

六味地黄汤及“补泻”药对对肾阴虚模型小鼠下丘脑-垂体-性腺轴功能的影响

张嘉妮¹, 李玉星¹, 杨梦琳¹, 肖子曾¹, 戴冰^{2*}, 肖望重², 欧阳林旗² (1.湖南中医药大学, 长沙 410208; 2.湖南中医药大学附属第一医院, 长沙 410007)

摘要: 目的 观察六味地黄汤及其3个“一补一泻”药对对肾阴虚模型小鼠下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴功能及性腺组织形态的影响。方法 将60只小鼠随机分为空白对照组、模型组、六味地黄汤组、山茱萸-牡丹皮组、熟地黄-泽泻组、山药-茯苓组共6个试验组;连续9d分别灌胃给予以上对应药物;第5~9天,除空白对照组灌胃蒸馏水外,其他各组按50 mg·kg⁻¹体重每天灌胃氯化可的松注射液建立模型,用ELISA法检测血浆环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)含量,用放射免疫分析法检测促卵泡素(FSH)、雌二醇(E2)及睾酮(T)含量,并用HE染色法观察性腺(睾丸、子宫)病理切片。结果 与空白对照组比较,肾阴虚模型小鼠血浆cAMP含量升高,血浆cGMP及血清FSH、E2、T含量降低,有显著性差异($P<0.01$),性腺组织受损;与模型组比较,六味地黄汤组及山茱萸-牡丹皮药对组均能上调肾阴虚小鼠血浆cGMP及血清FSH、E2、T含量,下调血浆cAMP含量,有显著性差异($P<0.05$, $P<0.01$),修复性腺组织,其中山茱萸-牡丹皮药对药效略低于六味地黄汤,而熟地-泽泻药对及山药-茯苓药对对肾阴虚小鼠基本无影响。结论 六味地黄汤能改善肾阴虚证,并对其引起的HPG轴功能紊乱有调节作用,其中仅山茱萸-牡丹皮药对的作用更近似于全方,可能是全方改善肾阴虚证的主要药效组成部分;说明3个“一补一泻”药对的协同作用是六味地黄汤调节HPG轴功能的重要基础,从而产生了六味地黄汤的综合作用,体现了其全方配伍高度的科学内涵。

关键词: 六味地黄汤;“补泻”药对;肾阴虚模型;下丘脑-垂体-性腺轴

中图分类号: R285.4

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)01-0025-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.01.007

Effects of Liuwei Dihuang Decoction and “Reinforcing and Reducing” Herb Couples on HPG Axis in Kidney Yin Deficiency Mice

ZHANG Jiani¹, LI Yuxing¹, YANG Menglin¹, XIAO Zizeng¹, DAI Bing^{2*}, XIAO Wangzhong², OUYANG Linqi² (1.Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2.The First Affiliated Hospital to Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effect of Liuwei Dihuang Decoction and three “reinforcing and reducing” herb couples on hypothalamus-pituitary-gonad (HPG) axis and morphologic changes of the gonad in kidney Yin deficiency mice. **METHODS** The mice were randomly divided into six experimental groups: blank group, model group, Liuwei Dihuang decoction group, Corni Fructus-Moutan Cortex couple group, Rehmanniae Radix Praeparata couple group and Dioscoreae Rhizoma-Poria couple group. The rats were gavaged with oral administration of corresponding medicines for 9 days. On 5–9 d, in addition to the blank group were given distilled water, the other groups were gavaged with hydrocortisone injection per day according to 50 mg·kg⁻¹ body weight. The contents of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and follicle-stimulating hormone (FSH), estradiol (E2), testosterone (T) were determined by ELISA and radio immunoassay, gonad was observed. **RESULTS** Compared with blank group, the plasma cAMP, serum FSH, E2, T contents were increased, while plasma cGMP in kidney Yin deficiency were decreased, the difference was statistically significant ($P<0.01$); gonad tissue damaged. Compared with model group, Liuwei Dihuang decoction and Corni Fructus-Moutan Cortex moutan couple group could increase plasma cGMP, serum FSH, E2, T contents and decrease the plasma cAMP contents ($P<0.05$ or $P<0.01$), the damaged gonad tissue were repaired. **CONCLUSION** Liuwei Dihuang decoction could improve kidney Yin deficiency syndrome and regulate the dysfunction of HPG axis, while only Corni Fructus-Moutan Cortex couple is approximate to the whole function; it illustrated that the synergistic action of three “reinforcing and reducing” herb couples are the important basis of Liuwei Dihuang decoction to regulate the HPG axis, which reflects the scientific connotation of the compatibility of the whole herbs.

