

右归丸“阴中求阳”配伍对肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的作用

刘浩龙 王家典 卢鋈 翟鹏云 赵晖 李明 王蕾

【摘要】 目的 探究右归丸及其拆方滋阴和补阳对肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的调节作用,阐释右归丸“阴中求阳”理论的科学内涵。**方法** 将 30 只雄性 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组、右归丸组、滋阴方组和补阳方组 5 组,每组 6 只。采用肌肉注射氢化可的松注射液的方法建立大鼠肾阳虚模型。观察各组大鼠体重、胸腺、肾上腺和脾重量变化;采用放免法测定各组大鼠下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone, CRH),血清促肾上腺皮质激素(adreno cortico hormones, ACTH)和皮质酮(Corticosterone, Cort)含量。**结果** 右归丸及其拆方对肾阳虚大鼠的体重、胸腺、肾上腺和脾重量有不同程度的改善作用,并且对大鼠下丘脑 CRH、血清 ACTH 和 Cort 的含量也有调节作用,而右归丸在调节 CRH 和 Cort 方面的作用优于滋阴方。**结论** 右归丸及其拆方均具有改善肾阳虚大鼠的作用,可能与调节肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴有关。右归丸治疗作用优于滋阴方或补阳方。

【关键词】 右归丸及其拆方; 肾阳虚大鼠; 下丘脑-垂体-肾上腺轴

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.09.004

Effect of compatibility of reinforcing yang from yin of Yougui pill on hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats with kidney-yang deficiency LIU Haolong, WANG Jiadian, LU Yun, et al.

School of Traditional Chinese Medicine, Beijing Key Lab of TCM Collateral Disease Theory Research, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Corresponding author: WANG Lei, E-mail: tmwangl@ccmu.edu.cn

【Abstract】 Objectives To study the effect of Yougui pill (YGP) and its disassembled formulas of nourishing yin (NY) and tonifying yang (TY) on regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in rats with kidney-yang deficiency and illuminate the scientific meaning of reinforcing yang from yin. **Methods** The 30 Wistar male rats were randomly divided into 5 groups: normal group, model group (MO), YGP group, NY group and TY group, 6 rats in each group. The kidney-yang deficiency rat model was induced by intramuscular injection with hydrocortisone. The changes of weight, thymus gland, adrenal gland and spleen were observed. The corticotropin releasing hormone (CRH) in hypothalamus, corticosterone (Cort) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in serum were detected by radioimmunoassay. **Results** The weight of rat, thymus gland, adrenal gland and spleen were improved by YGP and its disassembled formulas. The contents of CRH, ACTH and Cort were regulated by the above formulas. And the effect of YGP in the regulation of CRH and Cort was better than that of

基金项目:北京市自然科学基金(7132031);北京市属高等学校高层次人才引进与培养计划—长城学者项目(CIT&TCD20140329)

作者单位:100069 北京,首都医科大学中医药学院 中医络病研究北京市重点实验室[刘浩龙(博士研究生)、王家典(本科生)、卢鋈(本科生)、翟鹏云(本科生)、赵晖、李明、王蕾]

作者简介:刘浩龙(1988-),2014 级在读博士研究生。研究方向:天然药理学。E-mail: 793146134@qq.com

通信作者:王蕾(1967-),女,博士,教授,博士生导师。研究方向:中医药防治脑病研究。E-mail: tmwangl@ccmu.edu.cn

BY formula. **Conclusion** YGP and its disassembled formulas could improve the function of HPA axis in rats with kidney-yang deficiency. It might be related to the regulation of HPA axis. Therapeutical effect of YGP is better than the BY formula or TY formulas.

