

无比山药丸对肾阳虚模型小鼠勃起功能障碍的作用及机制研究

金小虎¹, 苏洁¹, 陈思敏¹, 钟玉滢¹, 周意情¹, 洪亚男³, 叶威³, 陈炜³, 陈素红^{2*}, 吕圭源^{1*}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

2. 浙江工业大学, 浙江 杭州 310014

3. 杭州胡庆余堂药业有限公司, 浙江 杭州 310016

摘要: 目的 研究无比山药丸对“房事不节+劳倦过度”导致的肾阳虚模型小鼠勃起功能障碍的作用及作用机制。方法 选取性功能良好的雄性 ICR 小鼠 60 只, 随机分为对照组、模型组、金匮肾气丸 (1.7 g/kg) 组和无比山药丸低、中、高剂量 (0.75、1.50、3.00 g/kg) 组。采用强迫小鼠游泳致力竭的方法造成劳倦过度, 并以 Collidge 效应诱导雄性小鼠房事不节, 建立肾阳虚勃起功能障碍模型小鼠。造模同时 ig 相应药物, 连续 8 周。测定小鼠肛温、抓力、自主活动次数、尾部微循环血流量及性行为等肾阳虚证候指标; 检测血清中尿酸 (uric acid, UA)、肌酐 (creatinine, CR) 和尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 水平; 检测肾脏组织中丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 水平和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-PX) 活性; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察肾组织病理变化; 采用 TUNEL 染色观察肾组织细胞凋亡情况; 采用试剂盒检测阴茎组织中鸟苷酸环化酶 (guanylate cyclase, GC)、一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 活性和一氧化氮 (nitric oxide, NO)、环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 水平; 采用 Western blotting 检测阴茎组织中内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 和 GC 蛋白表达。结果 无比山药丸显著增加肾阳虚模型小鼠的肛温、抓力、自主活动次数、尾部微循环血流量及捕捉、骑跨次数 ($P<0.05$ 、 0.01), 显著缩短捕捉、骑跨潜伏期 ($P<0.01$); 降低血清中 UA、CR、BUN 水平 ($P<0.05$ 、 0.01); 降低肾脏组织 MDA 水平 ($P<0.01$), 升高 SOD 和 GSH-PX 活性 ($P<0.05$ 、 0.01); 改善肾脏病变及细胞凋亡情况; 增加阴茎组织 NO、cGMP 水平和 NOS 及 GC 活性 ($P<0.01$); 上调阴茎组织 eNOS、GC 蛋白表达 ($P<0.01$)。结论 无比山药丸能够改善“房事不节+劳倦过度”致肾阳虚证候, 调节勃起功能障碍, 其作用机制可能与 UA 介导的 NO-cGMP 途径有关。

关键词: 无比山药丸; 肾阳虚; 房事不节; 劳倦过度; 勃起功能障碍; 一氧化氮-环磷酸鸟苷途径

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)17-5400-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.17.016

Effect and mechanism of Wubi Shanyao Pills on erectile dysfunction of kidney-yang deficiency model mice

JIN Xiao-hu¹, SU Jie¹, CHEN Si-min¹, ZHONG Yu-ying¹, ZHOU Yi-qing¹, HONG Ya-nan³, YE Wei³, CHEN Wei³, CHEN Su-hong², LYU Gui-yuan¹

1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

3. Hangzhou Huqingyutang Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310016, China

Abstract: Objective To observe the effect and mechanism of Wubi Shanyao Pills (无比山药丸) on erectile function of kidney-yang deficiency model mice caused by sexual overstrain and over-exertion. **Methods** Sixty male ICR mice with good sexual function were randomly divided into control group, model group, Jinkui Shenqi Pills (1.7 g/kg) group and Wubi Shanyao Pills low-, medium- and high-dose (0.75, 1.50, 3.00 g/kg) groups. The over-exertion model was caused by forcing mice to swim to exhaustion, and model of erectile dysfunction due to kidney-yang deficiency was established by sexual overstrain in male mice with College effect. Mice were

收稿日期: 2022-04-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81873036); 浙江省重点研发计划项目 (2017C03052); 浙江省重点实验室项目 (2012E10002)

作者简介: 金小虎 (1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。Tel: 15868130993 E-mail: jxh976116@163.com

*通信作者: 吕圭源, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药理学与新产品开发研究。E-mail: lv.gy@263.net

陈素红, 博士, 研究员, 主要从事中药药理学与新产品开发研究。E-mail: chensuhong@zjut.edu.cn

ig corresponding drugs for 8 consecutive weeks at the same time as modeling. The anal temperature, grasping power, number of autonomous activity, blood flow in tail microcirculation and sexual behavior of mice with kidney-yang deficiency symptoms were measured; Uric acid (UA), creatinine (CR) and blood urea nitrogen (BUN) levels in serum were detected; Malondialdehyde (MDA) level and superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX) activities in kidney tissue were detected; Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of renal tissue; TUNEL staining was used to observe the apoptosis of renal tissue; Kits were used to detect guanylate cyclase (GC), nitric oxide synthase (NOS) activities and nitric oxide (NO), cyclic guanosine monophosphate (cGMP) levels in penile tissue. Western blotting was used to detect protein expressions of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and GC in penis tissue. **Results** Wubi Shanyao Pills significantly increased the anal temperature, grasping power, number of autonomous activities, microcirculation blood flow in tail, capture and straddle times ($P < 0.05, 0.01$), and reduced capture and straddle latency ($P < 0.01$), decreased UA, CR, and BUN levels in serum ($P < 0.05, 0.01$), decreased MDA level in kidney tissue ($P < 0.01$), increased SOD and GSH-PX activities in kidney tissue ($P < 0.05, 0.01$), improved kidney lesions and cell apoptosis, increased NO, cGMP levels and NOS, GC activities in penile tissue ($P < 0.01$), and up-regulated eNOS and GC protein expressions in penile tissue ($P < 0.01$). **Conclusion** Wubi Shanyao Pills can improve the syndrome of kidney-yang deficiency caused by sexual overstrain and over-exertion, regulate erectile dysfunction, and its mechanism may be related to UA-mediated NO-cGMP pathway.

