

六味地黄丸血中移行成分对氢化可的松致大鼠肾虚动物模型的保护作用

王喜军^{1*}, 张 宁¹, 孙 晖¹, 李丽静², 吕海涛¹

(1. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 长春中医药大学药学院, 吉林 长春 130021)

[摘要] 目的: 通过研究六味地黄丸血中移行成分对氢化可的松致大鼠肾虚动物模型的保护作用, 阐明六味地黄丸补肾的药效物质基础。方法: 70 只大鼠随机分为空白组、模型组、总组分组、混合组分组、5-羟甲基-2-糠酸(5-HMFA)组、丹皮酚组和六味组共 7 个实验组, 按 5 mL/kg 体重连续 9 d 分别灌胃给予蒸馏水、蒸馏水、总组分药液、混合组分药液、5-HMFA 药液和丹皮酚药液; 第 5~9 天, 除空白组皮下注射生理盐水外, 其他各组按 5 mL/kg 体重每天皮下注射氢化可的松注射液 25 mg/kg, 于实验的第 10 天测定体重等 10 项评价指标。结果: 与模型组相比, 各给药组动物的检测指标均有明显改善, 其中莫诺昔、獐牙菜苷、马钱子苷的混合物组作用最显著。结论: 初步确定所分离得到的六味地黄丸的血中移行成分是六味地黄丸补肾的药效物质基础, 其中以莫诺昔、獐牙菜苷和马钱子苷的作用最为明显, 是补肾的核心成分。

[关键词] 六味地黄丸; 血中移行成分; 肾虚; 大鼠; 保护作用

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)02-0033-05

Protective Effect of Liuwei Dihuang Wan and its Constituents Absorbed into Blood After Oral Administration on Hydrocortisone Inducing Renal Deficiency in Rat

WANG Xi-jun^{1*}, ZHANG Ning¹, SUN Hui¹, LI Li-jing², LV Hai-tao¹

(1. School of Pharmacy of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;
2. School of Pharmacy of Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** To elucidate bioactive constituents for invigorating the kidney in Liuwei Dihuang Wan based on study on protective effect of Liuwei Dihuang Wan and its constituents absorbed into blood after oral administration on hydrocortisone inducing renal deficiency in rat. **Method:** Seventy rats were randomly divided into seven groups including control, model, total components, 5-HMFA, mixture containing morroniside, sweroside and loganin, paeonol and LW group. For continuous 9 days, every group rat was respectively orally administrated with distilled water, distilled water, total components, 5-HMFA mixture containing morroniside, sweroside and loganin, paeonol and LW, from 5 day to 9 day, control group rat was subcutaneously injected with sodium chloride at a dose of 5 ml/kg body weight, the other groups rat was subcutaneously injected with hydrocortisone at a dose of 25 mg/kg body weight (5 ml/kg). On 10th day, collected samples for analyzing 10 batches of indexes. **Result:** Every group drugs all improved such 10 batches of indexes in a large, the effect of mixture containing morroniside, sweroside and loganin group is most significantly. **Conclusion:** It

[收稿日期] 2007-07-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30572300)

[通讯作者] * 王喜军, Tel: (0451) 82110818; E-mail: wxj@hljuem.net

is found that determined constituents absorbed into blood after oral administration of Liuwei Dihuang Wan is mainly bioactive constituents for invigorating the kidney, and the bioactivities of morroniside, sweroside and loganin is most preferred.

[**Key words**] Liuwei Dihuang Wan; constituents absorbed into blood; renal deficiency; rat; Protective effect

六味地黄丸出自宋·钱乙《小儿药证直诀》，主治小儿“五迟”、“五软”等肾阴不足症，是滋阴补肾之首方。大量实验证明六味地黄丸对肾阴虚动物模型有明显的治疗作用^[1-3]，但其补肾的药效物质基础尚未阐明。在已往的研究中，本课题组采用中药血清药物化学的方法分析、分离并鉴定了六味地黄丸的 11 个血中移行成分^[4]。本研究拟用经典的氢化可的松肾阴虚大鼠模型，观察六味地黄丸血中移行成分的滋阴补肾作用，尝试寻找六味地黄丸补肾的药效物质基础。