【Key word】 Yougui pill and its disassembled formulas; Rats with kidney-yang deficiency; HPA axis

近年来研究表明,下丘脑-垂体-肾上腺轴功能紊乱与肾虚证有密切关系^[1]。具有补肾功效的单味中药或复方对于肾虚证的治疗作用主要是通过改善受损的下丘脑-垂体-靶腺轴而实现的^[2],包括肾上腺轴、甲状腺轴和性腺轴的作用^[3-5]。右归丸出自于明代张景岳所著《景岳全书》,主治肾阳不足、命门火衰,方中既有温补肾阳的附子、肉桂和补阳益精之鹿角胶、菟丝子等,又配伍滋阴补肾、填精益髓之熟地黄、山药、山茱萸、枸杞子等,诸药合用,则“阳得阴助,生化无穷”,体现“阴中求阳”“精中生气”之方剂配伍特色。

本研究采用传统的肾虚模型建立方法,于大鼠后肢肌肉注射氢化可的松建立肾虚模型^[6]。根据右归丸“阴中求阳”的组方思路,将右归丸拆分为滋阴方(熟地黄、山药、山茱萸、枸杞子、当归)和补阳方(附子、肉桂、杜仲、菟丝子、鹿角胶)。实验过程中观察大鼠精神、毛色等一般情况及大鼠体重、胸腺重量、肾上腺重量和脾脏重量,并采用放射免疫分析法(以下简称放免法)测定各组大鼠下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone, CRH)、血清促肾上腺皮质激素(adreno cortico hormones, ACTH)和皮质酮(corticosterone, Cort)含量的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 30 只,8 周龄,购自于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2012-0001。饲养于首都医科大学实验动物中心,许可证号:SCXK(京)2010-0020。实验方案经首都医科大学伦理委员会审查批准后执行。

1.1.2 药品与试剂 右归丸中的药物由北京市同仁堂有限责任公司提供,参考《中华人民共和国药典》(一部)^[7]右归丸的制法,简要步骤如下:熟地黄 240 g、炮附子 60 g、肉桂 60 g、山药 120 g、酒山茱萸 90 g、菟丝子 120 g、鹿角胶 120 g、枸杞子 120 g、当归 90 g、盐杜仲 120 g,以上十味,除鹿角

胶外,熟地黄等九味粉碎成细粉,过筛,混匀。鹿角胶加白酒炖化,混匀即得。滋阴方和补阳方的制备方法同上。氢化可的松注射液购自于国药集团容生制药有限公司,批号 1601201;CRH、ACTH 和 Cort 放免试剂盒均由北京华英生物技术研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 8 周龄雄性 Wistar 大鼠,适应性饲养一周,随机分为 5 组,分别为正常组、模型组、右归丸组、滋阴方组、补阳方组,每组 6 只。

1.2.2 动物模型制备与药物处理 模型组和各治疗组大鼠每日两后肢交替肌注氢化可的松(25 mg/kg),连续注射 14 天,制备肾虚模型^[5]。正常组大鼠肌注等体积生理盐水。将各组药物以 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液配制成混悬液。右归丸组于造模后第 1 天灌胃给予大鼠右归丸混悬液(1.8 g/kg);滋阴组给予滋阴方混悬液(1.0 g/kg);补阳组给予补阳方混悬液(0.8 g/kg)。各治疗组连续给药 4 周,正常组和模型组给予等量的羧甲基纤维素钠溶液。

1.2.3 样本收集与处理 每日观察一般情况,记录大鼠体重、体态、皮毛光泽度、竖毛情况、是否畏寒扎堆。给药 4 周后,以 40 mg/kg 剂量对各组大鼠腹腔注射 0.1% 戊巴比妥钠进行麻醉,麻醉后腹主动脉取血,以 3000 r/min 于 4℃ 离心分离血清,用于测定各组大鼠血清中 ACTH、Cort 含量;取各组大鼠下丘脑,用于测定 CRH 含量,取胸腺、肾上腺、脾脏等称重。

