

盐炙杜仲对大鼠肾阳虚的影响及机制研究[△]

程芬^{1*}, 杨长花¹, 宋艳丽¹, 杜蓓¹, 刘峰^{1,2}, 胡本祥^{1,3#} (1. 陕西国际商贸学院医药学院, 西安 712046; 2. 陕西步长制药有限公司, 西安 710075; 3. 陕西中医药大学药学院, 西安 712046)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)12-1460-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.12.09



摘要 目的 研究盐炙杜仲对大鼠肾阳虚的影响及潜在机制。方法 将90只SD大鼠随机分为正常对照组(15只)和造模组(75只),造模组大鼠灌胃腺嘌呤建立肾阳虚大鼠模型;造模完成后,将其随机分为模型组、阳性对照组(桂附地黄片2.5 g/kg)和盐炙杜仲低、中、高剂量组(1.5、3、6 g/kg),每组15只。各药物组大鼠灌胃相应药液,正常对照组和模型组大鼠灌胃生理盐水,每天1次,连续给药8周。称定各组大鼠建模前和给药结束后的体质量,并于给药结束后进行肾阳虚症候评分,检测其血清中血尿素氮(BUN)、肌酐(SCR)、睾酮(T)、皮质醇(COR)水平,肾组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)水平;经苏木精-伊红染色后观察其肾组织病理变化,采用实时定量聚合酶链反应检测其肾组织中缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)、信号转导及转录活化因子蛋白5(STAT5)mRNA的相对表达量,采用Western blot法检测其肾组织中HIF-1 α 、STAT5、磷酸化STAT5(p-STAT5)蛋白的相对表达量和p-STAT5与STAT5的灰度值比值(p-STAT5/STAT5)。结果 建模前,各组大鼠体质量比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。给药结束后,与模型组比较,盐炙杜仲各剂量组和阳性对照组大鼠肾组织病理改变均有所恢复,其体质量、血清T水平及肾组织中SOD活性均显著升高($P<0.05$),肾阳虚症候评分,血清中BUN、SCR、COR水平,肾组织中MDA水平, HIF-1 α 、STAT5 mRNA和HIF-1 α 、STAT5、p-STAT5蛋白的相对表达量,以及p-STAT5/STAT5均显著降低($P<0.05$),且盐炙杜仲的上述作用有剂量依赖性($P<0.05$)。结论 盐炙杜仲能明显缓解肾阳虚大鼠的肾组织损伤,降低血清中BUN、SCR、COR水平,升高血清中T水平,其机制可能与抗氧化应激、抑制HIF-1 α 和STAT5蛋白的表达有关。

关键词 盐炙杜仲;肾阳虚;大鼠;缺氧诱导因子1 α ;信号传导及转录活化因子5

Study on the effects and mechanism of saltwater stir-baked *Eucommia ulmoides* on kidney-yang deficiency in rats

CHENG Fen¹, YANG Changhua¹, SONG Yanli¹, DU Bei¹, LIU Feng^{1,2}, HU Benxiang^{1,3} (1. College of Pharmacy, Shaanxi Institute of International Trade & Commerce, Xi'an 712046, China; 2. Shaanxi Buchang Pharmaceutical Co., Ltd., Xi'an 710075, China; 3. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the effects and potential mechanism of saltwater stir-baked *Eucommia ulmoides* on kidney-yang deficiency in rats. **METHODS** Ninety SD rats were randomly divided into normal control group (15 rats) and modeling group (75 rats). Modeling group was given adenine intragastrically to establish kidney-yang deficiency model. After modeling, modeling group were randomly divided into model group, positive control group (Guifu dihuang tablet 2.5 g/kg), low-dose, medium-dose and high-dose groups of saltwater stir-baked *E. ulmoides* (1.5, 3, 6 g/kg), with 15 rats in each group. Administration groups were given relevant medicine intragastrically, normal control group and model group were given normal saline intragastrically, once a day, for consecutive 8 weeks. The body weight of rats was measured before modeling and after medication. The score of kidney-yang deficiency syndrome was performed after medication. The levels of blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (SCR), testosterone (T) and cortisol (COR) in serum and superoxide dismutase (SOD) activity, malondialdehyde (MDA) level in renal tissue were detected. The pathological changes of renal tissue were observed after HE staining. Relative expressions of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) mRNA in renal tissue were detected by RT-PCR. The relative expressions of HIF-1 α , STAT5 and phosphorylated STAT5 (p-STAT5) protein and the ratio of gray values of p-STAT5 and STAT5 (p-STAT5/STAT5) in renal tissue were detected by Western blot. **RESULTS** Before modeling, there was no statistical significance in body weight of rats in each group ($P>0.05$). After medication, compared with model group, pathological changes of renal tissue were all recovered in saltwater stir-baked *E. ulmoides* groups and positive control group, while body weight, the level of T in serum and SOD activity in renal tissue were all increased significantly ($P<0.05$). The scores of kidney-yang deficiency syndrome, levels of BUN, SCR and COR in serum, MDA level in renal tissue, the