1 材料

1.1 仪器 C200-2 高性能血凝仪；METTLER TOLEDO AG135 分析天平；KDC-160HR 高速冷冻离心机；Beckman DU640 分光光度计；MP-100 多导生理仪；FT630G 微机多探头放免测定仪；BLD5800 脉冲温度测试仪；日立 ky2000 型半自动生化分析仪；DY89-II 型电动玻璃匀浆机等。

1.2 药品与试剂 氢化可的松注射液(100 mg·20 mL⁻¹，扬州制药厂，20050926)；戊巴比妥钠(中国医药集团上海化学试剂公司，F20030816)；超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(20051115)，谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)试剂盒(20051113)，碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(20051215)均由南京建成生物工程研究所提供；游离甲状腺素(FT₄)放射免疫分析试剂盒、雌二醇(E₂)放射免疫分析试剂盒、血清睾酮(T)放射免疫分析试剂盒(维坊三维生物工程集团有限公司 20060225)；六味地黄丸血中移行成分，5-羟甲基-2-糠酸(5-HMFA)，经 HPLC 归一化法测定含量 ≥98%；莫诺昔(morroniside)、獐牙菜苷(sweroside)、马钱子苷(loganin)混合部位，经 HPLC 测定，马钱子苷含量为 26.75%，HPLC 归一化法确定三组分比例与原药材基本相同；丹皮酚，经 HPLC 归一化法测定含量 ≥98%；均由本实验室自制^[5]。

1.3 动物 健康雄性 Wistar 大鼠 70 只，体重(180 ± 20)g，黑龙江中医药大学动物中心提供，合格证号 P00102004。

2 实验方法

2.1 给药样品制备 取相应药材制备六味(LW)和成分加水配制成，“血中总成分组(Total Comp.)”药液，含丹皮酚 3 mg/mL，莫诺昔、獐牙菜苷和马钱子苷混合部位 8 mg/mL，5-HMFA 1 mg/mL；“莫诺昔、獐牙菜苷、马钱子苷混合部位(简称 Mix.)”药液，含莫诺昔、獐牙菜苷、马钱子苷混合部位 8 mg/mL；“5-HMFA”药液，含 5-HMFA 1 mg/mL；“丹皮酚(Paeon.)”药液，为丹皮酚 3 mg/mL 的 5% 吐温-80 水混悬液；另制备六味地黄丸组成药材的甲醇提取的水混悬液，作为“六味(LW)组”药液：相当于 2 g/mL 生药。

2.2 造模及给药 将实验动物在正常条件下饲养 1 周，随机分成空白组、模型组、Total Com. 组、Mix. 组、5-HMFA 组、丹皮酚组和 LW 组，共 7 个实验组，连续 9 d 分别灌胃给予蒸馏水、蒸馏水、“Total Comp.”药液剂量为 15 mg·kg⁻¹·d⁻¹、“Mix.”药液剂量为 40 mg·kg⁻¹·d⁻¹、“5-HMFA”药液剂量为 5 mg·kg⁻¹·d⁻¹、“Paeon.”药液剂量为 15 mg·kg⁻¹·d⁻¹和“LW”药液剂量为 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹；第 5~9 天，除空白组皮下注射生理盐水外，其他各组均每天皮下注射氢化可的松注射液剂量为 25 mg/kg 体重。

2.3 样品采集及指标测定 各组动物均于第 9 天晚禁食，测定肛温(5 min)，第 10 天用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后，称量体重，二导生理记录仪测定心率。由腹主动脉采血 7 mL，其中 4.5 mL 全血置普通生化采血管中，静置 20 min，3 000 r·min⁻¹离心 10 min，移取上层血清，利用相应试剂盒，用分光光度法测定血清 SOD，MDA，GSH-PX，NO，ALP，采用放免法测定血清 FT₃，FT₄，E₂，T，ET；1.5 mL 全血置肝素抗凝采血管中，3 000 r·min⁻¹离心 10 min，移取上层血浆，测定血浆黏度；1 mL 全血置含有 10% EDTA·Na₂ 15 mL 和抑肽酶 40 mL 普通离心管中，混匀，4 ℃ 下 3 000 r·min⁻¹离心 10 min，分离血浆，测定血浆 ET。采血后处死大鼠，立即摘取肾上腺、脾脏、胸腺、甲状腺、肾脏、睾丸，并称量湿重，按所取组织湿重/大鼠体重，计算脏器重量指数。