Key words: Wubi Shanyao Pills; kidney-yang deficiency; sexual overstrain; over-exertion; erectile function; nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway

肾阳虚是由于素体阳虚、年高肾亏、房劳过度、久病伤肾等，使肾阳亏虚，机体失却温煦所表现的证候^[1]。现阶段我国经济处于高速发展阶段，人们生活节奏快，经济、家庭、工作压力大，造成精神及身体长期处于过度疲劳（劳倦过度）状态，这些不良因素的长期存在，使越来越多的青年男性（工作单位主力、家庭经济主力）也出现了肾阳虚现象，发病年龄趋于年轻化。与此同时，青年男性性欲强烈，保持着高频率的性交行为（房事不节），也易导致肾阳虚。而肾阳虚衰，命门之火不足，精失所藏易致“性欲冷淡”，为肾阳虚主证之一，临床上男性主要表现为勃起功能障碍。

无比山药丸由山药、熟地、杜仲、巴戟天、肉苁蓉等 12 味中药组成，各味药补肾功效显著。据古书记载，无比山药丸古时常用于治疗“丈夫虚劳百损，阳气衰绝，体无光泽，头晕目眩，腰骭不遂等”。临床上无比山药丸对肾脏疾病具有一定的治疗作用^[2-7]。本课题组前期研究发现，无比山药丸对药物造成的肾阳虚动物模型的性功能具有良好的改善作用^[8-9]，但药物制备的肾阳虚动物模型不能完整地表现该症状的临床特点，因此，本研究采用“房事不节+劳倦过度”的造模方法，建立符合中医病因和现代人群肾阳虚的模型小鼠，深入探讨无比山药丸对拟人化肾阳虚模型小鼠勃起功能的改善作用，为无比山药丸拓展临床应用范围。

1 材料

1.1 动物

清洁级雄性 ICR 小鼠 65 只，6~8 周龄，体质

量 25~30 g，购自上海斯莱克实验动物有限公司，合格证号 20170005054902，动物生产许可证号 SCXK（沪）2017-0005。清洁级雌性 ICR 小鼠 300 只，4~6 周龄，体质量 20~25 g，购自上海斯莱克实验动物有限公司，合格证号 20170005053699，动物生产许可证号 SCXK（沪）2017-0005。动物于温度 20~26 °C、湿度 45%~60%、12 h 照明/12 h 黑暗的环境中饲养。动物实验经浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会决议批准（批准号 ZSLL-2017-023）。

1.2 药品与试剂

无比山药丸（批号 2013914）购自杭州胡庆余堂药业有限公司；金匱肾气丸（批号 19032610）购自北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂；苯甲酸雌二醇注射液（批号 20210119）购自吉林省华牧动物保健品有限公司；尿酸（uric acid, UA）检测试剂盒（批号 210913201）购自美康生物科技有限公司；肌酐（creatinine, CR）、检测试剂盒（批号 20210918）、尿素氮（blood urea nitrogen, BUN）检测试剂盒（批号 20210922）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）检测试剂盒（批号 20211201）、丙二醛（malonaldehyde, MDA）检测试剂盒（批号 20211201）、谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase, GSH-Px）检测试剂盒（批号 202111129）、一氧化氮（nitric oxide, NO）检测试剂盒（批号 20211211）、一氧化氮合酶（nitric oxide synthase, NOS）检测试剂盒（批号 20211130）购自南京建成生物工程研究所；环磷酸鸟苷（cyclic

guanosine monophosphate, cGMP) 检测试剂盒 (批号 20211208-20356B)、鸟苷酸环化酶 (guanylate cyclase, GC) 检测试剂盒 (批号 20211208-24742B) 购自泉州市睿信生物科技有限公司; 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (批号 122321220104)、BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 070721211202)、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶快速配制试剂盒 (批号 041221210804)、电泳液 (批号 121120210422)、转膜液 (批号 022021210719) 购自碧云天生物技术有限公司; 兔源内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 抗体 (批号 GR3422361-4) 购自英国 Abcam 公司; 兔源 GC 抗体 (批号 LL0422) 购自成都正能生物技术有限公司; 兔源 β -actin 抗体 (批号 B9901) 购自美国 ImmunoWay 公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 HP0119) 购自杭州华安生物科技有限公司。

1.3 仪器

YLS-13A 型小鼠抓力测定仪、YLS-1A 型多功能小鼠自动活动记录仪 (山东省医学科学院设备站); TBA-40FR 型全自动生化分析仪 (东芝医疗系统株式会社); MicroCL17 型微量离心机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); PowerWave340 型酶标仪 (美国 BioTek 公司); AXIOSCOPE.A1 型蔡司正置荧光显微镜 (德国 CarlZeissAG 公司); SCIENTZ-48 型高通量组织研磨器 (宁波新芝生物技术有限公司); EPS300 型电泳电压仪 (上海天能科技有限公司); QuickChemi 5200 型化学发光成像仪 (杭州莫纳生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 动情期雌鼠的准备及雄鼠的筛选