[△] 基金项目:陕西省教育厅科学研究专项计划项目(No.16JK2033); 陕西省中药绿色制造技术协同创新中心省级科研平台项目(No.2019XT-3-05);陕西高校青年科技创新团队项目(No.陕教[2019]90号)

* 讲师,硕士。研究方向:中药物质基础。E-mail:715684946@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:中药质量控制标准及中药规范化栽培技术。E-mail:hb800823@126.com

relative expressions of HIF-1 α and STAT5 mRNA, the relative expressions of HIF-1 α , STAT5 and p-STAT5 protein as well as p-STAT5/STAT5 were all significantly decreased ($P<0.05$). The above effects of saltwater stir-baked *E. ulmoides* were in dose-dependent manner ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Saltwater stir-baked *E. ulmoides* can significantly relieve renal tissue damage in rats with kidney-yang deficiency, decrease the levels of BUN, SCR and COR in serum, increase the level of T in serum, the mechanism of which may be associated with anti-oxidative stress and inhibition of the expression of HIF-1 α and STAT5 protein.

KEYWORDS saltwater stir-baked *Eucommia ulmoides*; kidney-yang deficiency; rat; hypoxia-inducible factor-1 α ; signal transducer and activator of transcription 5

肾阳虚是我国传统医学的常见证型之一,多与素体阳虚、年老肾亏、久病不愈等因素密切相关^[1]。研究发现,肾阳虚会导致患者出现骨质疏松、软骨退变及生殖能力减退等多种病理性改变,如不及时治疗会严重影响其生活质量^[2]。目前,临床尚无针对肾阳虚的系统治疗药物,只能进行基础的对症治疗,所以相关治疗药物的研发是当前工作重点^[1]。中医理论认为,肾主水,肾阳虚的临床表现主要呈小便清长等特征,故有学者结合现代医学研究认为,肾阳虚与肾组织病理学变化有关^[3]。杜仲可通过增强或提高肾阳虚小鼠抓力、肛温、自主活动能力、睾丸和精囊腺指数,延长其游泳时间,降低其血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、血肌酐(serum creatinine, SCR)水平,改善其血液学指标来改善其肾阳虚证之腰膝酸软、性欲减退、畏寒、肢冷、精神萎靡、阳虚水泛以及肾精亏虚、肝气虚弱所致的血液亏虚^[4]。盐炙杜仲对大鼠去卵巢所引起的骨质疏松症有良好的干预作用,且盐制品效果优于生品^[5]。杜仲盐炙后,能改变其大多数化学成分的结构,增加亲脂性,从而促进其体内吸收,提高生物利用度^[6]。然而目前盐炙杜仲在肾阳虚方面的药理作用及机制尚不明确。有研究报道,缺氧诱导因子1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)/信号转导及转录活化因子5(signal transducer and activator of transcription 5, STAT5)信号通路及相关蛋白的表达变化与肾阳虚的发病机制及患者预后密切相关,调控 HIF-1 α 和 STAT5 蛋白的表达可能是治疗肾阳虚的重要途径和方法^[7-8]。基于此,本研究拟初步探讨盐炙杜仲对肾阳虚大鼠的干预作用及潜在机制,为盐炙杜仲药理作用的深入研究及肾阳虚治疗药物的研发提供新的思路和参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 SD1-BS 型全自动生化分析仪(成都斯马特科技公司)、Axio Imager M2m 型倒置显微镜(德国 Carl Zeiss 公司)、ChemiDoc XRS 型凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)、ST-960 型多功能酶标仪(上海科华实验系统有限公司)、GL-20MS 型台式高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司)、DYCZ-30C 型双垂直电泳槽(北京海天友诚科技公司)等。

1.2 主要药品与试剂

盐炙杜仲(北京同仁堂制药有限公司,批号

1908161),经陕西中医药大学药学院胡本祥教授鉴定为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv.干燥树皮的盐制品;桂附地黄片[阳性对照药,批号 1806192,规格 0.4 g(相当于总药材 1 g)]购自太极集团重庆桐君阁药厂有限公司;磷酸腺嘌呤片(批号 1811271,规格 10 mg)购自天津力生制药股份有限公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒(货号 S0103)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(货号 S0131M)、睾酮(testosterone, T)酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(货号 PT872)、RIPA 蛋白裂解液(货号 P0013B)、超敏 ECL 化学发光试剂盒(货号 P0018M)、兔源 HIF-1 α 多克隆抗体(货号 PT872)、兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)单克隆抗体(货号 AF7087)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G(immunoglobulin G, IgG)二抗(货号 A0208)均购自上海碧云天生物科技有限公司;皮质醇(cortisol, COR)ELISA 试剂盒(货号 KB3114)购自上海恪敏生物科技有限公司;兔源 STAT5 及磷酸化 STAT5(phosphorylated STAT5, p-STAT5)多克隆抗体(货号分别为 ab16276、ab178941)均购自艾博抗(上海)贸易有限公司;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染液试剂盒(货号 G1120)购自北京索莱宝科技有限公司;RNA 提取试剂盒(货号 WLA088)、聚合酶链反应(PCR)试剂盒(货号 WLA071)均购自沈阳万类生物科技有限公司;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为蒸馏水。

