

五味子不同炮制品对大鼠肾阳虚的改善作用研究

王馨雅, 高 慧*, 王晓婷, 孙冬月

辽宁中医药大学 药学院, 辽宁 大连 116600

摘要: **目的** 通过比较五味子不同炮制品对肾阳虚大鼠的补益作用, 为酒五味子“入补药熟用”提供药理学依据。**方法** 采用甲巯咪唑法造肾阳虚大鼠模型, 将成模大鼠随机分为模型组、右归丸(3.7 g/kg)组、生五味子(2.8 g/kg)组、酒五味子(2.8 g/kg)组、醋五味子(2.8 g/kg)组, 另设对照组, 每组10只。各给药组从第16天开始ig相应药液, 给药体积均为10 mL/kg, 连续30 d。试剂盒测定各组大鼠血清中游离三碘甲状腺原氨酸(FT3)、游离四碘甲状腺原氨酸(FT4)、促甲状腺素(TSH)、一氧化氮(NO)、促甲状腺激素释放激素(TRH)水平; 测定血浆中环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)水平, 计算cAMP/cGMP; 观察各组大鼠甲状腺组织病理形态。**结果** 与模型组比较, 五味子各炮制品均能不同程度地提高大鼠血清FT3、FT4、NO及下丘脑TRH水平, 降低血清TSH水平, 两组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$ 、 0.01); 均可以提高血浆cAMP水平, 降低血浆cGMP水平, 两组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$ 、 0.01)。其中与生五味子、醋五味子组比较, 酒五味子作用最优($P < 0.01$)。五味子各炮制品对甲状腺病理形态均有所改善, 其中酒五味子、醋五味子较优。**结论** 五味子的补肾作用与改善下丘脑-垂体-甲状腺(HPT)轴功能抑制有关, 酒五味子补肾作用最好。

关键词: 五味子; 炮制品; 生五味子; 酒五味子; 醋五味子; 肾阳虚; 甲状腺激素; HPT轴

中图分类号: R283.1; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2018)01-0010-05

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2018.01.003

Improvement of different *Schisandrae Chinensis Fructus* processed products on yang kidney deficiency in rats

WANG Xin-ya, GAO Hui, WANG Xiao-ting, SUN Dong-yue

College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

Abstract: **Objective** To compare the effects of different *Schisandrae Chinensis Fructus* processed products on tonifying action in rats with yang kidney deficiency, so as to provide pharmacological basis for the “processed *Schisandra chinensis* fruits as a tonic”. **Methods** The model of yang kidney deficiency rats were induced by methimazole method, and were randomly divided into model group, Yougui Pills (3.7 g/kg) group, raw *S. chinensis* fruits (2.8 g/kg) group, wine *S. chinensis* fruits (2.8 g/kg) group, and vinegar *S. chinensis* fruits (2.8 g/kg) group, as well as the control group was established, and each group had 10 rats. Rats in treatment groups were ig administrated with corresponding drugs volume of 10 mL/kg from 16th day for 30 d. Kit determination methods were used to measure serum FT3, FT4, TSH, NO, and TRH. Plasma cAMP and cGMP contents were also determined and calculate the ratio of cAMP/cGMP. The thyroid pathological changes in rats were observed. **Results** Compared with the model group, the treatment groups could enhance the levels of serum FT3, FT4, NO, and hypothalamic TRH levels, and reduce the level of serum TSH, and there was difference between two groups ($P < 0.05$, 0.01). And *Schisandrae Chinensis Fructus* could increase the plasma contents of cAMP, decrease the levels of plasma cGMP, with significant difference between two groups ($P < 0.05$, 0.01). Compared with raw and vinegar *S. chinensis* fruits groups, the effects of wine *S. chinensis* fruits group was the best ($P < 0.01$). *Schisandrae Chinensis Fructus* could improve the pathological morphology of thyroid, and the effects of vinegar and wine *S. chinensis* fruits groups were better. **Conclusion** The kidney tonifying effect of *Schisandrae Chinensis Fructus* is related to improvement of the inhibition of hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT) axis function, and the best effect of kidney tonifying is wine *S. chinensis* fruits. **Key words:** *Schisandrae Chinensis Fructus*; raw *Schisandra chinensis* fruits; wine *S. chinensis* fruits; vinegar *S. chinensis* fruits; yang kidney deficiency; thyroid hormone; HPT axis

