

生脉散饮片配伍与组分配伍对热损伤大鼠糖皮质激素受体的作用比较

程彬彬¹, 吕 祥¹, 李 柏¹, 岳小强², 凌昌全^{1,2,3*}

(1. 第二军医大学附属长海医院中医科, 上海 200433; 2. 第二军医大学中医系, 上海 200433;
3. 上海高校中医内科 E-研究院, 上海 201203)

[摘要] **目的:**观察生脉散组分配伍与饮片配伍对热损伤大鼠糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 作用的差异。**方法:**雄性 SD 大鼠 32 只, 随机分为 4 组: 空白对照组、模型组、生脉散组分配伍组和生脉散饮片组, 每组 8 只。连续给药 1 周后除空白对照组外, 其余 3 组大鼠复制热损伤模型, 随后立即断头处死动物, 收集血清, 酶联免疫法检测血清皮质酮 (corticosterone, CS) 浓度, 放射免疫法检测血清促肾上腺皮质激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH) 的浓度; 放射配基法检测肝、肺、肾细胞液 GR 结合容量, 结果采用单点分析。**结果:**热损伤后, 大鼠肝、肺、肾细胞液 GR 结合容量明显低于空白对照组 ($P < 0.01$), 而生脉散组分配伍组及生脉散饮片组肝、肺 GR 结合容量均高于模型组; 生脉散组分配伍组肝脏 GR 结合容量高于生脉散饮片组 ($P < 0.01$), 但肺、肾 GR 结合容量两组之间差异无统计学意义。模型组、生脉散饮片组及生脉散组分配伍组 CS、ACTH 水平较正常对照组明显升高 ($P < 0.01$), 但 3 组间差异均无统计学意义。**结论:**生脉散组分配伍上调热损伤大鼠 GR 的效果略优于饮片配伍。

[关键词] 生脉散; 组分配伍; 热损伤; 糖皮质激素受体; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)01-0061-04

[收稿日期] 2009-06-19

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (90709024); 上海市教育委员会 E-研究院建设计划项目 (E03008)

[通讯作者] * 凌昌全, Tel: (021)81871558; E-mail: lingchangquan@hotmail.com

A Comparison for Effect of Components formula of Shengmai Powder and Decoction of Shengmai Powder on Regulating Glucocorticoid Receptor in Rats After Thermal Injury

CHENG Bin-bin¹, LV Xiang¹, LI Bai¹, YUE Xiao-qiang², LING Chang-quan^{1,2,3*}

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Faculty of Traditional Chinese Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. E-institute of Internal Medicine of Traditional Chinese Medicine, Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai 201203, China)

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the difference in effect of components formula of Shengmai Powder and that of decoction of Shengmai Powder (SMP) on regulating glucocorticoid receptor (GR) in rats after thermal injury. **Methods:** A total of 32 male SD rats were randomly assigned into normal control group, thermal injury group, components of SMP group and decoction of SMP group, with 8 rats in each group. Rats in normal control and thermal injury groups were intragastrically administered with normal saline (NS) at room temperature once daily and rats in components and decoction of SMP groups were treated with mixture of aqueous extracts of *Ophiopogonis Japonic*, *Fructus schizandrae Chinensis* and ginsenosides or decoction of SMP respectively once daily for a week. After the last administration, rats except those in normal control underwent thermal injury for one hour, and then were sacrificed immediately by decapitation. Blood serum was collected, and serum corticosterone (CS) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) levels were determined with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and radioimmunoassay (RIA) respectively. Cytosols from liver, lung and kidney were used to determine the GR binding capacity by radioligand receptor binding assay. The results were analyzed by one point analysis. **Results:** The simple point analysis showed that the binding capacities of GR in liver, lung and kidney cytosols after thermal injury were obviously lower than that of normal control ($P < 0.01$). GR binding capacities in liver and lung cytosols of components and decoction of SMP groups were higher than that of thermal injury group. GR binding capacities in liver cytosol of components of SMP group was higher than that of decoction of SMP group, but no significant differences were detected in lung and kidney cytosols between the two groups. Both the Serum CS and ACTH levels of thermal injury group, components of SMP group and decoction of SMP group were higher than that of normal control group. But there was no significant difference between the three groups. **Conclusion:** The effect of component of SMP on up-regulating GR is better at least partly than that of decoction of SMP in rats after thermal injury.