KEY WORDS: Liuwei Dihuang decoction; “reinforcing and reducing” herb couple; kidney Yin deficiency model; hypothalamus-pituitary-gonad axis

基金项目: 湖南省教育厅科学研究项目(15A140); 2016年湖南中医药大学研究生科研创新课题(2016CX16)

作者简介: 张嘉妮, 女, 硕士生 Tel: 15570883815 E-mail: 463689930@qq.com *通信作者: 戴冰, 女, 主任药师, 教授 Tel: 15973157636 E-mail: db0223@163.com

肾阴虚是指因病久亏损,或素体阴虚,或失血耗液,暗耗真阴,或过服温燥劫阴之品所致的病症。现代医学认为,生殖系统的功能受下丘脑-垂体-性腺(hypothalamus-pituitary-gonad, HPG)轴神经内分泌调节,且发现这种调节作用与中医“肾”的功能关系密切,肾阴虚者往往表现为垂体功能亢进,而卵巢、睾丸功能不足或衰退造成性激素水平低落^[1],故通过调节 HPG 轴可改善肾阴虚,从而达到补肾的目的。

六味地黄方是宋代钱乙《小儿药证直诀》中记载的著名滋阴补肾方剂,临床适用由于肾阴虚而引起的肾阴亏损、腰膝酸软、盗汗遗精等病候,且目前有大量实验和临床治疗证实六味地黄汤对改善肾阴虚证具有良好的疗效。六味地黄汤组方严谨,根据相反相成理论全方可拆成“一补一泻”,即熟地黄-泽泻、山茱萸-丹皮、山药-茯苓。但目前关于其拆方的研究都仅从其“三补三泻”的角度来探讨,单纯研究六味地黄汤中的“三补”和“三泻”,仅分开探讨了其滋补和降泻的作用,并未体现六味地黄汤组方补与泻的一一对应,补泻并用的配伍原则,因此有必要对其“一补一泻”拆方进行研究。

本实验以氢化可的松致小鼠肾阴虚为模型,从六味地黄汤“一补一泻”配伍理论的角度出发,研究比较六味地黄汤全方与其 3 个“一补一泻”药对对肾阴虚小鼠 HPG 轴的调节作用,旨在明确六味地黄汤中补肾作用最佳的药对,为阐明该方配伍的科学内涵和作用机制提供理论依据,使组分得以精简,药效更为确切。

1 材料

1.1 试验药物

熟地黄(批号:CS14120109)、酒山茱萸(批号:NG14122602)、山药(批号:CS15020203)、牡丹皮(批号:NG15030903)、盐泽泻(批号:SH15040701)和茯苓(批号:JC15051201)均由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供。按六味地黄方(熟地黄 24 g,山茱萸 12 g,山药 12 g,牡丹皮 9 g,泽泻 9 g,茯苓 9 g)称取原药材 4 付,再按六味地黄方中各药对的比例,分别称取山茱萸-牡丹皮药对,熟地黄-泽泻药对和山药-茯苓药对,各 2 付,各组药材均加 6 倍量水,浸泡 30 min,煎煮 2 次,每次 30 min,合并 2 次滤液并水浴浓缩,均得最终

生药浓度为 $1.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓缩液。

1.2 动物

清洁级健康昆明小鼠 60 只,♀♂各半,体重 $(20 \pm 2) \text{ g}$,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2011-0003,饲养于湖南中医药大学实验动物中心。