1.2.4 统计学处理 数据处理采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况的比较

与正常组比较,造模后模型组大鼠出现精神差,自主活动减少,畏寒扎堆,皮毛光泽差,竖毛等现象。与模型组大鼠相比,各治疗组大鼠自主活动

表 1 各组大鼠体重、胸腺重量、肾上腺重量、脾脏重量测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	体重(g)	胸腺重量(g)	肾上腺重量(g)	脾脏重量(g)
正常组	336.37±4.37	0.64±0.08	0.063±0.004	0.91±0.09
模型组	264.73±11.17 ^a	0.41±0.05 ^a	0.051±0.002 ^a	2.08±0.52 ^a
右归丸组	287.80±8.83 ^c	0.56±0.13	0.056±0.001 ^b	0.80±0.09 ^b
滋阴方组	291.70±11.01 ^c	0.52±0.05	0.051±0.003	0.91±0.13 ^b
补阳方组	294.37±13.49 ^c	0.53±0.11 ^b	0.056±0.005	1.02±0.25 ^b

注:与正常组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。

增多,无扎堆现象,皮毛光泽稍好,竖毛现象少。模型组大鼠的体重、胸腺和肾上腺重量均低于正常组,且具有显著性差异($P<0.01$),而脾重量明显高于正常组($P<0.01$)。右归丸及其拆方滋阴方和补阳方组大鼠的体重均明显升高,与模型组比较,具有显著性差异($P<0.01$)。右归丸及其拆方组大鼠的胸腺重量较模型组升高,但只有补阳方组有统计学意义($P<0.05$)。右归丸组大鼠的肾上腺重量较模型组明显升高($P<0.01$)。另外,右归丸及其拆方组大鼠的脾重量较模型组均明显降低($P<0.05$)。见表 1。

2.2 各组大鼠下丘脑 CRH 及血清 ACTH、Cort 含量比较

本实验采用放免法测定了下丘脑 CRH 及血清 ACTH、Cort 含量,模型组大鼠下丘脑 CRH 及血清 ACTH 均明显高于正常组($P<0.01$),而血清 Cort 显著低于正常组($P<0.05$)。与模型组相比,右归丸及其拆方组大鼠下丘脑 CRH 含量均明显低于模型组($P<0.05$),滋阴方组 CRH 明显高于右归丸组($P<0.05$);右归丸和滋阴方组大鼠血清 ACTH 与模型组比较没有明显变化,而补阳方组 ACTH 显著升高,与模型组、右归丸及滋阴方组比较,具有明显差异($P<0.01$);右归丸及其拆方组大鼠血清 Cort 含量明显高于模型组($P<0.01$),而滋阴方组 Cort 含量明显低于右归丸组($P<0.05$)。结果见表 2。

表 2 各组大鼠下丘脑内 CRH、血清 ACTH 及 Cort 的含量($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	CRH(ng/mL)	ACTH(pg/mL)	Cort(ng/mL)
正常组	0.62±0.03	14.68±0.59	295.25±31.31
模型组	1.03±0.04 ^b	17.86±1.49 ^b	234.48±10.86 ^a
右归丸组	0.63±0.13 ^d	18.48±1.72	322.50±16.14 ^d
滋阴方组	0.93±0.04 ^{ce}	16.52±0.77	265.24±9.47 ^{de}
补阳方组	0.72±0.08 ^d	26.58±2.10 ^d	309.33±29.08 ^d

注:与正常组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$;与右归丸组比较,^e $P<0.05$,^f $P<0.01$;与滋阴方组比较,^g $P<0.01$ 。

3 讨论

用氢化可的松建立肾阳虚动物模型是传统的造模方法,该模型通过对大鼠注射一定量的外源性糖皮质激素,从而使肾上腺皮质的类固醇分泌减少,动物则出现一系列耗竭现象^[8]。目前研究显示,大鼠与小鼠均可采用连续多日后肢肌肉注射 25 mg/kg 氢化可的松注射液的方法造成肾阳虚模型^[5-6]。本实验中,每日注射氢化可的松后,模型组大鼠逐渐出现畏寒喜暖、精神萎靡、体毛枯萎、消瘦等症状,并且其体重、胸腺和肾上腺重量明显下降,脾重量明显增加,并存在下丘脑-垂体-肾上腺轴功能的失调,与文献所描述肾阳虚证相符。现代研究显示,右归丸对下丘脑-垂体-靶腺轴具有调控作用,如右归丸能够明显升高肾阳虚大鼠的三碘甲腺原氨酸、四碘甲腺原氨酸、睾酮、ACTH、Cort 的含量^[4],但对右归丸的拆方研究较少。