收稿日期: 2017-09-06

基金项目: 中医药行业科研专项项目(20110700704)

作者简介: 王馨雅(1993—), 女, 辽宁省大连市人, 硕士研究生, 研究方向为中药炮制原理研究。Tel: 15104076757 E-mail: 15104076757@163.com

*通信作者 高 慧, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药炮制原理研究。Tel: (0411) 85890151 E-mail: gaohuitcm@163.com

五味子味酸、甘,性温,收敛固涩、益气生津、补肾宁心,主要用于津伤口渴、久嗽虚喘、遗尿尿频、久泻不止、心悸失眠等证^[1]。传统中医理论认为五味子“入补药熟用,入嗽药生用”^[2],即五味子“生熟异用”。《中国药典》1963年版收载的是五味子和酒五味子,自《中国药典》1977年版以来,收载变为五味子和醋五味子。“入补药熟用”指的是五味子何种炮制品,未见明确记载。早在明代《仁术便览》、《本草纲目》就有记载五味子“入补药熟用”,清代《本草易读》中也有五味子“生用止嗽,熟用入补”。醋五味子为近代新增加品种,故“入补药熟用”恐指的不是醋五味子。本课题组前期药效实验在一定程度上证明了五味子生熟的差异,如治疗肾阳虚、肾阴虚应选酒五味子^[3-4]。本实验以生五味子、酒五味子、醋五味子作为研究对象,采用甲巯咪唑诱导建立大鼠阳虚内寒证模型,考察五味子不同炮制品对肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-甲状腺(HPT)轴的调节作用,为五味子“入补药熟用”的临床合理应用提供实验参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

KQ-250DB型超声波清洗器(频率40 kHz,昆山市超声仪器有限公司);FA-1004B型电子天平(上海精密科学仪器有限公司);移液器(Thermo公司);DW-86W100超低温保存箱(青岛海尔股份有限公司);HC-1010微型台式恒温振荡器(安徽中科中佳科学仪器有限公司);D3024型离心机(赛洛捷克仪器有限公司);MultiskanMK3酶标仪(Thermo公司);BX51生物显微镜[奥林巴斯(中国)有限公司]。

1.2 材料

五味子饮片购自辽宁省大梨树五味子 GAP 基地,经辽宁中医药大学药学院王冰教授鉴别为北五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实。右归丸(河南省宛西制药有限公司,规格45 g/瓶,批号Z41022170);甲巯咪唑片(Merck KGaA,规格10 mg片,批号182607);一氧化氮(NO)测试盒96T(批号BEP10868,南京建成生物工程研究所);血清游离四碘甲状腺原氨酸(FT4)酶联免疫检测试剂盒96T(批号BPE30617)、血清游离三碘甲状腺原氨酸(FT3)酶联免疫检测试剂盒96T(批号BPE30618)、促甲状腺激素释放激素(TRH)酶联免疫检测试剂盒96T(批号BPE30423)、促甲状腺激素(TSH)酶联免疫检测试剂盒96T(批号

BPE30606)、环磷鸟嘌呤核苷(cGMP)酶联免疫检测试剂盒96T(批号BPE30335)、环磷酸腺苷(cAMP)酶联免疫检测试剂盒96T(批号BPE30335),均购于上海郎顿生物科技有限公司。其他所用试剂均为分析纯。

1.3 动物

SPF级SD大鼠,雄性,180~220 g,由辽宁长生生物技术有限公司提供,许可证号SCXK(辽)2010-0001。于室温25℃、相对湿度50%的环境下适应性饲养7d左右。