1.3 试剂

氢化可的松注射液(安阳九州药业有限责任公司,批号:140820001A)。促卵泡激素(follicle-stimulating hormone, FSH)放射免疫分析试剂盒(批号:150820)、雌二醇(estradiol, E2)放射免疫分析试剂盒(批号:150820)、睾酮(testosterone, T)放射免疫分析试剂盒(批号:150820)均由北京北方生物技术有限公司提供。环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP, 批号:201509)、环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)酶联免疫分析试剂盒(批号:201509)由 R&D systems 进口分装。

1.4 仪器

GC-1200 γ 放射免疫计数器(中国科学技术大学科技实业有限公司);MK3 型酶标分析仪(美国 Thermo 公司);ModularDPP 型全自动生化仪(美国罗氏);RE-52A 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);centrifuge5415R 型小型冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);Shandon325 型石蜡切片机(英国 Shandon 公司);MoticB5 型显微摄像系统(麦克奥迪实业集团公司)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药

60 只健康昆明小鼠在正常条件下适应性饲养 7 d 后,完全随机分成空白对照组、模型组、六味地黄汤组($9.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、山茱萸-牡丹皮组($2.73 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、熟地黄-泽泻组($4.29 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)和山药-茯苓组($2.73 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组 10 只。各给药组按相应剂量上午灌胃给药(按临床给药剂量折算),空白对照组和模型组按 $0.4 \text{ mL} \cdot (20 \text{ g})^{-1}$ 灌胃给予蒸馏水,每日 1 次,连续 9 d。第 6~9 天除空白对照组灌胃蒸馏水外,其余各组每天下午按 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重灌胃给予氢化可的松注射液,建立肾阴虚小鼠模型。

2.2 标本采集

末次给药后禁食 24 h,于试验第 10 天摘眼球

取血, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 分离血清及血浆; 取血后立即摘取睾丸及子宫, 置于 10% 甲醛溶液中固定, 保存待测。

2.3 指标检测

采用放免法测定血清中 FSH、E2、T 含量; 采用酶联免疫 ELISA 法测定血浆中 cAMP、cGMP 含量。摘取睾丸及子宫后, 置于 10% 甲醛溶液固定、常规脱水、石蜡包埋、切片、烘烤、脱蜡、复水、苏木素-伊红(HE)染色, 光学显微镜下观察小鼠子宫和睾丸的组织病理形态改变。

2.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学处理方法采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对肾阴虚模型小鼠血浆 cAMP、cGMP 的影响

与空白对照组比较, 模型组小鼠血浆 cAMP 水平上升, 血浆 cGMP 水平降低, 且均有显著性差异($P < 0.01$), 这与临床上肾阴虚患者 cAMP 明显升高相符^[2], 说明氢化可的松致肾阴虚模型成功。与模型组比较, 六味地黄汤组和山茱萸-牡丹皮药对组均能降低肾阴虚小鼠血浆 cAMP 的含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且六味地黄汤组还能升高血浆 cGMP 的含量($P < 0.05$); 而熟地黄-泽泻组和山药-茯苓组各值无显著性差异。结果见表 1。

3.2 对肾阴虚模型小鼠血清 FSH、E2、T 含量的影响

与空白对照组比较, 模型组小鼠血清 FSH 含量有显著性差异($P < 0.01$); 雌鼠血清 E2 含量有显

表 1 对肾阴虚模型小鼠血浆 cAMP、cGMP 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The effect of different group on plasma cAMP and cGMP content in kidney Yin deficiency mice($\bar{x} \pm s$)

组别	n	cAMP/nmol·L ⁻¹	cGMP/nmol·L ⁻¹
空白对照组	10	6.34±0.16	27.79±1.54
模型组	9	8.20±0.63 ¹⁾	18.29±1.89 ¹⁾
六味地黄汤组	10	6.49±0.46 ³⁾	25.38±1.84 ²⁾
山茱萸-牡丹皮组	9	6.93±0.15 ³⁾	22.52±0.69
熟地黄-泽泻组	10	7.52±0.15	20.09±3.37
山药-茯苓组	10	7.24±0.78	21.33±1.99

注: 与空白对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。
Note: Compared with blank control group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$.

