

鹿鞭对肾阴虚及肾阳虚小鼠抗疲劳作用 及 PI3K-Akt 通路机制研究

王祥山¹, 朱映黎¹, 吕美豫¹, 陈彦¹, 余淑惠¹, 王卫茜², 张建军¹,
王淳¹, 谷洪顺^{2*}, 王林元^{1*}

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 北京采瑞医药科技研究院, 北京 100094)

[摘要] 研究鹿鞭对肾阴虚及肾阳虚小鼠抗疲劳作用及机制。将健康雄性昆明小鼠 88 只适应性喂养 1 周后随机分为空白组、肾阴虚模型组、肾阴虚西洋参组、肾阴虚各给药组、肾阳虚模型组、肾阳虚人参组、肾阳虚各给药组, 每组 8 只, 合计 11 组。每日定时分别灌胃醋酸地塞米松、氢化可的松制备肾阴虚模型、肾阳虚模型, 并给予相应药物, 空白组给予空白溶剂, 连续 14 d。于第 14 天给药后 30 min 测定各组小鼠力竭游泳时间; 于第 15 天摘眼球取血清分离血清测定血清中乳酸(lactic acid, LD)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、环腺苷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)、环鸟苷酸(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)含量, 剖取肝脏测定肝糖原含量、肝组织中磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)和蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)蛋白表达情况。与肾阳虚模型组相比, 鹿鞭给药组体质量显著升高($P < 0.05$), 阴虚症状有所改善, cGMP 含量显著降低($P < 0.01$), cAMP/cGMP 比值显著升高($P < 0.01$), 力竭游泳时间显著增加($P < 0.01$), LD 含量显著降低($P < 0.01$), BUN 含量显著升高($P < 0.01$), 肝糖原含量显著增加($P < 0.01$), 肝脏 PI3K、Akt 蛋白表达明显增加($P < 0.05$)。与肾阴虚模型组相比, 鹿鞭给药组体质量显著升高($P < 0.01$), 阴虚症状有所改善, cGMP 含量显著升高($P < 0.01$), cAMP/cGMP 比值显著下降($P < 0.01$), 力竭游泳时间显著增加($P < 0.01$), LD 含量显著降低($P < 0.01$), BUN 含量显著降低($P < 0.01$), 肝糖原含量显著增加($P < 0.01$), 肝脏 PI3K 蛋白表达显著增加($P < 0.05$), 肝脏 Akt 蛋白表达显著增加($P < 0.05$)。综上, 鹿鞭对阴虚及阳虚证均有一定调节作用, 且可以通过影响 PI3K-Akt 通路增加糖原合成以起到抗疲劳作用。

[关键词] 鹿鞭; 抗疲劳; 肾阴虚; 肾阳虚; 糖原合成

Anti-fatigue effect of Lubian on kidney Yin deficiency and kidney Yang deficiency mice and mechanism based on PI3K-Akt pathway

WANG Xiang-shan¹, ZHU Ying-li¹, LYU Mei-yu¹, CHEN Yan¹, YU Shu-hui¹, WANG Wei-qian², ZHANG Jian-jun¹,
WANG Chun¹, GU Hong-shun^{2*}, WANG Lin-yuan^{1*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Beijing Cairui Institute of Pharmaceutical Science and Technology, Beijing 100094, China)

[Abstract] This study aimed to investigate the anti-fatigue effect and mechanism of Lubian (Cervi Penis et Testis) on kidney Yin deficiency and kidney Yang deficiency mice. After one week of adaptive feeding, 88 healthy male Kunming mice were randomly divided into a blank group, a kidney Yin deficiency model group, a kidney Yin deficiency-Panaxis Quinquefolii Radix (PQR) group, kidney Yin deficiency-Lubian treatment groups, a kidney Yang deficiency model group, a kidney Yang deficiency-Ginseng Radix et Rhizoma (GR) group, and kidney Yang deficiency-Lubian treatment groups, with eight mice in each group. The kidney Yin deficiency model and kidney Yang deficiency model were prepared by daily regular oral administration of dexamethasone acetate and hydrocortisone, re-

[收稿日期] 2022-10-31

[基金项目] 国家重点研发计划“中医药现代化”重点专项(2018YFC1706800)