3 实验结果

3.1 对体重、体温及心率的影响 与正常组大鼠相

比, 肾阴虚模型大鼠体重明显下降 ($P < 0.01$), Total Comp, Mix. 和 5-HMFA 组均能改变肾阴虚模型大鼠体重下降的趋势, 使模型大鼠体重上升 ($P < 0.01$), LW 和 Paeon. 组有减缓模型大鼠体重下降的趋势 ($P < 0.05$), 但各给药组大鼠体重均没有恢复到正常组水平; 肾阴虚模型大鼠心率加快 ($P < 0.01$), 各给药组均能减缓模型大鼠心率 ($P < 0.01$), 使模型大鼠心率恢复到正常水平, 其中 Paeon. 组作用最明显 ($P < 0.01$) (图 2); 各组大鼠体温十分接近, 均无统计学意义。

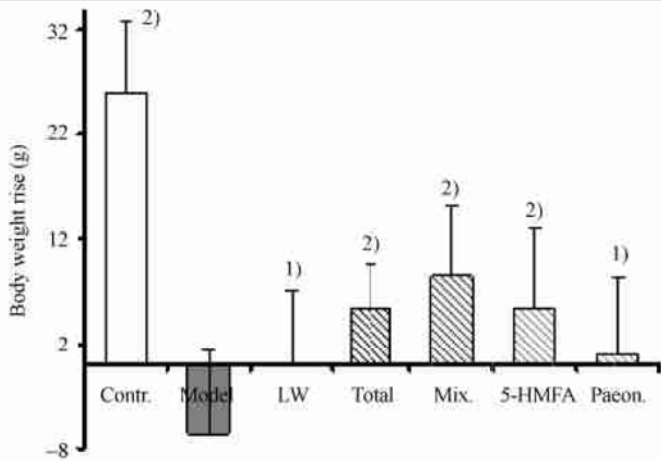


图 1 各给药组对模型大鼠体重的影响
与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

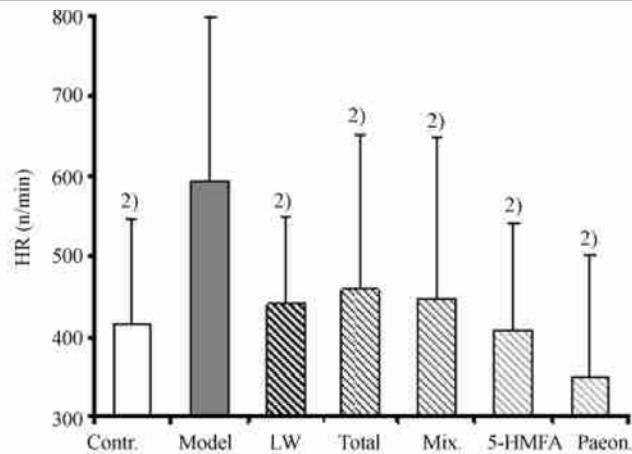


图 2 各给药组对模型大鼠心率的影响

3.2 对脏器重量指数的影响 与正常组大鼠相比, 肾阴虚模型大鼠胸腺指数明显下降 ($P < 0.01$), 各给药组均能减缓模型大鼠胸腺指数下降的幅度 ($P < 0.01$), 其中 LW, Mix. 和 5-HMFA 组作用更为明显, 但各给药组均未使模型大鼠胸腺指数恢复到正常水平 (图 3); 肾阴虚模型大鼠脾脏指数明显下降 ($P < 0.05$), 各给药组均能减缓模型大鼠脾脏指数下降的幅度, 其中 LW ($P < 0.01$) 和 Paeon. ($P < 0.05$) 组作用明显, 使模型大鼠脾脏指数恢复到正常水平 (图