著性差异($P < 0.01$), 但雄鼠无显著性差异; 雄鼠血清 T 含量有显著性差异($P < 0.01$), 但雌鼠无显著性差异; 提示氢化可的松可致小鼠 HPG 轴功能紊乱, 且不同性别的小鼠性激素也具有不同的表现, 但均表现为性激素水平低下, 即血清 FSH、E2、T 水平下降。结果见表 2。

与模型组比较, 六味地黄汤组和山茱萸-牡丹皮组雄鼠血清 FSH、T 含量以及熟地黄-泽泻组雄鼠血清 FSH 含量有显著性差异($P < 0.01$), 六味地黄汤组和山茱萸-牡丹皮组雌鼠血清 FSH、E2 含量有显著性差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。提示六味地黄汤和山茱萸-牡丹皮药对均能升高雄、雌鼠 FSH 水平, 但仅能升高雄鼠 T 水平和雌鼠 E2 水平, 对雌鼠 T 及雄鼠 E2 水平没有影响, 熟地黄-泽泻药对仅能升高雄鼠 FSH 水平, 但药效不如全方, 而山药-茯苓药对对性激素无影响。

表 2 对肾阴虚小鼠血清 E2、T 的影响($n=4\sim5$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The effect of different group on serum FSH, E2 and T content in kidney Yin deficiency mice($n=4\sim5$, $\bar{x} \pm s$)

组别	FSH/mIU·mL ⁻¹		E2/pg·mL ⁻¹		T/ng·mL ⁻¹	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
空白对照组	1.44±0.08	1.37±0.16	17.85±0.57	17.27±0.79	5.98±0.18	5.68±0.60
模型组	0.48±0.03 ¹⁾	0.66±0.02 ¹⁾	17.29±0.74	13.72±0.16 ¹⁾	2.14±0.05 ¹⁾	5.40±0.04
六味地黄汤组	1.03±0.02 ³⁾	0.91±0.04 ³⁾	16.08±0.45	15.35±0.39 ³⁾	5.35±0.18 ³⁾	5.94±0.93
山茱萸-牡丹皮组	0.85±0.06 ³⁾⁴⁾	0.85±0.03 ²⁾	16.20±0.66	14.68±0.23 ²⁾	4.87±0.21 ³⁾	4.71±0.18
熟地黄-泽泻组	0.77±0.04 ³⁾⁵⁾	0.72±0.07	16.83±0.75	14.45±0.49	2.25±0.16	5.21±1.05
山药-茯苓组	0.40±0.07	0.39±0.09	16.12±0.58	14.37±0.41	2.21±0.47	4.48±0.31

注: 与空白对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$; 与六味地黄汤组比较, ⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with blank control group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$; compared with Liuwei Dihuang decoction group, ⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$.

3.3 对肾阴虚模型小鼠子宫及睾丸病理组织形态的影响

3.3.1 子宫组织形态学观察 空白对照组子宫内膜较厚, 上皮细胞排列紧密, 固有层内子宫腺多, 腺腔大, 腺体丰富, 且组织细胞结构正常; 肾阴虚模型组子宫明显萎缩, 内膜较薄, 固有层腺体减少; 与模型组比较, 六味地黄汤组、山茱萸-牡丹皮组子宫内膜均有不同程度的增厚, 上皮细胞排列较紧密, 固有层内子宫腺增多, 组织细胞结构基本恢复正常, 其中六味地黄汤组改善更明显; 而熟地黄-泽泻组和山药-茯苓组子宫形态无明显改变。提示六味地黄汤、山茱萸-牡丹皮药对对氢化可的松致肾阴虚模型雌性小鼠受损子宫有修复作用, 但熟地黄-泽泻药对、山药-茯苓药对对其无修复作用。结果见图 1。

