

择时合用滋阴、益阳方对肾虚衰老模型 HPAT 轴的影响

李 巍 ,刘仁慧,康学,王秀娟*
(首都医科大学中医药学院,北京 100069)

【摘要】 目的:比较研究滋阴方六味地黄丸、益阳方金匱肾气丸单用及择时合用对肾虚衰老模型大鼠下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺(HPAT)轴的影响。方法:大鼠随机分为6组,除正常组外,其余组采用5% D-半乳糖 100 mg·kg⁻¹ 颈背部皮下注射联合糖皮质激素地塞米松 0.5 mg·kg⁻¹ 腹腔注射共造模6周,造模两周后,实验第15天开始各给药组分别给予动物 ig 1.16 g·kg⁻¹ 六味地黄丸、金匱肾气丸、六味地黄丸(早服)合金匱肾气丸(晚服)、金匱肾气丸(早服)合六味地黄丸(晚服),给药4周。比较各组血清皮质醇(COR)、血浆促肾上腺皮质激素(ACTH)、促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)含量及外周全血 CD4⁺、CD8⁺ 值。结果:与正常对照组相比,肾虚衰老模型组血清 COR 含量(6.35 ± 1.65) μg·L⁻¹ 显著降低($P < 0.05$),血浆 ACTH (53.00 ± 11.86) μg·L⁻¹, CRH(7.04 ± 1.37) μg·L⁻¹ 含量显著升高(均 $P < 0.05$), CD8⁺ 水平(23.70 ± 3.93)% 显著降低($P < 0.01$), CD4⁺/CD8⁺ (2.73 ± 0.29) 显著升高($P < 0.01$)。与肾虚衰老模型组相比,滋阴益阳组 COR 含量(10.76 ± 2.09) μg·L⁻¹ 显著上调($P < 0.01$), 益阳组、益阳滋阴组 ACTH(40.98 ± 8.55), (39.55 ± 14.67) μg·L⁻¹ 含量显著下调($P < 0.05$), 滋阴组、滋阴益阳组、益阳滋阴组 CRH 含量(5.39 ± 1.00), (5.27 ± 0.91), (5.61 ± 1.08) μg·L⁻¹ 均显著下调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 各用药组 CD8⁺ 水平, CD4⁺/CD8⁺ 无显著性差异, 各组 CD4⁺ 水平无显著性差异。结论:滋阴、益阳方单用及择时合用对肾虚衰老模型大鼠 HPA 轴的影响作用不同,其中以滋阴益阳方的作用较优,但未观察到对免疫功能紊乱的调节作用。

【关键词】 肾虚衰老; 滋阴/益阳方; HPAT 轴; 择时用药

【中图分类号】 R285.5 【文献标识码】 A 【文章编号】 1005-9903(2012)24-0256-04

Study of Effects of Time-dependent Combination of Ziyin Prescription
and Yiyang Prescription on HPAT Axis of Kidney Deficient Aging Model

LI Zhan, LIU Ren-hui, KANG Xue, WANG Xiu-juan*
(Department of Materia Medica, School of Traditional Chinese Medicine,
Capital Medicine University, Beijing 100069, China)

【Abstract】 Objective: To observe the effects of the separate application and time-dependent combination of Ziyin prescription (Liuwei Dihuang Pill, LWDHP) and Yiyang prescription (Jingui Shenqi Pill, JGSQP) on hypothalamus-pituitary-adrenal-thymus (HPAT) axis of kidney deficient aging model rats. Method: The rats were randomly divided into six groups. In addition to the normal group, other groups were injected 5% D-galactose solution 100 mg·kg⁻¹ combined with glucocorticoid dexamethasone solution 0.5 mg·kg⁻¹ to establish the model for six weeks, after establishing the model two weeks, each medication group was given LWDHP, JGSQP, LWDHP (morning use) combined with JGSQP (night use), JGSQP (morning use) combined with LWDHP (night use), 1.16 g·kg⁻¹ for four weeks, then the content of serum cortisol (COR), plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH), corticotropin-releasing hormone (CRH), and CD4⁺, CD8⁺ were detected. Result: Compared with natural group, serum COR of kidney deficient aging model group significantly decreased ($P < 0.05$), plasma ACTH, CRH significantly increased ($P < 0.05$), the level of CD8⁺ significantly decreased ($P < 0.01$), CD4⁺/