[**Key words**] Shengmai powder; components formula; thermal injury; glucocorticoid receptor; rats

糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 是由肾上腺分泌的一类甾体激素, 在生物体的生长、发育、生殖、代谢、免疫及维持内环境稳定等过程都有重要的调节作用, 而这些作用是由糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 介导实现的^[1]。我们在以往研究中发现参附汤、生脉散分别对失血性休克大鼠 (阳气虚脱) 和热损伤大鼠 (阴液亏损) 肝细胞液 GR 含量有明显的上调作用^[2-3]。组分配伍作为

中药方剂配伍的新形式, 它遵循传统方剂配伍理论与原则, 保持新模式配伍方剂的中医特色, 通过严谨规划, 针对有限适应证, 降低了方剂研究的难度, 且具有安全性较高、成分及作用机理相对清楚、质量稳定可控等优点^[4]。本实验拟从 GR 角度出发比较生脉散组分配伍与饮片配伍在热损伤大鼠中作用。

1 材料

1.1 动物 成年雄性 SD 大鼠 (6~8 周龄, 200~

250 g),由中国科学院上海实验动物中心提供,许可证号为 SCXK(沪)2007-0003。在人工调控的环境中进行饲养(光照 07:00 到 19:00,22 ℃),试验前先适应性饲养 1 周。

1.2 主要药品与试剂 人参总皂苷(>85%),麦冬总提取物(麦冬水提取物:麦冬生药=1:10),五味子总提取物(五味子水提取物:五味子生药=1:12)由西安奥晶科技发展有限公司提供。人参、麦冬、五味子饮片均购于上海雷允上大药房。[1,2,4-³H]-地塞米松,由 Amersham Phamacia 公司提供;地塞米松标准品, Sigma 公司提供;活性炭,由 E. Merck 公司提供;BCA 蛋白浓度测定试剂盒,由碧云天生物技术研究提供;大鼠皮质酮(corticosterone, CS)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒,由 Rapidbio Lab, Calabaras 公司提供;大鼠促肾上腺皮质激素(ACTH)放射免疫测定(RIA)试剂盒,由 Diagnostic Systems Laboratories 公司提供。

2 方法

2.1 分组、给药、造模 雄性 SD 大鼠 32 只随机分为 4 组:空白对照组、模型组、生脉散组分配伍组、生脉散饮片组,每组 8 只。每只每天 ig 1.5 mL,连续 1 周。空白对照组和模型组大鼠予生理盐水 ig;生脉散组分配伍组予人参总皂苷、麦冬水提取物和五味子水提取物混悬液 ig(组分 30 mg · mL⁻¹),组分剂量比为 35.5 mg · kg⁻¹: 86 mg · kg⁻¹: 96 mg · kg⁻¹,相当于生药剂量人参:麦冬:五味子=0.86 g · kg⁻¹: 0.86 g · kg⁻¹: 1.15 g · kg⁻¹;生脉散饮片组予生脉散饮片水煎液(生药 0.4 g · mL⁻¹),人参:麦冬:五味子=0.86 g · kg⁻¹: 0.86 g · kg⁻¹: 1.15 g · kg⁻¹。大鼠给药剂量由人与动物的体表面积计算法换算得到(按人常用剂量人参:麦冬:五味子=9 g: 9 g: 12 g)。

除空白对照组外,各组大鼠于末次给药 30 min 后复制热损伤模型:大鼠被置于干球(40 ℃ ± 1 ℃)、湿球(32 ℃ ± 1 ℃)的恒温鼓风箱内进行热应激 1 h 处理。1 h 后取出,此时大鼠的耳、爪、尾等暴露部位潮红,大量流涎,呼吸急促,四肢伸展,呈昏睡状态,表明大鼠已处于热损伤阶段。为避免昼夜节律对激素分泌及其受体的影响,各组动物完成实验程序后,均于早上 8:00 ~ 10:00 之间快速断头处死,取所需组织供实验用。

2.2 标本收集 建立大鼠热损伤模型后立即断头

处死大鼠,用冰冷的生理盐水从门静脉将肝内血液冲净,称取 4 g 肝组织,剪碎,按 1:3 加入匀浆缓冲液(W/V),匀浆。

2.3 肝、肺、肾细胞液 GR 结合性测定 以 [³H]地塞米松为配体,应用放射配体结合法测定肝、肺、肾细胞液 GR 结合活性。

2.4 血清 CS 含量测定 按照大鼠 CS 试剂盒(ELISA 法)操作步骤检测。

2.5 血清 ACTH 含量测定 按照大鼠 ACTH 试剂盒(RIA 法)操作步骤检测。

2.6 统计学处理 用 SPSS11.0 统计软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经方差齐性检验后,采用单因素多样本均数比较,两两比较采用 *q* 检验(Newman-Keuls 法)。

3 结果

3.1 大鼠肝细胞液 GR 的变化 见表 1。热应激后,模型组大鼠肝细胞液 GR 结合容量较空白对照组明显降低($P < 0.01$),生脉散组分配伍组明显高于模型组及生脉散饮片组($P < 0.01$)。

