

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110420. 0930. 004

五味子复方对模拟航渡及高强度运动大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴功能和代谢的影响

黄慧, 孙玲君, 顾萍, 王坚*

(南京大学医学院临床学院南京军区南京总医院内分泌科, 南京 210002)

[摘要] 目的:探讨五味子复方对模拟航渡及高强度运动大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴功能和代谢的影响。方法:选取 31 只大鼠,随机分成安静组(A组),应激组(B组)和五味子复方组(C组),大鼠给予五味子复方煎液 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 2 次/d ig, 剂量为 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 共 1 周, B 组和 C 组给予模拟航渡及高强度运动, 比较 3 组大鼠血糖(blood glucose)、甘油三酯(triglyceride, TG)、胆固醇(cholesterol, CHO)及皮质醇(corticosterone, CORT)水平,并观察 3 组大鼠垂体促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY)阳性细胞数量和肾上腺皮质的超微结构。结果:①与 A 组相比, B 组血糖水平显著增高($9.41 \pm 2.56 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $P < 0.01$), TG 和 CHO 水平显著降低, TG($0.42 \pm 0.16 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $P < 0.01$); CHO($1.69 \pm 0.23 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $P < 0.05$); C 组与 B 组相比, 其血糖水平降低($6.45 \pm 2.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $P < 0.05$), TG 水平升高($0.63 \pm 0.22 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $P < 0.05$), CHO 无明显差异($1.83 \pm 0.19 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。②垂体 ACTH 和 NPY 阳性细胞免疫组化结果: C 组 ACTH 阳性细胞和 NPY 阳性细胞数量较应激组增加, 但两组都少于 A 组。③肾上腺电镜结果:与 A 组相比, B 组肾上腺皮质细胞中分泌颗粒数目明显减少; C 组肾上腺皮质细胞内分泌颗粒数目较 B 组明显增多。结论:五味子复方能降低应激大鼠血糖水平, 维持物质代谢平衡, 提高大鼠抗应激能力, 保护垂体和肾上腺组织的结构功能。

[关键词] 五味子复方; 模拟航渡; 高强度运动; 下丘脑-垂体-肾上腺轴; 皮质醇

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0136-05

Effects of Schisandra Chinensis Fructus Compound on Function of Hypothalamus-pituitary-Adrenal Axis and Metabolism in Rats Underwent Experimental Navigation and Strenuous Exercise

HUANG Hui, SUN Ling-jun, GU Ping, WANG Jian*

[收稿日期] 20101202(002)

[基金项目] 南京军区“十一五”面上课题(06MA132)

[通讯作者] *王坚, 教授, 博士生导师, 研究方向: 内分泌学, Tel: 025-80863170, E-mail: wang_jndern@yahoo.com.cn

[网络出版时间] 2011-04-20 09:30

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110420.0930.004.html>

综上所述,常春卫矛和爬行卫矛在抗凝止血化瘀等方面药效作用明显,二者差异无显著性,常春卫矛与爬行卫矛作用相似。实验结果为常春卫矛临床的应用与开发提供了实验依据。

[参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 1108.

[2] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草. 第 5 册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 185.

[3] 田颖刚, 谢明勇, 吴红静, 等. 乌骨鸡正己烷提取物补血作用研究[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(1): 48.

[4] 钟正贤, 周桂芬, 陈学芬, 等. 黄杞总黄酮的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(6): 495.

[5] 钟正贤, 周桂芬, 陈学芬, 等. 黄杞总黄酮活血化瘀作用研究[J]. 广西中医药, 1999, 22(4): 45.

[责任编辑] 聂淑琴

(Department of Endocrinology, School of Clinical Medicine, Nanjing University Medical College Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, Nanjing 210002, China)