【收稿日期】 20120928(011)
【基金项目】 首都中医药与护理研究专项课题(10ZYH03)
【第一作者】 李巍,硕士研究生, Tel:13521687011, E-mail:lizhan0128@163.com
【通讯作者】 *王秀娟,教授,主任医师,从事临床中医学研究, Tel:010-83911624, E-mail:wxj0517@sina.com

CD8⁺ significantly increased ($P < 0.01$). Compared with kidney deficient aging model group, COR of Ziyin combined with Yiyang group (ZY group) significantly increased ($P < 0.01$), ACTH of Yiyang group, Yiyang combined with Ziyin group (YZ group) significantly decreased ($P < 0.05$), CRH of Ziyin group, ZY group, YZ group significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the level of CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ have no significant differences, the level of CD4⁺ have no significant differences between each group. **Conclusion:** The effects of separate application and time-dependent combination of Ziyin prescription and Yiyang prescription on HPA axis of kidney deficient aging model rats are different, ZY prescription have the best effect, but these prescriptions have no effect on immunity.

[**Key words**] kidney deficient aging; Ziyin/Yiyang prescription; HPAT axis; time-dependent medication

现代社会人口逐步走向老龄化,各种老年疾病也随之而来,因此研究衰老机制及延缓衰老的药物显得尤为重要。中医学认为肾精不足、肾虚是衰老的根本原因,临床多用补肾方药进行治疗。国内外大量研究已经证实补肾药物具有延缓衰老作用,本课题负责人通过长期的临床实践体会到,衰老患者多表现为阴阳俱损、肾精不足,故主张以补益肾中精气(阴阳双补)之法治疗,认为传统的补阴方六味地黄丸、补阳方金匮肾气丸为补益肾中精气的良药^[1],临床应用时若顺应人体阴阳的昼夜变化特点,择时应用金匮肾气丸(早服)合六味地黄丸(晚服)调治,较单一使用疗效更佳。中医“肾”的时间医学研究提示顺从人体的阴阳消长、脏腑盛衰之势择时服药可使药物取得最佳疗效^[2],但目前研究中尚无补肾阴、肾阳方药的择时用药的研究。机体衰老或肾虚时伴随着神经内分泌免疫的紊乱,尤其是与其中的 HPAT 轴密切相关^[3-4]。为了进一步阐释肾虚衰老之内涵,体现中医“辨证论治”的特点,本实验在前期建立的肾虚衰老模型的基础上^[5],主要观察滋阴方六味地黄丸、益阳方金匮肾气丸单用及择时合用对肾虚衰老模型大鼠 HPAT 轴功能的影响,以期为补肾方药择时合用延缓衰老的研究提供实验与理论基础。

1 材料

1.1 动物 清洁级健康雄性 SD 大鼠,体重(250 ± 10)g,由北京维通利华实验动物技术股份有限公司提供,许可证号 SCXK(京)2006-0009。

1.2 仪器 XH6080 型放免仪(西安核仪厂),酶标仪(Denley Dragon Wellscan, USA),FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.3 药物与试剂 金匮肾气丸、六味地黄丸(水蜜丸,购自北京同仁堂药店,金匮肾气丸批号 1032327,六味地黄丸批号 1032529,北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂生产);D-半乳糖

(Sigma-Aldrich 公司,批号 1000845739);地塞米松磷酸钠注射液(天津药业焦作有限公司,批号 10081711);CD3-FITC/CD4-APC / CD8-PE 抗体(产品号分别为 559975, 550057, 559976),FACS Lysing Solution 红细胞裂解液(产品号 349202),均购自 BD 公司;促肾上腺皮质激素(ACTH)酶联免疫检测试剂盒(上海朗顿生物科技有限公司,产品号 BP-E30596);皮质醇(COR)放射免疫试剂盒(北京北方生物技术研究所,批号 2011420);促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)放射免疫试剂盒(北京华英生物技术研究所,批号 20110501)。

