

• 药理 •

# 六味地黄汤对皮质酮所致小鼠下丘脑-垂体-卵巢轴紊乱的调节作用及其拆方研究

马 渊, 周文霞, 程军平, 张永祥  
(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

**摘要:**目的: 研究比较六味地黄汤全方(LW)及其拆方三补(地黄、山茱萸、山药)和三泻(茯苓、泽泻、牡丹皮)对下丘脑-垂体-卵巢(HPO)轴的调节作用。方法: 以肌肉注射外源性皮质酮(CORT)导致小鼠 HPO 轴功能紊乱为模型, 用放射免疫分析法检测血清雌二醇浓度及下丘脑促性腺激素释放激素(GnRH)含量, 用 Western blot 检测垂体促黄体生成素(LH)水平。结果: 肌注 CORT 导致小鼠体重下降、卵巢重量减少, 血清雌二醇、垂体 LH 及下丘脑 GnRH 水平下降, 口服 LW(5、10、15g/kg)对 CORT 所致的血清雌二醇、垂体 LH 及下丘脑 GnRH 水平下降具有不同程度的改善作用。LW 及大、中剂量(9.6、6.4g/kg)三补对模型小鼠卵巢重量减轻的趋势无明显改善作用, 而三泻及小剂量三补(3.2g/kg)却使小鼠卵巢重量进一步下降, 单独应用三补和三泻对 CORT 处理小鼠血清雌二醇和垂体 LH 水平无明显调节作用。结论: 外源性 CORT 导致小鼠 HPO 轴功能紊乱, LW 对 CORT 所致的 HPO 轴功能紊乱具有改善作用, 三补和三泻的作用不如 LW, 单独应用时存在产生不良反应的可能性。

**关键词:** 六味地黄汤(LW); 三补; 三泻; 下丘脑-垂体-卵巢(HPO)轴; 促性腺激素释放激素(GnRH)

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2005)02-0028-05

## Effects of Liuwei Dihuang Decoction and Its Decomposed Recipes on Hypothalamus-pituitary-ovary Axis in Corticosterone Administrated Mice

MA Yuan, ZHOU Wen-xia, CHENG Jun-ping, ZHANG Yong-xiang

(Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China)

**Abstract:** Objective: To investigate the effects of Liuwei Dihuang decoction(LW) and its decomposed recipes on hypothalamus-pituitary-ovary(HPO) axis in corticosterone administrated mice. Methods: Radioimmunoassay(RIA) was used to test the concentrations of hypothalamus gonadotropin-releasing hormone(GnRH) and serum estradiol, the western blot technique was employed to quantify the level of luteinizing hormone(LH) in the pituitary. Results: The body weights and ovary weights of CORT administrated mice were markedly decreased. Meanwhile, the concentrations of serum estradiol, pituitary LH and hypothalamal GnRH in CORT treated mice were significantly decreased. Oral administration of LW showed little effect on the body and ovary weights in CORT administrated mice, but showed significantly improving effects on the levels of serum estradiol, pituitary LH and hypothalamous GnRH. Oral administration of three purgative(5.4g/kg) decreased body weight of tested mice even further, while administration of three purgative(1.8, 3.6, 5.4g/kg) or three tonic(3.2g/kg) induced further decrease on ovary weight of tested mice. The decomposed recipes of LW are no longer effective in ameliorating hormone secretion of HPO axis. Conclusion: Administration of CORT induced malfunction of HPO axis, and LW improved or restored the disturbance of HPO axis in CORT treated mice. The decomposed recipes of LW are no longer effective in ameliorating malfunction of HPO axis, indicating that there were co-operations among components of LW.

