

● 实验研究 ●

从能量代谢角度探讨 肾气丸少火生气作用机制及其方证相关性

邱 林,赵群菊,李美红,刘仙菊,胡方林

(湖南中医药大学,湖南 长沙,410208)

[摘要] 目的:观察肾气丸对肾阳虚证大鼠肝细胞果糖6磷酸激酶(PFK)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙酮酸激酶(PK)以及己糖激酶(HK)活性的影响。方法:于60只SD大鼠中随机选取48只,采用氯化可的松腹腔注射的方法制备肾阳虚证大鼠模型,随机分为模型组、肾气丸组、肾气丸去附桂组、附子桂枝组,每组12只,分别予相应药物灌胃;剩余12只设为正常组,予等体积0.9%氯化钠注射液灌胃。采用ELISA法分别测定各组PFK、LDH、PK、HK的活性。结果:与正常组比较,模型组PFK、LDH、PK、HK活性均降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,肾气丸组上述指标活性均明显增高,差异具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);与肾气丸组比较,桂枝附子组、肾气丸去附桂组上述指标活性均明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:肾气丸能明显提高肾阳虚证大鼠肝细胞内PFK、LDH、PK、HK活性,这些酶活性的上调使得线粒体内合成能量的来源增加,提高机体的能量代谢,这在一定程度上表明肾气丸与肾阳虚证具有系统生物学上的相关性。

[关键词] 肾阳虚证;肾气丸;能量代谢;PFK;LDH;PK;HK;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.06.075

Mechanism of the heat-reducing and qi-generating effect of Shenqi pills from the perspective of energy metabolism and formula-syndrome association

QIU Lin, ZHAO Qun-ju, LI Mei-hong, LIU Xian-ju, HU Fang-lin

(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China)

Abstract: Objective: To investigate the effect of Shenqi pills on the activities of 6-phosphofructokinase (PFK), lactate dehydrogenase (LDH), pyruvate kinase (PK), and hexokinase (HK) in hepatocytes in rats with kidney-yang deficiency. Methods: A total of 60 Sprague-Dawley rats were selected, and among these rats, 48 were selected to establish a rat model of kidney-yang deficiency by intraperitoneal injection of hydrocortisone and then randomly divided into model group, Shenqi pill group, modified Shenqi pill group (treated with Shenqi pills without Radix Aconiti Lateralis Preparata and Ramulus Cinnamomi), and Radix Aconiti Lateralis Preparata-Ramulus Cinnamomi group, with 12 rats in each group, and these groups were treated with the corresponding drug by gavage; the remaining 12 rats were established as normal group and were given an equal volume of 0.9% sodium chloride injection by gavage. ELISA was used to measure the activities of PFK, LDH, PK, and HK. Results: Compared with the normal group, the model group had significant reductions in the activities of PFK, LDH, PK, and HK ($P < 0.01$). Compared with the model group, the Shenqi pill group had significant increases in the activities of PFK, LDH, PK, and HK ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the Shenqi pill group, the Radix Aconiti Lateralis Preparata-Ramulus Cinnamomi group and the modified Shenqi pill group had significant reductions in the activities of PFK, LDH, PK, and HK ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Conclusion: Shenqi pills can significantly improve the activities of PFK, LDH, PK, and HK in hepatocytes in rats with kidney-yang deficiency. The upregulation of the activities of these enzymes increases the source of energy in the mitochondria and improve the body's energy metabolism, which suggests the association between Shenqi pills and kidney-yang deficiency from the perspective of systems biology.