2.1.1 动情期雌鼠准备 将雌鼠进行输卵管结扎手术, 术后恢复 2 周, 连续 2 d ig 苯甲酸雌二醇 (0.02 mg/g), 第 3 天通过阴道涂片检查角化细胞, 筛选发情状况良好的雌鼠。

2.1.2 雄鼠的筛选 前 1 d 晚上将每只雄鼠与 2 只动情期雌鼠共笼, 次日早晨, 检查笼内雌鼠阴部, 发现有阴道栓说明有过交配行为, 将笼内雄鼠取出作为实验用。

2.2 分组、造模及给药

将筛选出具有良好性能力的雄鼠 60 只, 按体重随机分成对照组、模型组、金匱肾气丸 (1.7 g/kg, 溶于蒸馏水配制成 0.170 g/mL 的溶液) 组和无比山药丸低、中、高剂量 (0.75、1.50、3.00 g/kg, 分别

相当于临床剂量的 2.5、5、10 倍, 溶于蒸馏水分别配制成 0.075、0.150、0.300 g/mL 的溶液) 组。除对照组外, 其余各组每日 8:00 时强迫小鼠游泳至无力而下沉至水面以下 5 s 不上浮时捞出, 以诱导劳倦过度, 同时根据 Colldege 效应 (雄鼠与 1 只发情期雌鼠交配完后又会和新的发情雌鼠交配), 每只雄鼠与 5 只动情期雌鼠同笼, 并且每日更换动情期雌鼠以诱导房事不节^[10]。连续造模 8 周。造模期间每日 ig 相应药物 (10 mL/kg)。

肾阳虚证模型建立成功的判断标准: 根据国家技术监督局发布的《中医临床诊疗术语》中肾阳虚证的判断标准, 当小鼠出现腰膝酸软 (抓力减小)、畏寒肢冷 (抱团少动、肛温降低、尾部微循环血流量减少) 及性欲减退 (捕捉、骑跨行为减弱) 等肾阳虚主证, 精神萎靡 (自主活动降低)、发髯齿摇 (皮毛无光泽) 等肾阳虚次证, 认定造模成功。实验中模型组及无比山药丸高剂量组各死亡 1 只, 2 组纳入统计为 9 只, 其余各组纳入统计为 10 只。

2.3 检测肾阳虚证候指标

2.3.1 形态学观察 造模给药期间观察小鼠的活动情况、精神状态、毛发色泽等, 观察模型组小鼠是否出现畏寒喜暖、抱团少动、精神萎靡、形体消瘦、皮毛疏松、杂乱无光泽等一系列类似肾阳虚的表现。

2.3.2 肛温 造模给药第 4 周, 在安静环境下, 将温度计插入小鼠肛门处, 当温度计稳定后记录所测数据, 测定 3 次, 取平均值。

2.3.3 自主活动次数 造模给药第 4 周, 在下午安静昏暗环境下, 将小鼠放入自主活动箱内, 适应 5 min 后, 记录接下来 5 min 内小鼠的活动次数。

2.3.4 抓力 造模给药第 4 周, 应用抓力测定仪测定小鼠抓力, 每只小鼠测定 3 次, 取平均值。

2.4 检测尾部微循环血流量

造模给药第 5 周, 用异氟烷呼吸麻醉机对小鼠进行呼吸麻醉, 使用 MoorFLPI 散斑全帧实时扫描成像系统测定小鼠尾部微循环血流量。测量起点靠近小鼠尾根部, 每只小鼠尽量保持测量位置一致。在检测区域长度范围内, 固定分布 3 个测量点, 测量时间为 30 s, 扫描速度为 25 Hz/s。检测期间保持环境相对安静, 避免对测定产生影响, 使用 MoorFLPI ReviewV 3.0 软件对所记录的 3 个测量点数据进行处理, 取平均值。

2.5 检测雄鼠性行为指标

造模给药第 8 周, 通过对雌鼠制备阴道涂片,

选取发情状态良好的雌鼠用于交配实验, 来检测雄鼠性行为(捕捉、骑跨的次数及潜伏期)。于 19:00 时开始, 在昏暗且能观察的安静环境下, 按文献方法^[5]观察记录 20 min 内雄鼠的性行为情况。

2.6 观察肾脏组织病理变化

末次给药后, 小鼠眼眶取血致死, 剥离肾组织, 置于 4% 中性福尔马林固定液中, 固定、脱水、包埋、切片, 制得 4 μm 石蜡切片, 进行苏木素-伊红(HE)染色, 于显微镜下观察肾脏组织病理变化。

2.7 检测肾脏组织细胞凋亡情况

取肾脏组织石蜡切片, 按 TUNEL 试剂盒说明书操作, 用抗荧光淬灭封片液封片后在荧光显微镜下观察, 观察到的荧光细胞为凋亡细胞。

2.8 检测肾功能指标

小鼠眼眶取血死后, 离心取上层血清, 用全自动生化分析仪检测血清中 UA、CR 和 BUN 水平。

2.9 检测肾脏氧化指标

小鼠处死后, 取肾脏, 按 1:9 比例加入生理盐水, 利用组织研磨器研磨制备匀浆, 3500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 按试剂盒说明书测定 SOD、GSH-PX 活性和 MDA 水平。

2.10 检测阴茎组织中 NO、cGMP 水平和 NOS、GC 活性

末次给药后, 解剖取小鼠阴茎组织, 用生理盐水冲洗, 称取阴茎组织, 剪碎后加入蛋白裂解液, 以组织研磨器制备为匀浆液, 冰中裂解 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 按试剂盒说明书测定阴茎组织中 NO、cGMP 水平和 NOS、GC 活性。

