

巴戟天及其不同炮制品对脾肾阳虚模型大鼠的改善作用比较[△]

史 辑^{1,2,3*}, 景海漪¹, 黄玉秋¹, 范亚楠¹, 贾天柱^{1,2,3#}(1.辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600; 2.国家中医药管理局炮制原理解析重点实验室, 辽宁大连 116600; 3.辽宁省中药炮制工程技术研究中心, 辽宁大连 116600)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)13-1756-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.13.08

摘要 目的:比较巴戟天及其不同炮制品对脾肾阳虚模型大鼠的改善作用。方法:将80只大鼠随机分为正常组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、辅料组(甘草汁, 0.063 g/kg)、全鹿丸组(阳性药物, 1.89 g/kg)和巴戟天、巴戟肉、盐巴戟、制巴戟组[给药剂量均为1.05 g(生药)/kg]。除正常组外,其余各组大鼠均采用ig大黄酒煎液+im氢化可的松复制脾肾阳虚模型,并同时ig相应药物,每天1次,连续15 d。测定血清中睾酮(T)、雌二醇(E₂)、环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)、三碘甲状腺原氨酸(T₃)、甲状腺素(T₄)、促肾上腺皮质激素(ACTH)水平,并计算E₂/T、cAMP/cGMP比值。结果:与正常组比较,模型组大鼠血清中T、T₃、T₄、cGMP水平降低,E₂、cAMP、ACTH水平及E₂/T、cAMP/cGMP比值升高(P<0.05或P<0.01)。与模型组比较,各给药组大鼠血清中T水平升高,E₂、cAMP、ACTH水平及cAMP/cGMP比值降低(P<0.05或P<0.01),且以盐巴戟组大鼠血清中T水平最高,E₂/T比值最低,制巴戟组大鼠血清中E₂、cAMP、ACTH水平及cAMP/cGMP比值最低;巴戟天组和制巴戟组大鼠血清中cGMP水平升高(P<0.01);巴戟天组、盐巴戟组和制巴戟组大鼠血清中T₃水平及各给药组大鼠血清中T₄水平升高(P<0.05或P<0.01),且以制巴戟组升高最为显著。结论:在巴戟天及其不同炮制品中,制巴戟对脾肾阳虚大鼠的改善作用更明显。

关键词 巴戟天;炮制品;脾肾阳虚模型;睾酮;雌二醇;三碘甲状腺原氨酸;甲状腺素;促肾上腺皮质激素;大鼠

Comparison of Improvement Effect of *Morinda officinalis* and Its Processed Products on Spleen-kidney Yang Deficiency Model Rats

SHI Ji^{1,2,3}, JING Haiyi¹, HUANG Yuqiu¹, FAN Yanan¹, JIA Tianzhu^{1,2,3}(1.College of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Liaoning Dalian 116600, China; 2.Key Lab of Processing Principle Analysis, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Liaoning Dalian 116600, China; 3.Liaoning Research Center of Processing Engineering Technology for TCM, Liaoning Dalian 116600, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To compare the improvement effects of *Morinda officinalis* and its processed products on rats with spleen-kidney Yang deficiency. METHODS: 80 rats were randomly divided into normal group (normal saline), model group (normal saline), excipients group (succus liquiritiae, 0.063 g/kg), Quanlu pill group (positive drug, 1.89 g/kg), *M. officinalis* group, *M. officinalis* without wood, *M. officinalis* processed by salt and *M. officinalis* processed by licorice-juice groups [1.05 g (crude drug)/kg]. Those groups were given Rheum palmatum water solution intragastrically and hydrocortisone intramuscularly to induce spleen-kidney Yang deficiency model, and given relevant medicine intragastrically once a day for consecutive 15 d. The levels of testosterone (T), estradiol (E₂), cAMP, cGMP, triiodothyronine (T₃), thyroxine (T₄), adrenal cortex hormone (ACTH) in the serum were measured, and E₂/T and cAMP/cGMP were calculated. RESULTS: Compared with normal group, the serum level of T, T₃, T₄ and cGMP decreased in model group, while the levels of E₂, cAMP and ACTH, E₂/T and cAMP/cGMP increased (P<0.05 or P<0.01). Compared with model group, serum level of T increased in treatment groups, while serum levels of E₂, cAMP, ACTH and cAMP/cGMP decreased (P<0.05 or P<0.01); serum level of T was highest and E₂/T was the lowest in *M. officinalis* processed by salt group; serum level of E₂, cAMP, ACTH and cAMP/cGMP were the lowest in *M. officinalis* processed by licorice-juice group; serum level of cGMP increased in *M. officinalis* group and *M. officinalis* processed by licorice-juice group (P<0.01); serum levels of T₃ in *M. officinalis*, *M. officinalis* processed by salt and *M. officinalis* processed by licorice-juice groups, and T₄ increased in all treatment groups (P<0.05 or P<0.01), especially in *M. officinalis* processed by licorice-juice group. CONCLUSIONS: *M. officinalis* processed by licorice-juice is better in improving spleen-kidney Yang deficiency, compared to *M. officinalis* and its other processed products.