[Abstract] Objective: To investigate the influence of Schisandra compound on the function of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, the carbohydrate and blood-lipid metabolism in male rats underwent experimental navigation and strenuous exercise. **Method:** Thirty-one SD male rats were randomly allocated into three groups, quiet group (group A), stress control group (group B) and Schisandra Chinensis Fructus compound administration (10 mL·kg⁻¹, 2/d, ig, one week) group (group C). Both group B and C underwent wearing floating with psychological stress, then the corticosterone (CORT), cholesterol (CHO), triglyceride (TG) and blood glucose levels of the three groups were measured. At the same time, we excised the pituitary tissue to observe the number of the positive expression of ACTH and NPY cells by immunohistochemistry. **Result:** ① In group B the plasma glucose level increased [(9.41 ± 2.56) mmol·L⁻¹, P < 0.01], TG and CHO levels decreased significantly compared to group A [TG (0.42 ± 0.16) mmol·L⁻¹, P < 0.01]; CHO [(1.69 ± 0.23) mmol·L⁻¹, P < 0.05]. In group C, the plasma glucose level increased [(6.45 ± 2.25) mmol·L⁻¹, P < 0.05] and TG level decreased significantly compared to group B [(0.63 ± 0.22) mmol·L⁻¹, P < 0.05], but there's no obvious difference in serum CHO level [(1.83 ± 0.19) mmol·L⁻¹]. ② By immunohistochemistry, we found that in group C the number of the positive cells of ACTH and NPY in the pituitary tissue were increased compared to group B. However, the number of the positive cells of ACTH and NPY in both two groups were less than group A. ③ In group C, the number of the lipid granules increased obviously compared with group B, which is less than that in group A under electron microscope. **Conclusion:** Schisandra compound has the effects on adjusting serum levels of blood glucose and blood-fat, and can protect the structure of pituitary and adrenocortical cells.

[Key words] Schisandra Chinensis Fructus compound; simulated navigation and combat; strenuous exercise; hypothalamus-pituitary-adrenal axis; corticosterone

应激是指机体的不协调状态或内环境稳定受到威胁^[1],其主要特征为机体受到内外环境刺激后发生交感肾上腺髓质及垂体-肾上腺皮质活性增强,并伴有神经、内分泌、免疫和行为等变化。过度应激可导致机体生理功能障碍如高血压、消化性溃疡、高血糖、血脂代谢紊乱等,以及心理障碍如抑郁、焦虑、认知障碍等。由于应激可导致机体多系统的功能障碍,而不同个体在不同应激原、不同环境下所致的结果也不相同,给临床预防和治疗应激性疾病带来很大困难,中医药的整体调理,辨证论治在这方面显示了巨大优越。已有研究证实,五味子、黄芪等中药能提高大鼠运动能力和抗应激的能力,而五味子、黄芪和三七等组成的复方制剂对机体应激状态下的神经内分泌调节的研究甚少。因此,本实验通过建立模拟渡航及高强度运动的应激动物模型,从而研究五味子复方对神经内分泌及物质代谢的影响,探讨五味子复方抗应激作用机制。

1 材料

1.1 受试药物及制备 实验采用的药材为五味子

复方,由五味子、黄芪、三七等药物构成,置于清水中浸泡 20 min,加热至沸腾,回流 30 min,过滤并浓缩,使其质量浓度相当于生药 1 g·mL⁻¹。

1.2 动物与分组 清洁级雄性 SD 大鼠,鼠龄 6 周,体重 120 ~ 150 g,共 31 只,由南京军区南京总医院比较医学科提供,合格证号 SYXK(苏)2003-0032。

1.3 试剂 皮质醇放射免疫分析药盒(批号 FRFJ055;北京市福瑞生物工程公司);促肾上腺皮质激素放射免疫分析药盒(批号 20070411;北京北方生物技术研究所);兔抗鼠促肾上腺皮质激素一抗(批号 BA0565;Vector 公司),兔抗鼠神经肽 Y 一抗(批号 RA1289;Boster 公司),羊抗兔的辣根过氧化物酶标记的二抗(批号 XL3047;Dako 公司)。

1.4 仪器 大鼠跑台(杭州段式 PT-98 型);电动机造浪装置;充气水池(直径 1.8 m);HITA-CHI7180 血液生化检测仪(上海亦扬医疗器械有限公司)。

2 方法

试验前在清洁级动物饲养中心以标准啮齿类动物维持期饲料适应性饲养 1 周。大鼠随机分为 3 组:

A 组为安静组 ($n = 10$), B 组为模拟渡航并高强度运动组即应激组 ($n = 12$), C 组为五味子复方 + 模拟渡航并高强度运动组即五味子复方组 ($n = 9$)。实验过程中 A 组不接触任何应激原, B、C 组大鼠笼子与土猫笼子并排放置, 但无直接接触, 每天 8 h 共 10 d。各组自由进食和饮水, C 组予五味子复方煎液 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每日 2 次 ig , 剂量为 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 共 1 周。