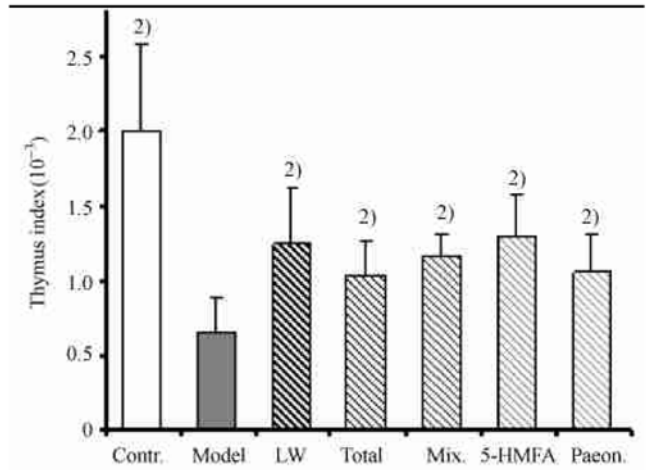


图 3 各给药组对模型大鼠胸腺指数的影响

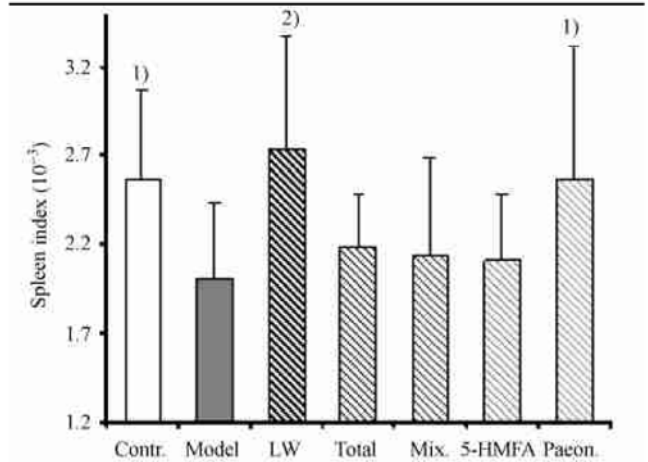


图 4 各给药组对模型大鼠脾脏指数的影响

4)。肾阴虚模型大鼠肾上腺指数稍有上升, LW, Total Comp, Mix. 组有回调的趋势, 而 5-HMFA 和 Paeon. 组较肾阴虚模型组反而略有上升, 各组间均无显著性差异。肾阴虚模型大鼠肾脏指数稍有上升, 各给药组有回调的趋势, 其中 5-HMFA 组回调较明显, 但各组间均无显著性差异。肾阴虚模型大鼠睾丸指数稍有上升, LW, Total Comp, Mix. 组有回调的趋势, 5-HMFA 和 Paeon. 组较肾阴虚模型组反而略有上升, 但各组间均无显著性差异。各组甲状腺指数均无显著性差异。

3.3 对血清 SOD、MDA 和 GSH-PX 的影响 与正常组大鼠相比, 肾阴虚模型大鼠血清 SOD 活力明显下降 ($P < 0.01$), Mix. 和 Paeon. 组与模型组相比血清 SOD 活力明显增加 ($P < 0.01$), 恢复到正常水平, 其他给药组与模型组相比血清 SOD 活力有增加的趋势, 但作用不显著 (图 5)。肾阴虚模型大鼠血清 GSH-PX 活力明显下降 ($P < 0.01$), Mix. 组与模型组相比血清 GSH-PX 活力明显增加 ($P < 0.05$), 恢复到正常水平, 其他给药组与模型组相比血清 GSH-PX 的活力没有被改善 (图 6)。