KEYWORDS *Morinda officinalis*; Processed product; Spleen-kidney Yang deficiency model; Testosterone; Estradiol; Triiodothyronine; Thyroxine; Adrenal cortex hormone; Rat

巴戟天为茜草科植物巴戟天 *Morinda officinalis* How. 的干燥根,味甘、辛,性微温,具有补肝肾、强筋骨、祛风湿的功效。其用于治疗阳痿遗精、宫冷不孕、月经不调、少腹冷痛、风湿痹痛、筋骨痠软等症^[1],是常用的补肾阳中药之一。生巴戟天以补肝肾、祛风湿为主;巴戟天经盐炙后专入肾经,温而不燥,可

增强补肾助阳作用,多服、久服无伤阴之弊;巴戟天经甘草炙后补益作用增强,偏于脾肾双补、益气养血^[2]。本课题组前期研究表明,巴戟天盐炙后补肾壮阳作用增强^[3],同时盐巴戟也是临床上巴戟天使用最为广泛的炮制品种。而古文献记载的制巴戟用于脾肾双补的作用未见现代药学研究证实。脾肾两虚证在临床上较为常见,但实验研究中往往侧重单一脏器,涉及脾肾两脏损伤的则很少。笔者根据脾肾相关理论复制大鼠脾肾两虚模型,观察巴戟天及其不同炮制品对脾肾两虚大鼠的影响,以确定巴戟天脾肾双补的有效炮制品种,为临床合理用药提供实验依据。

△ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81473350)

* 副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药炮制化学。电话:0411-85890157。E-mail:lnshiji@163.com

通信作者:教授,博士生导师。研究方向:中药炮制原理解析。电话:0411-85890135。E-mail:jiatzh@126.com

1 材料

1.1 仪器

BS600-L电子天平(上海友声衡器有限公司);TGL-16G离心机(上海安亭科学仪器厂);BPS-50CL恒温恒湿箱(上海一恒科学仪器有限公司);Multiskan MK3 酶标仪(美国 Thermo Electron 公司);涡旋混合器(上海青浦沪西仪器厂)。

1.2 药材、药品与试剂

巴戟天、大黄购自安徽亳州药材市场,甘草购自大连市开发区阳光大药房,经辽宁中医药大学鉴定教研室翟延君教授鉴定巴戟天为茜草科植物巴戟天 *Morinda officinalis* How.的干燥根、甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.的干燥根及根茎、大黄为蓼科植物药用大黄 *Rheum officinale* Baill.的干燥根及根茎。

氢化可的松注射液(天津金耀氨基酸有限公司,批号:1209071,规格:20 ml:100 mg);全鹿丸(阳性药物,江西大自然制药有限公司,批号:20130201,规格:每40粒重约3 g)。