1.3 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠共 90 只,6~8 周龄,体质量为 180~200 g,购自西安交通大学医学部实验动物中心,使用许可证号为 SYXK(陕)2018-001。所有大鼠均饲养在温度(22 \pm 2) $^{\circ}$ C、相对湿度 40%~60%的动物房内,自由摄食、饮水。本动物实验方案经陕西国际商贸学院动物伦理委员会批准同意,批准号为 201940。

2 方法

2.1 盐炙杜仲混悬液的制备

取盐炙杜仲 300 g,粉碎,得粗粉,取适量,置于 60%乙醇 1 000 mL 中,回流提取 1.5 h \times 2 次,合并提取液,加热浓缩制成质量浓度为 3 g/mL(以生药量计)的浸膏,备

用。使用时,将上述浸膏用水稀释成质量浓度分别为0.6、0.3、0.15 g/mL(以生药量计)的混悬液。

2.2 造模与给药

90只大鼠适应性喂养1周后,称定其体质量(记为 W_1)。按体质量均衡和随机数字表法分为正常对照组(15只)和造模组(75只)。除正常对照组外,其余大鼠每天上午灌胃腺嘌呤250 mg/kg建立肾虚大鼠模型,连续给药14 d^[9]。根据中医理论观察大鼠是否出现如下症状:(1)精神萎靡、畏寒;(2)活动减少、蜷缩抱团;(3)大便溏稀、小便清长、肛周污秽;(4)体毛疏松、黯淡无光等。根据上述症状对各组大鼠肾虚症候进行评分:未出现以上症状记0分,出现1项症状记1分,出现2项症状记2分,出现3项症状记3分,出现4项症状记4分;以大鼠肾虚症候评分大于0分并伴有血清T水平降低、COR水平升高视为造模成功^[10]。造模完成后,将造模组大鼠随机分为模型组、阳性对照组和盐炙杜仲低、中、高剂量组,每组15只。阳性对照组大鼠灌胃桂附地黄片混悬液2.5 g/kg(溶剂为水)^[9],盐炙杜仲低、中、高剂量组大鼠分别灌胃盐炙杜仲混悬液1.5、3、6 g/kg^[11],正常对照组和模型组大鼠灌胃生理盐水,每天1次,连续给药8周^[10]。给药结束后,对各组大鼠的肾虚症候进行评分并再次称定其体质量(记为 W_2)。

2.3 大鼠血清中BUN、SCR、T、COR水平测定

取材前,大鼠禁食不禁水12 h。末次给药1 h后,取大鼠眼眶静脉丛血,于4℃下静置4 h后,以3 500 r/min离心10 min,取上清液,用全自动生化分析仪测定血清中BUN、SCR水平;严格按照ELISA试剂盒说明书方法操作,检测血清中T、COR水平。

2.4 大鼠肾组织病理学检查

取血后,大鼠颈椎脱臼处死,取肾组织适量,用中性甲醛固定后,浸蜡、切片(厚度5 μm),常规HE染色后,使用倒置显微镜观察其肾组织病理学变化。

2.5 大鼠肾组织中SOD活性、MDA水平检测

取大鼠肾组织适量,严格按照试剂盒说明书方法操作,以WST-8法检测各组大鼠肾组织中SOD活性,显色法检测肾组织中MDA水平。

2.6 大鼠肾组织中HIF-1 α 、STAT5 mRNA表达检测

取大鼠肾组织适量,提取总RNA后,逆转录成cDNA,采用荧光定量PCR法检测其HIF-1 α 、STAT5 mRNA的表达水平。PCR反应体系(20 μL)包含cDNA模版2 μL,PCR Master Mix 10 μL,上、下游引物各1 μL,用无菌水补足20 μL。反应条件如下:94℃预变性3 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,共30个循环。引物由赛默飞世尔科技有限公司设计、合成,其具体序列和扩增产物长度见表1。以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算HIF-1 α 、STAT5 mRNA的相对表达量。