2.2 大鼠肺细胞液 GR 的变化 见表 1。热应激后,模型组肺细胞液 GR 结合容量低于($P < 0.01$),生脉散组分配伍组与生脉散饮片组明显高于模型组,配伍组有高于饮片组的趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 大鼠肾细胞液 GR 的变化 见表 1。热应激后,模型组、生脉散组分配伍组、生脉散饮片组大鼠肾细胞液 GR 结合容量均低于空白对照组($P < 0.01$),且 3 组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 大鼠血清中激素水平的变化 见表 2。正常大鼠的 CS 和 ACTH 水平分别为 66 ± 16 ng · mL⁻¹、 59 ± 18 pg · mL⁻¹,与其他各组差异均有统计学意义($P < 0.01$),但模型组、生脉散组分配伍组、生脉散饮片组组间均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 大鼠肝、肺、肾细胞液 GR 结合容量的变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 (生药 g · kg ⁻¹)	GR 结合容量 (fmol · mg ⁻¹ protein)		
		肝	肺	肾
正常对照组	—	308 ± 44 ¹⁾	226 ± 22 ¹⁾	124 ± 17 ¹⁾
模型组	—	226 ± 42	87 ± 9	75 ± 14
生脉散组分配伍组	2.87	360 ± 29 ¹⁾	130 ± 13 ¹⁾	83 ± 9
生脉散饮片组	2.87	254 ± 21 ²⁾	113 ± 13 ¹⁾	78 ± 9

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与生脉散组分配伍组比较,²⁾ $P < 0.01$ (下同)

表 2 大鼠血清 CS 及 ACTH 浓度的变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 (生药 $g \cdot kg^{-1}$)	CS ($ng \cdot mL^{-1}$)	ACTH ($pg \cdot mL^{-1}$)
正常对照组	—	$66 \pm 16^{(1)}$	$59 \pm 18^{(1)}$
模型组	—	113 ± 33	125 ± 20
生脉散组分	2.87	123 ± 26	110 ± 30
生脉散饮片组	2.87	121 ± 27	100 ± 25

4 讨论

20 世纪末,有学者研究发现阴虚证、阳虚证模型大鼠 GR 均存在一定程度的下降;我们在临床研究中也发现,GR 数量和结合位点在阴虚、阳虚证患者中也表现为明显下调,因此我们认为 GR 是阴虚、阳虚证可能的病理生理基础之一。下丘脑-垂体-肾上腺轴是神经内分泌系统的重要部分,肾上腺皮质激素对 GR 具有负反馈调节作用,GC 水平的升高往往会造成 GR 水平的下降。

组分配伍作为中药方剂配伍的新形式,具有诸多优点,但是其在疗效上与传统的饮片配伍方剂是否存在差异亦存在一定的争议。本研究仅从生脉散提高热损伤大鼠 GR 这一客观指标上,对二者的功效进行的比较。研究结果显示:生脉散组分配伍在提高肝胞液 GR 水平上优于饮片组,而在对肺泡、肾胞液 GR 的作用上,二者无明显差别;二者对 CS 和 ACTH 亦无明显影响。这一研究结果提示我们,生脉散组分配伍组成的方剂在提高热损伤大鼠 GR 水平上不输于,甚至略优于传统的饮片配伍。由于热应激可导致糖皮质激素受体 (GR) 结合活性下降^[3,5-6],在使用益气养阴的方剂治疗后其肝细胞液 GR 水平升高,根据中医以方测证的原理,该模型能够作为模拟中医气阴两虚证型的动物模型,而 GR 作为可能用于诊断阴虚证的一个微观指标,在一定程度上可反映阴虚证发生及其严重程度^[7]。从这个

角度上说,生脉散组分配伍的方剂在治疗气阴两虚证时,其疗效与饮片配伍的方剂亦略占优势。其原因,可能与组分配伍的方剂成分简单、清楚、疗效确切有关,尤其是人参皂苷是我们多年来研究发现的对提高 GR 有确切效果的药物成分。但由于我们所用的另外两味中药的提取物仍是总提物,其中的具体有效组分尚需做进一步的分析研究。并需进一步研究其与人参皂苷配伍后对 GR 乃至气阴两虚证其他指标、症状的作用效果,为中药方剂的现代化、客观化提供更多的依据。

[参考文献]

- [1] Schaaf MJ, Cidlowski JA. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance [J]. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2002, 83(1-5):37-48.
- [2] 凌昌全, 李敏, 卢军华, 等. 参附汤对失血性休克大鼠糖皮质激素及其受体的影响 [J]. 第二军医大学学报, 1996, 17(3):284-286.
- [3] 凌昌全, 李敏, 谭金兴, 等. 中药对糖皮质激素受体保护作用的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(5):302-303.
- [4] 王阶, 郭丽丽, 王永炎. 中药方剂有效成分(组)分配伍研究 [J]. 中国中药研究, 2006, 31(1):6.
- [5] 李敏, 凌昌全, 黄雪强, 等. 人参茎叶皂苷对热损伤大鼠不同脏器糖皮质激素受体的影响 [J]. 中西医结合学报, 2006, 4(2):156-159.
- [6] 李敏, 赵法伋, 郭俊生, 等. 加味生脉散对热损伤大鼠糖皮质激素及其受体的影响 [J]. 第二军医大学学报, 1996, 17(6):542-544.
- [7] 李勇. 糖皮质激素受体与虚证的关系及中药的调节 [J]. 中西医结合学报, 2004, 2(3):172-174.