2.11 检测阴茎组织中 eNOS 和 GC 蛋白表达

取“2.10”项中的上清液, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度, 蛋白样品经十二烷基硫

酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 于 5% 脱脂牛奶中室温封闭 2 h, 分别加入 β -actin、eNOS、GC 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBST 溶液漂洗 3 次; 加入相应二抗, 室温孵育 2 h, PBST 溶液漂洗 3 次, 采用化学发光成像仪进行蛋白条带曝光检测, 并用 Image J 软件进行结果分析。

2.12 调节肾功能与勃起功能相关性分析

应用 SPSS 软件 Pearson 相关性分析法, 计算出肾功能指标数据 UA、CR、BUN (X) 与勃起功能相关指标 NO、NOS (Y) 之间的相关系数 (r)。 r 的绝对值越大(即越接近于 1 或-1), 则相关度和相关性越强; 若 r 为正值则表示 2 个变量的关系呈正相关; 若 r 为负值则呈负相关。

2.13 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析及 t 检验。

3 结果

3.1 无比山药丸对小鼠肾阳虚证候的影响

与对照组比较, 模型组小鼠出现抱团少动、行动迟缓、毛发无光泽、小便清长等类似肾阳虚证候表现; 与模型组比较, 各给药组小鼠状态明显好转。如表 1 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠自主活动次数、抓力值和肛温均显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组小鼠自主活动次数和抓力值均显著升高 ($P < 0.01$); 金匱肾气丸组 and 无比山药丸低、中剂量组小鼠肛温显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.2 无比山药丸对小鼠尾部微循环血流量的影响

如图 1 和表 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠尾部微循环血流量显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 无比山药丸各剂量组小鼠尾部微循环血流量均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

表 1 无比山药丸对肾阳虚模型小鼠抓力、自主活动和肛温的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Wubi Shanyao Pills on grip, autonomic activity and rectal temperature in kidney-yang deficiency model mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	抓力/N	自主活动/次	肛温/ $^{\circ}\text{C}$
对照	—	10	318.79 $\pm$ 45.72	96.20 $\pm$ 21.42	37.50 $\pm$ 0.44
模型	—	9	171.68 $\pm$ 32.21**	46.25 $\pm$ 20.75**	36.47 $\pm$ 0.51**
金匱肾气丸	1.7	10	290.34 $\pm$ 69.36##	100.60 $\pm$ 18.24##	37.30 $\pm$ 0.67##
无比山药丸	0.75	10	270.18 $\pm$ 36.00##	90.40 $\pm$ 16.28##	37.14 $\pm$ 0.37##
	1.50	10	261.42 $\pm$ 34.24##	117.90 $\pm$ 12.64##	36.99 $\pm$ 0.72#
	3.00	9	356.99 $\pm$ 81.54##	99.90 $\pm$ 20.49##	36.91 $\pm$ 0.53

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as belows

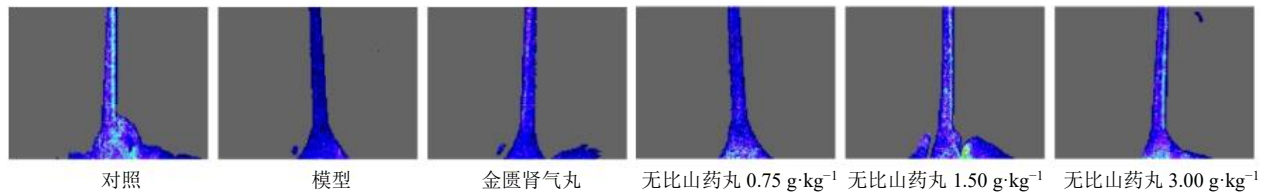


图 1 无比山药丸对肾阳虚模型小鼠尾部微循环血流量的影响

Fig. 1 Effect of Wubi Shanyao Pills on tail microcirculation blood flow of kidney-yang deficiency model mice

表 2 无比山药丸对肾阳虚模型小鼠尾部微循环血流量的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Effect of Wubi Shanyao Pills on tail microcirculation blood flow of kidney-yang deficiency model mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	尾部微循环血流量/PU
对照	—	10	108.40 ± 13.89
模型	—	9	71.21 ± 15.20**
金匱腎氣丸	1.7	10	83.78 ± 15.25
无比山药丸	0.75	10	93.68 ± 23.46 ^{##}
	1.50	10	88.44 ± 20.70 [#]
	3.00	9	91.44 ± 17.20 [#]

3.3 无比山药丸对小鼠性行为的影响

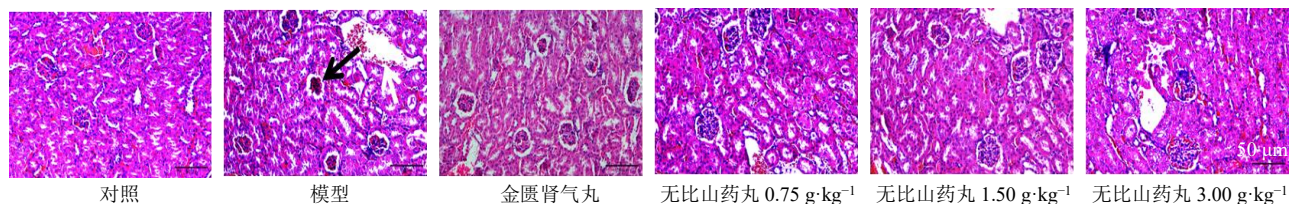
如表 3 所示,与对照组比较,模型组小鼠捕捉潜伏期显著延长 ($P < 0.01$),捕捉次数显著减少 ($P < 0.01$),并且未观察到骑跨行为;与模型组比较,各给药组小鼠捕捉潜伏期显著缩短 ($P < 0.01$),捕捉次数显著增加 ($P < 0.01$),骑跨行为明显改善 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.4 无比山药丸对小鼠肾组织病理变化的影响