表1 HIF-1 α 等基因的引物序列和扩增产物长度

基因	引物序列	扩增产物长度/pb
HIF-1 α	上游引物:5'-ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG-3'	98
	下游引物:5'-CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG-3'	
STAT5	上游引物:5'-CCCTGGCCCTCTAAACAC-3'	136
	下游引物:5'-AAGGAACCCCTAGAGTGCTTACT-3'	
β -actin	上游引物:5'-AAATGGTGAAGTCGGTGTGAAC-3'	102
	下游引物:5'-CAACAATCTCCACTTTGCCACTG-3'	

2.7 大鼠肾组织中HIF-1 α 、STAT5蛋白表达检测

采用Western blot法进行检测。取大鼠肾组织适量,经RIPA蛋白裂解液提取总蛋白后,按BCA法定量,然后加热变性,取变性后的蛋白样品50 μg进行电泳分离,随后转移至聚偏氟乙烯膜上,用脱脂牛奶于室温下封闭2 h后,置于4℃冰箱中,加入HIF-1 α 、STAT5、p-STAT5、GAPDH一抗(稀释比例均为1:500),孵育过夜;使用PBST缓冲液清洗3次,共15 min,加入相应二抗(稀释比例为1:1 000),室温孵育1 h,用PBST缓冲液清洗3次,以ECL显色后,于凝胶成像仪上成像并使用Image J 1.52v软件分析蛋白灰度值,以目标蛋白与内参蛋白(GAPDH)的灰度值比值为该蛋白的相对表达量,以p-STAT5与STAT5的灰度值比值(p-STAT5/STAT5)评价STAT5蛋白的磷酸化水平。

2.8 统计学方法

应用SPSS 20.0软件对数据进行统计分析。计量资料(符合正态分布)以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 大鼠体质量变化及肾虚症候评分

盐炙杜仲对大鼠体质量及肾虚症候评分的影响见表2。由表2可见,造模前,各组大鼠体质量比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。给药结束后,模型组大鼠的体质量较正常对照组显著降低($P < 0.05$),肾虚症候评分显著升高($P < 0.05$);盐炙杜仲各剂量组和阳性对照组大鼠的体质量均较模型组显著升高($P < 0.05$),肾虚症候评分均显著降低($P < 0.05$),且盐炙杜仲的上述作用有剂量依赖性($P < 0.05$)。

表2 盐炙杜仲对大鼠体质量及肾虚症候评分的影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	W_1/g	W_2/g	肾虚症候评分/分
正常对照组	190.64 ± 6.76	387.09 ± 6.09	0
模型组	193.66 ± 5.17	263.14 ± 6.73 ^a	3.46 ± 0.26 ^a
盐炙杜仲低剂量组	186.38 ± 5.09	313.38 ± 5.48 ^b	2.94 ± 0.11 ^b
盐炙杜仲中剂量组	196.17 ± 6.33	336.19 ± 4.22 ^c	2.48 ± 0.24 ^c
盐炙杜仲高剂量组	192.60 ± 5.83	351.70 ± 5.36 ^{bcd}	2.13 ± 0.17 ^{bcd}
阳性对照组	197.53 ± 6.04	353.78 ± 5.18 ^b	2.08 ± 0.26 ^b

a:与正常对照组比较, $P < 0.05$;b:与模型组比较, $P < 0.05$;c:与盐炙杜仲低剂量组比较, $P < 0.05$;d:与盐炙杜仲中剂量组比较, $P < 0.05$

3.2 大鼠血清中BUN、SCR、T、COR水平变化

盐炙杜仲对肾阳虚大鼠血清中BUN、SCR、T、COR水平的影响见表3。由表3可见,模型组大鼠血清中BUN、SCR、COR水平均较正常对照组显著升高($P < 0.05$),T水平显著降低($P < 0.05$);盐炙杜仲各剂量组和阳性对照组大鼠血清中BUN、SCR、COR水平均较模型组显著降低($P < 0.05$),T水平均显著升高($P < 0.05$),且盐炙杜仲的上述作用有剂量依赖性($P < 0.05$)。