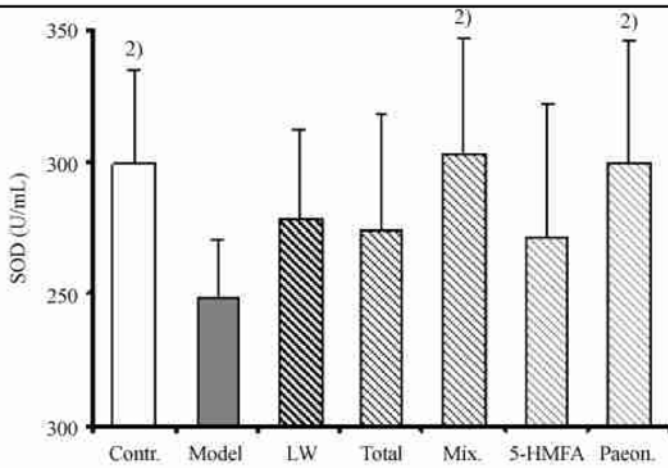


图 5 各给药组对模型大鼠血清 SOD 活力的影响

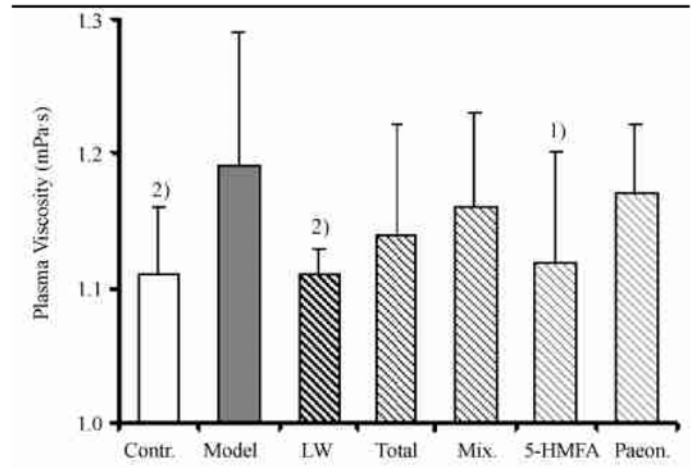


图 7 各给药组对模型大鼠血浆黏度的影响

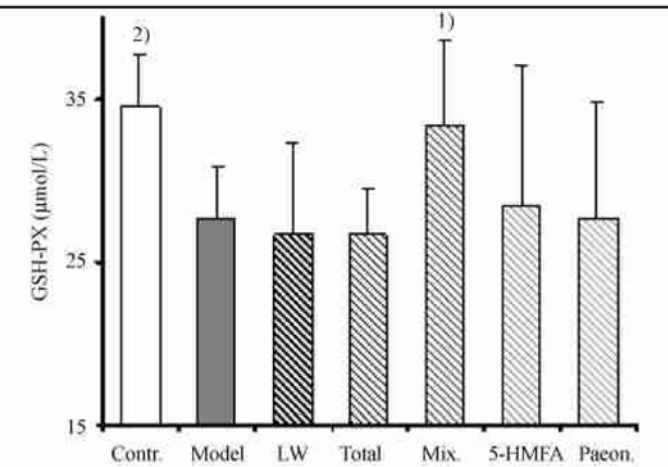


图 6 各给药组对模型大鼠血清 GSH-PX 活力的影响

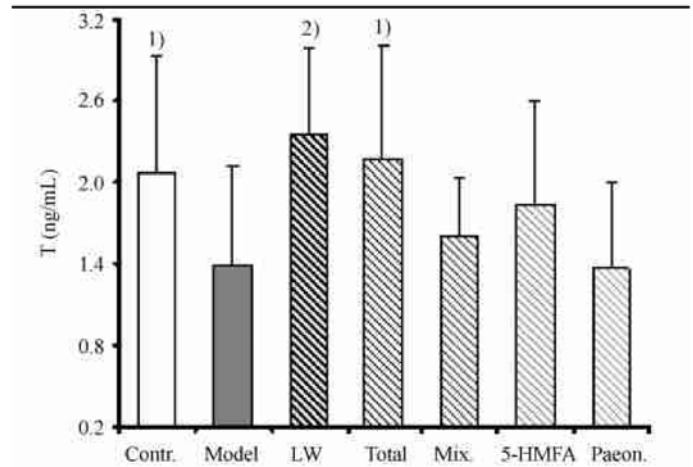


图 8 各给药组对模型大鼠血清 T 的影响

3.4 对血浆黏度及血清 NO, 血浆 ET 的影响 与正常组大鼠相比, 肾阴虚模型大鼠血浆黏度明显升高 ($P < 0.01$), 各给药组均能减小升高的幅度, 其中 LW ($P < 0.01$) 和 5-HMFA ($P < 0.05$) 组作用最明显, 使模型大鼠血浆黏度基本恢复到正常水平(图 7)。肾阴虚模型大鼠血清 NO 值下降, 各给药组均有回调的趋势, 其中 LW、Total Comp 和 Paeon. 组作用较强, 但因为 SD 过大, 各组间均无显著性差异。肾阴虚模型大鼠血清 ET 值有上升的趋势, 各给药组均未显示治疗作用, 各组间均无显著性差异。