2 方法

2.1 样品溶液的制备

2.1.1 右归丸水溶液 取右归丸,用研钵研碎,加沸水超声至全部溶解,配制成0.37 g/mL右归丸水溶液。

2.1.2 甲巯咪唑水溶液 取甲巯咪唑片,用研钵研成细粉,加纯化水,超声过程中用玻璃棒不断搅拌至全部溶解,配制成1 mg/mL甲巯咪唑水溶液。

2.1.3 五味子炮制品水煎液 参照前期确定的炮制工艺制备酒五味子、醋五味子^[5]。取净五味子200 g,加入黄酒40 mL拌匀,闷润1 h,蒸制4 h,置于50℃烘箱烘干至恒定质量,即得酒五味子。取净五味子200 g,加入米醋40 mL拌匀,闷润1.5 h,蒸制5 h,置于50℃烘箱烘干至恒定质量,即得醋五味子。取生五味子、酒五味子、醋五味子适量,分别加10倍量水,加热回流提取3次,每次回流提取1 h,合并滤液,浓缩,得五味子各炮制品水煎液,质量浓度均为280 mg/mL^[6]。

2.2 造模和给药

选取甲巯咪唑法造大鼠肾阳虚模型^[7-14], ig 甲巯咪唑10 mg/kg连续15 d,结果大鼠体毛松懈,少有光泽,行为迟缓,精神状态不佳,畏寒聚堆,体质量下降,而未给药大鼠体毛致密有光泽,紧贴皮肤,精神状态良好,活泼好动,表明甲巯咪唑造模成功。

成模后,随机将其分为模型组、右归丸组、生五味子组、酒五味子组、醋五味子组,每组各10只。另设未给药的对照组。右归丸组给药剂量为3.7 g/kg^[15],生、酒、醋五味子组给药剂量均为2.8 g/kg^[6]。各给药组从第16天开始ig相应药液,给药体积均为10 mL/kg,连续30 d。给药期间,模型组和各给药组仍按造模时的剂量每隔1天ig甲巯咪唑。实验期间内,对照组根据体质量给予等体积的

生理盐水。定时测量体质量,以调整给药剂量。

2.3 检测指标

最后一次给药后,各组大鼠均禁食不禁水,12 h后乙醚麻醉,腹主动脉取血,离心,取上清为血清;加肝素抗凝,取上清为血浆,分装, -20 ℃保存待测。严格按照试剂盒说明书步骤进行操作,测定大鼠血清 FT3、FT4、NO 和 TSH 水平;测定大鼠血浆 cAMP、cGMP 水平,计算 cAMP/cGMP。

采血完毕后,将大鼠的胸腔打开,裸露出气管,分离出甲状腺,用 10%福尔马林溶液固定,常规切片,HE 染色,进行组织病理学检查。

将大鼠后脑打开,取出大脑后分离出下丘脑,装于 EP 管中, -80 ℃保存。精密称取下丘脑的质量,按质量与体积 1:9 的比例,加入 PBS,手动研磨成 10%的下丘脑研磨液。严格按照测试盒说明书方法操作,测定大鼠下丘脑促甲状腺素释放激素

(TRH) 水平。

2.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 对数据进行分析,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。

3 结果

3.1 五味子对肾阳虚大鼠血清 FT3、FT4、NO、TSH 及下丘脑 TRH 水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠血清 FT3、FT4、NO 和下丘脑 TRH 水平均显著下降,血清 TSH 水平显著升高,两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组比较,各给药组均能不同程度地提高大鼠血清 FT3、FT4、NO 和下丘脑 TRH 水平,同时降低血清 TSH 水平,两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01),表明各给药组均具有补肾的作用,其中与生五味子、醋五味子组比较,酒五味子作用最佳 ($P < 0.01$)。结果见表 1。