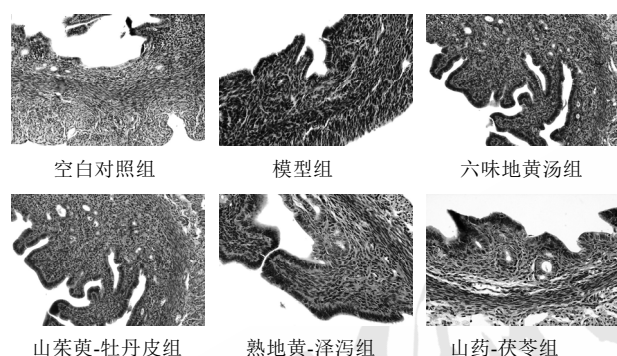


图 1 各组雌性小鼠子宫组织形态学光镜图(HE 染色, 400×)

Fig. 1 The morphologic changes of uterus in female mice in different groups (HE staining, 400×)

3.3.2 睾丸组织形态学观察 空白对照组生精小管排列致密, 间质细胞丰富, 生精小管内可见许多精原细胞、初级精母细胞、精子细胞和精子等各级生精细胞, 排列规则, 层次清晰, 精子数量多; 模型组生精小管萎缩, 边缘部出现大小不等的空泡, 排列疏松, 间质水肿, 初级和次级精母细胞有脱落, 精子数量少。与模型组比较, 六味地黄汤组、山茱萸-牡丹皮组生精小管排列较紧密, 间质水肿得到一定的改善, 生精小管内可见各级生精细胞, 层次清晰, 精子数量有所增加; 而熟地黄-泽泻组和山药-茯苓组睾丸形态无明显改变。提示六味地黄汤、山茱萸-牡丹皮药对对氢化可的松致肾阴虚模型雄性小鼠受损睾丸有修复作用, 但熟地黄-泽泻药对、山药-茯苓药对对其无修复作用。结果见图 2。

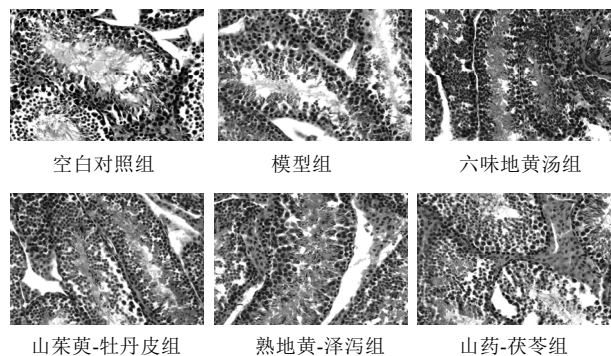


图 2 各组雄性小鼠睾丸组织形态学光镜图(HE 染色, 400×)

Fig. 2 The morphologic changes of testicles in male mice in different groups (HE staining, 400×)

4 讨论

HPG 轴是由下丘脑、垂体、性腺三者在调节生殖内分泌功能方面形成了一个不可分割的相互影响、相互作用的功能单位, 是神经-内分泌-免疫网络的重要组成部分。下丘脑接受经中枢神经系统分析与整合后的各种信息, 通过释放 GnRH 调节垂体促性腺激素(FSH、促黄体生成激素)的释放, 促性腺激素又作用于性腺(雄性的睾丸和雌性的卵巢)调节性激素的分泌及生殖功能。性腺、垂体、下丘脑释放的调控因子又可以作用于上级中枢或其自身, 形成长轴、短轴和超短轴反馈调节通路, 对维持体内外周身循环血中激素水平的恒定极为重要^[3]。

