC, VE, CRP 具有一定的清除自由基活性能力, 且清除率与药物浓度呈正比关系, 当药物浓度达到一定值后, 清除率趋于平缓。VC 质量浓度 0.800 ~ 2.400 mg·L⁻¹, 抗氧化剂浓度与 DPPH 清除率之间基本呈线性关系, 经回归得方程: Y = 0.325 3 X - 0.054 7, R² = 0.996 4, 其中, Y 为 DPPH 清除率, X 为维生素 C 的浓度。VE 在 2.944 ~ 8.832 mg·L⁻¹, 抗氧化剂浓度与 DPPH 清除率之间基本呈线性关系, 经回归得方程 Y = 0.089 3 X - 0.048 7, R² = 0.994 0, 其中, Y 为 DPPH 清除率, X 为 VE 的浓度。CRP 具有一定的清除自由基活性的能力, 且清除率与提取物浓度呈正比关系, 当提取物浓度达到一定值后, 清除率趋于平缓。醇提物在 40 ~ 200 mg·L⁻¹ 内, 抗氧化剂的浓度与 DPPH 清除率之间基本呈线性关系, 经回归得方程为: Y = 0.003 7 X + 0.076 7, R² = 0.991 1, 其中, Y 为 DPPH 清除率, X 为醇提物的浓度。见图 1。

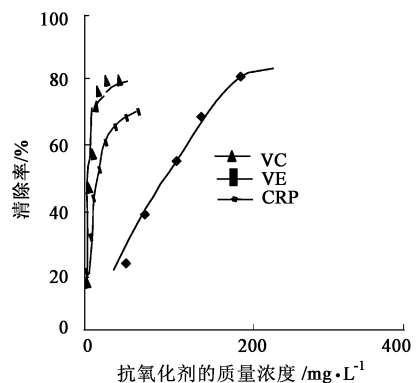


图 1 VC, VE, CRP 对 DPPH 清除率曲线

3.3.2 CRP 的抗氧化能力的评价 由公式算出各供试液的 IC₅₀, 维生素 C 为 7.71 mg·L⁻¹, 维生素 E 为 2.00 mg·L⁻¹, CRP 为 114 mg·L⁻¹。CRP 有一定

的自由基清除作用,但与维生素 C 和维生素 E 差别很大,可能是因为 CRP 为药对粗提物,成分复杂,对其中的自由基清除物质基础还需进一步研究。

3.4 CRP 对脾细胞增殖的影响 由表 3 可以看出,CRP 的实验孔吸光度与空白孔吸光度比较有明显差异($P < 0.05$),提示在 $100 \sim 1\,600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 内,对脾细胞有明显的增殖作用,且在 $100 \sim 1\,600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 具有量效关系。

表 3 CRP 对脾细胞的直接增殖作用($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A	增殖率/%
空白	-	0.295 ± 0.080	-
ConA	5	0.661 ± 0.100 ²⁾	98.45
CRP	1 600	0.531 ± 0.048 ²⁾	74.13
	800	0.462 ± 0.059 ¹⁾	51.49
	400	0.433 ± 0.030 ¹⁾	41.90
	200	0.398 ± 0.019 ¹⁾	30.41
	100	0.370 ± 0.018 ¹⁾	21.31

3.5 对睾丸间质细胞分泌睾酮的影响 CRP 并无直接的促进睾丸间质细胞分泌睾酮的作用,见表 4。

表 4 CRP 对睾丸间质细胞分泌睾酮的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	T/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	-	11.64 ± 1.72
CRP	500	11.37 ± 0.78
	250	10.64 ± 1.57
	125	11.98 ± 0.18
HCG	5	13.46 ± 2.47 ¹⁾

4 讨论

国家技术监督局发布的《中医临床诊疗术语》中规定,肾阳虚证的主症有腰膝酸软,性欲减退,畏寒肢冷;次症有精神萎靡,夜尿频多,下肢浮肿,动则气促,发槁齿摇,舌淡苔白,脉沉迟,尺无力。具备以上主症 2 项、次症 2 项,即可诊断为肾阳虚证。中医理论认为“肾为先天之本,主骨生髓”,肾藏精,精化髓,髓充养于肾,所以肾主骨生髓,肾虚则各脏腑皆虚,最易导致疾病和衰老。因此,肾虚证涉及神经、内分泌、物质代谢、生殖、免疫、受体等多个方面^[7]。

本实验数据表明,从整体看 CRP 对肾阳虚动物有一定的治疗作用,能延长小鼠游泳时间,有显著抗疲劳作用($P < 0.05$)。动物的附性器官是目前较常用的检测具有雄激素作用的一种方法,凡能使雄

性动物的附性器官湿重增加的药物,均表明具有雄激素样作用^[8]。CRP 能显著增加附睾指数,证明其具有促雄激素样作用。

现代研究认为,人的疲劳、衰老与体内自由基含量升高有关,自由基引起的过氧化反应,核酸及蛋白质性降解导致的各种表现,与中医学肾虚表现极为相似^[9]。CRP 能显著清除 DPPH 自由基,表明其可能是通过清除自由基来治疗肾阳虚证。究竟是哪种成分有清除自由基作用还有待进一步研究。

沈自尹^[10]经大量研究证实,补肾药有一定的免疫调节作用,肾阳虚证与神经内分泌免疫网络有内在的联系。中医学认为:“久病者多肾虚”,肾虚患者免疫功能下降者较多,应用补肾益精药物能够特异性地提高下丘脑的关键性功能—促肾上腺皮质激素释放激素的表达,调节神经内分泌免疫网络,从而证实了肾在免疫调节中的主导作用。CRP 能显著促进小鼠脾细胞增殖,表明其可能通过免疫途径治疗肾虚证。

[参考文献]

- [1] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2010,1286.
- [2] 金龙,葛争艳,刘建勋. 五子衍宗丸对大鼠交配功能和肾阳虚模型小鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(16):228.
- [3] 赵启鹏,兰莎,张艺. 糖脉康颗粒清除 DPPH 自由基的作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):41.
- [4] 陈志国,叶松山,范迎,等. 金钗石斛多糖提取工艺的优化及对小鼠脾细胞增殖的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):27.
- [5] Morgan J A, Cheepala S B, Wang Y, et al. Deregulated hepatic metabolism exacerbates impaired testosterone production in MRP4-deficient mice [J]. J Biol Chem, 2012,287(18):14456.
- [6] 韦若琪. 绝经后妇女肾虚证与 MTHFR 基因多态性的相关性研究[D]. 南宁:广西医科大学,2012.
- [7] 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.
- [8] 许士凯. 当代抗衰老与养生进展[M]. 北京:中国科学技术出版社,1990:271.
- [9] 韦品清,刘成柱. 肾虚与自由基[J]. 江西中医药,2000,31(4):57.
- [10] 沈自尹. 肾阳虚证的定位研究[J]. 中国中西医结合杂志,1997,17(1):50.

[责任编辑 聂淑琴]