2.1 训练方案 先进行 1 次筛选性训练, 然后 B 和 C 组实验大鼠参照 Bedford^[2] 跑台训练方法进行为期 10 d 的训练, 具体的训练方法见表 1。

表 1 实验动物运动方案

天数	速度 $/\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$	坡度 $/\text{度}$	运动时间 $/\text{min}$
01 ~ 03 d	15	0	15
05 d	25	0	45
07 d	20	5	30
09 d	25	5	45
10 d	25	5	60

注: 第 4, 6, 8 天大鼠仍进行跑台训练。

2.2 大鼠模拟渡航模型的建立 第 11 天将 B、C 组大鼠置于木制船模型 ($1.4 \text{ m} \times 0.8 \text{ m} \times 0.4 \text{ m}$) 中。船模型漂浮于充气水池内, 并用电动机械造浪装置使船前后左右摇摆 20 度角。大鼠在水上漂浮历时 3 h, 期间禁食水。

结束后 B 和 C 组大鼠立即进行跑台高强度运动, 期间继续禁食水。按照 Benford 等运动强度与最大耗氧量关系的研究, 大鼠运动强度定为: 5 度坡度, 速度 $26.8 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ 。历时 3 h 后立即采集血样。

2.3 取材及样品制备 实验结束予氯胺酮按 $10.0 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量对大鼠进行麻醉, 心脏静脉窦取血 5 mL, 离心、分离后放射免疫法测定血清 CORT 水平, 检测 CORT 灵敏度 $< 1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 批内 RSD $<$

5%, 批间 RSD $< 10\%$ 。血糖、血脂水平由 HITA-CHI7180 血液生化检测仪分析, 相关检测试剂均为配套产品。

免疫组化标本制备: 取大鼠垂体组织固定 48 h 后, 制成组织石蜡块, 并连续切片, 厚度为 $3 \mu\text{m}$, 再经脱蜡、水化及高温高压抗原修复后, 滴加兔抗大鼠 ACTH 一抗 $50 \mu\text{L}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱孵育过夜, 再滴加羊抗兔的辣根过氧化物酶标记的二抗 (Dako 公司, EnVision 方法) $50 \mu\text{L}$, 室温下孵育 30 min, 缓冲液冲洗后, 二甲苯联苯胺 (dimethylbenzidine, DAB) 显色 5 ~ 10 min, 阴性对照用 PBS 代替一抗, 水洗、复染、脱水后, 二甲苯透明, 中性树脂封片。棕黄色为阳性, 背景为紫蓝色。

免疫组化阅片: 每例在光镜下随机挑选 10 个高倍视野 ($\times 400$), 用 HPIAS-1000 型全自动医学彩色图像分析系统分析切片, 测定垂体组织中棕黄色颗粒所占视野下面积的百分比。

取大鼠一侧肾上腺组织, 2.5% 戊二醛固定后 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冷藏。经 1% 锇酸双重固定后, 常规脱水、包埋, 超薄切片, 醋酸铀及柠檬酸铅双重染色, 电子显微镜下观察肾上腺皮质超微结构。

2.4 统计学分析 所有数值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 13.0 版统计分析软件进行处理, 组间两两比较采用 One-Way ANOVA, 组间多重比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 五味子复方对大鼠血清激素及血糖、血脂的影响 应激组大鼠的 TG、CHO 水平较安静组显著降低, 血糖显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。五味子复方可显著升高应激大鼠 TG、显著降低血糖水平 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 五味子复方对各组大鼠血清激素及血糖、血脂的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	皮质醇 $/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	甘油三酯 $/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	胆固醇 $/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	血糖 $/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
安静	10	-	4.67 ± 1.19	0.97 ± 0.43	1.90 ± 0.24	5.22 ± 2.13
应激	12	-	7.25 ± 6.20	$0.42 \pm 0.16^{2)}$	$1.69 \pm 0.23^{1)}$	$9.41 \pm 2.56^{2)}$
五味子复方	9	2.0	6.65 ± 3.24	$0.63 \pm 0.22^{3)}$	1.83 ± 0.19	$6.45 \pm 2.25^{3)}$

注: 与安静组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与应激组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 3 同)。

3.2 垂体 ACTH 和 NPY 阳性细胞免疫组化 应激组大鼠垂体 ACTH 阳性细胞数和 NPY 阳性细胞数较安静组减少 ($P < 0.01$), 五味子复方则能增加应激大鼠垂体 ACTH, NPY 阳性细胞数 ($P < 0.05$)。