如图 2 所示,对照组小鼠肾脏结构完整,肾小球、肾小管结构清晰,皮质、髓质结构无异常改变。

表 3 无比山药丸对肾阳虚模型小鼠性行为的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Effect of Wubi Shanyao Pills on sexual behaviors of kidney-yang deficiency model mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	捕捉		骑跨	
			潜伏期/s	次数/次	潜伏期/s	次数/次
对照	—	10	8.80 ± 3.01	14.60 ± 2.76	392.89 ± 147.01	9.67 ± 4.47
模型	—	9	23.22 ± 6.06**	4.67 ± 2.40**	1 200.00 ± 0.00**	0.00 ± 0.00**
金匱腎氣丸	1.7	10	9.90 ± 3.78 ^{##}	10.30 ± 2.50 ^{##}	633.00 ± 130.64 ^{##}	4.33 ± 2.92 [#]
无比山药丸	0.75	10	14.80 ± 5.41 ^{##}	9.40 ± 4.48 ^{##}	863.50 ± 123.11 ^{##}	3.50 ± 2.37 [#]
	1.50	10	11.20 ± 3.39 ^{##}	13.30 ± 2.54 ^{##}	703.10 ± 196.51 ^{##}	4.90 ± 2.85 ^{##}
	3.00	9	13.22 ± 2.59 ^{##}	11.56 ± 3.50 ^{##}	510.78 ± 134.38 ^{##}	7.11 ± 3.33 ^{##}



黑色箭头表示肾小球萎缩硬化,白色箭头表示肾小管扩张成囊状

black arrow indicates glomerulus atrophy and sclerosis, white arrow indicates renal tubule expansion into cystic shape

图 2 无比山药丸对肾阳虚模型小鼠肾组织病理的影响 (HE, ×200)

Fig. 2 Effect of Wubi Shanyao Pills on histopathology of kidneys in kidney-yang deficiency model mice (HE, ×200)

与对照组相比,模型组小鼠肾体积增大,肾小球萎缩、硬化,肾小管扩张成囊状。与模型组相比,各给药组小鼠肾体积减小,肾小球萎缩硬化症状减轻,肾小管扩张情况减少。

3.5 无比山药丸对小鼠肾组织细胞凋亡的影响

如图 3 所示,与对照组比较,模型组小鼠肾脏凋亡细胞数量增加,主要见于肾小球和肾锥体中的肾小管中,严重影响肾小球的滤过作用和肾小管的

重吸收作用,故观察到模型小鼠小便清长的现象。与模型组相比,各给药组肾脏组织凋亡细胞数量均减少。

3.6 无比山药丸对小鼠肾功能指标的影响

如表 4 所示,与对照组比较,模型组小鼠血清中 CR、UA 和 BUN 水平均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠血清中 CR、UA 和 BUN 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

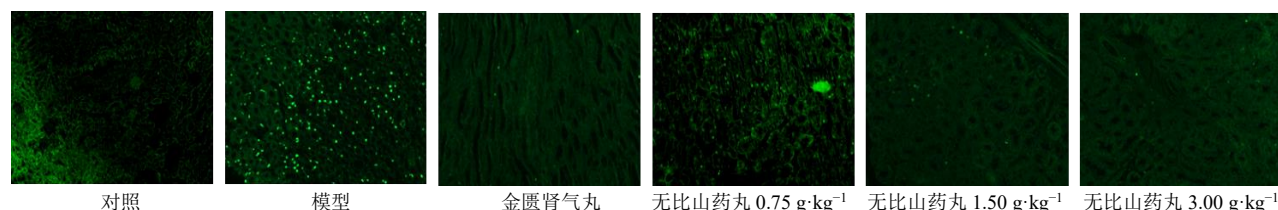


图 3 无比山药丸对肾阳虚模型小鼠肾组织细胞凋亡的影响 (×200)

Fig. 3 Effect of Wubi Shanyao Pills on cell apoptosis of kidney tissue in kidney-yang deficiency model mice (× 200)

表 4 无比山药丸对肾阳虚模型小鼠肾功能指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of Wubi Shanyao Pills on renal function indexes in kidney-yang deficiency model mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	CR/(μmol·L ⁻¹)	UA/(μmol·L ⁻¹)	BUN/(mmol·mL ⁻¹)
对照	—	10	16.77±2.42	130.12±6.43	8.70±0.85
模型	—	9	21.80±2.56**	217.74±38.92**	11.18±0.56**
金匱腎氣丸	1.7	10	16.82±2.94 [#]	112.76±19.90 ^{##}	7.44±0.57 ^{##}
无比山药丸	0.75	10	14.53±3.87 ^{##}	116.31±25.76 ^{##}	7.91±1.17 ^{##}
	1.50	10	15.67±4.72 [#]	114.50±31.94 ^{##}	8.91±0.91 ^{##}
	3.00	9	14.78±4.33 [#]	123.19±12.53 ^{##}	9.96±1.76 [#]

3.7 无比山药丸对小鼠肾脏氧化指标的影响

如表 5 所示,与对照组比较,模型组小鼠肾脏组织中 MDA 水平显著升高 ($P<0.01$),SOD 和 GSH-Px 活性均显著下降($P<0.05$);与模型组比较,各给药组小鼠肾脏组织中 MDA 水平显著下降($P<0.01$),金匱腎氣丸组和无比山药丸中、高剂量组小鼠肾脏组织中 SOD 和 GSH-Px 活性均显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.8 无比山药丸对小鼠阴茎组织中 NO、cGMP 水平和 NOS、GC 活性的影响