睾酮(T)、雌二醇(E₂)、环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、三碘甲状腺原氨酸(T₃)、甲状腺素(T₄)试剂盒(上海科兴商贸有限公司,批号:BPE30610、BPE30521、BPE30574、BPE30335、BPE30632、BPE30618、BPE30617);其余试剂均为国产分析纯。

1.3 动物

SPF级Wistar大鼠,♂,体质量(200±20)g,由辽宁长生生物技术有限公司提供,合格证号为SCXK(辽)2010-0001。

2 方法

2.1 药材的炮制及药液制备^[1]

2.1.1 药材的炮制 ①巴戟天:取原药材,除去杂质及木心,洗净,晒干。②巴戟肉:取净巴戟天,置于蒸器内蒸透,趁热抽去木心,切段干燥。③盐巴戟:取净巴戟天,用适量的食盐(每100 g巴戟天加2 g食盐)水拌匀,闷润,待盐水被吸尽后,置于蒸器内蒸透,趁热抽去木心,切段干燥。④制巴戟:取甘草加10倍量水,煎煮3次,合并滤液,浓缩即为甘草汁(10 g甘草得250 ml甘草汁);取净巴戟天,加1.5倍量甘草汁,同置锅内,闷润,文火煮至甘草汁被吸尽,趁热抽去木心,切段干燥(每100 g巴戟天约加入6 g甘草)。

2.1.2 药液制备 ①巴戟天醇提液:分别取巴戟天、巴戟肉、盐巴戟和制巴戟,各加8倍量的80%乙醇溶液,回流提取3次,每次2 h,合并提取液,过滤,将续滤液浓缩至无醇味,得浸膏;浸膏加适量水混悬成0.105 g(生药)/ml的巴戟天各炮制品提取液。②辅料甘草汁:将甘草加10倍量水煎煮3次,每次1 h,合并滤液,浓缩成6.3 mg(生药)/ml的溶液。③全鹿丸溶液:将全鹿丸加适量水超声,溶解制成189 mg/ml的混悬液。④大黄药液:取大黄原药材,加5倍量水,煎煮2次,合并滤液,浓缩制成2 g(生药)/ml的药液。

2.2 动物分组、造模与给药^[4-5]

取80只健康Wistar大鼠(♂),适应性喂养3 d后,随机分为8组,分别为正常组、模型组、全鹿丸(阳性药物)组、巴戟天组、巴戟肉组、盐巴戟组、制巴戟组和辅料(甘草汁)组,各组给药情况如下(各给药组剂量均为按体表面积法换算后人临床用量的等效剂量):

(1)正常组:每天上午8:00、下午15:00(下同)各ig等量生理盐水(10 ml/kg),连续14 d;于第15天上午im生理盐水(2 ml/kg),同时下午ig生理盐水(10 ml/kg),连续10 d。

(2)模型组:每天上午ig大黄药液(10 ml/kg),下午ig等量生理盐水(10 ml/kg),连续14 d,复制大鼠脾虚模型;于第15天上午im氢化可的松(10 mg/kg),同时下午ig生理盐水(10 ml/kg),连续10 d,最终造成脾肾两虚模型。

(3)全鹿丸组:每天上午ig大黄药液(10 ml/kg),下午按

1.89 g/kg的剂量ig全鹿丸溶液,连续14 d;于第15天上午im氢化可的松(10 mg/kg),同时下午按1.89 g/kg的剂量ig全鹿丸溶液10 ml/kg,连续10 d。

(4)巴戟天组、巴戟肉组、盐巴戟组和制巴戟组:每天上午ig大黄液(10 ml/kg),下午按1.05 g/kg的剂量ig相应巴戟天炮制品药液(10 ml/kg),连续14 d;于第15天上午im氢化可的松(10 mg/kg),同时下午按1.05 g/kg的剂量ig相应巴戟天炮制品药液(10 ml/kg),连续10 d。

(5)辅料组:每天上午ig大黄药液(10 ml/kg),下午按0.063 g/kg剂量ig生理盐水(10 ml/kg),连续14 d;于第15天上午im氢化可的松(10 mg/kg),同时下午按0.063 g/kg的剂量ig甘草汁10 ml/kg,连续10 d。