2 方法

2.1 动物分组 取 SD 大鼠 48 只,按随机数字表法分为 6 组:正常对照组、肾虚衰老模型组,滋阴组(六味地黄丸),益阳组(金匮肾气丸),滋阴益阳组(六味地黄丸早服合金匮肾气丸晚服),益阳滋阴组(金匮肾气丸早服合六味地黄丸晚服),每组 8 只。

2.2 造模及给药 除正常对照组外,其余各组每日 1 次颈背部皮下注射 5% D-半乳糖生理盐水溶液,剂量为 100 mg · kg⁻¹,同时腹腔注射地塞米松 0.5 mg · kg⁻¹,每日 1 次,1 周后按照每周地塞米松 0.1 mg · kg⁻¹递减撤减激素用量,共计造模 6 周。实验第 15 天开始 ig,每日定时(8 am, 8 pm)给药 2 次。滋阴组:六味地黄丸 1.16 g · kg⁻¹,10 mL · kg⁻¹ ig, bid;益阳组:等剂量金匮肾气丸 1.16 g · kg⁻¹,10 mL · kg⁻¹ ig, bid;滋阴益阳组:早六味地黄丸 ig,晚金匮肾气丸 ig,剂量均为 1.16 g · kg⁻¹,10 mL · kg⁻¹;益阳滋阴组:早金匮肾气丸 ig,晚六味地黄丸 ig,剂量均为 1.16 g · kg⁻¹,10 mL · kg⁻¹。

2.3 取材处理 造模 6 周、给药 4 周后,实验第 43 天,腹腔麻醉,腹主动脉取血,其中 1 mL 加 EDTA 抗凝立即用于流式细胞检测;其余血液分离血清及血浆,血清用于 COR 含量的测定,血浆用于 ACTH, CRH 含量的测定。

2.4 观测指标及检测

2.4.1 外周全血 CD4⁺, CD8⁺ 采用流式细胞法。取抗凝血 100 μL, 加 CD4-APC/ CD8-PE/CD3-FITC 抗体各 5 μL, 混匀, 避光 20 min 后, 加红细胞裂解液 1 mL, 混匀, 静置 10 min, 离心, 弃上清, 加入 1.5 mL PBS, 混匀, 离心, 沉淀加 PBS 液混匀, 上机检测。

2.4.2 血清 COR 及血浆 ACTH, CRH 按照试剂盒说明书, ACTH 采用酶联免疫方法检测, 其余采用放射免疫测定法检测。

2.5 统计学处理 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差齐性检验及单因素方差分析, 根据方差齐性检验结果选择 LSD(方差齐)或 Tamhane's T2(方差不齐), 采用 SPSS 17.0 for Windows 软件包完成。

3 结果

3.1 血清 COR, 血浆 ACTH, CRH 含量的比较 与正常对照组相比, 肾虚衰老模型组血清 COR 含量显著降低($P < 0.05$), 血浆 ACTH, CRH 含量显著升高(均 $P < 0.05$)。与肾虚衰老模型组相比, 滋阴益阳组 COR 含量显著上调($P < 0.01$), 益阳组、益阳滋阴组 ACTH 含量显著下调($P < 0.05$), 滋阴组、滋阴益阳组、益阳滋阴组 CRH 含量均显著下调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。(表 1)。

3.2 外周全血 CD4⁺, CD8⁺ 的比较 与正常对照组相比, 肾虚衰老模型组 CD8⁺ 水平显著降低($P < 0.01$), CD4⁺/CD8⁺ 显著升高($P < 0.01$), 各个用药组 CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ 和肾虚衰老模型组比无显著性差异。各组 CD4⁺ 水平无显著性差异。(表 2)。