如表 6 所示,与对照组比较,模型组小鼠阴茎

组织中 NO、cGMP 水平和 NOS、GC 活性均显著降低 ($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠阴茎组织中 NO 和 cGMP 水平均显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01),无比山药丸各剂量组小鼠阴茎组织中 NOS 活性显著升高 ($P<0.01$),金匱腎氣丸组和无比山药丸中、高剂量组小鼠阴茎组织中 GC 活性显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.9 无比山药丸对小鼠阴茎组织中 eNOS 和 GC 蛋白表达的影响

如图 4 所示,与对照组比较,模型组小鼠阴茎组织中 eNOS 和 GC 蛋白表达水平均显著降低($P<$

表 5 无比山药丸对肾阳虚模型小鼠肾脏氧化指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of Wubi Shanyao Pills on renal oxidation indexes in kidney-yang deficiency model mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	GSH-Px/(U·mg ⁻¹)
对照	—	10	5.18±1.18	49.38±2.70	127.27±10.80
模型	—	9	7.59±1.09**	45.83±4.91*	114.76±14.95*
金匱腎氣丸	1.7	10	4.78±1.20 ^{##}	50.96±5.19 ^{##}	135.65±21.39 ^{##}
无比山药丸	0.75	10	5.47±0.90 ^{##}	48.31±2.24	121.89±5.51
	1.50	10	2.95±0.59 ^{##}	50.60±3.25 ^{##}	130.09±9.91 [#]
	3.00	9	5.24±1.19 ^{##}	49.87±2.18 [#]	126.13±6.98 [#]

表 6 无比山药丸对肾阳虚模型小鼠阴茎组织中 NO、cGMP 水平和 NOS、GC 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Effect of Wubi Shanyao Pills on NO, cGMP levels and NOS, GC activities in penile tissues of kidney-yang deficiency model mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	NO/(μmol·L ⁻¹)	cGMP/(nmol·L ⁻¹)	NOS/(U·mg ⁻¹)	GC/(U·L ⁻¹)
对照	—	10	10.80±1.66	1.39±0.04	0.25±0.10	15.55±4.52
模型	—	9	6.79±1.87**	1.20±0.04**	0.12±0.06**	5.16±2.31**
金匱腎氣丸	1.7	10	11.88±4.98 ^{##}	1.24±0.04 [#]	0.17±0.04	9.77±4.14 [#]
无比山药丸	0.75	10	13.56±3.03 ^{##}	1.36±0.05 ^{##}	0.29±0.08 ^{##}	8.23±4.81
	1.50	10	14.40±1.71 ^{##}	1.40±0.04 ^{##}	0.26±0.07 ^{##}	12.27±3.86 ^{##}
	3.00	9	11.31±4.98 ^{##}	1.32±0.02 ^{##}	0.30±0.11 ^{##}	11.24±3.88 ^{##}

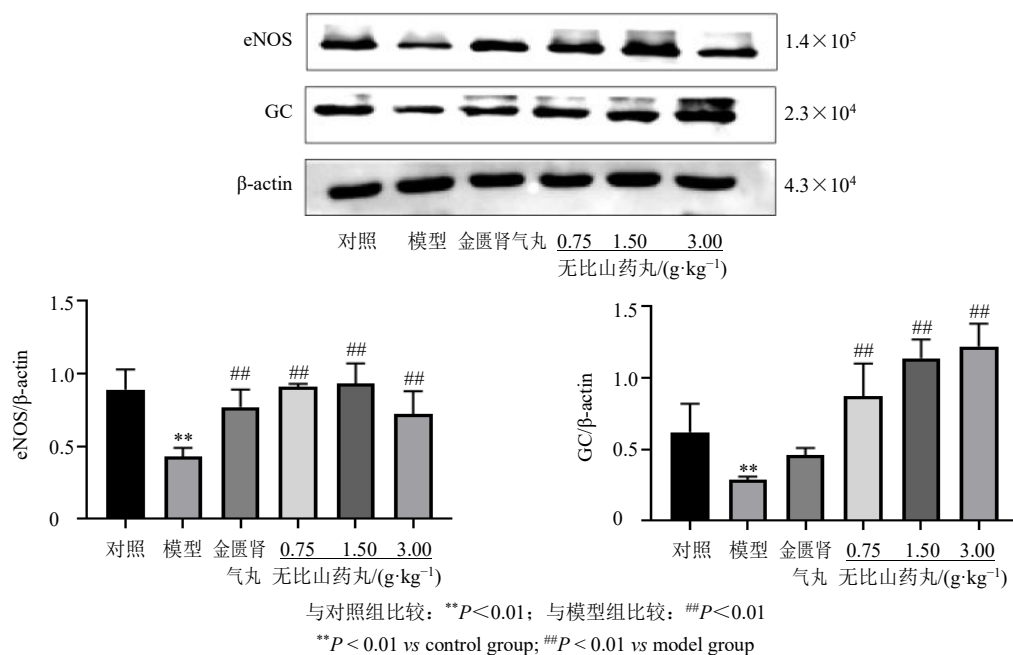


图 4 无比山药丸对肾阳虚模型小鼠阴茎组织中 eNOS 和 GC 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of Wubi Shanyao Pills on eNOS and GC protein expressions in penile tissues of kidney-yang deficiency model mice

0.01); 与模型组比较, 无比山药丸各剂量组小鼠阴茎组织中 eNOS 和 GC 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$), 金匱肾气丸组小鼠阴茎组织中 eNOS 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。