3.5 对血清 E_2 , T 的影响 各组大鼠间血清 E_2 的水平无明显差异。与正常组大鼠相比, 肾阴虚模型大鼠血清 T 明显下降 ($P < 0.05$), 除 Paeon. 组外其他给药组均能使这种趋势回调, 其中 LW 组 ($P < 0.01$) 和 Total Comp 组 ($P < 0.05$) 组作用显著(图 8)。肾阴虚模型大鼠血清 E_2/T 值上升, 但因为 SD 过大, 与正常组大鼠相比无显著性差异, 各给药组均能使这种趋势回调, 其中 LW 组和 Total Com 组与模型组相比作用显著 ($P < 0.05$, 图 9)。

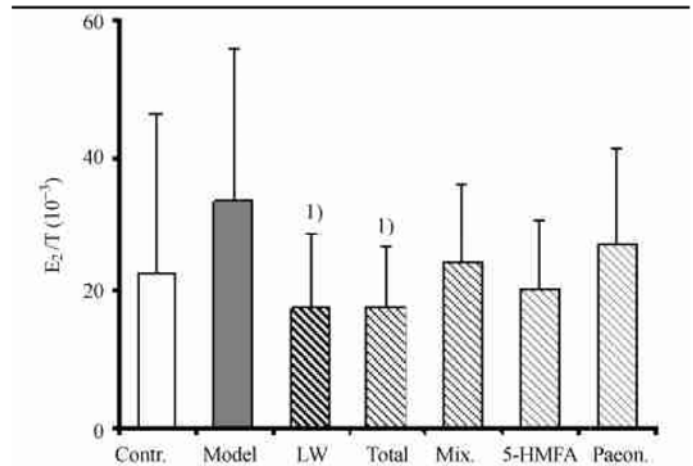


图 9 各给药组对模型大鼠血清 E_2/T 的影响

3.6 对血清 FT_3 , FT_4 和 ALP 的影响 与正常组大鼠相比, 肾阴虚模型大鼠血清 FT_4 明显升高 ($P < 0.01$), 各给药组均能降低模型大鼠血清 FT_4 , 其中 LW ($P < 0.01$), Total Comp ($P < 0.01$), 5-HMFA ($P < 0.01$), Paeon. ($P < 0.05$) 组作用明显, 使模型大鼠血清 FT_4 基本恢复到正常水平(图 10)。各组大鼠血清 FT_3 值均无显著差异。肾阴虚模型大鼠血清 ALP 值明显上升 ($P < 0.01$), 各给药组均能降低模型大鼠血

清 ALP 值, 其中 LW ($P < 0.05$), Total Com ($P < 0.01$) 和 Mix. ($P < 0.01$) 组作用明显, 使模型大鼠血清 ALP 值恢复到正常水平(图 11)。