Key words: kidney-yang deficiency; Shenqi pill; energy metabolism; 6-phosphofructokinase; lactate dehydrogenase; pyruvate kinase; hexokinase; experimental study

基金项目:湖南省自然科学基金资助项目(编号:2015JJ2110);湖南省中医药管理局资助项目(编号:201437);湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地开放基金(编号:ZYFT201409)

第一作者:邱林,女,2015级硕士研究生,研究方向:方剂配伍机制研究

通讯作者:胡方林,男,教授,硕士研究生导师,研究方向:中医各家学说, E-mail:970679945@qq.com

一直以来中医方剂研究的重点和热点就是对方剂配伍作用机制以及方证关系的研究,“方从法出,法随证立”,这充分说明了方剂的作用与主治证存在高度相关性。方剂作用机制以及方证关系在临床实现了一方用于多病(证)和-病(证)允许多方治疗的事实正在由原来理解的“一方一证”转变为方与证之间的适配性与关联性,即“方证相关”,中医辨证论治就包括“方证相关”这个重要命题。“方证相关”不仅诠释了中医方证经验的逻辑基础,而且正在成为揭示中医药科学内涵的前沿领域^[1]。肾气丸立方之旨并非峻补元阳,乃在微微生火、鼓舞肾气,即“少火生气”之意,尽管对“少火生气”在理论上有一定的阐述,但对“少火生气”的生物学基础和作用机制以及肾气丸方证关系的研究未见报道。因此,本实验通过观察肾气丸对肾虚证大鼠肝细胞内果糖 6 磷酸激酶(PFK)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙酮酸激酶(PK)以及己糖激酶(HK)活性活性的影响,探讨肾气丸与肾虚证“方证相关”的现代生物学基础,从而更好地指导临床肾虚证的治疗。

1 实验材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠 60 只,雌雄各半,体质量(180 ± 20)g,由湖南中医药大学动物实验中心提供。动物实验许可证号:SCXK(湘)2013-0004。

1.2 药品及试剂 肾气丸原方:熟地黄 24g、山药 12g、山茱萸 12g、泽泻 9g、茯苓 9g、丹皮 9g 附子 3g、桂枝 3g;肾气丸去桂枝附子组:熟地黄 24g、山药 12g、山茱萸 12g、泽泻 9g、茯苓 9g、丹皮 9g;桂枝附子组:附子 3g、桂枝 3g。以上药材购自湖南中医药大学杏林药号,经鉴定符合药典规定。按中药常规煎法进行煎煮,将以上各配伍组的药物总重量(g)与水(mL)按 1:10 的比例,先取 70% 的水浸泡 30min,之后加热至煮沸,保持微沸 30min,过滤;残渣加上剩下 30% 的水量马上进行第 2 次煎煮,保持微沸 30min,过滤。将 2 次滤液进行合并后浓缩至 40.5mL,置于冰箱,4℃ 恒温保存备用。氢化可的松注射液购于天津金耀药业有限公司。PFK、LDH、PK、HK 测定试剂盒均购自于南京建成生物工程研究所。

1.3 主要仪器 TGL-16 台式离心机;AJC-0501-P 纯水仪;WH-2 微型旋涡混合器;TL-420D 水浴锅;BCD-186 冰箱;RT-2100C 酶标仪;DS74948 10μL 枪;DS93879 1000μL 枪;DX1548 100μL 枪;7 GNP-9080 隔水式恒温培养箱。

2 实验方法

2.1 动物造模与分组 选取 60 只合格 SD 大鼠,雌雄各半,进行编号,按照随机分组原则分为正常组(12 只)和模型储备组(48 只),予普通饲料饲养 2 周后,模型储备组予氢化可的松腹腔注射造模^[1],观察 2 周,制备肾虚证大鼠模型。造模成功后随机分为模型组、肾气丸组、肾气丸去附桂组、附子桂枝组,每组 12 只。

2.2 药物干预 按照《中药药理实验方法学》^[2]中方法计算给药剂量,肾气丸组、肾气丸去附桂组、附子桂枝组均以 1.5mL/100g·d 剂量灌胃;正常组、模型组灌胃给予