表 1 五味子对阳虚内寒证大鼠血清 FT3、FT4、TSH、NO 下丘脑 TRH 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Table 1 Effects of *Schisandrae Chinensis Fructus* on serum FT3, FT4, TSH, NO, and hypothalamus TRH in kidney deficiency rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	FT3/(ng·L ⁻¹)	FT4/(ng·L ⁻¹)	TSH/(mIU·L ⁻¹)	NO/(μmol·L ⁻¹)	TRH/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	0.37±0.08	0.18±0.00	0.24±0.01	0.50±0.09	0.47±0.02
模型	—	0.19±0.01**	0.15±0.00*	0.37±0.02*	0.43±0.01**	0.35±0.02**
右归丸	3.7	0.57±0.05 ^{###}	0.59±0.06 ^{###}	0.27±0.01 ^{###}	0.63±0.01 ^{###}	0.65±0.01 ^{###}
生五味子	2.8	0.41±0.02 ^{###}	0.46±0.02 ^{###}	0.35±0.01 ^{###}	0.54±0.02 ^{###}	0.54±0.02 ^{###}
醋五味子	2.8	0.61±0.02 ^{###}	0.52±0.04 ^{###}	0.33±0.01 ^{###}	0.65±0.02 ^{###}	0.68±0.06 ^{###}
酒五味子	2.8	0.72±0.02 ^{###△△}	0.70±0.05 ^{###△△}	0.26±0.02 ^{###△△}	0.77±0.03 ^{###△△}	0.85±0.03 ^{###△△}

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$; 与生五味子、醋五味子组比较: △△ $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$ vs model group; △△ $P < 0.01$ vs raw *Schisandra chinensis* fruits and vinegar *Schisandra chinensis* fruits groups

3.2 五味子对肾阳虚大鼠血浆 cAMP、cGMP 及 cAMP/cGMP 影响

与对照组比较,模型组大鼠血浆 cAMP、cAMP/cGMP 水平显著降低,血浆 cGMP 水平显著升高,两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组均可以提高血浆 cAMP 水平、cAMP/cGMP 值,降低血浆 cGMP 水平,两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01),表明各给药组均有补肾的效果,其中与生五味子、醋五味子组比较,酒五味子作用最优 ($P < 0.01$)。结果见表 2。

3.3 五味子对肾阳虚大鼠甲状腺病理形态的影响

对照组镜下可见甲状腺实质内为大量的甲状

腺滤泡,滤泡壁由单层上皮围成,形成双层壁,壁内有少量的间质,腔内含有胶状物,呈红色,滤泡上皮通常呈立方形,随着状况而改变,可呈现出矮柱状或扁平状。模型组镜下可见卵圆形或圆形的上皮细胞,且滤泡体积比较大,滤泡壁出现断裂,界限不清楚,存在大量的异染色质,同时可见大量的炎性细胞存在,腔内含有的红色胶状物着色深浅不一,有裂痕、萎缩、坏死现象。生五味子组与模型组比较,镜下可观察到甲状腺滤泡上皮细胞呈圆形或卵圆形,滤泡的体积大、小形态结构都有所改善,腺滤泡壁界限有的部位比较清楚,但仍可见异染色质和浸润的炎性细胞存在,裂痕、萎缩、坏死有所改善。酒五味子组、

醋五味子组结构基本接近于右归丸组，甲状腺滤泡大小排列稀疏但有规则，滤泡上皮细胞结构较完整，形成双层壁，可见间质中有的部位呈现大量浸润的炎性细胞，滤泡腔内红色胶状物着色深浅不一致、有裂痕、坏死有所恢复。其中酒五味子、醋五味子较优，见图1。

表2 五味子对大鼠血浆 cAMP、cGMP 水平及 cAMP/cGMP 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Table 2 Effect of *Schisandrae Chinensis Fructus* on plasma cAMP, cGMP content and cAMP/cGMP ratio in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	cAMP/(pmol·mL ⁻¹)	cGMP/(nmol·L ⁻¹)	cAMP/cGMP
对照	—	0.46±0.02	0.050±0.020	8.66±0.37
模型	—	0.34±0.03**	0.060±0.030**	5.39±0.53**
右归丸	3.7	0.54±0.02 ^{##}	0.050±0.020 ^{##}	9.81±0.52 ^{##}
生五味子	2.8	0.48±0.02 ^{##}	0.050±0.001 [#]	8.08±0.43 [#]
醋五味子	2.8	0.64±0.02 ^{##}	0.049±0.001 ^{##}	10.85±0.58 ^{##}
酒五味子	2.8	0.87±0.02 ^{##△△}	0.044±0.00 ^{##△△}	17.48±0.85 ^{##△△}

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$; 与生五味子、醋五味子组比较: ^{△△} $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group; ^{△△} $P<0.01$ vs raw *Schisandra chinensis* fruits and vinegar *Schisandra chinensis* fruits groups