2.3 指标检测

每天上午观察各组大鼠在造模、用药中的一般状况,包括大鼠的身体状态和活动情况等。于第25天实验结束时,对各组大鼠进行腹主动脉取血(取血前12 h禁食不禁水),血液样品放置60 min后,以离心半径为6 cm、4 000 r/min离心10 min,取血清,-20 ℃保存,备用。采用酶联免疫吸附法测定血清中T、E₂、cAMP、cGMP、ACTH、T₃、T₄水平,具体操作严格按照试剂盒说明书进行。

2.4 统计学方法

采用统计软件SPSS 19.0进行数据分析。数据资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 动物死亡情况及纳入分析数量

实验过程中因灌胃操作失误及造模所用药物损伤等原因造成全鹿丸组大鼠2只死亡,巴戟天组大鼠2只死亡,巴戟肉组大鼠1只死亡,盐巴戟组大鼠1只死亡,辅料组大鼠2只死亡,共损失8只大鼠,最终进入试验结果分析的大鼠为72只。

3.2 动物一般情况

正常组大鼠较其余各组明显肥大,皮毛干爽顺滑,精神状态良好,反应、活动灵敏,正常进食、饮水;模型组大鼠于造模第2天开始出现便溏,并随着时间的延长逐渐加重,体质量增长缓慢,精神日渐萎靡,第14~25天时症状更加明显,出现体质量减轻、皮毛干燥稀疏、反应迟钝、弓背萎缩、活动减少、畏寒多尿、身体瘦削、喜蜷缩扎堆、进食和饮水量减少等显著的脾肾阳虚症状;各用药组大鼠的症状较模型组均有所改善。

3.3 大鼠血清中T、E₂水平

与正常组比较,模型组大鼠血清中T水平明显降低,E₂水平和E₂/T比值明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠血清中T水平明显升高,E₂水平和E₂/T比值明显降低($P < 0.01$),其中盐巴戟组T水平升高,E₂/T比值降低最为显著,制巴戟组E₂水平降低最为显著。各组大鼠血清中T、E₂水平测定结果见表1。

3.4 大鼠血清中cAMP、cGMP水平

与正常组比较,模型组大鼠血清中cGMP水平明显降低,cAMP水平和cAMP/cGMP比值明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠血清中cAMP水平和cAMP/cGMP比值明显降低,巴戟天组和制巴戟组大鼠血清中cGMP水平水平明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中制巴戟组大鼠血清中cAMP水平及cAMP/cGMP比值降低最为显著,cGMP水平升高最为显著。各组大鼠血清中cAMP、cGMP水平及cAMP/cGMP比值测定结果见表2。

3.5 大鼠血清中T₃、T₄水平

与正常组比较,模型组大鼠血清中T₃、T₄水平明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠血清中T₄水平明显升高,巴戟天、盐巴戟、制巴戟组大鼠血清中T₃水平升高($P < 0.05$

或 $P<0.01$),其中以制巴戟组大鼠血清中 T_3 、 T_4 水平升高最为显著。各组大鼠血清中 T_3 、 T_4 测定结果见表3。

表1 各组大鼠血清中 T 、 E_2 水平及 E_2/T 比值测定结果($\bar{x}\pm s$)
Tab 1 Serum levels of T and E_2 and E_2/T in rats of each group($\bar{x}\pm s$)

组别	n	T, nmol/L	E_2 , ng/L	E_2/T
正常组	8	107.06±4.41	46.87±2.21	0.44±0.02
模型组	12	96.03±3.32*	59.66±4.83**	0.62±0.05**
全鹿丸组	8	107.86±7.12 [#]	50.56±2.10 [#]	0.47±0.03 [#]
巴戟天组	8	125.87±5.42 [#]	52.16±1.62 [#]	0.42±0.02 [#]
巴戟肉组	9	115.27±10.50 [#]	50.69±3.95 [#]	0.44±0.05 [#]
盐巴戟组	9	143.95±13.92 [#]	47.37±3.25 [#]	0.33±0.03 [#]
制巴戟组	10	106.63±5.56 [#]	45.28±2.44 [#]	0.42±0.02 [#]
辅料组	8	114.04±6.59 [#]	54.04±5.11 [#]	0.47±0.05 [#]