见表 3。

3.3 肾上腺皮质超微结构 在透射电镜下发现, A 组大鼠肾上腺皮质细胞较大, 胞内散在分布大小不一的脂滴。线粒体丰富, 大小一致, 基质较透亮。

表3 各组大鼠垂体组织 ACTH 和 NPY 阳性细胞数的水平比较($\bar{x} \pm s$)

分组	剂量 /g·kg ⁻¹	只	ACTH 阳性 细胞数/%	NPY 阳性 细胞数/%
安静	-	10	57.126 ± 3.0	29.361 ± 2.1
应激	-	12	10.753 ± 2.6 ²⁾	5.105 ± 2.3 ²⁾
五味子复方	20	9	26.087 ± 5.1 ³⁾	13.893 ± 3.8 ³⁾

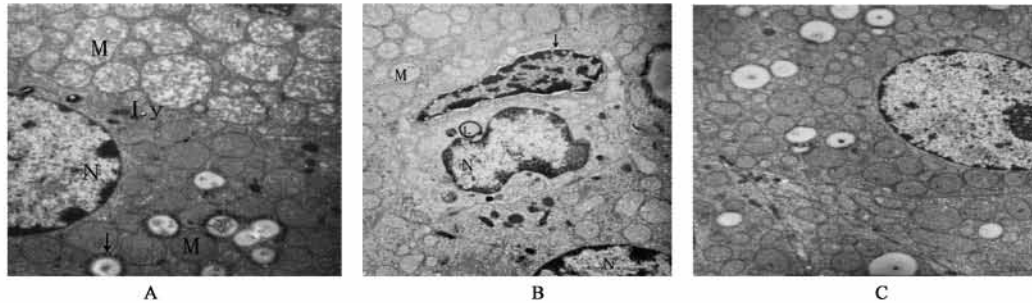


图1 各组大鼠肾上腺超微结构的改变(醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, ×1 000)

A. 安静对照组; B. 应激组; C. 五味子复方 20 g·kg⁻¹组

应激使大鼠血糖水平明显升高,但五味子复方可显著降低应激大鼠的血糖水平,推测其降糖机制主要通过五味子发挥作用。研究证实五味子能抑制 α -葡萄糖苷酶活性,减缓葡萄糖的生成和吸收,降低血糖水平^[3]。有人从五味子中提取出 α -葡萄糖苷酶抑制剂,它能明显降低正常和四氧嘧啶糖尿病小鼠的血糖,提高正常小鼠的糖耐量^[4]。应激大鼠食物摄入减少,分解代谢效应增强且体重减轻的观点已得到广泛的认同^[5-7],本实验结果显示,应激组大鼠的TG,CHO水平较安静组显著降低。主要与以下因素有关,一是应激时下丘脑释放促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)增加和NPY明显减少有关^[8],CRH被认为是一种控制食欲的药物^[9-10],而NPY是最强的中枢食欲刺激肽之一。二是HPA轴的激活,使得胰岛素分泌反馈调节CORT发生变化,引起能量平衡的破坏,出现分解代谢效应^[11]。本实验中五味子复方组大鼠TG水平升高,而CHO无统计学意义,提示五味子复方对维护胰岛素分泌反馈调节CORT的平衡而保持能量代谢的平衡有一定作用。研究证明,三七可以降低血中的甘油三酯,提高高密度脂蛋白含量^[12]。现代药理研究表明,黄芪的降脂作用可能与其有效成分黄酮有关^[13]。由此可见,五味子复方通过多种途径对应激机体的血糖及血脂代谢产生影响,维持物质代谢平衡,提高机体应激能力。本实验显示应激组大鼠的血清CORT水平与安静组相比却

B组可见散在的凋亡细胞,脂滴、脂质空泡较少见,线粒体大小不一,内质网扩张。C组细胞中脂滴、脂质空泡丰富,与A组相比无明显差异(图1)。

4 讨论

应激时机体表现为神经内分泌系统的改变,最主要的反应是HPA轴的兴奋激活,长期处于应激状态可致机体血糖及血脂代谢紊乱。本实验研究发现

无显著性差异,有研究报告对束缚应激12d的大鼠亦发现CORT水平变化不明显^[14]。而五味子复方组大鼠CORT水平与应激组相比亦无显著性差异,可能与五味子复方的给药时间、药物剂量、应激的类别、强度和持续时间等多种因素有关。