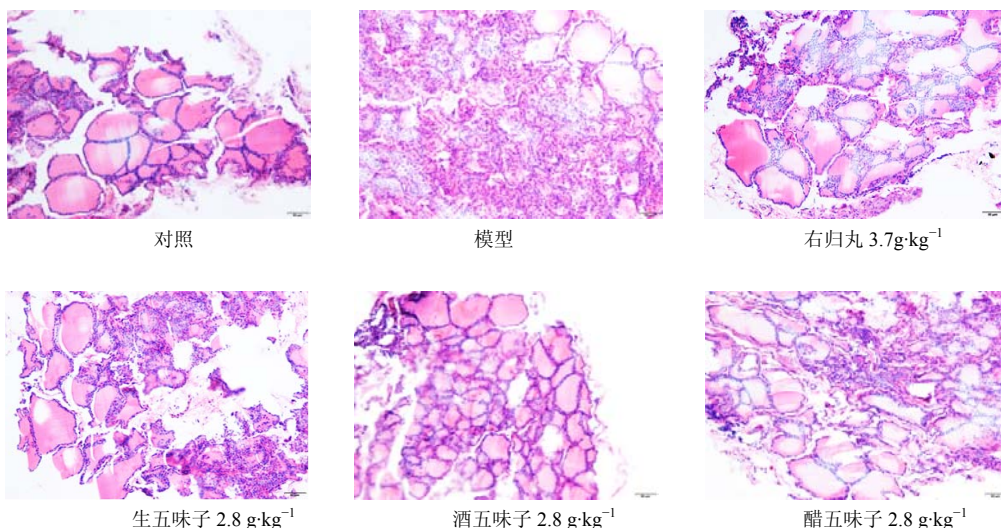


图1 生五味子、酒五味子、醋五味子对甲状腺病理形态的影响 (HE 染色)

Fig. 1 Effect of *S. chinensis* fruits, *S. chinensis* fruits processed with wine, and *S. chinensis* fruits processed with vinegar on pathological morphology of thyroid gland (HE staining)

4 讨论

甲状腺功能低下所致肾阳虚模型制备方法目前大致可以分为两种，一种是给予硫脲类药物^[16-17]，一种是甲状腺组织手术全切。较给药相比，手术的方法复杂，并且会对实验动物的内环境带来一定程度的损伤，无法正确判断造模原因；故采用给药的方法，并且根据结果可明确造模方法的可靠性和稳定性。2012年美国甲状腺学会和美国临床内分泌医师学会《成人甲减的诊治指南》指出血清FT3、FT4、TSH是诊断甲减的主要依据^[18]。甲状腺病理是观察

HPT功能的主要指标。FT3 又名血清游离三碘甲状腺原氨酸（游离T3），是诊断甲亢最灵敏的一项指标，由于其含量不受甲状腺结合球蛋白的影响，因此在甲亢和甲减的诊断、病情严重程度评估、疗效监测等方面有重要应用价值。FT4 又名血清游离甲状腺素，甲状腺素是甲状腺滤泡细胞合成、分泌的激素，以游离形式释放入血循环中，大部分迅速与血浆蛋白相结合。结合部分的三碘甲状腺原氨酸（T3）、四碘甲状腺原氨酸（T4）没有生物活性，其水平高低不能反映甲状腺的功能状态，只有很小一部分不与蛋

白质结合,呈游离状态,称为血清游离三碘甲腺原氨酸(FT3)、血清游离甲状腺素(FT4)。两者最能直接反映甲状腺功能状态,并且不受血中甲状腺素结合球蛋白浓度、结合力改变的影响。下丘脑分泌的促甲状腺素释放激素TRH刺激垂体前叶释放促甲状腺素TSH,后者又刺激甲状腺分泌T3、T4。外源性的TRH可使TSH、T3、T4水平升高,借以了解垂体TSH的储备能力,用于鉴别甲状腺功能低下的病变部位。