**Key words:** Liuwei Dihuang(LW) decoction; Three tonic; Three purgative; Hypothalamus-pituitary-ovary(HPO) axis; Gonadotropin-releasing hormone(GnRH)

收稿日期: 2004-05-09

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(G199054401)

通讯作者: 张永祥, Tel: (010) 66930151, FAX: (010) 68211656, E-

mail: zhangyx@nic.bmi.ac.cn

六味地黄汤(LW)是中医滋补肾阴的经典名方, 临床上用于上百种疾病的治疗, 如糖尿病、高血压等, 对于性功能障碍, 更年期综合征、儿童性早熟等生殖内分泌相关疾病亦具有显著疗效<sup>[1]</sup>。LW 的组方特点是三补三泻。其中熟地、山茱萸和山药组成

三补, 泽泻、牡丹皮和茯苓组成三泻。原则是以补肾为主, 兼补肝脾, 使“三补三泻”在功能上成为一个有机的整体, 具有滋补而不留邪、降泻而不伤正, 以补为主, 泄中寓补的特点。

我室多年来从神经内分泌免疫调节网络的角度对 LW 的作用机理及物质基础进行了研究, 发现 LW 及其活性成分对神经内分泌免疫网络失衡具有纠正作用<sup>[2,3]</sup>。下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴是神经内分泌免疫调节网络的重要组成部分, LW 是否也会通过调节 HPG 轴的平衡来发挥药理作用呢? 到目前为止, 实验药理学尚未对此进行过深入研究。

本文试图以肌肉注射外源性 CORT 导致小鼠 HPO 轴紊乱为模型, 从 LW 配伍理论的角度出发, 研究比较 LW 与三补和三泻对 HPO 轴的调节作用, 旨在探讨 LW 配伍对于其调节生殖内分泌功能作用的现代药理学意义, 为揭示 LW 配伍组方的科学意义提供实验药理学依据。

## 1 材料

**1.1 动物及分组** Balb/c 小鼠, 雌性, 6~8 周龄, 军事医学科学院动物中心提供, 饲养室温度 18~22℃, 随意进食和饮水。随机分为以下各组: 正常对照组, 每日以蒸馏水灌胃并肌注生理盐水; 肌注 CORT 模型组, 每日灌服蒸馏水并后肢肌注 CORT 混悬液(25mg/kg); 给药组, 分别按剂量灌服 LW、三补及三泻并肌肉注射 CORT 混悬液(25mg/kg), 每组 15~17 只小鼠。

**1.2 药品** 六味地黄由熟地、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮和茯苓, 按 8:4:4:3:3:3 的比例混合, 加水浸泡 12h, 以 600mL/100g 生药的比例加水煎煮两次, 每次 2h, 过滤后合并煎液, 浓缩至 1g 生药/mL 备用。三补和三泻: 分别取熟地、山茱萸、山药(三补)和泽泻、牡丹皮、茯苓(三泻)按 2:1:1 和 1:1:1 的比例混合, 加水浸泡 12h, 以 600mL/100g 生药的比例加水煎煮两次, 每次 2h, 过滤后合并煎液, 浓缩至 1g 生药/mL 备用。

**1.3 仪器** 20PR-5 型低温离心机, 高速冷冻离心机, HITACHI; HV300 多用电泳仪, 小型垂直电泳槽, 北京东方仪器厂; 凝胶扫描成像图像分析仪, Kodak 公司;  $\gamma$ -计数器, LKB 公司。

**1.4 试剂** CORT 为 FARCO CHEMICAL 公司产品; <sup>125</sup>I-雌二醇检测试剂盒为天津协和生物技术研究所产品; GnRH 检测试剂盒为中国人民解放军海军放射免疫技术研究所产品; 山羊抗鼠促黄体生成素

