

人参与蛤蚧配方颗粒配伍对肾阳虚模型大鼠神经内分泌免疫网络的调节机制研究[△]

周蓓^{1*},朱巧凤¹,陈誉丹²,冯莉婷³,刘舒凌¹,吴燕春^{1#}(1.广西中医药大学药学院,南宁 530200;2.广西农业职业技术学院药学系,南宁 530007;3.广西中医药大学附属瑞康医院药学部,南宁 530012)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)11-1313-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.11.06



摘要 目的 探讨人参与蛤蚧配方颗粒配伍对肾阳虚模型大鼠的调节作用机制。方法 将SD雄性大鼠随机分为正常组(不造模、不给药)、模型组(造模、不给药)、金匱肾气丸组(造模,给药剂量为2.33 g/kg)、人参组(造模,给药剂量为0.53 g/kg)、蛤蚧组(造模,给药剂量为0.21 g/kg)、配伍组(造模,人参0.53 g/kg+蛤蚧0.21 g/kg)。分别测定大鼠不同时点的体质量、肛温;检测血清环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)、促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质醇(CORT)、睾酮(T)、三碘甲状腺原氨酸(T₃)、甲状腺素(T₄)、雌二醇(E₂)、IgG、IgM水平;观察肾上腺、甲状腺、睾丸组织病理形态学变化;检测下丘脑CRH、促甲状腺激素释放激素(TRH)、促性腺激素释放激素(GnRh)mRNA表达水平。结果 与模型组比较,配伍组大鼠肛温、血清cAMP、CRH、ACTH、CORT、T₃、T水平和cAMP/cGMP、T/E₂及下丘脑TRH、GnRH mRNA表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);血清cGMP、E₂、IgG水平和下丘脑CRH mRNA表达水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);肾上腺、甲状腺、睾丸组织的病理性损伤均有所改善。与单用人参或蛤蚧配方颗粒对比,配伍组大鼠肛温、T/E₂显著升高,下丘脑CRH mRNA表达水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 人参与蛤蚧配方颗粒配伍应用对肾阳虚模型大鼠具有协同调节作用,其机制可能与下丘脑-垂体-肾上腺轴、下丘脑-垂体-甲状腺轴、下丘脑-垂体-性腺轴及免疫功能形成的神经内分泌免疫网络有关,且配伍用药优于单方用药。**关键词** 人参;蛤蚧;配伍;肾阳虚;下丘脑-垂体-肾上腺轴;下丘脑-垂体-甲状腺轴;下丘脑-垂体-性腺轴;神经内分泌免疫网络

Study on regulatory mechanism of compatibility of ginseng and gecko dispensing granule on neuroendocrine immune network in model rats with kidney yang deficiency

ZHOU Bei¹, ZHU Qiaofeng¹, CHEN Yudan², FENG Liting³, LIU Shuling¹, WU Yanchun¹(1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. Dept. of Pharmacy, Guangxi Agricultural Vocational College, Nanning 530007, China; 3. Dept. of Pharmacy, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530012, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the regulatory mechanism of compatibility of ginseng and gecko dispensing granule on kidney yang deficiency model rats. **METHODS** Male SD rats were randomly divided into normal group (no modeling, no administration), model group (modeling, no administration), Jinkui shenqi pill group (modeling, dose of 2.33 g/kg), ginseng group (modeling, dose of 0.53 g/kg), gecko group (modeling, dose of 0.21 g/kg) and compatibility group (modeling, ginseng 0.53 g/kg and gecko 0.21 g/kg). The body mass and anal temperature of rats were measured at different time points; the serum levels of cAMP, cGMP, CRH, ACTH, CORT, T, T₃, T₄, E₂, IgG and IgM were measured; the pathomorphological changes of adrenal gland, thyroid gland and testis were observed; mRNA expression of CRH, thyroid stimulating hormone releasing hormone (TRH) and gonadotropin releasing hormone (GnRH) in hypothalamus were detected. **RESULTS** Compared with model group, the anal temperature, the levels of cAMP, CRH, ACTH, CORT, T₃, T and cAMP/cGMP, T/E₂ in serum and mRNA expressions of TRH and GnRH in hypothalamus were significantly increased in the compatibility group ($P<0.05$ or $P<0.01$); the levels of cGMP, E₂ and IgG in serum and mRNA expression of CRH in hypothalamus decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$); the pathological injuries of adrenal gland, thyroid gland and testis were all improved. Compared with ginseng or gecko dispensing granules alone, the anal temperature and T/E₂ of rats in the compatibility group increased significantly, and mRNA expression of CRH in hypothalamus decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** The

[△] 基金项目:广西自然科学基金资助项目(No.2019GXNS-FAA245092);广西中医药大学2019—2021年广西一流学科建设开放课题(No.2019XK074);广西中医药大学引进博士科研启动基金项目(No.2018BS022)

* 副教授,博士。研究方向:中药药效筛选。E-mail:63637131@qq.com

通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药药理学。E-mail:wuyanchun_3333@126.com

compatibility of ginseng and gecko dispensing granule has a synergistic regulatory effect on kidney yang deficiency model rats, the mechanism of which may be associated with hypothalamus-pituitary-adrenal axis, hypothalamus-pituitary-thyroid axis, hypothalamus-pituitary-gonad axis and neuroendocrine immune network formed by immune function. Compatible drugs are better than single drugs.