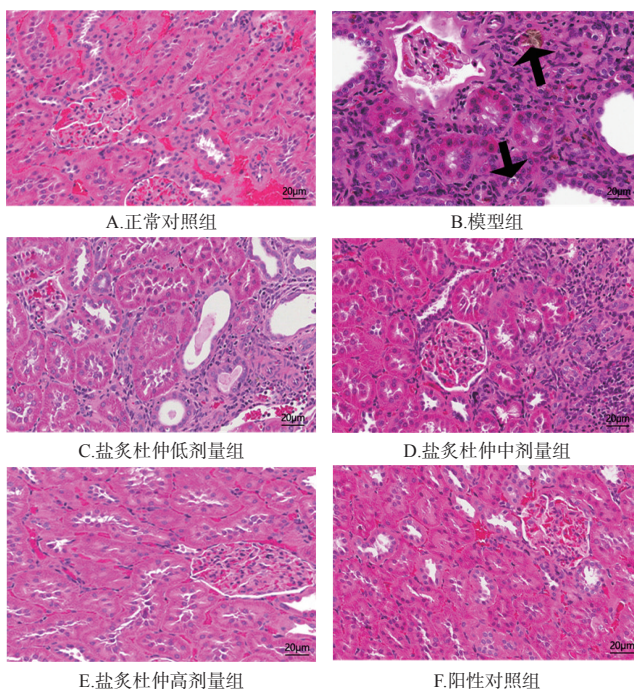
表3 盐炙杜仲对肾阳虚大鼠血清中BUN、SCR、T、COR水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	BUN/(mmol/L)	SCR/(mmol/L)	T/(ng/mL)	COR/($\mu\text{g/L}$)
正常对照组	5.36 ± 0.73	16.69 ± 1.17	1.73 ± 0.14	242.18 ± 16.61
模型组	9.29 ± 0.42 ^a	58.51 ± 1.36 ^a	0.75 ± 0.09 ^a	318.73 ± 14.96 ^a
盐炙杜仲低剂量组	6.84 ± 0.38 ^b	41.37 ± 0.99 ^b	0.97 ± 0.06 ^b	281.79 ± 17.42 ^b
盐炙杜仲中剂量组	5.67 ± 0.48 ^{bc}	30.58 ± 0.73 ^{bc}	1.31 ± 0.11 ^{bc}	263.26 ± 12.51 ^{bc}
盐炙杜仲高剂量组	5.58 ± 0.53 ^{bcd}	20.43 ± 0.68 ^{bcd}	1.62 ± 0.12 ^{bcd}	248.19 ± 15.23 ^{bcd}
阳性对照组	5.65 ± 0.41 ^b	22.86 ± 1.14 ^b	1.40 ± 0.07 ^b	253.86 ± 19.26 ^b

a: 与正常对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与盐炙杜仲低剂量组比较, $P < 0.05$; d: 与盐炙杜仲中剂量组比较, $P < 0.05$

3.3 大鼠肾组织病理变化

各组大鼠肾组织病理检查的显微图见图1。由图1可见,正常对照组大鼠肾组织细胞排列整齐,未见明显病理改变;与正常对照组比较,模型组大鼠肾小管坏死,肾小球数量减少、囊腔增大,炎症细胞增生;与模型组比较,盐炙杜仲各剂量组和阳性对照组大鼠肾小球及肾小管的病理改变均有所恢复,肾组织细胞排列均较为整齐,炎症细胞浸润均明显减轻。



→: 肾小管管腔狭窄、坏死

图1 各组大鼠肾组织病理检查的显微图(HE染色)

3.4 大鼠肾组织中SOD活性、MDA水平变化

盐炙杜仲对肾阳虚大鼠肾组织中SOD活性、MDA水平的影响见表4。由表4可见,模型组大鼠肾组织中SOD活性较正常对照组显著降低($P < 0.05$),MDA水平显著升高($P < 0.05$);盐炙杜仲各剂量组和阳性对照组大鼠肾组织中SOD活性均较模型组显著升高($P < 0.05$),MDA水平均显著降低($P < 0.05$),且盐炙杜仲的上述作用有剂量依赖性($P < 0.05$)。

表4 盐炙杜仲对肾阳虚大鼠肾组织中SOD活性、MDA水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	SOD/(U/mg prot)	MDA/(nmol/mg prot)
正常对照组	84.84 ± 2.18	2.65 ± 0.24
模型组	27.49 ± 2.74 ^a	11.85 ± 0.34 ^a
盐炙杜仲低剂量组	38.11 ± 2.30 ^b	8.73 ± 0.41 ^b
盐炙杜仲中剂量组	58.01 ± 1.89 ^{bc}	5.93 ± 0.35 ^{bc}
盐炙杜仲高剂量组	75.29 ± 2.71 ^{bcd}	3.32 ± 0.26 ^{bcd}
阳性对照组	64.53 ± 2.46 ^b	4.16 ± 0.37 ^b

a: 与正常对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与盐炙杜仲低剂量组比较, $P < 0.05$; d: 与盐炙杜仲中剂量组比较, $P < 0.05$

3.5 大鼠肾组织中HIF-1 α 、STAT5 mRNA相对表达量变化

盐炙杜仲对肾阳虚大鼠肾组织中HIF-1 α 、STAT5 mRNA相对表达量的影响见表5。由表5可见,模型组大鼠肾组织中HIF-1 α 、STAT5 mRNA的相对表达量均较正常对照组显著升高($P < 0.05$);盐炙杜仲各剂量组和阳性对照组大鼠肾组织中HIF-1 α 、STAT5 mRNA的相对表达量均较模型组显著降低($P < 0.05$),且盐炙杜仲的上述作用有剂量依赖性($P < 0.05$)。