(LH) 多克隆抗体购自美国 Santa cruz 公司; 辣根酶标记抗山羊 IgG 购自北京中山生物技术有限公司。

## 2 方法

**2.1 动情周期同步化** 生理盐水溶解孕马血清促性腺激素(PMSG)配制成 120IU/mL 的溶液, 取 0.1mL (12IU/只)腹腔注射, 48h 后取小鼠阴道涂片, 确定动情周期是否同步于动情期。

**2.2 肌肉注射 CORT 试验** 动物分组及动情期同步化后分别灌胃给予蒸馏水或相应中药(六味地黄汤 5、10、15g/kg, 按全方给药剂量折算相应三补与三泻的剂量), 7d 后开始肌注生理盐水或 CORT 混悬液, 于给 CORT 第 5 天(实验开始的第 12 天)选处于动情间期的小鼠, 断头处死, 取下丘脑、垂体、卵巢于液氮中冻存, 分离血清于 -70℃冰箱保存。

**2.3 放射免疫法检测血中雌二醇、下丘脑 GnRH 含量** 每只鼠取血清 200 $\mu$ L 检测雌二醇浓度, 血清量不足的动物将血清合并后检测。每组合并 3~5 只小鼠的下丘脑(约 40mg)进行肽提取及 GnRH 检测, 具体操作步骤按实验说明书进行。

**2.4 蛋白免疫印记杂交检测垂体 LH 含量** 取同组 4~5 只小鼠的垂体(约 4~5mg)准确称重后投入细胞裂解液中, 用眼科剪剪碎, 加入胃蛋白酶抑制剂、胰蛋白酶抑制剂及 PMSF, 于冰上作用 30min, 加 0.5mL 2 $\times$  上样缓冲液, 100℃煮沸 5min, 使蛋白变性, 每组制备 2 份蛋白样品。蛋白质聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳、半干转印、杂交及特异条带扫描过程按已有文献进行<sup>[4]</sup>。

**2.5 统计学处理** 实验数据用平均值  $\pm$  标准差(mean  $\pm$  SD)表示, 多组间比较用 ANOVA Dunnett 检验,  $P < 0.05$  时差别有统计学意义。

## 3 实验结果

**3.1 LW 对肌注 CORT 小鼠 HPO 轴功能的影响**

**3.1.1 LW 对肌注 CORT 小鼠体重和卵巢重量的影响** 肌注 CORT 3d 后小鼠体重开始下降, 肌注 5d 体重明显下降, 卵巢重量有下降趋势, 但与对照组比较无统计学意义( $P > 0.05$ )。口服 LW(5、10、15g/kg)对模型动物体重和卵巢重量没有明显影响。见表 1、图 1A。

**3.1.2 LW 对肌注 CORT 小鼠 HPO 轴激素水平的影响** 与对照组比较, 肌注 CORT 5d 后小鼠血清雌二醇浓度、垂体 LH 及下丘脑 GnRH 水平显著下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 口服 LW 10、15g/kg 能明显升高 CORT 处理小鼠血清雌二醇和垂体 LH 水平( $P <$

0.01),口服给予 LW 10g/kg 可以升高 CORT 处理小鼠下丘脑 GnRH 含量( $P < 0.05$ )。见图 1。

表 1 LW 对肌注 CORT 小鼠体重的影响

组别	给药剂量 (g/kg)	n	体重(g)		
			第 1d	第 3d	第 5d
CON	—	17	20.1±1.0	20.4±1.1	20.4±1.0
CORT	—	15	19.8±0.9	19.5±0.9 <sup>1)</sup>	19.1±0.9 <sup>2)</sup>
LW	5	15	19.9±1.0	19.9±1.1	19.3±1.1
	10	15	20.0±1.3	19.9±1.4	19.0±1.0
	15	15	19.2±0.8	19.3±0.9	19.4±1.1