本实验测得成模后大鼠的血清FT3、FT4、NO、下丘脑TRH含量均显著降低,血清TSH、cAMP/cGMP值明显增高,表明反映甲状腺功能低下的一些经典常用指标均发生了明显的改变,同时镜下结果显示甲状腺组织功能也发生了一定程度的损害,与临床肾阳虚症的基本病理特征相符,表明模型组大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴功能受到抑制。甲状腺功能低下可促进促甲状腺激素分泌导致甲状腺代偿性增生,出现甲状腺肿大^[15-16];甲状腺功能低下还可以导致血浆环磷鸟苷降低,故cAMP/cGMP比值升高。

实验结果表明,给药组能显著提高大鼠血清FT3、FT4、NO、下丘脑TRH、血浆cAMP/cGMP水平,使血清TSH水平显著降低,且酒五味子作用效果好。即五味子炮制品对甲状腺的功能低下的病理症状能显著改善,以酒五味子最佳。故推测,酒五味子补肾宁心作用机制可能与改善阳虚内寒证大鼠的HPT轴功能抑制状态有关。

因此五味子酒制后对肾阳虚大鼠补肾作用效果增强,与五味子“入补药熟用”的传统理论一致,本研究结果提示五味子“入补药熟用”指的是酒五味子。

参考文献

[1] 中国药典[S].一部.2015:61-62.

[2] 张浩方.仁术便览[M].海口:海南国际新闻出版社,1995:320.

[3] 高慧,佟鑫,裴启洋,等.五味子“生熟异用”之补肾阴作用[J].中成药,2014,36(12):2471-2474.

[4] 高慧,佟鑫,裴启洋,贾天柱.五味子“生熟异

用”之补肾阳作用[J].中草药,2014,45(13):1889-1893.

[5] 徐月,高慧,贾天柱.HPLC测定五味子不同炮制品及不同部位有机酸含量[J].中国中医药信息杂志,2014,21(7):85-88.

[6] 徐月,高慧,贾天柱.五味子“生熟异用”之降血糖作用[J].中药材,2014,37(11):1977-1979.

[7] 裴妙荣,王晓英.用甲状腺功能减退症大鼠确立脾肾阳虚证之病症结合模型的探讨[J].世界中西医结合杂志,2007,2(5):299-301.

[8] 宋洁,李震,于海芳.从下丘脑-垂体-甲状腺轴研究肾阳虚证的现状与思考[J].时珍国医国药,2009,20(7):1808-1810.

[9] 李雪萍,赵树华.肾系疾病之中医辨证属阳虚证型与甲状腺激素关系的研究进展[J].时珍国医国药,2006,17(12):2583-2584.

[10] 陈英华,欧阳铁强,孙琪,等.肾阳虚证动物模型规范化研究中诊断指标选择的初步探讨[J].中国中医基础医学杂志,2003,9(10):26-30.

[11] 卢德赵,沃兴德.肾阳虚证研究的现状与思考[J].浙江中医药大学学报,2007,31(3):399-401.

[12] 欧阳铁强,邹移海,张薇,等.对大鼠他巴唑肾阳虚证动物模型下丘脑-垂体-靶腺轴几项指标的考察[J].中华中医药学刊,2006,24(9):1658-1661.

[13] 张子泰,侯英萍,汪静,等.用左旋T4建立大鼠功能亢进模型的实验研究[J].西北国防医学杂志,2006,27(1):34-36.

[14] Rees D A, Alcolado J C. Animal models of diabetes mellitus[J].Diabet Med,2010,22(4):359-370.

[15] 贾锡莲,曲竹秋,徐灿坤,等.右归丸对实验性甲减大鼠甲状腺滤泡细胞凋亡相关因子Bcl-2/Bax表达的影响[J].山东中医杂志,2007,26(10):706-708.

[16] 苗明三,朱飞鹏.常用医药研究动物模型[M].北京:人民卫生出版社,2007:402-403.

[17] 陈小野,邹世洁,王震,等.小鼠甲状腺机能减退肾阳虚模型的胃黏膜病理研究[J].吉林中医药,1997(6):36-37.

[18] Garber J R, Cobin R H, Gharib H, et al. Clinical practice guidelines for hypothyroidism in adults: cosponsored by the American Association of Clinical Endocrinologists and the American Thyroid Association[J].Endocr Pract,2012,8(3):988-1028.