表5 盐炙杜仲对肾阳虚大鼠肾组织中HIF-1 α 、STAT5 mRNA相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	HIF-1 α mRNA	STAT5 mRNA
正常对照组	0.83 ± 0.17	1.32 ± 0.46
模型组	6.57 ± 0.43 ^a	7.23 ± 0.54 ^a
盐炙杜仲低剂量组	4.89 ± 0.52 ^b	5.03 ± 0.39 ^b
盐炙杜仲中剂量组	3.47 ± 0.36 ^{bc}	3.88 ± 0.40 ^{bc}
盐炙杜仲高剂量组	1.38 ± 0.44 ^{bcd}	1.67 ± 0.32 ^{bcd}
阳性对照组	1.87 ± 0.52 ^b	1.94 ± 0.46 ^b

a: 与正常对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与盐炙杜仲低剂量组比较, $P < 0.05$; d: 与盐炙杜仲中剂量组比较, $P < 0.05$

3.6 大鼠肾组织中HIF-1 α 、STAT5蛋白表达变化

各组大鼠肾组织中HIF-1 α 、STAT5、p-STAT5蛋白表达的电泳图见图2,盐炙杜仲对肾阳虚大鼠肾组织中HIF-1 α 、STAT5、p-STAT5蛋白相对表达量和p-STAT5/STAT5的影响见表6。由图2、表6可见,模型组大鼠肾组织中HIF-1 α 、STAT5、p-STAT5蛋白的相对表达量和p-STAT5/STAT5均较正常对照组显著升高($P < 0.05$);盐炙杜仲各剂量组和阳性对照组大鼠肾组织中HIF-1 α 、STAT5、p-STAT5蛋白的相对表达量和p-STAT5/STAT5均较模型组显著降低($P < 0.05$),且盐炙杜仲的上述作用

有剂量依赖性($P < 0.05$)。

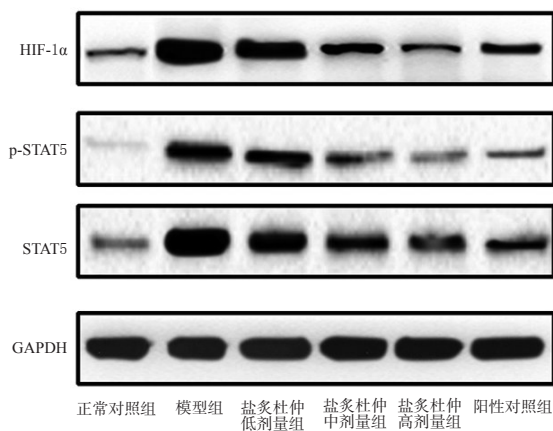


图2 各组大鼠肾组织中HIF-1 α 、STAT5、p-STAT5蛋白表达的电泳图

表6 盐炙杜仲对肾虚大鼠肾组织中HIF-1 α 、STAT5、p-STAT5蛋白相对表达量和p-STAT5/STAT5的影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	HIF-1 α	STAT5	p-STAT5	p-STAT5/STAT5
正常对照组	0.43 ± 0.07	0.32 ± 0.09	0.11 ± 0.05	0.32 ± 0.10
模型组	1.30 ± 0.06 ^a	1.33 ± 0.10 ^a	0.64 ± 0.05 ^a	0.48 ± 0.02 ^a
盐炙杜仲低剂量组	0.84 ± 0.06 ^b	0.93 ± 0.06 ^b	0.36 ± 0.06 ^b	0.39 ± 0.04 ^b
盐炙杜仲中剂量组	0.59 ± 0.09 ^{bc}	0.62 ± 0.06 ^{bc}	0.20 ± 0.04 ^{bc}	0.32 ± 0.05 ^{bc}
盐炙杜仲高剂量组	0.41 ± 0.03 ^{bcd}	0.47 ± 0.05 ^{bcd}	0.10 ± 0.01 ^{bcd}	0.21 ± 0.04 ^{bcd}
阳性对照组	0.48 ± 0.04 ^b	0.53 ± 0.10 ^b	0.15 ± 0.04 ^b	0.27 ± 0.04 ^b

a: 与正常对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与盐炙杜仲低剂量组比较, $P < 0.05$; d: 与盐炙杜仲中剂量组比较, $P < 0.05$

4 讨论

中医理论认为,肾阳虚是由机体肾阳虚衰、温煦失职、气化失权等病因所导致的畏寒怕冷、精神不振等一系列症候^[12-13]。现代医学研究发现,肾阳虚发病机制与脑、肾、性腺等组织器官神经内分泌紊乱等因素相关^[14]。腺嘌呤致肾阳虚是目前实验室常用的肾阳虚动物模型建立方法,经实践证实,该方法具有操作简便、安全性及重复性较好的优点^[15]。桂附地黄片是临床应用较为广泛的肾阳虚治疗药物,故本研究将其作为阳性对照药。