KEYWORDS ginseng; gecko; compatibility; kidney yang deficiency; hypothalamus-pituitary-adrenal axis; hypothalamus-pituitary-thyroid axis; hypothalamus-pituitary-gonadal axis; neuroendocrine immune network

人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的根和根茎,性微温,味甘、微苦,主归脾、肺、心、肾经,临床常用于治疗久病虚羸、惊悸失眠、阳痿宫冷等^[1]。因其具有强心、免疫增强、抗衰老、抗肿瘤等广泛的药理作用,故具有极高的药用价值^[2]。蛤蚧为壁虎科动物蛤蚧 *Gekko gecko* Linnaeus. 的干燥体,性平而味咸,主归肺、肾经,临床常用于治疗虚喘气促、阳痿、遗精等^[1]。《本草纲目》曰:“昔人言补可去弱,人参、羊肉之属。蛤蚧补肺气,定喘止渴,功同人参;益阴血,助精扶羸,功同羊肉”。

经典人参蛤蚧补虚药对配伍出自《卫生宝鉴》“人参蛤蚧散”、《医级》“人参蛤蚧丸”、《圣济总录》“独圣饼”等,临床应用历史悠久。古今诸多医家认为蛤蚧配伍人参使用可增强补虚壮阳之效。目前的研究多集中在人参、蛤蚧为君药的复方治疗喘息性支气管炎、慢性阻塞性肺疾病、支气管哮喘等肺系疾病^[3-5]。本课题组前期研究已明确蛤蚧对肿瘤、衰老等均具有实验免疫调节作用,并对肾虚动物具有改善作用^[6-8],但蛤蚧配伍人参后,是否能增强其补肾阳作用及相关机制尚未明确。

中药配方颗粒由于质量标准统一,更有利于进行配伍的药效学研究。目前中药配方颗粒的药理作用研究主要集中在抗炎、止痛等中医药优势领域^[9]。本研究通过氢化可的松复制肾虚模型大鼠,观察人参与蛤蚧配方颗粒配伍应用对模型大鼠的补肾阳作用,并探讨其对模型大鼠下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)轴、下丘脑-垂体-甲状腺(hypothalamus-pituitary-thyroid, HPT)轴、下丘脑-垂体-性腺(hypothalamic-pituitary-gonadal, HPG)轴及免疫功能形成的神经内分泌免疫网络的调节机制,为人参与蛤蚧配方颗粒的临床配伍应用提供科学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

SQP 型精密电子天平购自赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; Infinite M200 Pro 型酶标仪购自瑞士 Tecan 公司; i2000 型全自动免疫发光分析仪购自美国 Abbott 公司; cobas® c 311 型全自动生化分析仪购自德国罗氏诊断有限公司; TGL-16 型低温离心机购自湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; GeneAmp PCR System

9700 型基因扩增仪、ViiA™ 7 型实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)系统均购自美国 ABI 公司; BX43 型光学显微镜购自奥林巴斯贸易(上海)有限公司。

1.2 主要药物与试剂

人参配方颗粒购自江阴天江药业有限公司(批号 20010253,每 2.50 g 颗粒相当于饮片 10 g); 蛤蚧配方颗粒购自深圳华润三九医药股份有限公司(批号 1903001C,每 2.99 g 颗粒相当于饮片 20 g); 金匱肾气丸购自北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂(批号 1803280,规格 360 丸); 氢化可的松注射液购自百正药业股份有限公司(批号 1908003,规格 10 mg:2 mL); 环磷酸腺苷(serum cyclic adenosine monophosphate, cAMP)、环磷酸鸟苷(guanosine cyclic phosphate, cGMP)、促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone, CRH)、促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、皮质醇(cortisol, CORT)、睾酮(testosterone, T)的大鼠酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司(批号分别为 LY2B9CTRRR、6P6TK8JK57、N3VIFVDNRX、3H9J32UP81、512AVRZZQT、9DVDF6-2B98); 三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine, T₃)、甲状腺素(thyroxine, T₄)、雌二醇(estradiol, E₂)的放射免疫分析试剂盒均购自意大利 DiaSorin 公司(批号分别为 201946、201913B、RE34872); 鼠源 IgG、IgM 试剂盒均购自德国罗氏诊断有限公司(批号分别为 38451501、35257501); Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司(批号 15596026); 苏木素-伊红(HE)染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司(批号 G1120); Gold View 染料购自上海赛百胜基因技术有限公司(批号 HGV- II); RNA 酶抑制剂、SuperScript™ III 反转录酶购自美国 Epicentre 公司(批号分别为 SRI6310K、RF910100); 2×PCR Master Mix 核酸扩增试剂购自美国 Arraystar 公司(批号 AS-MR-006-25)。