3.10 肾功能与勃起功能相关性分析

如图 5 和表 7 所示, 经 SPSS 软件分析可知肾功能指标与勃起功能指标呈负相关, 其中 UA 与

NO、NOS 存在显著性差异 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

4 讨论

肾阳虚证为中医常见证候, 由肾阳亏虚、机失温煦所致。肾阳, 又称命门之火, 为人体阳气之根本。肾阳足, 全身之阳亦足, 则生命力强壮。若房劳过度, 耗伤肾精, 可致肾阳虚。无比山药丸出自《太平惠民和剂局方》, 由山药、熟地黄、杜仲、肉

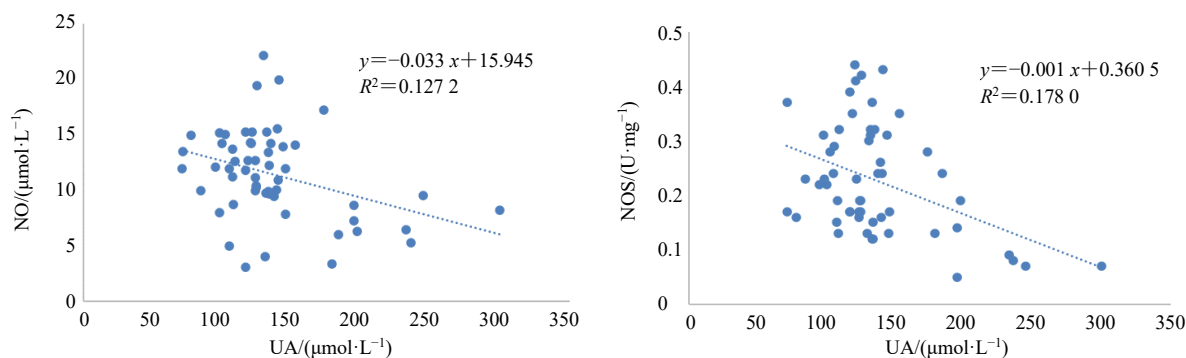


图 5 肾功能指标与勃起功能指标 NO、NOS 的相关性分析

Fig. 5 Correlation analysis between renal function index UA and erectile function index NO and NOS

表 7 肾功能与勃起功能的 Pearson 相关性分析

Table 7 Pearson correlation analysis between renal function and erectile function

勃起功能指标	UA		CR		BUN	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
NO	-0.334	0.014 [#]	-0.154	0.256	-0.211	0.118
NOS	-0.398	0.003 ^{##}	-0.113	0.408	-0.091	0.503

[#]在 0.05 水平上显著相关, ^{##}在 0.01 水平上显著相关

[#] is significant correlation at 0.05 level, ^{##} is significant correlation at 0.01 level

茯苓等 12 味中药组成。各味药物配伍可奏健脾补肾之功，用于脾肾两虚、食少肌瘦、腰膝酸软、目眩耳鸣。本课题组前期研究发现无比山药丸补肾功效显著，对于肾阳虚证具有良好的疗效。肾阳虚主症有腰膝酸软、畏寒肢冷、性欲减退^[1]，次症有精神萎靡、夜尿频多、下肢浮肿等。本研究中采用抓力量化肾阳虚证之“腰膝酸软”；肛温、尾部微循环血流量量化肾阳虚证之“畏寒肢冷”；捕捉、骑跨（潜伏期、次数）行为量化肾阳虚证之“性欲减退”；自主活动次数量化肾阳虚证之“精神萎靡”。结果显示，无比山药丸可增加模型小鼠抓力，升高肛温，增加尾部微循环血流量，缩短捕捉、骑跨潜伏期，增加捕捉、骑跨次数，增加模型小鼠自主活动次数。通过上述证候指标结果提示，无比山药丸可改善“房事不节+劳倦过度”致肾阳虚模型小鼠腰膝酸软、畏寒肢冷、性欲减退、精神萎靡等症状。

房劳是中医理论上一个特有的发病因素。由于房事过多、劳累过度导致机体过度损耗从而会引起疾病的发生^[12]。《灵枢·邪气脏腑病形》明确指出：“有所用力举重，若入房过度，汗出浴水，则伤肾。”强调劳力过度和房事不节最耗体内肾阳，先伤肾，肾脏不荣，体内阳气耗竭，精失温煦，则不行其职，易致肾阳虚。因此，“房事不节+劳倦过度”能够引起肾功能的低下。临床上，血清 CR、UA、BUN 水平可反映肾小球的滤过作用，是检测肾功能的重要指标。本研究结果显示，无比山药丸可降低模型小鼠血清 CR、UA 和 BUN 水平。肾脏发挥正常的生理功能与其组织结构的完整性密不可分。HE 染色结果显示，无比山药丸能改善模型小鼠肾小球萎缩、肾小管扩张等；TUNEL 染色结果显示，无比山药丸能减少模型小鼠肾小球和肾小管中细胞凋亡。其可能与无比山药丸改善模型小鼠肾脏氧化损伤有关，结果显示，无比山药丸能降低模型小鼠肾脏中 MDA 水平，升高 SOD 和 GSH-PX 活性。

《素问·痿论篇》提及“入房太甚，宗筋弛纵”指房事过多会导致男子前阴痿弱不举。清代韩善徵《阳痿论》曰：“阳者，男子之外肾，痿者，弱也；弱而不用，欲举而不能之谓。”而肾阳，又称命门之火，为人体阳气之根本，能够增强脏腑组织器官的功能活动。肾阳温煦、推动阴茎勃起，因此阳痿乃“肾虚不能荣于阴器，故萎弱也。”所以“房事不节+劳累过度”最终会导致男子性功能低下。