杜仲为杜仲科植物杜仲 *E. ulmoides* Oliv. 的干燥树皮,最早记载于我国传统医学著作《神农本草经》,具有强筋壮骨、补益肝肾等功效,可用于治疗肾阳虚致腰膝酸痛等症^[16]。盐炙杜仲是杜仲药材经一系列加工工艺所制得的中药炮制品,与传统杜仲药材相比,盐炙杜仲具有更强的抗氧化能力,并可缓和生品药性^[17]。

肾阳虚症候评分是研究者对肾阳虚大鼠造模效果评价及药效学评价的重要手段之一^[18]。BUN、SCR水平是反映肾功能的重要指标,其水平升高提示肾功能下降^[19]。近年来有学者提出,下丘脑-垂体-性腺轴相关激素水平能够反映肾阳虚疾病状态及病情进展,血清中T、

COR水平是下丘脑-垂体-性腺轴相关激素的代表,血清中T水平降低及COR水平升高则是肾阳虚的重要表现之一^[20]。本研究结果表明,与模型组比较,盐炙杜仲各剂量组大鼠肾小球及肾小管的病理改变均有所恢复,其肾阳虚症候评分和血清中BUN、SCR、COR水平均显著降低,血清中T水平均显著升高,且盐炙杜仲的上述作用有剂量依赖性,提示该炮制品能剂量依赖性地改善腺嘌呤诱导的大鼠肾组织病理改变和下丘脑-垂体-性腺轴相关激素水平。

现代研究发现,HIF-1 α 与肾阳虚的发病机制及疾病进展密切相关^[21]。陈琪琪等^[22]研究显示,腺嘌呤会引发大鼠肾动脉血管钙化、肾小球萎缩及肾间质纤维化等肾组织病理改变,其机制可能与HIF-1 α 水平升高有关;孔翠文等^[23]研究显示,腺嘌呤可诱导大鼠肾组织缺氧损伤、肾纤维化改变以及肾组织中HIF-1 α 水平升高;贾云波等^[24]研究显示,降低HIF-1 α 水平能够有效改善肾阳虚大鼠的血瘀证。STAT5蛋白在生殖细胞发育和性激素水平调节的过程中有重要意义,其表达的上调会造成机体性激素水平的异常^[25]。本研究结果表明,经盐炙杜仲干预后,肾阳虚大鼠肾组织中HIF-1 α 、STAT5 mRNA及HIF-1 α 、STAT5、p-STAT5蛋白的相对表达量和p-STAT5/STAT5均显著降低,表明盐炙杜仲不仅能显著降低HIF-1 α 水平,还能够显著降低STAT5蛋白的表达水平及其磷酸化水平,提示盐炙杜仲对肾阳虚大鼠的改善作用可能是通过下调HIF-1 α 和STAT5蛋白的表达来实现的。

SOD及MDA是体现抗氧化应激能力的指标。研究表明,SOD活性降低、MDA水平升高均会导致肾组织处于氧化应激损伤状态,同时导致肾组织中HIF-1 α 水平升高^[26];冯杰等^[27]研究显示,抑制MDA的产生和增强SOD的活性,可抑制肾组织中HIF-1 α 的表达水平,从而修复实验动物的肾组织损伤。本研究结果表明,不同剂量的盐炙杜仲均能增强大鼠肾组织中SOD活性并降低MDA水平,提示盐炙杜仲能够通过提高大鼠的抗氧化应激能力进而修复肾阳虚大鼠的肾组织损伤,同时抑制HIF-1 α 的表达。

综上所述,盐炙杜仲能够明显缓解肾阳虚大鼠的肾组织损伤,降低血清中BUN、SCR、COR水平,升高血清中T水平,其机制可能与抗氧化应激、抑制HIF-1 α 和STAT5蛋白的表达有关。

参考文献

- [1] 招文华,任辉,沈耿杨,等.骨质疏松症肾阳虚病证结合模型的研究进展[J].中华中医药杂志,2018,33(1):219-223.
- [2] CHEN R Q,WANG J,ZHAN R H,et al. Fecal metabolomics combined with 16S rRNA gene sequencing to ana-