注:与 CON 比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

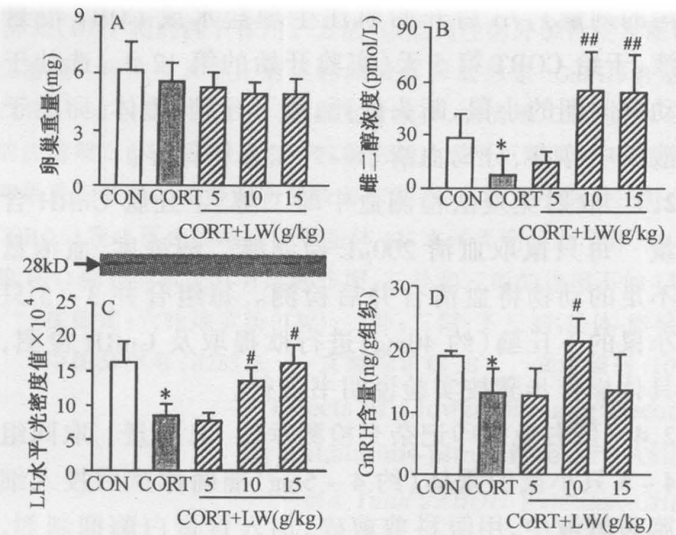


图 1 LW 对肌注 CORT 小鼠 HPO 轴功能的影响

注:与 CON 比较,\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ;与 CORT 处理组比较,#  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。

### 3.2 三补三泻对肌注 CORT 小鼠 HPO 轴功能的影响

#### 3.2.1 三补三泻对肌注 CORT 小鼠体重和卵巢重量的影响

肌注 CORT 3d 后小鼠体重开始下降,肌注 5d 体重明显下降,与对照组比较差别显著( $P < 0.01$ )。口服 LW5g/kg 及三补对小鼠体重下降无明显改善作用;口服给予 1.8g/kg、3.6g/kg 三泻对模型小鼠体重下降亦无明显改善作用,但口服三泻 5.4g/kg 使模型小鼠体重进一步下降,与模型组比较差异显著( $P < 0.01$ )。见表 2。

肌注 CORT 5d 后小鼠卵巢重量有下降趋势,但与对照组比较无统计学意义( $P > 0.05$ )。口服给予 LW 5g/kg 及大、中剂量三补均对卵巢重量无明显影响,而低剂量三补及各剂量三泻使卵巢重量进一步下降,与模型组比较差异显著( $P < 0.01$ )。见图 2A。

#### 3.2.2 三补三泻对肌注 CORT 小鼠 HPO 轴激素水平的影响

与对照组比较,肌注 CORT 5d 时小鼠血清雌二醇和垂体 LH 水平显著下降( $P < 0.05$ ),口服

给予 LW 5g/kg 能升高肌注 CORT 小鼠血清雌二醇水平,但没有统计学意义( $P > 0.05$ )。而 LW 的拆方三补和三泻对模型小鼠血清雌二醇水平没有明显影响。口服给予 LW 5g/kg 可以纠正 CORT 所致小鼠垂体 LH 水平的下降( $P < 0.05$ ),中剂量三补和大剂量三泻也能升高模型小鼠垂体 LH 水平,但小剂量三泻却使垂体 LH 水平与模型组比较进一步降低,但均无统计学差异( $P > 0.05$ )。见图 2。

表 2 三补三泻对肌注 CORT 小鼠体重的影响

组别	给药剂量 (g/kg)	n	体重(g)			
			第 1d	第 3d	第 5d	
CON	—	16	18.8±0.8	18.7±0.8	19.3±1.0	
CORT	—	15	18.9±1.2	17.7±1.0	16.8±0.8 <sup>2)</sup>	
LW	5	16	18.2±1.0	17.3±0.6	17.0±0.6	
	三补	3.2	16	18.0±1.0	17.0±1.0	16.5±0.8
		6.4	15	18.2±1.0	17.1±1.1	16.7±1.0
9.6		16	18.2±1.2	17.1±1.0	16.8±0.9	
三泻	1.8	16	18.3±1.8	16.6±1.4	16.2±1.2	
	3.6	15	18.6±1.6	17.0±1.4	16.3±1.3	
	5.4	16	18.2±1.6	16.5±1.5 <sup>3)</sup>	15.4±1.3 <sup>4)</sup>	