表 1 各组大鼠血清中 COR, 血浆中 ACTH, CRH 含量的比较($\bar{x} \pm s, n = 8$) μg·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	COR	ACTH	CRH
正常对照	—	9.30 ± 5.39	42.13 ± 7.19	5.73 ± 1.18
肾虚衰老模型	—	6.35 ± 1.65 ¹⁾	53.00 ± 11.86 ¹⁾	7.04 ± 1.37 ¹⁾
滋阴(六味地黄丸)	1.16	7.24 ± 1.92	45.52 ± 9.63	5.39 ± 1.00 ³⁾
益阳(金匮肾气丸)	1.16	7.18 ± 1.62	40.98 ± 8.55 ²⁾	6.02 ± 1.05
滋阴益阳(早六味 + 晚金匮)	1.16	10.76 ± 2.09 ³⁾	46.25 ± 10.27	5.27 ± 0.91 ³⁾
益阳滋阴(早金匮 + 晚六味)	1.16	7.24 ± 2.40	39.55 ± 14.67 ²⁾	5.61 ± 1.08 ²⁾

注:与正常对照组比¹⁾ $P < 0.05$;与肾虚衰老模型组比²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 各组大鼠外周全血 CD4⁺, CD8⁺ 及 CD4⁺/CD8⁺ 的比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CD4 ⁺ / %	CD8 ⁺ / %	CD4 ⁺ / CD8 ⁺
正常对照	—	60.68 ± 3.39	37.55 ± 3.26	1.63 ± 0.24
肾虚衰老模型	—	64.57 ± 11.95	23.70 ± 3.93 ¹⁾	2.73 ± 0.29 ¹⁾
滋阴(六味地黄丸)	1.16	68.63 ± 5.77	26.23 ± 5.73	2.77 ± 0.86
益阳(金匮肾气丸)	1.16	72.20 ± 1.87	23.23 ± 2.27	3.14 ± 0.35
滋阴益阳(早六味 + 晚金匮)	1.16	62.32 ± 11.12	26.22 ± 4.80	2.43 ± 0.54
益阳滋阴(早金匮 + 晚六味)	1.16	65.68 ± 11.56	24.48 ± 3.76	2.73 ± 0.64

注:与正常对照组比¹⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

中医学认为肾精不足、肾虚渐亏是衰老的核心和根本原因, 现代研究证明, 肾虚衰老与神经内分泌免疫系统的功能失调有着紧密的联系^[6-7], 而 HPAT 轴功能紊乱是其主要的一个方面^[4, 8-9]。补肾益精中药是中医延缓衰老的首选药物, 其中以补阴方六味地黄丸、补阳方金匮肾气丸为代表性方剂, 已有研究证实, 六味地黄丸、金匮肾气丸对衰老机体的神经内分泌免疫功能具有调节作用^[10-11], 但均为单方研

究, 缺乏对两方合用的研究, 且未能考虑到用药时间对药物作用的影响。有关中医“肾”的时间医学研究提示科学地服用补肾药对人体尤为重要, 强调顺从人体的阴阳消长、脏腑盛衰之势择时服药可使药物取得最佳疗效^[2]。本课题负责人通过长期的临床实践体会到, 虽然部分衰老患者表现为肾阴虚或肾阳虚证候, 但在阴虚或阳虚的基础上更多见阴阳俱损、肾精不足见证, 故主张以补益肾中精气(阴阳双补)之法治疗本病, 临床应用时若顺应人体阴阳

的昼夜变化特点,择时应用金匱肾气丸(早服)合六味地黄丸(晚服)调治,较单方使用疗效更佳。为了更好的阐释肾虚衰老之内涵,本实验采用 *D*-半乳糖与糖皮质激素联合造模建立肾虚衰老模型,比较研究单用及择时合用滋阴方六味地黄丸、益阳方金匱肾气丸对 HPAT 轴相关指标的影响作用,为择时合理应用滋阴方、益阳方延缓衰老研究提供实验依据。