- lyze the changes of gut microbiota in rats with kidney-Yang deficiency syndrome and the intervention effect of You-Gui pill[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 244: 112139.
- [3] 徐文彬, 王文鹏, 祁鹏, 等. 二仙汤合玉屏风散加味治疗肾阳虚证排卵障碍性不孕的临床研究[J]. *中医药临床杂志*, 2020, 32(6): 1151-1155.
- [4] 范景, 吕圭源, 李恒辉, 等. 杜仲提取物对雌二醇致肾阳虚小鼠的影响[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2009, 19(1): 1-4.
- [5] 翁泽斌, 颜翠萍, 吴育, 等. 盐制对杜仲治疗去卵巢大鼠骨质疏松症影响的研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(12): 1457-1463.
- [6] 邓翀, 韩磊, 张亚强, 等. 杜仲盐制前后化学成分的变化[J]. *中成药*, 2015, 37(11): 2464-2468.
- [7] LI Z H, WU C, KE H, et al. You-Gui-Yin improved the reproductive dysfunction of male rats with chronic kidney disease via regulating the HIF1 α -STAT5 pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 246: 112240.
- [8] 卢本银, 史仁杰. 美沙拉嗪联合附子理中丸治疗脾阳虚证溃疡性结肠炎的效果及对血清 HIF-1 α 、SOCS-3 水平的影响[J]. *中国现代医生*, 2019, 57(16): 30-33.
- [9] 鞠成国, 李媛媛, 王巍, 等. 仙茅不同炮制品对腺嘌呤致肾阳虚大鼠的作用机制分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(16): 101-107.
- [10] 方萍, 苏洁, 陈炜, 等. 无比山药丸对腺嘌呤致肾阳虚大鼠性功能障碍的影响[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(10): 2439-2445.
- [11] 赵亮, 陈志明. 盐炙杜仲对去卵巢骨质疏松大鼠骨代谢生化指标的影响[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(3): 587-588.
- [12] 张意侗, 梁晖, 张俊, 等. 强直颗粒对肾阳虚型强直性脊柱炎患者疼痛及疗效的影响[J]. *中医临床研究*, 2020, 12(17): 101-104.
- [13] 李景花, 刘建涛, 张自强, 等. 附子理中丸和真武汤加减联合治疗糖尿病肾病脾肾阳虚证的临床研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2020, 47(5): 135-137.
- [14] 张涛, 徐福如, 蒋文君, 等. 电针肾俞穴对肾阳虚豚鼠形态行为及血清激素的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2020, 40(6): 703-707.
- [15] YANG J X, WANG Y L, BAO Y, et al. The total flavones from *Semen cuscutae* reverse the reduction of testosterone level and the expression of androgen receptor gene in kidney-Yang deficient mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 119(1): 166-171.
- [16] 刘宁, 粟克喜, 刘春山. 杜仲国内外研究进展[J]. *西南国防医药*, 2002, 12(5): 449-451.
- [17] 高学昌, 赵海东. 杜仲炮制初探[J]. *时珍国药研究*, 1994, 5(3): 25.
- [18] 沈自尹, 王文健. 中医虚证辨证参考标准[J]. *中西医结合杂志*, 1986, 6(10): 598.
- [19] ROUHANI M H, MORTAZAVI NAJAFABADI M, SURKAN P J, et al. The impact of oat (*Avena sativa*) consumption on biomarkers of renal function in patients with chronic kidney disease: a parallel randomized clinical trial[J]. *Clin Nutr*, 2018, 37(1): 78-84.
- [20] JIN S B, SUN D J, XI Q K, et al. Identification of genes in the hypothalamus-pituitary-gonad axis in the brain of Amur Sturgeons (*Acipenser schrenckii*) by comparative transcriptome analysis in relation to kisspeptin treatment[J]. *Gene*, 2016, 595(1): 53-61.
- [21] 邵国民, 陈肖蓉, 张史昭. HIF-1 α 在原发性系膜增生性肾小球肾炎的表达以及与中医辨证分型的相关性[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2013, 14(1): 39-41, 101.
- [22] 陈琪琪, 谭茹瑜, 朱婷婷, 等. 慢性肾脏病血管钙化大鼠模型血清中 HIF-1 α 、 β -catenin 的表达及意义[J]. *海南医学院学报*, 2021, 27(9): 656-660.
- [23] 孔翠文, 闫慧, 李靖, 等. 缬沙坦对尿酸性肾病大鼠肾间质纤维化的干预机制研究[J]. *中国全科医学*, 2013, 16(7): 644-648.
- [24] 贾云波, 杜惠兰, 高星, 等. 补肾温阳化瘀方对子宫内腺异位症肾阳虚血瘀证模型大鼠 HIF-1 α 、PHD2、VHL 表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2015, 35(10): 1210-1217.
- [25] CRISÓSTOMO L, ALVES M G, GORGA A, et al. Molecular mechanisms and signaling pathways involved in the nutritional support of spermatogenesis by sertoli cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1748: 129-155.
- [26] 许晓丽, 何志婷, 刘琼, 等. 肾康丸对慢性间歇性缺氧致肾损伤大鼠氧化应激及炎症反应的影响[J]. *西部医学*, 2019, 31(8): 1185-1189.
- [27] 冯杰, 佟小雅, 俞佳丽, 等. 褪黑素通过 HIF-1 α /VEGF 信号通路减轻急性肾损伤的研究[J]. *中国当代医药*, 2016, 23(29): 12-15.

(收稿日期: 2021-12-29 修回日期: 2022-05-28)

(编辑: 邹丽娟)