中医认为“肾藏精, 主生长发育与生殖”, 肾气的盛衰直接影响着人体的生殖功能, 而现代医学认为, HPG 轴是调节生殖功能的主要功能单位^[4], 因此肾虚与 HPG 轴的功能有密切联系; cAMP 和 cGMP 是调节物质代谢和生物学功能的重要物质, 对细胞功能处于稳定状态具有双向控制调节作用^[5], 且与中医学的阴阳学说有相似之处, 经多数研究表明, cAMP 含量升高是肾阴虚的特征之一, 故本实验考察了小鼠血浆 cAMP、cGMP 水平和 HPG 轴中血清 FSH、E2、T 水平。

由于外源性给予大量糖皮质激素可以在 HPG 轴的多个环节对其产生抑制作用^[6], 因此通过上调 HPG 轴中垂体分泌的 FSH 以及性腺分泌的 E2、T, 并调节性腺组织形态, 可改善肾阴虚证。本实验研究结果表明, 六味地黄汤对肾阴虚小鼠受损性腺(睾丸、子宫)有修复作用, 并能上调小鼠血清 FSH 水平, 雄鼠血清 T 水平和雌鼠血清 E2 水平,

说明六味地黄汤可改善肾阴虚症, 并对其引起的 HPG 轴功能紊乱有靶向调节作用。

中医理论认为六味地黄组方严谨, 3 个“一补一泻”药对以补为主, 以泻为辅, 补泻并用, 共同支撑全方滋阴补肾的作用^[7]。本实验研究结果表明, 山茱萸-牡丹皮药对能上调肾阴虚小鼠 HPG 轴中血清 FSH、E2、T 水平, 并对其性腺组织受损有修复作用, 且其药效略低于六味地黄汤; 熟地黄-泽泻药对仅能上调肾阴虚小鼠 HPG 轴中血清 FSH 水平, 对其他指标无明显改善作用; 山药-茯苓药对则对肾阴虚小鼠无改善作用。说明 3 个“一补一泻”药对的协同作用是六味地黄汤调节 HPG 轴功能的重要基础, 而山茱萸-牡丹皮药对的作用更近似于全方的药效, 可能是全方改善肾阴虚证的主要药效组成部分。

综上所述, 六味地黄汤全方对氢化可的松致肾阴虚 HPG 轴功能紊乱具有明显的调节作用, 其 3 个“一补一泻”药对中仅山茱萸-牡丹皮药对表现出明显调节作用, 说明全方在药效方面要优于单用药对, 三个“一补一泻”配伍后可产生相互协同增效的作用, 这充分体现了六味地黄方配伍高度的科学内涵。然而, 六味地黄汤及其山茱萸-牡丹皮药对通过 HPG 轴改善肾阴虚证的药效物质

基础还尚未可知, 仍需进一步的深入研究。

REFERENCES

- [1] CHENG B B, ZHU L, LI C Z, et al. Effect of Zuogui pill on reproductive endocrine of female Yin-deficiency mice [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med(现代中西医结合杂志), 2003, 12(13): 1362-1364.
- [2] 印会河, 童瑶. 中医基础理论[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 388.
- [3] LI S D. Study of the regulative effects of Liuwei Dihuang decoction and its compatibilities from the angle of neuroendocrine immunomodulation network and metabolomics [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2010.
- [4] LIU X F, DU J, CAI J, et al. The study on decoction of Kangxin capsule and its minor components are influenced on E2, T and E2/T ratio of kidney asthenia with blood stasis vascular dementia rat model [J]. Strait Pharm J(海峡药理学), 2005, 17(2): 37-43.
- [5] PAN X, HU C J, GENG Y Y, et al. T lymphocyte sub-pipulation and cAMP/cGMP regulating effect by processed Ershen pill formula [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2014, 20(13): 138-141.
- [6] MA Y, ZHOU W X, CHENG J P, et al. Effects of liuwei dihuang decoction and its decomposed recipes on hypothalamus-pituitary-ovary axis in corticosterone administrated mice [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2005, 11(2): 28-32.
- [7] 马坤. 六味地黄丸与左归丸在补阴方面的临床应用[J]. 吉林中医药, 2011, 31(3): 260-261, 276.

收稿日期: 2016-05-31