注:与 CORT 处理组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ; <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。

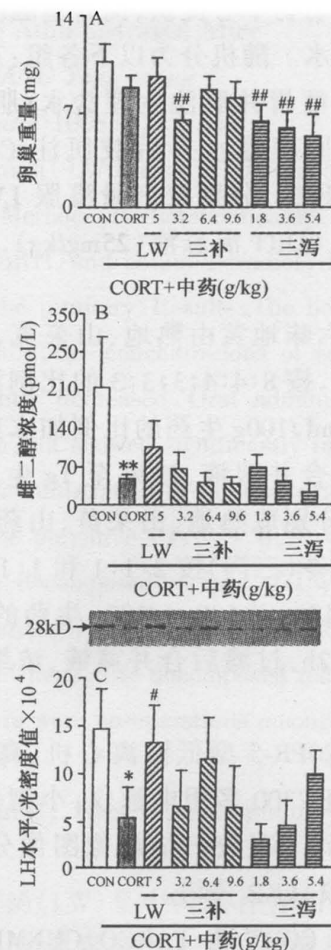


图 2 三补三泻对肌注 CORT 小鼠 HPO 轴功能的影响

注:与 CON 比较,\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与 CORT 处理组比较, $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

#### 4 讨论

CORT 是下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴在应激过程中释放的主要效应分子,外源性给予 CORT 可以在 HPG 轴的多个环节对其产生抑制作用<sup>[5-7]</sup>。大量临床研究表明,应激等因素导致的 HPA 轴长时间兴奋特别是糖皮质激素水平持续升高可对机体多种生理功能产生损害,并与生殖功能紊乱密切相关<sup>[8]</sup>。实验研究也发现,CORT 可从下丘脑、垂体、性腺多个环节对 HPG 轴产生抑制作用,导致实验动物下丘脑 GnRH<sup>[9]</sup>、垂体 LH<sup>[10]</sup>、血清性激素水平下降<sup>[11]</sup>,并可诱导体外培养的性腺细胞凋亡<sup>[11,12]</sup>。

本研究结果表明,肌注 CORT 可使小鼠体重下降、卵巢重量降低,说明外源性 CORT 导致小鼠的性腺功能受到明显抑制,测定 HPO 轴各环节激素水平发现,血清雌二醇、垂体 LH、下丘脑 GnRH 水平均明显下降,提示外源性 CORT 使小鼠 HPO 轴在多环节多水平受到了抑制,与文献报道的结果相一致。口服给予 LW 能明显纠正外源性 CORT 肌肉注射所致小鼠血清雌二醇浓度的下降,同时能明显改善或纠正垂体 LH 及下丘脑 GnRH 水平的低下,提示 LW 对 HPO 轴紊乱具有明显调节作用,能显著改善 CORT 处理小鼠的生殖内分泌功能。

中医理论认为 LW 组方中的三补三泻各司其职、各尽其能。本研究结果表明,与 LW 全方比较,三补及小、中剂量三泻(相当于全方 5、10g/kg 所含的三泻量)对模型小鼠体重下降均无明显改善作用,但大剂量三泻(相当于全方 15g/kg 所含的三泻量)却使小鼠体重进一步下降;中、大剂量三补(相当于全方 10、15g/kg 所含的三补量)对模型小鼠卵巢重量减轻的趋势无明显改善作用,而三泻及小剂量三补(相当于全方 5g/kg 所含的三补量)却使小鼠卵巢重量进一步下降,提示三补和三泻对 CORT 所致小鼠体重及性腺重量下降无改善作用,单独应用时存在产生不良反应的可能性,三泻所致卵巢重量下降的原因及性质不明,有待进一步研究阐明。对 HPO 轴激素的检测结果表明,三补和三泻对外源性 CORT 导致的小鼠 HPO 轴激素分泌紊乱的调节作用明显降低,进一步提示三补和三泻的协同作用是 LW 调节 HPO 轴功能的重要基础,而三补的作用更近似于 LW 全方的效应,在 LW 中可能发挥主要作用,三泻对三补起辅助和补充作用。对于 LW 调节性腺功能的作用而言,三补和三泻配伍后不仅可产生协同作用,同时又可通过相互制约降低毒副作用的产生,我们的研究