1.3 动物

48 只雄性 SPF 级 SD 大鼠,体质量(200 ± 20) g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物许可证号: SCXK(湘)2016-0002。本研究经广西中医药大学伦理委员会审核通过(批准号 DW20190106-003)。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

大鼠适应性喂养1周,根据体质量按随机数字表法分为正常组、模型组、金匱肾气丸组(阳性对照)、人参组、蛤蚧组、配伍组,每组8只。除正常组外,其余组大鼠每天后腿肌内注射氢化可的松25 mg/kg,连续15 d进行造模,根据参考文献[10]判断造模是否成功;正常组同期肌内注射等体积生理盐水。造模成功后,对各组大鼠进行灌胃。金匱肾气丸组灌胃剂量为2.33 g/kg,临用时用生理盐水配制。人参、蛤蚧按照配方颗粒量/饮片量比例、人体质量60 kg换算,并参照人与大鼠体表面积折算的等效剂量比值换算^[11],临用时用生理盐水溶解,37 ℃水浴搅拌5 min,配制混悬液。人参组灌胃剂量为0.53 g/kg(临床等效剂量的2倍),蛤蚧组灌胃剂量为0.21 g/kg(临床等效剂量的2倍),配伍组灌胃剂量为人参配方颗粒0.53 g/kg和蛤蚧配方颗粒0.21 g/kg。模型组和正常组灌胃等体积生理盐水。所有大鼠灌胃体积均为10 mL/kg,每日1次,共灌胃28 d。

2.2 大鼠体质量、肛温测定

分别于灌胃前和灌胃第7、14、21、28天,采用电子天平测定大鼠体质量,采用电子体温计测定大鼠肛温。

2.3 取材与处理

灌胃28 d后,大鼠禁食不禁水12 h,然后以水合氯醛麻醉,腹主动脉取血。血样以3 000 r/min于4 ℃离心10 min,取上清液于-80 ℃保存。腹主动脉取血后,在冰上将大鼠左右肾上腺、甲状腺、左右睾丸完整剪下,生理盐水洗净,置于4%甲醛溶液中固定。在冰下摘取大鼠下丘脑,置于冻存管在-80 ℃保存待测。

2.4 大鼠血清cAMP、cGMP水平检测

采用ELISA法检测。根据“2.1”项下分组、造模与给药,根据“2.3”项下取材与处理。按相应试剂盒说明书方法检测大鼠血清cAMP、cGMP水平并计算cAMP/cGMP。

2.5 大鼠HPA轴(CRH、ACTH、CORT)、HPT轴(T₃、T₄)、HPG轴(T、E₂)、免疫(IgG、IgM)相关指标检测

根据“2.1”项下分组、造模与给药,根据“2.3”项下取材与处理。采用ELISA法,按相应试剂盒说明书检测大鼠血清CRH、ACTH、CORT、T水平。采用放射免疫法,按相应试剂盒说明书检测T₃、T₄、E₂水平。采用免疫比浊法,按相应试剂盒说明书检测IgG、IgM水平。根据检测结果计算T/E₂。

2.6 大鼠肾上腺、甲状腺、睾丸组织病理形态学观察

根据“2.1”项下分组、造模与给药,根据“2.3”项下取

材与处理。肾上腺、甲状腺、睾丸组织用4%甲醛溶液固定,再进行乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片、乙醇梯度脱蜡、HE染色,采用光学显微镜观察组织病理形态学变化并拍照。

2.7 大鼠下丘脑CRH、TRH、GnRH mRNA表达水平检测

采用qRT-PCR法检测。根据“2.1”项下分组、造模与给药,根据“2.3”项下取材与处理。取-80 ℃冻存的下丘脑(每组取3只小鼠样本),先用Trizol提取总RNA,反转录成cDNA后行PCR扩增,用以检测CRH、促甲状腺激素释放激素(thyrotropin releasing hormone, TRH)、促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRh)mRNA表达水平。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列及产物长度见表1。

表1 PCR引物序列及产物长度

基因	引物序列	产物长度/bp
GAPDH	上游:5'-GCTCTCTGCTCCCTGTCTA-3'	124
	下游:5'-TGGTAACCAAGCGTCCGATA-3'	
TRH	上游:5'-CAGCCAGTTTGCCTCTTTCAG-3'	142
	下游:5'-GGCGCAGGATTCAGGGATAC-3'	
CRH	上游:5'-AGAACAACAGTGCAGGCTCA-3'	117
	下游:5'-AGGCAGACAGGGCGACAGA-3'	
GnRH	上游:5'-GCCGCTGTGTCTGTGTACT-3'	142
	下游:5'-CCATTGATCCTCTCTTGC-3'	

2.8 统计学分析

采用SPSS 23.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 人参与蛤蚧配方颗粒配伍对肾阳虚模型大鼠体质量、肛温的影响