[通信作者] * 王林元, 教授, 博士生导师, 研究方向为中医药基本理论与中药新技术, E-mail: wangly@bucm.edu.cn; * 谷洪顺, 博士, 副研究员, 研究方向为中医药大健康产品研究与开发, E-mail: guhongshun@bjcrry.com

[作者简介] 王祥山, 硕士研究生, E-mail: 19801293023@163.com

spectively, and meanwhile, corresponding drugs were provided. The mice in the blank group received blank reagent. The treatment lasted 14 days. The exhaustive swimming time was measured 30 min after drug administration on the 14th day. On the 15th day, blood was collected from eyeballs and the serum was separated to determine the content of lactic acid (LD), blood urea nitrogen (BUN), lactate dehydrogenase (LDH), cyclic adenosine monophosphate (cAMP), and cyclic guanosine monophosphate (cGMP). The liver was dissected to determine the content of liver glycogen and the protein expression of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and protein kinase B (Akt). Compared with the kidney Yang deficiency model group, the kidney Yang deficiency-Lubian treatment groups showed increased body weight ($P<0.05$), relieved symptoms of Yang deficiency, decreased cGMP content ($P<0.01$), increased cAMP/cGMP ($P<0.01$), prolonged exhausted swimming time ($P<0.01$), reduced LD ($P<0.01$), elevated BUN content ($P<0.01$), increased liver glycogen content ($P<0.01$), and increased protein expression of PI3K and Akt in the liver ($P<0.05$). Compared with the kidney Yin deficiency model group, the kidney Yin deficiency-Lubian treatment groups showed increased body weight ($P<0.01$), relieved symptoms of Yin deficiency, increased content of cGMP ($P<0.01$), decreased cAMP/cGMP ($P<0.01$), prolonged exhausted swimming time ($P<0.01$), decreased LD ($P<0.01$), decreased BUN content ($P<0.01$), increased liver glycogen content ($P<0.01$), and increased protein expression of PI3K ($P<0.05$) and Akt in the liver ($P<0.05$). To sum up, Lubian can regulate Yin deficiency and Yang deficiency and increase glycogen synthesis by affecting the PI3K-Akt pathway, thereby exerting an anti-fatigue role.

[Key words] Lubian; anti-fatigue; kidney Yin deficiency; kidney Yang deficiency; glycogen synthesis

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20230202.401

李时珍云:“鹿之一身益人,……纯阳多寿之物。”^[1]《本草纲目》记载全鹿可供药用,且均为滋补之物,多用于滋补肾阳。其中鹿茸、鹿角、鹿角胶、鹿角霜药效显著,应用较广收录于《中国药典》。其他药用部位药性缓和多收录于地方标准中,其药性在不同古籍、标准中的记载不甚统一,如鹿鞭在《名医别录》《本草药性大全》《吉林省药品标准》记载性平,而在《医林纂要》等中记载性温。药性作为指导中药临床应用的指导原则,对临床用药有着十分重要的作用,故而形成完善的药性需要经过长时间的积累与反复的论证^[2]。对鹿类中药药性的研究一方面为标准提升奠定基础,促进临床用药的规范化;另一方面,使得辨证用药更加准确,保证合理用药^[3]。

鹿鞭又称鹿肾、鹿冲,为鹿科动物梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 或马鹿 *C. elaphus* Linnaeus 的阴茎和睾丸^[4],含有核苷类、磷脂类、激素类、多糖类、生物胺类、氨基酸类、脂肪类、维生素类、微量元素等成分^[5],具有补肾、壮阳、益精、活血之功效,主治肾虚劳损。现代研究表明鹿鞭水提物与醇提物均具有良好的抗疲劳、增强体力的作用^[4-6];鹿鞭中的多肽、多糖类物质还具有升高机体睾酮含量的作用^[7],而睾酮含量的提高则是抗疲劳作用的主要机制之一,其作用原理与淫羊藿苷类似^[8]。现有研究多是单一研究鹿鞭的抗疲劳作用,但从其中草药性出发,针对不同机体状态下抗疲劳作用的研究却未见报道。许