注:与正常组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组比较, [#] $P<0.01$
 Note: vs. normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.01$

表2 各组大鼠血清中cAMP、cGMP水平及cAMP/cGMP比值测定结果($\bar{x}\pm s$)
Tab 2 Serum level of cAMP and cGMP and cAMP/cGMP in rats of each group($\bar{x}\pm s$)

组别	n	cAMP, U/L	cGMP, nmol/L	cAMP/cGMP
正常组	8	16.74±0.85	8.86±0.98	1.91±0.28
模型组	12	19.91±0.79*	6.84±0.56*	2.93±0.31*
全鹿丸组	8	17.50±1.47 [#]	7.80±1.42	2.30±0.42 [#]
巴戟天组	8	18.56±0.91 [#]	8.55±1.34 [#]	2.22±0.34 [#]
巴戟肉组	9	16.84±0.97 [#]	7.58±0.75	2.23±0.15 [#]
盐巴戟组	9	17.02±0.86 [#]	7.73±0.88	2.22±0.21 [#]
制巴戟组	10	16.29±1.67 [#]	8.94±0.87 [#]	1.85±0.33 [#]
辅料组	8	17.81±0.97 [#]	7.02±0.63	2.55±0.23 [#]

注:与正常组比较, * $P<0.01$;与模型组比较, [#] $P<0.05$, [#] $P<0.01$
 Note: vs. normal group, * $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$, [#] $P<0.01$

表3 各组大鼠血清中 T_3 、 T_4 及ACTH水平测定结果($\bar{x}\pm s$)
Tab 3 Serum level of T_3 , T_4 and ACTH in rats of each group($\bar{x}\pm s$)

组别	n	T_3 , ng/L	T_4 , μ g/L	ACTH, ng/L
正常组	8	95.57±9.13	152.68±4.53	80.77±6.76
模型组	12	76.62±5.35*	139.88±5.55*	95.85±3.73*
全鹿丸组	8	78.66±6.06	148.21±6.23 [#]	80.97±5.21 [#]
巴戟天组	8	87.69±7.87 [#]	158.04±11.09 [#]	82.19±6.20 [#]
巴戟肉组	9	82.62±8.30	154.32±7.27 [#]	70.72±4.84 [#]
盐巴戟组	9	83.77±4.99 [#]	147.77±4.97 [#]	66.86±3.95 [#]
制巴戟组	10	89.81±8.51 [#]	165.48±6.46 [#]	63.57±3.99 [#]
辅料组	8	80.21±4.31	150.60±7.31 [#]	76.33±10.73 [#]

注:与正常组比较, * $P<0.01$;与模型组比较, [#] $P<0.05$, [#] $P<0.01$
 Note: vs. normal group, * $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$, [#] $P<0.01$

3.6 大鼠血清中ACTH水平测定结果

与正常组比较,模型组大鼠血清中ACTH水平明显升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠血清中ACTH水平显著降低($P<0.01$),其中以制巴戟组降低最为显著。各组大鼠血清中ACTH水平测定结果见表3。

4 讨论

全鹿丸收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》中药成方制剂第一册,由全鹿干、当归、川芎、锁阳、枸杞子和五味子等32味药组成,具有补肾填神、益气培元的功效,用于老年阳虚、腰膝酸软、畏寒肢冷、肾虚尿频、妇女血亏、崩漏带下等症。全鹿丸具有明显提高老年小鼠巨噬细胞的吞噬能力,治