与正常组比较,模型组大鼠体质量在不同时点均显著降低($P<0.01$)。各给药组大鼠灌胃前体质量差异无统计学意义($P>0.05$);灌胃第7、14、21、28天,各给药组大鼠体质量均有升高趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$)。与配伍组比较,人参组、蛤蚧组大鼠体质量在不同时点的差异均无统计学意义($P>0.05$)。结果见表2。

与正常组比较,模型组大鼠肛温在各时点均显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各给药组大鼠灌胃前肛温差异常无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比较,配伍组大鼠肛温在灌胃第7、14、21、28天均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与配伍组比较,人参组、蛤蚧组大鼠肛温在灌胃第7天均显著降低($P<0.05$),蛤蚧组大鼠肛温在灌胃第14、21天均显著降低($P<0.05$)。这说明人参与蛤蚧配方颗粒配伍对升高肾阳虚模型大鼠肛温具有一定的协同作用。结果见表3。

表2 各组大鼠灌胃不同时点体质量变化($\bar{x} \pm s, n=8, g$)

组别	灌胃前	灌胃第7天	灌胃第14天	灌胃第21天	灌胃第28天
正常组	321.78±14.63	351.26±16.00	365.80±21.78	381.86±22.42	392.74±22.06
模型组	244.50±14.93 ^a	272.37±16.15 ^a	284.91±14.23 ^a	298.48±15.27 ^a	305.44±9.67 ^a
金匱肾气丸组	244.31±19.34	273.42±15.04	299.13±8.26	307.46±25.38	312.07±27.64
人参组	249.80±14.74	276.69±12.84	303.36±7.65	319.22±12.95	330.02±18.26
蛤蚧组	245.05±12.48	275.95±15.80	286.69±35.19	298.75±34.58	310.98±24.64
配伍组	243.82±11.31	275.63±7.86	297.21±15.62	312.75±18.51	327.70±24.65

a:与正常组比较, $P<0.01$

表3 各组大鼠灌胃不同时点肛温变化($\bar{x} \pm s, n=8, ^\circ C$)

组别	灌胃前	灌胃第7天	灌胃第14天	灌胃第21天	灌胃第28天
正常组	37.55±0.12	37.68±0.24	37.66±0.28	37.51±0.31	37.38±0.28
模型组	37.15±0.41 ^a	37.14±0.18 ^a	37.08±0.43 ^a	37.04±0.22 ^b	37.02±0.35 ^b
金匱肾气丸组	37.39±0.37	37.38±0.37	37.34±0.25	37.32±0.27	37.48±0.22
人参组	37.10±0.24	37.15±0.36 ^a	37.24±0.22	37.23±0.70	37.42±0.35
蛤蚧组	37.09±0.32	37.19±0.29 ^a	37.16±0.17 ^a	37.00±0.29 ^a	37.43±0.29
配伍组	37.29±0.22	37.47±0.22 ^a	37.45±0.26 ^d	37.41±0.45 ^d	37.49±0.33 ^d

a:与正常组比较, $P<0.01$;b:与正常组比较, $P<0.05$;c:与模型组比较, $P<0.05$;d:与模型组比较, $P<0.01$;e:与配伍组比较, $P<0.05$

3.2 人参与蛤蚧配方颗粒配伍对肾虚模型大鼠血清cAMP、cGMP、cAMP/cGMP的影响

与正常组比较,模型组大鼠cAMP水平、cAMP/cGMP显著降低($P<0.01$),cGMP水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠cAMP水平、cAMP/cGMP显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),cGMP水平显著降低($P<0.01$)。与配伍组比较,人参组、蛤蚧组大鼠cAMP水平、cAMP/cGMP有降低趋势,cGMP水平有升高趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$)。结果见表4。

表4 各组大鼠血清cAMP、cGMP水平和cAMP/cGMP比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	cAMP/(ng/mL)	cGMP/(pmol/mL)	cAMP/cGMP
正常组	12.06±2.67	19.95±2.73	0.62±0.19
模型组	6.35±2.27 ^a	32.88±4.77 ^a	0.20±0.07 ^a
金匱肾气丸组	10.25±2.51 ^b	20.65±6.48 ^b	0.56±0.26 ^b
人参组	9.12±1.52 ^c	24.48±4.85 ^b	0.39±0.09 ^c
蛤蚧组	9.18±2.99 ^c	21.59±6.16 ^b	0.44±0.14 ^c
配伍组	10.50±3.63 ^b	20.97±5.15 ^b	0.53±0.24 ^b

