

忧虑康液对抑郁肾阴虚模型大鼠的滋肾阴作用机制研究

史冰¹, 李晟², 陈晓阳^{2*}, 秦莉花², 陈容³, 邹志³

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410208;
3. 湖南中医药大学研究生, 长沙 410208)

[摘要] 目的: 观察忧虑康液对肾阴虚抑郁模型大鼠行为学, 血浆环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)以及足跖汗腺细胞形态学的影响。方法: 采用慢性不可预见性应激并 ig 甲状腺素加孤养法复制肾阴虚抑郁大鼠模型。将筛选的大鼠随机分为 7 组, 造模同时 ig 给药, 连续 21 d, 氟西汀组给予氟西汀 3.6 mg·kg⁻¹, 地黄丸组给予六味地黄 1.6 g(生药)·kg⁻¹, 忧虑康低、中、高剂量组分别给予忧虑康液 7.2 g, 14.4, 28.8 g(生药)·kg⁻¹, 正常组与模型组均 ig 等容量蒸馏水, 以敞箱试验、液体消耗试验观察行为学, 放免法检测血浆 cAMP、cGMP 含量, HE 染色法光镜下观察足跖汗腺细胞形态学变化。结果: 模型大鼠饮水渐多而体重增长缓慢, 敞箱试验和液体消耗试验有关指标显著下降, 血浆 cAMP 含量显著升高, 足跖汗腺细胞发生明显空泡样变化、汗腺导管扩张。忧虑康液能改善模型大鼠阴液受伤及行为学异常, 显著降低 cAMP 含量, 并使足跖细胞形态及分泌的病理状况基本恢复正常; 尤以高剂量与六味地黄丸作用相近。结论: 忧虑康液能调整 β -受体系统, 且呈量效关系, 并能改善足跖汗腺细胞病理形态学变化; 这些均是其滋阴作用机制之一。

[关键词] 抑郁症; 肾阴虚; 忧虑康液; cAMP; 细胞形态学; 大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)05-0171-05

The Effect of You Lv Kang on the Model Rat of Kidney-Yin Deficiency and Depression Syndrome

SHI Bing¹, LI Sheng², CHEN Xiao-yang^{2*}, QIN Li-hua², CHEN Rong³, ZOU Zhi³

(1. The Affiliated Hospital, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China;
2. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China;
3. Post-graduate Class 2006, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of You Lv kang on depression behavior, plasma cyclic adenosine monophosphate(cAMP), cyclic guanosine monophosphate(cGMP), and cell morphology changes of plantar sweat gland cells in the model rat of kidney-Yin deficiency and depression syndrome. **Method:** Rats were divided into seven groups randomly. The rat model of kidney-Yin deficiency was established by exposing the animals to chronic unpredictable stress and giving thyroxine by intragastric administration. The model establishment and the treatment by different drugs were started at the same time. The dose for fluoxetine group was 3.6 mg·kg⁻¹, the dose of Liuwei Dihuang Wan group was 1.6 g·kg⁻¹. The three doses of You Lv Kang were 7.2 g·kg⁻¹, 14.4 g·kg⁻¹ and 28.8 g·kg⁻¹ respectively. The blank and model groups were administered with water daily. All the treatments lasted for 21 days. The behavior changes was evaluated by the open-field test and fluid consumption test. The plasma samples of the rats were taken for cAMP and cGMP determination by radioimmunoassay. The morphology changes of plantar sweat gland cells with HE staining in rats were investigated under light microscope. **Result:** All the indexes of the open-field test and fluid consumption test in the model rats were significantly decreased, with significantly

[收稿日期] 20100211(003)

[基金项目] 湖南省教育厅资助项目(05C372); 湖南省科技厅项目(03SSY4043); 湖南中医药大学中药学重点学科项目

[通讯作者] * 陈晓阳, Tel: 13077309853; E-mail: cxy53@126.com.

increased the content of plasma cAMP. Vacuole-like changes in plantar sweat gland cells in the model rats were obvious, and sweat gland ducts were expanded. You Lv Kang could improve the behavior of the rats. The level of cAMP was significantly decreased in the Liuwei Dihuang Wan and You Lv Kang groups, and the morphological appearance of plantar sweat gland cells showed to be basically normal, especially in the high dose group of You Lv Kang and Liuwei Dihuang Wan group. **Conclusion:** You Lv Kang can regulate α -receptor system and improve the pathological changes of plantar sweat gland cell. Nourishing Yin might be one of the mechanisms responsible for the effects.