1.5mL/100g·d 的 0.9% 氯化钠注射液,1 次/d,连续 2 周。

2.3 指标采集与检测 灌药结束后,予大鼠以 10% 水合氯醛(0.3mL/kg)麻醉,迅速剖取动物肝脏,冷 0.9% 氯化钠注射液洗净、眼科剪剪碎,在冰浴上制备 10% 组织匀浆,在 0℃~4℃ 条件下用差速离心法提取上清液。采用酶联免疫分析(ELISA)法分别测定大鼠肝细胞内 PFK、LDH、PK、HK 活性。

2.4 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间资料比较采用单因素方差分析或秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 实验结果

与正常组比较,模型组 PFK、LDH、PK、HK 降低,差异具有统计学意义;与模型组比较,肾气丸组上述指标活性增高、差异具有统计学意义;与肾气丸组比较,桂枝附子组、肾气丸去附子桂枝组上述指标活性均明显降低,差异具有统计学意义。(见表 1)

表 1 各组大鼠糖酵解关键酶活性测定($\bar{x} \pm s$, U/L)

组别	n	PHK	LDH	PK	HK
正常组	12	58.79 ± 1.51	7958.56 ± 195.46	469.15 ± 16.71	51.42 ± 2.94
模型组	12	54.38 ± 1.24 ^a	7578.38 ± 114.60 ^a	438.49 ± 11.64 ^a	42.07 ± 4.20 ^a
肾气丸组	12	58.65 ± 1.60 ^b	7949.55 ± 146.45 ^b	453.72 ± 6.83 ^b	50.19 ± 5.03 ^b
桂枝附子组	12	54.90 ± 1.55 ^c	7619.82 ± 141.17 ^c	446.05 ± 8.65 ^c	43.79 ± 4.14 ^c
肾气丸去桂附组	12	53.81 ± 1.28 ^c	7542.34 ± 120.50 ^c	468.27 ± 12.71 ^c	41.08 ± 5.11 ^c

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与肾气丸组比较^c $P < 0.05$ 。

4 讨论

糖酵解是机体在有氧或者无氧条件将葡萄糖降解为丙酮酸并伴随着 ATP 生成重要途径,PFK、LDH、PK、HK 是糖酵解过程中的关键酶,HK 催化葡萄糖生成 6-R 磷酸葡萄糖,是糖酵解过程中的限速酶,在糖酵解途径中起重要的调控作用^[3]。LDH 广泛地存在于肝、心肌、脑组织中,在组织的有氧代谢中 LDH 使乳酸变为丙酮酸而进入柠檬酸循环,为机体提供能源^[4]。PK 的活性与丙酮酸的生成有着直接联系,当糖酵解受阻时导致丙酮酸的生成量下降,从而使线粒体内合成 ATP 的原料也相应减少,造成机体能量代谢紊乱^[5]。PFK、LDH、PK、HK 活性增加可使糖酵解过程顺利进行,从而促进线粒体内合成能量的来源增加,提高机体的能量代谢。

肾虚证是中医临床多种疾病常见证候之一,其临床主要包括畏寒肢冷、舌淡苔白、神疲乏力、面色苍白、脉沉迟等机体能量代谢障碍的表现。任永申等^[4]观察到肾虚证体质模型动物在冷热板高温区停留比例前 3d 有所下降、后 7d 显著提高,机体能量代谢明显降低。卢德赵等^[3]观察到肾虚动物能量代谢相关酶的变化,即 ATP 合酶、醛脱氢酶和 NADH 脱氢酶表达量增加,而丙酮酸脱氢酶、α-酮戊二酸脱氢酶表达量均有所下降,这与肾虚的临床虚寒症状有关。肝是人体最重要的物质代谢中心与枢纽,在脂类、蛋

绿豆对小鼠巴豆中毒的减毒作用研究

王文婷,陈娟,冯菲,李忠原
(山东中医药大学,山东 济南,250014)