研究显示:肾虚衰老大鼠血清 COR 含量显著降低($P < 0.05$),血浆 ACTH、CRH 含量显著升高(均 $P < 0.05$)。提示肾虚衰老模型肾上腺皮质功能降低,从而产生负反馈调节,下丘脑和垂体合成、分泌 CRH 和 ACTH 增加,HPA 轴功能紊乱。滋阴方可显著降低 CRH 含量($P < 0.01$);益阳方可下调 ACTH 水平($P < 0.05$);滋阴益阳方可显著上调 COR 水平($P < 0.01$),并抑制 CRH 水平($P < 0.01$);益阳滋阴方可使 ACTH、CRH 含量降低($P < 0.05$)。提示不同补肾方药的择时应用针对 HPA 轴功能紊乱的不同环节有一定的改善作用,其中以滋阴益阳方改善作用较显著。

胸腺是 T 淋巴细胞分化发育的场所,老年机体免疫功能的下降主要与 T 淋巴细胞功能降低有关,T 细胞中的 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 两大细胞亚群,是细胞免疫的重要效应细胞。如果 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ 数量或功能有缺陷,免疫功能就会失调,从而导致衰老^[12]。孙理军等^[13]研究发现,肾虚体质大鼠 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞的百分率的降低是肾虚体质大鼠免疫功能下降的表现。本实验结果显示:肾虚衰老模型组 $CD8^+$ 水平较正常对照组显著降低($P < 0.01$), $CD4^+/CD8^+$ 显著升高($P < 0.01$),细胞免疫功能紊乱,但应用补肾中药对此无明显调节作用。

综上所述,滋阴方六味地黄丸、益阳方金匱肾气丸单用及择时合用对肾虚衰老模型大鼠的神经内分泌功能紊乱有一定的调节作用,其中以滋阴益阳方的作用较优。但本实验中未观察到滋阴、益阳方对免疫功能紊乱的调节作用,考虑在今后的研究中应加大样本量进行观察。因大鼠的昼夜生理节律与人类相反,本实验结果也验证了临床应用补肾阳药宜

晨间服,补肾阴药宜晚间服,符合中医的“阳时养阳,阴时养阴”的原理。

[参考文献]

[1] 赵宇昊,高忠英,史成和,等.金匱肾气丸主治证候与君药辨析[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(12):112.

[2] 王义周,王庆松,刘妍,等.肾虚证择时用药的研究进展[J].安徽医药,2009,13(9):1009.

[3] 沈自尹,黄建华,陈伟华.以药测证对肾虚和肾阳虚大鼠基因表达谱的比较研究[J].中国中西医结合杂志,2007,27(2):135.

[4] 沈自尹,黄建华,陈瑜.老年大鼠下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺轴基因表达谱的研究[J].中国老年学杂志,2004,24(2):125.

[5] 李崧,刘仁慧,康学,等.肾虚衰老模型的建立及其与 *D*-半乳糖衰老模型的比较研究[J].中国中药杂志,2012,37(16):2435.

[6] 邓洋洋,郑洪新.人之衰老肾为其本——试论肾虚衰老说[J].中华中医药学刊,2007,25(12):2593.

[7] 姚建平,金国琴.神经内分泌免疫网络的老龄化变化及调控[J].国外医学:老年医学分册,2004,25(4):160.

[8] 李晓清,杨国汉.肾虚证物质基础及模型研究现状[J].贵阳中医学院学报,2009,31(3):64.

[9] 姚建平,金国琴,戴薇薇,等.右归丸对衰老大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴功能变化的影响[J].中药药理与临床,2010,26(1):8.

[10] 程革.金匱肾气丸延缓衰老作用的理论和实验研究[D].南京:南京中医药大学,2008.

[11] 赵建生,叶振邦,赵涛,等.六味地黄丸延缓衰老的临床研究及其药理实验研究[J].世界科学技术——中医药现代化,2006,8(2):117.

[12] 王思程,郑洪新.肾虚衰老说——肾虚衰老与 T 细胞凋亡 自由基损伤的相关性[J].中华中医药学刊,2009,27(4):836.

[13] 孙理军,郝蕊,薛昶.肾虚质大鼠 $CD4^+$ $CD8^+$ T 淋巴细胞亚群表达水平的研究[J].陕西中医,2008,29(12):1671.

[责任编辑 聂淑琴]