NPY在中枢神经系统的含量最高,能够对抗应激所致的CRH效应和蓝斑-去甲肾上腺素系统,抗焦虑,以及损伤恐惧记忆。我们的研究显示应激组大鼠垂体NPY阳性细胞数较安静组有所减少,而五味子复方组大鼠垂体NPY阳性细胞数虽少于安静组,但多于应激组。已有研究发现,腺垂体ACTH细胞合成、分泌激素的能力与面数密度有关,它可以反映细胞数量^[15]。本实验发现应激组大鼠垂体ACTH阳性细胞数较安静组显著降低,而五味子复方则能增加应激大鼠垂体ACTH阳性细胞数。

通过观察肾上腺组织超微结构,我们发现应激组大鼠肾上腺皮质细胞内可见散在的凋亡细胞,脂滴、脂质空泡较少见,线粒体大小不一,内质网扩张,表明该模型动物处于过度应激状态。而五味子复方组大鼠的肾上腺皮质超微结构有显著改善,与安静组相比无明显差异。

综上所述,五味子复方能显著降低应激时机体的血糖水平,维持物质代谢平衡,保护应激时垂体组织结构功能,提高机体抗疲劳能力,增强机体的应激能力。但因五味子复方含有多种中药成分,对机体

的影响也是多方面的,故其具体作用机制也较为复杂,有待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Chrousos G P, Gold P W. The concept of stress and stress system disorders[J]. JAMA, 1992, 267(9):1244.
- [2] Bedford T G, Tipton C M, Wilson N C, et al. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures [J]. J Appl Physiol, 1979, 47(6):1278.
- [3] 林玉桓, 王树林, 王颖, 等. 34 种中药对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用[J]. 大连轻工业学院学报, 2004, 23(4):270.
- [4] 袁海波, 沈忠明, 殷建伟, 等. 五味子中 α -葡萄糖苷酶抑制剂对小鼠的降血糖作用[J]. 中国生化药物杂志, 2004, 23(3):112.
- [5] Harris R B, Zhou J, Youngblood B D, et al. Effect of repeated stress on body weight and body composition of rats fed low-and high-fat diets[J]. Am J Physiol, 1998, 275(6):1928.
- [6] Smaquin G N, Howell L A, Redmann S Jr, et al. Prevention of stress-induced weight loss by third ventricle CRF receptor antagonist[J]. Am J Physiol, 1999, 276(5):1461.
- [7] Yahata T, Murazumi K, Kuroshima A. Stress-and cold-induced adrenocortical responses in repetitively immobilized or cold-acclimated rats[J]. Can J Physiol Pharmacol, 1987, 65(7):1448.
- [8] 张纓, 冯美云, 吴昊, 等. 有氧运动训练对大鼠下丘脑食欲调节肽的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2002, 21(1):19.
- [9] Cole B J, Cador M, Stinus L, et al. Central administration of a CRF antagonist blocks the development of stress-induced behavioral sensitization[J]. Brain Res, 1990, 512(2):343.
- [10] Murakami K, Akana S, Dallman M F. Correlation between the stress-induced transient increase in corticotrophin-releasing hormone content of the median eminence of the hypothalamus and adrenocorticotrophic hormone secretion [J]. Neuroendocrinology, 1989, 49(3):233.
- [11] Dallman M F, Akana S F, Strack A M, et al. The neural network that regulates energy balance is responsive to glucocorticoids and insulin and also regulates HPA axis responsivity at a site proximal to CRF neurons[J]. Ann NY Acad Sci, 1995, 771(1):730.
- [12] 惠飞虎, 柯昕, 赵亮. 三七总皂苷对力竭运动大鼠血糖代谢及 T 淋巴细胞亚群免疫功能的影响[J]. 陕西中医, 2008, 29(2):243.
- [13] 韦日周. 黄芪注射液对肾病综合征患者血脂和血液流变学的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2001, 2(5):178.
- [14] Harris R B, Gu H, Mitchell T D, et al. Increased glucocorticoid response to a novel stress in rats that have been restrained[J]. Physiol Behav, 2004, 81(4):557.
- [15] 米娜娃, 唐军民, 唐岩, 等. 大鼠实验性腺胃癌形成过程中脑垂体远侧部 ACTH 细胞的免疫组织化学观察[J]. 中国组织化学与细胞化学, 2000, 9(3):255.

[责任编辑 聂淑琴]