多市售鹿鞭产品以原粉入药,如三鞭参茸固本丸(批准文号 Z20026988)、补肾助阳丸(批准文号 Z20226226、Z20026227)、海马强肾片(批准文号 Z20025315)等。故本实验采用灌胃地塞米松、氢化可的松分别诱导小鼠产生肾阴虚、肾阳虚证候,用鹿鞭原粉进行研究,探讨鹿鞭对肾阴虚、肾阳虚小鼠抗疲劳作用及机制。糖原的储存水平也是衡量体力的重要指标之一,磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路能够通过促进机体糖原的合成^[9],发挥抗疲劳的作用。本研究从 PI3K-Akt 糖原合成信号通路深入探讨鹿鞭抗疲劳作用及机制。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF 级健康雄性昆明小鼠 88 只,体质量 18~22 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2019-0010。动物饲养于北京中医药大学 SPF 级动物房,实验过程中给予小鼠普通维持饲料,自由饮水,室温(22±2)℃,相对湿度 60%~70%,灯照周期 12 h,7:00—19:00 灯照,19:00—7:00 黑暗。实验通过北京中医药大学医学与实验动物伦理委员会审查,符合相关伦理学要求,动物伦理号 BUCM-4-2021040601-2005。

1.2 药物 鹿鞭(批号 20210401)购自吉林省长春市南关区上君堂鹿制品经销处,经北京中医药大学高级实验师李伟老师鉴定为鹿科动物梅花鹿 *C. nippon* Temminck 的阴茎和睾丸,滑石粉烫,粉碎过

80目筛,用0.5%的羧甲基纤维素钠溶液配制不同的给药浓度。醋酸地塞米松片(上海信谊药厂有限公司,批号501210402,每片含醋酸地塞米松0.75mg);注射用氢化可的松琥珀酸钠(常州四药制药有限公司,批号20210717D1);西洋参配方颗粒(北京康仁堂药业有限公司,批号20008141,每克西洋参配方颗粒相当于西洋参3.33g);人参配方颗粒(北京康仁堂药业有限公司,批号21006942,每克人参配方颗粒相当于人参2.5g)。

1.3 试剂与仪器 血乳酸(lactic acid, LD)试剂盒(批号20220411)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)试剂盒(批号20220310)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒(批号20220310)、糖原试剂盒(批号20220416)、二喹啉甲酸法(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度检测试剂盒(批号20220418)、中强度RIPA(radio immunoprecipitation assay)裂解液(批号20220418)均购自南京建成生物科技研究所;小鼠血清环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)ELISA试剂盒(批号202203)、小鼠血清环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)ELISA试剂盒(批号202203)均购自上海酶联生物科技有限公司;Akt抗体(批号00107910)、PI3K抗体(批号10005702)、山羊抗兔二抗(批号20000487)、ECL发光显影液(批号20030323)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;蛋白酶和磷酸酶抑制剂(批号032321211012)购自上海碧云天生物技术有限公司。酶标分析仪(型号Epoch2C型,美国伯腾仪器有限公司);凝胶成像系统(型号ChemiScope 6000,上海勤翔科学仪器有限公司)。

1.4 分组与给药 雄性昆明小鼠,体质量18~22g,于SPF环境中适应性喂养7d后,将其分为11组,每组8只,即空白组(给予0.5% CMC-Na);肾阴虚组(醋酸地塞米松 $0.25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、阳性药组(西洋参 $1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,相当于成人剂量 $5\text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$)、鹿鞭低剂量组($0.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,相当于成人剂量 $1\text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$)、鹿鞭中剂量组($0.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,相当于成人剂量 $2\text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$)、鹿鞭高剂量组($0.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,相当于成人剂量 $4\text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$);肾阳虚组(氢化可的松 $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、阳性药组(人参 $1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,相当于成人剂量 $5\text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$)、鹿鞭低剂量组($0.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,相当于成人剂量 $1\text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$)、鹿鞭中剂量组($0.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,相当于成人剂量 $2\text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$)、鹿鞭高剂

量组($0.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,相当于成人剂量 $4\text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$)。每天上午8:00按 $0.01\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 灌胃给药,每日1次,给药14d。