[Key words] depression; kidney-Yin deficiency; You Lv Kang; cAMP; cell morphology; rat

抑郁症是一种包括精神症状和躯体症状的复杂的情感性精神障碍,肾阴虚证是其常见证型。肾阴虚辩证要点包括肾的定位证候(头晕目眩、腰膝酸软等),以及一般阴虚症状(五心烦热、易怒、饮水量增加、汗出、形体消瘦、大便干燥、舌红少苔、脉细数)。本课题组运用忧虑康液治疗肾阴虚抑郁症患者,取得了满意疗效。继之进行忧虑康液对肾阴虚抑郁模型大鼠肾、肾上腺细胞形态学影响的研究;本实验同期检测模型大鼠血浆环磷酸腺苷(Cyclic adenosine monophosphate; cAMP)、环磷酸鸟苷(Cyclic guanosine monophosphate; cGMP)含量及观测足跖汗腺细胞形态学变化,以期多方位阐明该中药复方的滋肾阴作用机制。现介绍如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康 SD 大鼠,雌雄各半,体重(170~190) g,由湖南省长沙市开福区东创科技服务部提供,合格证号 SYXK(湘)2006-0001。

1.1.2 药物 忧虑康方由熟地黄、何首乌、郁金、石斛、丹参、当归等组成,饮片购于湖南中医药大学附属第一医院药剂科,并经生药检验。第 1 次 8 倍体积饮用水冷浸 30 min,再提取 40 min,纱布过滤,第 2 次 4 倍量水提取 30 min,过滤,合并 2 次滤液,减压浓缩成相应浓度(浸膏),4℃ 保存备用。六味地黄丸(湖南省长沙九芝堂股份有限公司生产,国药准字 243020145,批号 20050219,用蒸馏水配成每毫升含生药 0.16 g 的溶液。盐酸氟西汀胶囊,购于常州华生制药有限公司,批号 80706001。甲状腺素片购于济南维尔康生化制药有限公司,批号 0505505,用冷开水配制成 0.18 mg·mL⁻¹。

1.1.3 仪器 莱卡光学显微镜(型号 020-507010,德国 leica 公司);石蜡切片机(型号 2035,德国 leica 公司);彩色光学摄像仪(型号 JVC TK-C1381EG,日

本);放射免疫计数器(GC-1200 放射免疫计数器,中国科学技术大学科技实业有限公司);低温大容量高速离心机(型号 KDC-2046 低温大容量离心机,中国科学技术大学科技实业有限公司);离心管,匀浆器,微量取样器,恒温烘箱等。自制敞箱(不透明材料制成高 50 cm,底面为 100 cm×100 cm 的正方形,被等分为 25 个等边方格);游泳器具(内径 35 cm,高 45 cm 水桶)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 将 SD 大鼠适应环境后,进行敞箱试验和液体消耗试验。根据敞箱试验结果,将筛选的大鼠,按体重随机区组分为 7 组:即正常对照(简称正常)组、模型对照(简称模型)组、盐酸氟西汀(简称氟西汀)组、六味地黄丸(简称地黄丸)组、忧虑康低剂量(简称 ylk 低剂量)组、忧虑康中剂量(简称 ylk 中剂量)组、忧虑康高剂量(简称 ylk 高剂量)组。每组 8 只。整个实验过程中动物自由摄食和饮水(禁食禁水应激除外),室温(22±3)℃(热、冷应激除外),自然昼夜节律光照,相对湿度 60%~70%,背景噪音(40±10 db)。