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

表5 各组大鼠血清HPA轴、HPT轴、HPG轴、免疫相关指标比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	HPA轴			HPT轴		HPG轴			免疫指标	
	CRH/(pmol/mL)	ACTH/(pmol/mL)	CORT/(pmol/mL)	T ₃ /(nmol/L)	T ₄ /(nmol/L)	T/(ng/L)	E ₂ /(pg/L)	T/E ₂	IgG	IgM
正常组	2.43±0.52	73.88±11.65	2.33±0.36	1.26±0.30	226.89±42.58	2.01±0.43	10.90±1.14	0.19±0.05	0.90±0.06	0.14±0.06
模型组	1.45±0.19 ^a	43.01±9.61 ^a	1.52±0.23 ^b	0.98±0.09 ^a	153.72±32.76 ^b	1.02±0.59 ^a	15.24±2.76 ^b	0.07±0.05 ^b	1.17±0.05 ^a	0.26±0.16 ^b
金匱肾气丸组	2.43±0.69 ^a	74.94±22.69 ^a	2.06±0.60 ^d	1.25±0.13 ^c	220.85±66.55 ^a	1.92±0.37 ^c	14.57±2.45	0.14±0.04 ^d	1.16±0.12	0.19±0.04
人参组	2.07±0.37 ^d	67.73±17.03 ^a	1.98±0.51 ^d	1.18±0.17 ^d	158.11±61.74	1.31±0.34	11.99±2.61 ^d	0.12±0.05 ^e	1.15±0.12	0.20±0.09
蛤蚧组	2.08±0.56 ^d	68.18±12.05 ^a	2.01±0.36 ^d	1.17±0.16 ^d	164.17±83.64	1.21±0.53	12.84±3.03	0.09±0.04 ^e	1.12±0.11	0.25±0.09
配伍组	2.29±0.44 ^d	71.67±12.08 ^a	2.03±0.19 ^d	1.18±0.15 ^d	165.75±58.99	1.70±0.37 ^e	10.76±3.00 ^d	0.17±0.07 ^e	1.05±0.10 ^d	0.19±0.08

a:与正常组比较, $P<0.01$;b:与正常组比较, $P<0.05$;c:与模型组比较, $P<0.01$;d:与模型组比较, $P<0.05$;e:与配伍组比较, $P<0.01$;f:与配伍组比较, $P<0.05$

3.3 人参与蛤蚧配方颗粒配伍对肾虚模型大鼠HPA轴、HPT轴、HPG轴、免疫相关指标的影响

与正常组比较,模型组大鼠CRH、ACTH、CORT、T₃、T₄、T水平和T/E₂均显著降低,E₂、IgG、IgG水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠CRH、ACTH、CORT、T₃水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),金匱肾气丸组、配伍组大鼠T水平、T/E₂均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),人参组、配伍组大鼠E₂水平均显著降低($P<0.05$),配伍组大鼠IgG水平显著降低($P<0.05$)。与配伍组比较,人参组、蛤蚧组大鼠CRH、ACTH、CORT、T₃、T₄水平差异无统计学意义($P>0.05$),金匱肾气丸组T₄水平显著升高($P<0.01$),人参组、蛤蚧组大鼠T/E₂显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。这说明人参与蛤蚧配方颗粒配伍对升高肾虚模型大鼠T/E₂比值有一定协同作用。结果见表5。

3.4 人参与蛤蚧配方颗粒配伍对肾虚模型大鼠肾上腺、甲状腺、睾丸组织病理形态学的影响

与正常组比较,模型组大鼠可见肾上腺组织皮质细胞分层不清晰,细胞排列不规则、体积缩小,束状带变窄,细胞呈空泡样改变;甲状腺组织滤泡大部分上皮细胞被破坏,细胞核减少,组织紊乱,部分滤泡胶质缺失,可见明显病理性损伤;睾丸组织生精小管排列略松散、间隙略变大,部分生精细胞排列紊乱,部分有初级精母细胞固缩、精子细胞质消失现象,有轻微病理性损伤。与模型组比较,各给药组大鼠肾上腺、甲状腺、睾丸组织的病理性损伤均有所改善。结果见图1。

3.5 人参与蛤蚧配方颗粒配伍对肾虚模型大鼠下丘脑CRH、TRH、GnRH mRNA表达的影响

与正常组比较,模型组大鼠下丘脑CRH mRNA表达水平显著升高,TRH、GnRH mRNA表达水平均显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠下丘脑CRH mRNA表达水平均显著降低,TRH、GnRH mRNA表达水平均显著升高($P<0.01$)。与配伍组比较,金匱肾气丸组CRH、GnRH和蛤蚧组CRH mRNA表达水平均显著升高($P<0.01$)。这说明人参与蛤蚧配方颗粒配伍对降低肾虚模型大鼠下丘脑CRH mRNA表达有一定的协同作用。结果见图2。