造模^[10]:适应性喂养7d后,每日下午4:00空白组给予等量蒸馏水,肾阴虚组小鼠灌胃地塞米松溶液($0.25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),肾阳虚组小鼠灌胃氢化可的松溶液($25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),分别制备肾阴虚、肾阳虚模型,连续造模14d。于第14天给药后30min进行力竭游泳实验,于第15天不负重游泳力竭游泳,休息30min后取材。

1.5 小鼠负重游泳实验 第14天给药30min后进行负重游泳实验。小鼠在 $40\text{ cm}\times 55\text{ cm}\times 75\text{ cm}$ 游泳箱中游泳,人工驱赶小鼠不停游泳,水温保持(25 ± 1.0) $^{\circ}\text{C}$,小鼠负重约为体质量的5%的铅块,记录自游泳开始至完全没入水中5~8s不出水面时间为力竭游泳时间^[10]。

1.6 血清指标 给药第15天早晨进行一次无负重游泳力竭运动,30min后脱颈椎处死动物,摘眼球取血,静置2h,3000 $\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15min,吸取血清,按试剂盒说明书方法检测血清LDH、LD、BUN、cAMP、cGMP水平。

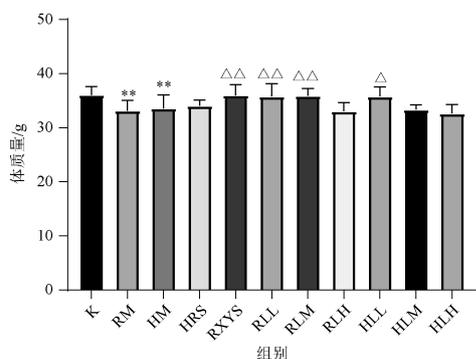
1.7 肝组织指标 摘眼球取血后迅速解剖,取小鼠肝脏大叶,用0.9%氯化钠溶液冲洗干净,滤纸吸干,放入冻存管后投入液氮罐中保存备用,取其肝脏100mg,用冰0.9%氯化钠溶液冲洗干净,滤纸吸干,剪碎后加入适量中强度RIPA裂解液(按1:1:48加入蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂和RIPA裂解液)匀浆制成10%的肝组织匀浆液,12000 $\times g$ 离心20min,取上清液,用BCA法测定蛋白含量。采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝组织中Akt、PI3K蛋白的表达水平。

2 结果

2.1 鹿鞭对肾阳虚、肾阴虚小鼠一般状况及体质量的影响 与空白组相比,肾阴虚模型组小鼠出现饮水增加、小便发黄、自主活动增加、易被激惹等症状;肾阳虚模型组小鼠出现消瘦、毛发失去光泽、肢尾冷、抱团等症状;与肾阳虚、肾阴虚模型组相比,西洋参、人参、鹿鞭能够在一定程度上改善小鼠状态。

给药第14天测量小鼠体质量,与空白组相比,肾阳虚模型组体质量显著下降($P<0.01$);与肾阳虚模型组相比,鹿鞭低剂量组体质量明显增加($P<0.05$),人参组体质量略有增加但差异无统计学意

义;与空白组相比,肾阴虚模型组体质量显著下降($P<0.01$);与肾阴虚模型组相比,西洋参组、鹿鞭低剂量组、鹿鞭中剂量组体质量显著增加($P<0.01$),高剂量组体质量略有降低但差异无统计学意义,见图1。



K. 空白组;RM. 肾阴虚组;HM. 肾阳虚组;HRS. 肾阳虚人参阳性药组;RXYS. 肾阴虚西洋参阳性药组;RLL. 肾阴虚鹿鞭低剂量组;RLM. 肾阴虚鹿鞭中剂量组;RLH. 肾阴虚鹿鞭高剂量组;HLL. 肾阳虚鹿鞭低剂量组;HLM. 肾阳虚鹿鞭中剂量组;HLH. 肾阳虚鹿鞭高剂量组;与空白组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与各自模型组比较 $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ (图2、3同)。

图1 鹿鞭对肾阳虚、肾阴虚小鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)
Fig.1 Effect of Lubian on body weight of mice with kidney Yang deficiency and kidney Yin deficiency($\bar{x}\pm s, n=8$)