[摘要] 目的:研究绿豆对巴豆中毒的减毒作用。方法:实验分为单用巴豆组(对照组)及巴豆与绿豆配伍比1:1(1组)、1:2(2组)、1:3(3组),通过提高巴豆、绿豆的配伍比,观察灌胃后72h实验小鼠中毒反应,记录每组小鼠的死亡率。结果:灌胃后4组小鼠中毒表现基本一致,但出现反应的时间先后不同,对照组小鼠反应迅速,灌胃2h时即出现狂躁表现,后活动性下降,腹部抽搐不停,随即有淡黄色稀薄粪便泻出,4h后小组内出现小鼠死亡现象;巴豆与绿豆配伍的第3组小鼠出现反常表现的时间最晚,小组内死亡数量最少。结论:于巴豆中加入绿豆后实验小鼠中毒的时间有所延长,中毒表现有所减弱,绿豆对巴豆有一定的减毒作用。

[关键词] 巴豆;绿豆;减毒作用;实验研究

[中图分类号] R285.1 **[文献标识码]** A **DOI:**10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.06.076

Effect of mung bean in reducing croton poisoning in mice

WANG Wen-ting, CHEN Juan, FENG Fei, LI Zhong-yuan

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong, China)

Abstract: Objective: To investigate the effect of mung bean in reducing croton poisoning. Methods: The mice were divided into control group (treated with croton alone) and groups 1, 2, and 3 (treated with croton and mung beans at a ratio of 1:1, 1:2, and 1:3, respectively). The ratio between croton and mung beans was increased to observe the poisoning reaction of these mice at 72 hours after gavage, and the mortality rate of the mice was recorded for each group. Results: The four groups had basically the same manifestations after poisoning, but there was a difference in the time to the occurrence of these manifestations. The control group developed reactions early after poisoning, with mania, reduced activities, abdominal tics, and light yellow loose feces at 2 hours after gavage, and death was observed at 4 hours after gavage. Group 3 had the longest time to the occurrence of abnormal manifestations and the lowest number of deaths. Conclusion: After mung beans are added to croton, the time to poisoning is increased

白质、维生素、水、电解质代谢中也具有独特的作用,肝脏受机体调节,会生成ATP,提供能量,其功能与中医学中“少火生气”具有高度趋同性,“少火生气”出自《素问·阴阳应象大论》:“壮火之气衰,少火之气壮,壮火食气,气食少火;壮火散气,少火生气”,少火有滋生元气、维持生命活动的作用,与肾中阳气密切相关。

肾气丸由熟地、山药、山茱萸、泽泻、茯苓、丹皮等滋阴药中加入少量附子、桂枝组成,有补肾助阳,化生肾气之功效,主治肾阳气不足证。经实验研究发现,附子桂枝组的PFK、LDH、PK、HK活性较模型组有所升高,但差异无统计学意义,表明了附子桂枝单独使用没有起到少火生气的作用,而肾阳虚模型大鼠给予肾气丸之后较附子桂枝组及肾气丸去附桂组的活性要高,进一步说明肾气丸少火生气配伍与肾阳虚证的相关性体现在能量代谢上,同时说明肾气丸与肾阳虚证“方证相关”的现代生物学基础可能在于线粒体能量代谢的正常与否。

参考文献

- [1] 张业,谢鸣. 中医方证关系研究的新思考[J]. 中医杂志, 2011,52(3):181-183.
- [2] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006.
- [3] 卢德赵,沃兴德,施孟如,等. 激素型肾阳虚动物肝线粒体蛋白组与能量代谢相关性[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2005,21(6):807-814.
- [4] 李望,胡盛寿,魏英杰,等. 心肌梗死对大鼠心肌能量代谢途径中关键酶的影响及意义[J]. 中国分子心脏病学杂志,2008(5):277-280.
- [5] 北京医学院. 生物化学[M]. 北京:人民卫生出版社,1978:101-136.
- [6] 任永申,赵艳玲,王伽伯,等. 基于动物热活性检测的肾阴虚/肾阳虚模型寒热属性差异研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(12):94-97. (收稿日期:2017-07-07)