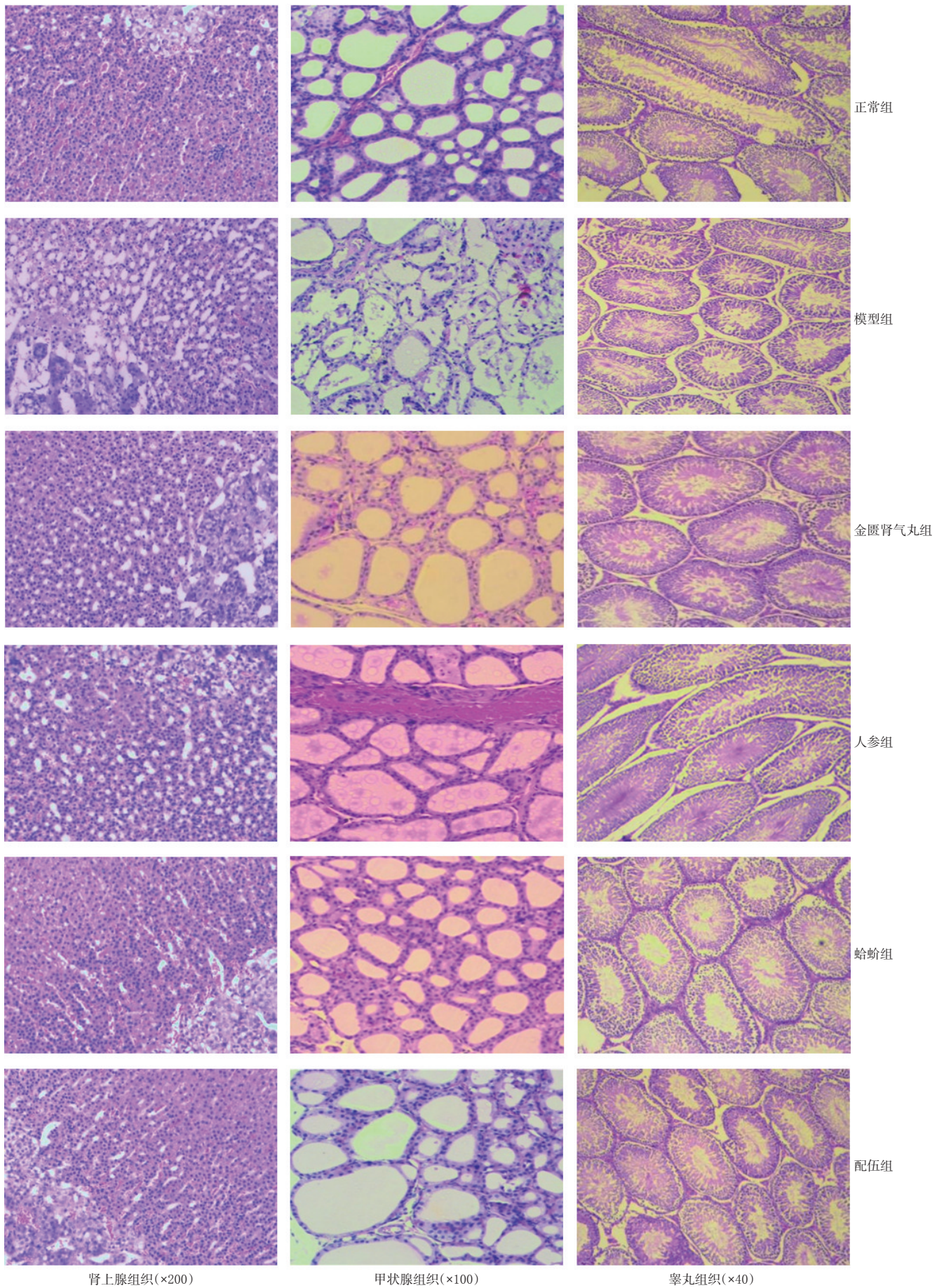
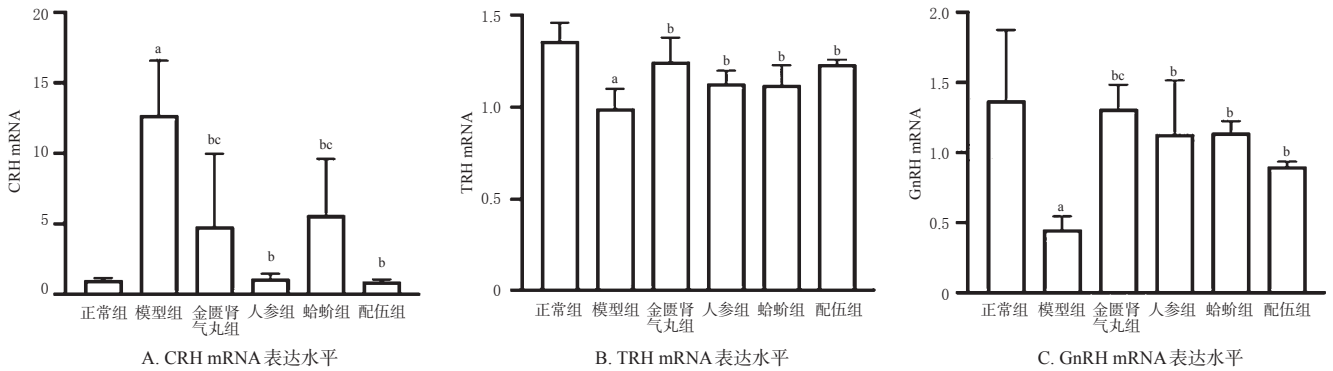