疗不孕、精子过少等肾阳虚的作用^[6]。故本文选其作为阳性对照药物。

中医认为脾肾在生理和病理上有着密切的联系。肾主生殖,性激素的变化与肾功能密切相关;脾主运化,所吸收的精微物质藏于肾。脾虚日久,难免会影响肾的藏精功能,从而出现性激素等激素水平紊乱^[7-8]。本实验证明,脾肾两虚模型组T水平明显降低, E_2 水平及 E_2/T 比值明显升高;各给药组大鼠T水平显著升高, E_2 水平和 E_2/T 比值显著降低。这说明巴戟天及其炮制品对脾肾两虚大鼠有一定的保护作用,其作用机制与调节性激素水平有关。

甲状腺素调节机体生长发育的功能可能是脾肾协调机体生长发育作用的机制之一。以往的实验研究表明,在脾虚或肾虚时血清 T_3 、 T_4 水平均降低^[9-10]。本实验中脾肾两虚模型组大鼠血清中 T_3 、 T_4 水平均显著降低,这可能是由于脾虚期大苦寒伤及脾胃,使脾胃运化失调,人体精微物质供应不足,导致甲状腺轴和其他系统功能失养,从而引起 T_3 、 T_4 水平分泌不足、转换失常;脾肾两虚期在脾虚基础上又伤及肾,损及元气,更加深了机体虚弱程度。与模型组比较,各给药组大鼠血清中 T_4 水平均不同程度升高,巴戟天组、盐巴戟组和制巴戟组 T_3 水平均不同程度升高,其中制巴戟组效果更明显。

同时,本实验中脾肾两虚模型组cAMP水平及cAMP/cGMP比值显著升高,cGMP水平明显降低。各给药组脾肾两虚大鼠cAMP水平及cAMP/cGMP比值均不同程度下降,巴戟天组和制巴戟组大鼠cGMP水平显著升高,其中制巴戟组效果最明显。因此制巴戟可能是通过培补肾精,使阳气生化有源而间接补脾,从而治疗脾肾两虚证^[11]。

在肾上腺皮质激素方面,与正常组比较,脾肾两虚模型组大鼠ACTH水平明显升高;各给药组大鼠ACTH水平均不同程度降低,其中制巴戟组大鼠ACTH水平降低最为显著。

综上,巴戟天及其不同炮制品对脾肾两虚模型大鼠均有一定的改善作用,且以制巴戟的改善作用最为明显。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:81-82.
- [2] 景海漪,史辑,贾天柱.巴戟天的炮制历史沿革[J].中国药房,2013,24(27):2574.
- [3] 崔妮,景海漪,史辑,等.巴戟天不同炮制品补肾壮阳作用的比较研究[J].中国中药杂志,2013,38(12):3898.
- [4] 潘新,胡昌江,耿媛媛,等.补骨脂、肉豆蔻炮制前后在“二神丸”中对脾肾阳虚泄泻小鼠的止泻研究[J].中成药,2014,36(5):1059.
- [5] 潘新,胡昌江,耿媛媛,等.脾肾阳虚泄泻大鼠模型造模方法研究[J].中国中药杂志,2014,39(23):2598.
- [6] 卫生部药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准:中药成方制剂:第一册[S].北京:人民卫生出版社,1994:71-73.
- [7] 邓铁涛,雷立屏.脾肾阳虚证[J].新中医,2001,33(2):123.
- [8] 黄娜娜,濮欣,何希俊,等.温阳解郁汤治疗脾肾阳虚型抑郁症30例[J].新中医,2014,27(8):25.
- [9] 陈芝喜,刘小斌,周名璐,等.健脾补肾药对脾虚大鼠环核苷酸及甲状腺激素水平的影响[J].放射免疫学杂志,2003,16(5):278.
- [10] 郭凯,徐蓉,俞伟,等.金匮肾气丸对肾阳虚动物模型的拆方研究[J].中国药学报,2003,31:159.
- [11] 陈敏,余江平,黄敏.环核苷酸的生理作用及临床应用[J].中国药房,2007,18(11):872.

(收稿日期:2015-11-26 修回日期:2016-03-01)
 (编辑:林静)