1.2.2 造模及给药 参照文献方法并加以改进^[1]。除正常组外,其余各组均连续接受各种不同的应激及 ig 甲状腺素以制备肾阴虚抑郁(病证复合)模型。采取单笼饲养,按以下程序从实验第 1 天起给予应激刺激,即昼夜颠倒、禁食禁水、潮湿垫料、鼠笼倾斜、40℃ 高温环境、夹尾、4℃ 冰水游泳、陌生异常物品、电击足底等应激因子,随机安排每日 1 种,连续 21 d;并 ig 甲状腺素混悬液 2.5 mg·(kg·d)⁻¹。造模同时氟西汀组给予氟西汀 3.6 mg·kg⁻¹,地黄丸组给予六味地黄 1.6 g(生药)·kg⁻¹,忧虑康低、中、高剂量组分别给予忧虑康液 7.2, 14.4 g, 28.8 g(生药)·kg⁻¹;各组治疗药物 ig 容量为 10 mL·kg⁻¹。ig 每日 1 次,正常组与模型组均 ig 等容量蒸馏水。

1.2.3 观察及检测指标

1.2.3.1 液体消耗试验、敞箱试验

1.2.3.2 一般状态及体重 实验过程中每日观察大鼠外表、性情、活动、大便情况,每周测 1 次饮水量、体重。

1.2.3.3 血浆 cAMP, cGMP 测定 实验第 22 天所有动物,断头采血,取血 1~2 mL,注入含 EDTA·Na₂ 50 μL 的试管中,摇匀放入冰浴中,1 h 内,4 离心 2 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,置于 -15~-20 保存用于测定。测定时严格按试剂盒说明书进行操作。

1.2.3.4 形态学观察 实验第 22 d,所有动物处死后,立刻取其足跖皮肤及其皮下组织,用 4% 甲醛固定,常规脱水、透明、包埋,石蜡切片,HE 染色,光镜下观察;并对足跖汗腺细胞空泡率和导管直径进行统计比较。

1.2.4 统计学分析 SPSS14.0 软件统计包,计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,方差齐者用单因素方差分析,方差不齐的采用 Tamhan 分析。 $P < 0.05$ 即认为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 忧虑康液对模型大鼠一般状况、饮水、体重的影响 正常组整个实验过程中 24 h 饮水量变化不大。模型组表现出不愿多饮水-多饮-持续多饮过程,表明在抑郁基础上出现了阴虚口渴状况;各中药治疗组表现出不愿多饮水-多饮-基本恢复正常并保持平稳的过程,表明中药起到了滋阴而缓解阴虚口渴的作用。见结果表 1。

与正常组比较,实验一周来各造模大鼠体重增长均缓慢,出现活动减少,但捉拿时易激怒、毛无光泽、大便干燥等抑郁及阴虚表现;经用药后的大鼠攻击性明显减轻、粪便变软,体重增长较快。

表 1 忧虑康液对肾阴虚抑郁症模型大鼠 24 h 饮水量的影响 (mL, $\bar{x} \pm s$, $n=8$)

| 组别 | 剂量 /g·kg ⁻¹ | 实验前 | 实验第 7 d | 实验第 14 d | 实验第 21 d |
|--------|------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常 | — | 47.16 ±5.21 | 46.78 ±6.29 | 43.58 ±5.39 | 44.16 ±5.21 |
| 模型 | — | 46.18 ±5.02 | 40.55 ±5.45 ¹⁾ | 47.21 ±5.06 ¹⁾ | 52.56 ±9.58 ²⁾ |
| 地黄丸 | 1.6 | 45.56 ±4.89 | 41.23 ±4.85 | 44.23 ±5.21 ³⁾ | 45.14 ±7.01 ⁴⁾ |
| 氟西汀 | 0.000 36 | 45.87 ±4.51 | 43.35 ±3.59 | 46.67 ±5.21 | 49.25 ±5.54 |
| 忧虑康低剂量 | 7.2 | 46.24 ±3.98 | 40.52 ±4.45 | 47.68 ±5.55 | 48.82 ±6.68 ³⁾ |
| 忧虑康中剂量 | 14.4 | 44.56 ±4.79 | 39.99 ±5.14 | 45.12 ±4.38 ³⁾ | 44.87 ±3.78 ⁴⁾ |
| 忧虑康高剂量 | 28.8 | 44.49 ±2.89 | 40.89 ±4.57 | 43.38 ±5.58 ²⁾ | 44.58 ±8.21 ⁴⁾ |

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$

2.2 忧虑康液对模型大鼠行为学的影响^[7] 液体消耗试验显示,实验第 7 d,各造模组糖水消耗及糖水偏爱%均低于正常组;治疗第 21 d,各用药组自身(与实验第 7 d)对照,可见总液体消耗减少、糖水偏爱%增加。