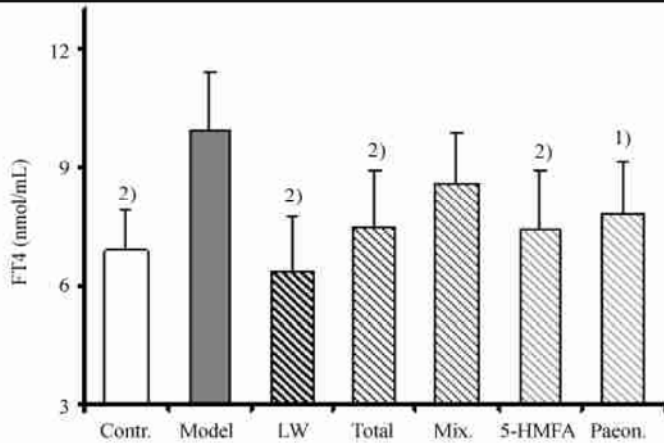


图 10 各给药组对模型大鼠血清 FT₄ 的影响

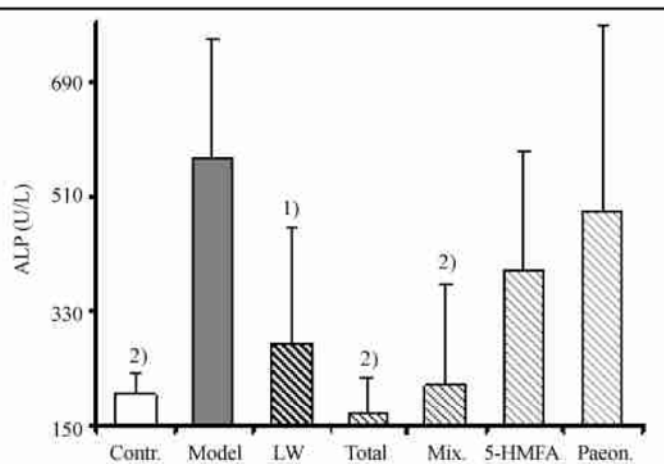


图 11 各给药组对模型大鼠血清 ALP 的影响

4 讨论

糖皮质激素肾阴虚模型的建立是基于许多肾阴虚患者存在肾上腺皮质功能亢进这一病理变化。大量的研究证实, 应用大剂量外源性糖皮质激素可导致实验动物的“耗竭”现象, 出现一系列“虚弱”症状。这种可的松模型被不断重复出来, 成为人们广泛采用并较为公认的“肾阴虚”动物模型之一。建立在该模型基础上的实验观察能客观地反映肾阴虚证患者体内的病理变化, 因此, 我们选用这种经典的“肾阴虚”动物模型来验证六味地黄丸血中移行成分的补肾作用。动物造模后出现毛无光泽、竖毛、食量减少、消瘦、拱背、反应迟钝、大便干结等现象, 并且, 体重下降、胸腺和脾脏重量指数下降、血清 SOD 和 GSH-PX 活力减低、血浆黏度上升、血清 FT₄ 升高、血清 T 下降、血清 E₂/T 值升高、血清 ALP 升高 10 项指标的改变, 与文献报道的肾阴虚动物模型表现基本一致, 证明造模成功^[6-8]。

本课题组已经分离得到了六味地黄丸的 11 个血中移行成分, 其中有 4 个是丹皮酚的代谢产物, 另外两个成分血中转移量小, 所以, Total Comp. 组药液基本上可以代表 11 个血中移行成分的作用。给药后 Total Comp. 组所有指标值均呈回调趋势, 除胸腺指数等 3 项指标外其余的都恢复正常, 同模型组相比, 体重增长值等 6 项指标显著改善, 表明已分离得到的血中移行成分虽然不能完全代表六味地黄丸的补肾作用, 但确实有明显的保护肾阴虚动物模型的作用, 是六味地黄丸补肾的主要药效物质基础。

Total Comp. 组, Mix. 组, 5-HMFA 组和丹皮酚组分别有 6 项 5 项 4 项和 5 项指标显著改善, 而且各组之间作用显著的指标并不重叠, 充分体现了中药复方多成分多靶点的作用特点, 成分之间存在着明显的相互协同或相互拮抗, 提示我们在以经典方剂为基础的新药开发过程中, 应该注意疗效定位准确, 成分搭配合理。

本实验初步找到了六味地黄丸补肾的药效物质基础, 是采用中药血清药物化学的方法阐明中药复方药效物质基础又一成功范例, 既丰富了中药血清药物化学实践, 又为举步维艰的补肾方药的现代化开发提供了借鉴。

[参考文献]

- [1] 杜标炎, 徐勤, 罗惠, 等. 六味地黄汤抗糖皮质激素所致小鼠胸腺萎缩的病理学研究[J]. 广州中医药大学学报, 1999, 16(2): 111-113.
- [2] 徐勤, 杜标炎, 罗惠, 等. 六味地黄汤对糖皮质激素肾阴虚模型免疫器官淋巴细胞凋亡的抑制作用(II)[J]. 广州中医药大学学报, 2000, 17(3): 207-208.
- [3] 傅万山, 丁伯平, 杨解人. 六味地黄丸对甲亢型肾阴虚大鼠滋阴作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(5): 16-18.
- [4] 王喜军, 张宁. 六味地黄丸的血清药物化学研究[J]. 中国天然药物, 2004, 2(4): 219-222.
- [5] 李满郁, 王喜军. 山茱萸富集产物中血中移行成分的含量测定[J]. 中医药学报, 2005, 33(3): 4-6.
- [6] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 490.
- [7] 陈主初. 实验动物学[M]. 长沙: 湖南科技出版社, 2001. 163.
- [8] 郭文娟, 严惠芳, 张登本. 肾阴虚证现代研究的回顾[J]. 陕西中医学院学报, 2003, 26(3): 49-51.