图1 各组大鼠肾上腺、甲状腺、睾丸组织的HE染色病理显微图



a: 与正常组比较, $P < 0.01$; b: 与模型组比较, $P < 0.01$; c: 与配伍组比较, $P < 0.01$

图2 各组大鼠下丘脑CRH、TRH、GnRH mRNA表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

肾阳虚是中医研究的热点。沈自尹院士多年研究得出肾阳虚证具有下丘脑-垂体-靶腺轴(包括HPA轴、HPT轴、HPG轴)不同水平、不同程度的功能紊乱,也与免疫功能形成的神经内分泌免疫网络相关^[12]。神经内分泌免疫网络学说将神经、内分泌、免疫三大系统相互间的调节关系作为动态性整体进行全面系统研究,并以细胞因子、激素、神经递质作为信息分子来实现人体整体功能的调控^[13]。

中医认为肾是先天之本,肾阳乃一身阳气之根本。肾阳虚是中医临床基本证型之一。肾阳虚证有畏寒肢冷、腰膝酸痛、男子遗精、女子带下清稀等临床症状。外源性糖皮质激素复制大鼠肾阳虚模型是目前比较经典、应用最广的模型。本研究造模后大鼠出现体质量、肛温下降。研究表明,肾阳虚的评价指标包括cAMP、cGMP水平及cAMP/cGMP^[10]。本研究中模型组大鼠cAMP水平、cAMP/cGMP显著降低,cGMP水平显著升高,表明肾阳虚动物模型构建成功。

本研究复制大鼠肾阳虚模型是利用外源性糖皮质激素抑制ACTH的释放,使肾上腺萎缩、肾上腺皮质分泌类固醇激素减少,能真实模拟HPA轴受抑制时的病理状态,而HPT轴、HPG轴受干扰相对不明显^[12]。血清CRH、ACTH、糖皮质激素(主要为CORT)为HPA轴参与控制应激反应的激素。同时,糖皮质激素升高也会造成HPA轴负反馈作用减弱,下丘脑CRH mRNA表达水平升高^[14]。本研究结果显示,造模后大鼠HPA轴功能被抑制,表现为血清CORT、CRH、ACTH水平降低,这与以往文献报道一致^[15-16];人参与蛤蚧配方颗粒配伍灌胃能显著升高大鼠血清CRH、ACTH、CORT水平,而显著降低下丘脑CRH mRNA表达水平,且对下丘脑CRH mRNA表达的影响效果优于阳性对照药金匮肾气丸,同时改善肾上腺组织的病理损伤。这提示人参与蛤蚧配方颗粒配伍能有效改善HPA轴功能紊乱及病理损伤。HPT轴

功能抑制与 T_3 、 T_4 分泌紊乱有关, T_3 是诊断甲状腺功能亢进症的特异性指标, T_4 是甲状腺分泌最丰富的激素,而临床上肾阳虚者通常表现为甲状腺功能降低^[17]。本研究结果显示,外源性糖皮质激素复制肾阳虚模型大鼠的 T_3 、 T_4 水平和下丘脑TRH mRNA表达水平显著降低,这与以往文献报道一致^[18-20];人参与蛤蚧配方颗粒配伍灌胃后,大鼠 T_3 水平显著升高, T_4 水平有升高趋势,而阳性对照药金匮肾气丸对 T_4 水平升高更有优势。此外,人参与蛤蚧配方颗粒配伍后还能显著升高下丘脑TRH mRNA表达水平,同时改善甲状腺组织的病理损伤。这提示人参与蛤蚧配方颗粒配伍能改善HPT轴功能紊乱及病理损伤。 E_2 、T为性激素,与HPG轴生殖器官发育相关。肾阳虚造模后动物往往表现为卵巢、睾丸功能不足或衰退,性激素水平紊乱^[10]。本研究结果显示,外源性糖皮质激素复制肾阳虚模型导致大鼠T水平和下丘脑GnRH mRNA表达水平显著降低、 E_2 水平显著升高,这与以往文献报道一致^[21-22];人参与蛤蚧配方颗粒配伍灌胃能显著升高大鼠T水平、 E_2 /T、下丘脑GnRH mRNA表达水平,显著降低 E_2 水平,同时改善睾丸组织的病理损伤。这提示人参与蛤蚧配方颗粒配伍能改善HPG轴功能紊乱及病理损伤。

“正气存内,邪不可干”,正气的产生离不开肾阳温煦,故肾与免疫具有密切关系。免疫球蛋白是重要的免疫分子,IgG、IgM水平升高也是外源性糖皮质激素复制大鼠肾阳虚模型后免疫功能紊乱的表现^[23]。本研究结果显示,肾阳虚造模后大鼠IgG、IgM水平升高;人参与蛤蚧配方颗粒配伍灌胃可在一定程度上降低两者水平,使之恢复至免疫蛋白分泌正常。这说明人参与蛤蚧配方颗粒配伍能在一定程度上改善免疫系统功能紊乱。