敞箱试验显示,实验开始至第 21 d,模型组水平得分、垂直得分、清洁次数指标值均下降,中央格停留时间延长。与模型组比较,各用药组的垂直得分增加有统计学意义,表明已逐渐改善抑郁状态;氟西汀组各项指标值差异有显著性,表明其改善抑郁效果较好;忧虑康低剂量组清洁次数增加出现较早,提示该药起效时间较早;随时间推移该药效果显著与氟西汀接近。

2.3 忧虑康液对模型大鼠血浆 cAMP, cGMP 的影响 与正常组比较,模型组 cAMP 含量升高,其差异具显著性;与模型组比较,六味地黄丸组、忧虑康液

中、高剂量使之降低,具有统计学意义 ($P < 0.05$)。表明模型组大鼠存在内在肾阴虚;忧虑康液能改善肾阴虚状态,尤以高剂量效果与经典方六味地黄丸接近。结果见表 2。

表 2 忧虑康液对模型大鼠血浆 cAMP、cGMP 的影响 ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | cAMP /pM·mL ⁻¹ | cGMP /pM·mL ⁻¹ | cAMP/cGMP |
|--------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 正常 | 50.88 ±15.38 | 7.75 ±2.43 | 6.68 ±0.99 |
| 模型 | 76.63 ±23.74 ²⁾ | 8.25 ±2.25 | 9.31 ±1.26 ²⁾ |
| 地黄丸 | 53.75 ±20.08 ³⁾ | 7.50 ±2.73 | 7.27 ±1.37 ⁴⁾ |
| 氟西汀 | 78.88 ±24.01 | 8.63 ±2.77 | 9.36 ±1.73 |
| 忧虑康低剂量 | 61.25 ±16.90 | 8.38 ±3.89 | 8.02 ±2.26 |
| 忧虑康中剂量 | 56.13 ±17.69 ³⁾ | 8.00 ±3.63 | 7.50 ±1.50 ³⁾ |
| 忧虑康高剂量 | 54.25 ±11.71 ³⁾ | 7.88 ±2.23 | 7.07 ±0.89 ⁴⁾ |

2.4 忧虑康液对模型大鼠足跖汗腺的影响 与正常组比较,模型组大鼠足跖汗腺导管扩张,腺体扩张,腺上皮胞浆丰富,分泌旺盛,空泡样变化明显,部

分腺体可见分泌物;六味地黄丸和忧虑康液能不同程度改善模型大鼠足跖汗腺细胞的分泌状况;氟西汀这一效果不明显。提示忧虑康液滋阴效果较好。结果见表 3。

表 3 忧虑康液对模型大鼠足跖汗腺的影响 (n=8, ̄±s)

| 组别 | 剂量 /g · kg ⁻¹ | 导管内径 / μm | 空泡发生率 / % |
|--------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常 | — | 15.23 ±1.57 | 1.40 ±0.20 |
| 模型 | — | 50.45 ±1.87 ²⁾ | 20.21 ±0.24 ²⁾ |
| 地黄丸 | 1.6 | 18.34 ±1.51 ⁴⁾ | 1.56 ±0.12 ⁴⁾ |
| 氟西汀 | 0.003 6 | 47.86 ±1.59 | 17.30 ±0.16 |
| 忧虑康低剂量 | 7.2 | 30.57 ±1.25 ³⁾ | 10.54 ±0.21 ³⁾ |
| 忧虑康中剂量 | 14.4 | 19.25 ±1.37 ⁴⁾ | 1.27 ±0.11 ⁴⁾ |
| 忧虑康高剂量 | 28.8 | 16.32 ±1.21 ⁴⁾ | 0.98 ±0.12 ⁴⁾ |