结果与以往对 LW 免疫调节活性的拆方研究结果相近<sup>[13]</sup>。

基于上述初步研究的结果,可以认为,LW 全方对 CORT 所致的 HPO 轴功能紊乱具有明显的改善或调节作用,其拆方组分未表现出明显的调节作用。可见,全方在药效强度、潜在的毒副作用等方面优于单用三补或三泻。三补和三泻配伍后可产生协同或相互制约作用,充分体现了 LW 配伍具有的高度科学内涵。然而,由于中药方剂是一个复杂体系,作用环节多,机理复杂,而目前我们所进行的拆方研究还是初步的,所获得的信息量也是有限的,进一步的深入研究尚在进行当中。

#### 参考文献:

- [1] 杨继红. 六味地黄汤治疗更年期综合征 50 例报告[J]. 中华中西医杂志, 2001, 2(1): 68.
- [2] 齐春会, 张永祥, 沈倍奋. 六味地黄方现代药理学研究新进展[J]. 军事医学科学院院刊, 2002, 26(1): 57-61.
- [3] 聂伟, 张永祥. 六味地黄方的现代药理学研究进展[J]. 中药药理与临床, 1998, 14(5): 41-44.
- [4] 马渊等, 周文霞, 程军平, 等. 六味地黄汤对悬吊应激小鼠下丘脑-垂体-卵巢轴激素分泌功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(6): 18-21.
- [5] Nyska A, Hester SD, Cooper RL, et al. Single or group housing altered hormonal physiology and affected pituitary and interstitial cell kinetics al[J]. J Toxicol Sci, 2002, 27(5): 449-457.
- [6] Li XF, Mitchell JC, Wood S, et al. The effect of oestradiol and progesterone on hypoglycaemic stress-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone release and on corticotropin-releasing hormone mRNA expression in the rat [J]. J Neuroendocrinol, 2003, 15(5): 468-476.
- [7] Tsai PS, Lunden JB, Jones JT. Effects of steroid hormones on spermatogenesis and GnRH release in male Leopard frogs, Rana pipiens[J]. Gen Comp Endocrinol, 2003, 134(3): 330-338.
- [8] Saketos M, Sharma N, Santoro NF. Suppression of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis in normal women by glucocorticoids[J]. Biol Reprod, 1993, 49(6): 1270-1276.
- [9] Calogero AE, Burrello N, Bosboom AM, et al. Glucocorticoids inhibit gonadotropin-releasing hormone by acting directly at the hypothalamic level[J]. Endocrinol Invest, 1999, 22(9): 666-670.
- [10] Suter DE, Schwartz NB, Ringstrom SJ. Dual role of glucocorticoids in regulation of pituitary content and secretion of gonadotropins[J]. Am J Physiol, 1988, 254(5): 595-600.

- [ 11] Gao HB, Tong MH, Hu YQ, et al. Glucocorticoid induces apoptosis in rat leydig cells[ J]. *Endocrinology*, 2002, 143( 1) : 130-138.
- [ 12] Gohel A, McCarthy MB, Gronowicz G. Estrogen prevents glucocorticoid-induced apoptosis in osteoblasts in vivo and in

vitro[ J]. *Endocrinology*, 1999, 140( 11) : 5339-5547.

- [ 13] 龚婕定, 马健, 樊巧珍, 等. 六味地黄汤及拆方对大鼠巨噬细胞 ADCC 活性的影响[ J]. *中国实验方剂学杂志*, 1997, 3( 6) : 23-25.