右归丸符合“阴中求阳”的配伍理论,是基于阴阳互根、阴阳互生等理论用来治疗肾阳虚的补益法,即治疗阳虚证时配伍滋阴药,达到“阴阳相济之妙”^[9-10]。本实验依“阴中求阳”理论,将右归丸拆方为滋阴方与补阳方探讨其治疗效果,以阐释“阴中求阳”配伍理论的部分科学内涵。

经右归丸治疗后,右归丸及其两组拆方均能显著增加大鼠降低的体重,对抗肾阳虚所致大鼠胸腺和肾上腺萎缩,补阳方改善胸腺的作用明显,而右归丸对肾上腺萎缩有明显缓解作用。另外,右归丸及其拆方均能降低肾阳虚大鼠增加的脾重量。以上结果表明,右归丸及其拆方可以缓解长期注射糖皮质激素所造成的免疫抑制现象,从而对肾阳虚大鼠具有明显的改善作用。

研究发现,分泌 CRH 的神经元主要分布在下丘脑室旁核,下丘脑 CRH 以脉冲式释放,激发垂体释放 ACTH,又使肾上腺皮质分泌 Cort 而发挥免疫调节作用。本实验研究发现,肾阳虚大鼠的 HPA 轴功能出现失调,表现为下丘脑 CRH 和血清 ACTH 含量

明显升高,血清 Cort 含量明显下降。经过右归丸及其拆方治疗后,上述指标得到明显的改善,表明各治疗方可以调节肾阳虚大鼠 HPA 轴负反馈引起的 CRH、ACTH 和 Cort 的分泌的异常变化,从而缓解大鼠的肾阳虚症状,并且右归丸全方在调节 CRH 和 Cort 方面的作用优于滋阴方。以上结果部分阐释了右归丸“阴中求阳”配伍的科学内涵,也为本方临床治疗肾阳虚疾病提供了部分依据,但其深入的作用及其配伍机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 沈自尹,王文健,俞瑾. 肾本质理论研究与临床应用[J]. 中国中西医结合杂志,2006,26(1):94-95.
- [2] 沈自尹. 对中医基础理论研究的思路[J]. 中国中西医结合杂志,1997,17(11):643.
- [3] 陈李圳,王秀凤,马娜,等. 右归丸对肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴的动态影响[J]. 广东药学院学报,2016,32(6):771-774.
- [4] 张磊,廖成彬,黄榕波,等. 右归丸调节肾阳虚垂体-靶腺轴功能的动态变化[J]. 广东药学院学报,2016,32(1):102-106.
- [5] 马娜,罗来成,王永霞. 右归丸对肾阳虚大鼠垂体-性腺轴动态影响的实验研究[J]. 中国医学前沿杂志(电子版),2014,6(8):26-28.
- [6] 马娜,罗来成,朱东海. 右归丸对肾阳虚大鼠垂体-肾上腺轴动态影响的实验研究[J]. 中华中医药学刊,2014,32(6):1324-1326.
- [7] 国家药典委员会.《中华人民共和国药典》(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:767.
- [8] 黄厚才,彭蕴茹,沈明勤. 金匱肾气丸对大鼠肾阳虚模型的影响[J]. 中国比较医学杂志,2004,14(3):155-157.
- [9] 王建红,胡翔健,罗来成,等. 复杂系统理论思路设计肾气丸右归丸右归饮 3 首补肾阳类方配伍规律研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(1):13-14.
- [10] 冀晓敏,王秀娟,王蕾. “阴中求阳”理论源流及现代研究[J]. 中医药信息,2014,31(5):44-46.

(收稿日期: 2016-11-04)

(本文编辑: 禹佳)