3 讨论

抑郁症之症状,散见于古代文献郁证、癩证等病证中,由于长期情志不畅、郁而伤阴及或年老肝肾阴精亏虚,可使髓海不充、脑失所养而致抑郁症,可见肾阴虚证是其常见证型。忧虑康液以熟地黄“滋肾水,益真阴”,“长骨中脑中之髓”而为君药;辅以首乌、石斛滋阴益精填髓,并以当归、郁金、丹参凉血兼活血。宫斌等发现以熟地为主药组方的补肾中药能显著增加其 M 受体结合容量(Rt 值),改善胆碱能 MI 受体的 mRNA 表达,从分子水平证实熟地有提高记忆能力、延缓脑组织衰老的功能^[2]。何首乌所含的卵磷脂是构成神经组织特别是脑髓的主要成分,其对大鼠乙酰胆碱酯酶神经元及其投射纤维有保护作用^[3];不同提取部位的提取物能缩短小鼠到达平台时间,延长跳台实验潜伏期,影响脑海马区 e-Jun 蛋白表达可能是其改善记忆的作用机理之一^[4];也有学者研究何首乌的 50% 乙醇提取物可对抗结扎沙土鼠大脑中动脉造成的局部脑缺血,减少大脑梗死灶近 50%^[5]。可以推测熟地、何首乌通过益智保护脑而能抗抑郁。

肾阴虚证需检测的客观指标太多,关于肾阴虚的特异性指标国内外还未形成统一,但现阶段多从内分泌方面及第二信使等方面去研究^[6]。本课题前期^[7]进行忧虑康液对肾阴虚抑郁模型大鼠肾、肾上腺组织细胞形态学影响的研究,实验显示该方能使肾间质炎症细胞减少,以及肾小管腔变形、管壁细胞空泡样变化和肾小球黏连、结构紊乱等病理形态基本趋于正常;并使肾上腺束状带胞核圆形,核/质比增大,细胞界限清晰,形态基本恢复正常。本实验显

示,造模后大鼠出现饮水量持续升高不降、捉拿时易激怒、毛无光泽、大便干燥、体重增长缓慢,糖水消耗及糖水偏爱%均低于正常组,水平得分、垂直得分、清洁次数指标值均下降,中央格停留时间延长等阴虚和抑郁状况,检测血浆 cAMP 含量升高,表明造模是成功的。而清热滋阴之忧虑康液能缓解大鼠实验郁热阴虚状态,能降低血浆 cAMP 含量,高剂量滋阴效果显著与六味地黄丸接近;但模型组 cAMP/cGMP 比值升高、六味地黄丸和忧虑康液组该比值降低,这种错位与有些相关文章所述不一致,考虑可能系 cGMP 无显著性变化所为或由其他因素所致。忧虑康低剂量组清洁次数的增加出现较早,提示该药起效时间较早,随时间推移忧虑康中高剂量改善抑郁行为显著并与氟西汀接近,说明效果与药物浓度有关。

汗腺是人体的冷却系统,可以保证体内的温度正常,但过度的汗出势必伤阴。现在市面上虽出现有低浓度凡士林的抑汗剂组合物^[8],可仍属治标不治本。本实验显示,肾阴虚抑郁症模型大鼠足跖汗腺导管扩张,腺体扩张,腺上皮胞浆丰富,分泌旺盛,出现明显空泡样变化,部分腺体可见分泌物等过度分泌现象,表明有内热;忧虑康液与六味地黄丸可以明显减少这种汗腺过度分泌,使水份不过度流失,而能从根本上扭转阴虚。

总之,汗出与阴虚,阴虚与肾、肾上腺、足跖汗腺功能形态学改变之间均存在因果关系。

忧虑康液能修复肾、肾上腺、足跖汗腺细胞形态学损伤,以及降低血浆 cAMP 含量,这些正是其滋肾阴作用机制之一。抑郁症的抑郁行为是体内动力低下的表现,但导致动力低下应当涉及到能量的不足,忧虑康方能滋阴益肾充脑,补充和保护能量,从而使“肾脑相通”而抗抑郁,但其更深微的作用机制研究还有待继续。

[参考文献]

- [1] 陈晓阳, 陈容, 李晟, 等. 肾阴虚抑郁症大鼠模型的建立及评价[J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(5): 28.
- [2] 马骏, 张倩, 宫斌. 补肾中药对老年大鼠脑组织中胆碱能 M 受体分布的影响[J]. 标记免疫分析与临床, 2002, 9(1): 37.
- [3] 李昊, 杜小平, 杨期东, 等. 何首乌对海人藻酸致大鼠脑 AChE 神经元及纤维损伤的保护作用[J]. 卒中与神经疾病, 2002, 9(5): 299.