综上所述,人参与蛤蚧配方颗粒配伍应用对肾阳虚模型大鼠具有协同调节作用,其机制可能与调节HPA轴、HPT轴、HPG轴及免疫功能形成的神经内分泌免疫网络有关;且人参与蛤蚧配方颗粒配伍对提高肾阳虚模

型大鼠肛温、T/E₂,降低下丘脑CRH mRNA表达水平的效果优于单用人参或蛤蚧配方颗粒。笔者团队下一步拟对人参、蛤蚧配方颗粒的不同配伍比例进行研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:8,358.
- [2] 高健,吕邵娃.人参化学成分及药理作用研究进展[J].中医药导报,2021,27(1):127-130,137.
- [3] 白朝辉,马姝丽,闫雪丽,等.孟鲁司特钠联合人参蛤蚧汤加减治疗小儿喘息性支气管炎的临床研究[J].中药材,2018,41(9):2224-2226.
- [4] 王子燕,黄衍杨,王怿,等.人参蛤蚧散联合肠内营养治疗COPD稳定期临床观察[J].中国中医药现代远程教育,2021,19(16):96-98.
- [5] 曹晓倩,梁小步,梁成新.人参蛤蚧汤加减治疗支气管哮喘临床效果[J].内蒙古中医药,2020,39(6):4-5.
- [6] 周蓓,邓家刚,吴燕春,等.蛤蚧对S180荷瘤鼠免疫逃逸功能的影响[J].时珍国医国药,2015,26(12):2883-2884.
- [7] 吴丽丽,周蓓,陈豪,等.蛤蚧不同提取液对衰老模型小鼠免疫功能的影响[J].中国老年保健医学,2018,16(1):17-20.
- [8] 黄馨慧,王晓珊,刘舒凌,等.蛤蚧生品及不同炮制品对腺嘌呤致肾虚模型小鼠的改善作用比较[J].中国药房,2020,31(13):1608-1612.
- [9] 路露,施钧瀚,侯富国,等.中药配方颗粒:历史、现状及“后试点时代”的发展展望[J].中国中药杂志,2022,47(8):2008-2014.
- [10] 唐维我,张会永,李芹,等.肾虚证动物模型造模方法及模型评价[J].世界科学技术-中医药现代化,2021,23(4):1317-1324.
- [11] 徐叔云.药理实验方法学[M]. 3版.北京:人民卫生出版社,2002:1834.
- [12] 陈士奎.我国开创的中西医结合科研及其启示:四:沈自尹院士与中医“肾”本质的中西医结合“探微索隐”研究[J].中国中西医结合杂志,2016,36(12):1414-1417.
- [13] 李博林,张纨,王志坤,等.化浊解毒方治疗溃疡性结肠炎的临床疗效及对神经-内分泌-免疫网络的影响[J].中国中西医结合杂志,2019,39(2):184-188.
- [14] 柴丽,赵博.抑郁症与HPA轴关系及中药干预的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(12):268-271.
- [15] 冯莉婷,周蓓,陈誉丹,等.西江桂和清化桂对肾阳虚大鼠HPA轴、HPG轴的影响[J].中药新药与临床药理,2021,32(4):499-504.
- [16] 娄勇军,王佳,黄玉秋,等.巴戟天及其炮制品对肾阳虚大鼠HPA轴功能的改善作用[J].中成药,2018,40(11):2535-2539.
- [17] 黄婉怡.血清甲状腺素(T₃、T₄)指标与中医肾虚证的相关性分析[J].临床医学工程,2018,25(3):309-310.
- [18] 李亚,王通,王广飞,等.牡蛎肽对肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴调节作用的研究[J].食品工业科技,2019,40(12):291-294.
- [19] 乐娜,侯燕,张建军,等.霍山石斛不同提取物对肾阴虚证和肾阳虚证小鼠温度趋向性、环核苷酸及甲状腺激素的影响[J].中华中医药杂志,2021,36(2):705-710.
- [20] 张鹏,高珍珍,马晓彤,等.列当对肾阳虚模型大鼠血清中内分泌激素水平的影响[J].中国兽医学报,2020,40(10):2020-2025.
- [21] 王启新,陈则华,罗琥捷,等.肉苁蓉不同提取部位改善肾阳虚大鼠性能力的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(22):95-101.
- [22] 闵志云,程立红,闵友江,等.基于正交设计的不同针刺因素对肾阳虚大鼠HPG轴影响的实验研究[J].中国中医基础医学杂志,2016,22(8):1080-1083.
- [23] 徐何方,杨颂,李莎莎,等.菟丝子醇提取物对肾阳虚证模型大鼠免疫功能的影响[J].中药材,2015,38(10):2163-2165.

(收稿日期:2021-12-01 修回日期:2022-03-15)

(编辑:舒安琴)

《中国药房》杂志——RCCSE中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