勃起功能障碍是男性性功能低下的主要表现之

一^[13]，其中勃起功能障碍是指阴茎持续不能达到或维持足够的勃起硬度以完成满意的性生活，病程在 3 个月以上^[14]。研究证明，NO-cGMP 途径对于维持阴茎勃起起到关键的调控作用，NO 作为一种内源性信号分子，由 NOS 催化产生，可通过激活 GC，将三磷酸鸟苷转化为 cGMP，作用于钙离子通道，松弛平滑肌，促使血液进入阴茎动脉和海绵窦间隙，引起阴茎勃起^[15-16]。因此，任何引起阴茎海绵体中 NO 减少的因素都可能导致勃起功能障碍的发生。本研究结果显示，无比山药丸能缩短模型小鼠捕捉、骑跨行为潜伏期，增加捕捉、骑跨次数，故能改善模型小鼠阴茎勃起能力，并且能增加阴茎组织中 NO、cGMP 水平，增强阴茎组织中 NOS、GC 活性，上调 NO-cGMP 途径中 eNOS 和 GC 蛋白表达。

中医认为肾主生殖，男性阳痿与肾脏不荣密切相关。本研究中将肾功能指标与勃起功能指标利用 SPSS 软件进行 Pearson 相关性分析，发现 UA 与 NO、NOS 之间呈显著负相关。研究表明，高 UA 水平对机体 NO 的表达有着重要的影响^[17]。高尿酸血症时体内氧自由基增多，促进氧自由基与 NO 反应增强，从而消耗了大量 NO，导致 NO 含量下降^[18]。故推测“房事不节+劳倦过度”导致的勃起功能障碍可能与 UA 介导的 NO-cGMP 途径有关。

本研究结果显示，无比山药丸能够改善“房事不节+劳倦过度”导致的模型小鼠肾阳虚之腰膝酸软、畏寒肢冷、性欲减退、精神萎靡等症状；改善模型小鼠肾功能损伤和勃起功能障碍。其作用机制可能与尿酸介导的 NO-cGMP 途径有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张子怡, 陈宝军, 张庆, 等. 肾阳虚证动物模型的造模方法与评价指标 [J]. 福建中医药, 2014, 45(2): 61-63.
- [2] 桂芬. 无比山药丸加减方治疗慢性尿路感染脾肾亏虚、湿浊滞留证的临床研究 [J]. 内蒙古中医药, 2017, 36(16): 22-23.
- [3] 靳小梅, 李静, 孙婷婷, 等. 无比山药丸合八正散加减治疗（肾虚湿热型）围绝经期慢性尿路感染的效果及对 XOD、MDA、SOD 水平的影响 [J]. 中国妇幼保健, 2020, 35(8): 1461-1464.
- [4] 李洁. 无比山药丸加减治疗气阴两虚型肾性血尿的疗效及机制研究 [J]. 中国社区医师, 2018, 34(24): 86-87.
- [5] 肖禄. 无比山药丸加减方治疗慢性尿路感染脾肾亏虚、湿浊滞留证的临床研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2016.

- [6] 张英强, 龚巧巧. 加用无比山药丸治疗肾性血尿的临床观察 [J]. 现代临床医学, 2015, 41(5): 369-371.
- [7] 郑路照, 王亚辉, 李斌, 等. 加服无比山药丸加减方治疗脾肾阳虚型慢性肾小球肾炎临床观察 [J]. 广西中医药大学学报, 2016, 19(1): 17-19.
- [8] 方萍, 苏洁, 陈炜, 等. 无比山药丸对腺嘌呤致肾阳虚模型大鼠肾脏病变的影响 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(3): 11-16.
- [9] 陈青青, 单超文, 苏洁, 等. 无比山药丸对氢化可的松致肾阳虚模型小鼠性功能的影响 [J]. 浙江大学学报: 医学版, 2020, 49(6): 697-704.
- [10] 李震, 贾素菊, 王华云, 等. 应用诱导劳倦过度、房事不节法建立肾阳虚模型的研究 [J]. 山东中医学院学报, 1994, 18(6): 418-419.
- [11] 中医临床诊疗术语 [S]. 1997: 23-24.
- [12] 杨德威, 孙洁, 智屹惠, 等. 浅谈《黄帝内经》的房劳致病思想 [J]. 浙江中医药大学学报, 2018, 42(9): 695-699.
- [13] 王建宇. 男性性功能及性功能障碍 [J]. 国际妇产科学杂志, 2013, 40(5): 413-415.
- [14] 张敏建, 常德贵, 贺占举, 等. 勃起功能障碍中西医结合诊疗指南 (试行版) [J]. 中华男科学杂志, 2016, 22(8): 751-757.
- [15] Wang J, Mi Y Y, Yuan F L, *et al.* The involvement of corin in the progression of diabetic erectile dysfunction in a rat model by down-regulating ANP/NO/cGMP signal pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(8): 2325-2332.
- [16] Nguyen S, Rajfer J, Shaheen M. Safety and efficacy of daily Revactin® in men with erectile dysfunction: A 3-month pilot study [J]. *Transl Androl Urol*, 2018, 7(2): 266-273.
- [17] 杨诗云, 杨金月, 陆荃, 等. 高尿酸对小鼠阴茎勃起功能及血清睾酮水平的影响 [J]. 中国临床新医学, 2021, 14(5): 502-506.
- [18] Gersch C, Palii S P, Kim K M, *et al.* Inactivation of nitric oxide by uric acid [J]. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2008, 27(8): 967-978.

[责任编辑 李亚楠]