2.2 鹿鞭对肾阳虚、肾阴虚小鼠力竭游泳时间的影响 与空白组相比,肾阳虚、肾阴虚模型组小鼠力竭游泳时间显著降低($P<0.01$);与肾阳虚模型组相比,人参可显著增加小鼠力竭游泳时间($P<0.05$),鹿鞭低、中剂量可显著增加肾阳虚小鼠力竭游泳时间($P<0.01$);与肾阴虚模型组相比,西洋参可显著增加小鼠力竭游泳时间($P<0.01$),鹿鞭低、中剂量可显著增加肾阴虚模型小鼠力竭游泳时间($P<0.01$),见图2。

2.3 鹿鞭对肾阳虚、肾阴虚小鼠血清环核苷酸水平的影响 与空白组相比,肾阳虚模型组小鼠血清cGMP含量显著升高($P<0.01$),cAMP/cGMP比值显著下降($P<0.01$);与肾阳虚模型组相比,人参有降低血清cGMP含量趋势,但差异无统计学意义,鹿鞭低、中剂量可显著降低肾阳虚模型小鼠血清cGMP含量($P<0.01$),显著增加cAMP/cGMP比值($P<0.01$),见表1。

与空白组相比,肾阴虚模型组小鼠血清cAMP

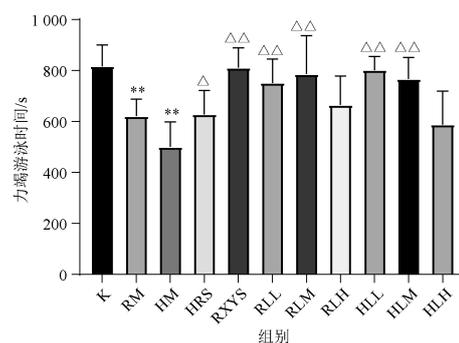


图2 鹿鞭对肾阳虚、肾阴虚小鼠力竭游泳时间的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig.2 Effect of Lubian on exhausted swimming time of mice with kidney Yang deficiency and kidney Yin deficiency($\bar{x}\pm s, n=8$)

表1 鹿鞭对肾阳虚小鼠血清环核苷酸水平的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 1 Effect of Lubian on serum cyclic nucleotide level in mice with kidney Yang deficiency($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	cAMP /pmol·mL ⁻¹	cGMP /pmol·mL ⁻¹	cAMP/cGMP
空白	-	8.73±0.45	9.21±0.38	0.95±0.07
肾阳虚模型	-	8.72±0.51	11.41±1.00 ²⁾	0.78±0.11 ²⁾
人参	1	8.62±0.88	10.69±0.59	0.81±0.08
鹿鞭	0.2	8.56±0.53	9.00±0.40 ⁴⁾	0.98±0.13 ⁴⁾
	0.4	8.56±0.82	9.13±0.54 ⁴⁾	0.94±0.12 ⁴⁾
	0.8	8.91±0.93	10.56±1.11	0.85±0.13

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表2~4同)。

含量显著升高($P<0.05$),cGMP含量显著降低($P<0.01$),cAMP/cGMP比值显著升高($P<0.01$);与肾阴虚模型组相比,西洋参及鹿鞭均可显著增加小鼠血清cGMP含量($P<0.01$),显著降低cAMP/cGMP比值($P<0.01$),见表2。

表2 鹿鞭对肾阴虚小鼠血清环核苷酸水平的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of Lubian on serum cyclic nucleotide level in mice with kidney Yin deficiency($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	cAMP /pmol·mL ⁻¹	cGMP /pmol·mL ⁻¹	cAMP/cGMP
空白	-	8.73±0.45	9.21±0.38	0.95±0.07
肾阴虚模型	-	9.66±0.54 ¹⁾	7.61±0.92 ²⁾	1.17±0.15 ²⁾
西洋参	1	9.27±0.87	9.46±1.29 ⁴⁾	0.97±0.09 ⁴⁾
鹿鞭	0.2	10.79±0.77	10.62±0.53 ⁴⁾	0.98±0.11 ⁴⁾
	0.4	9.75±0.74	10.26±0.74 ⁴⁾	0.98±0.11 ⁴⁾
	0.8	9.27±0.33	9.83±0.51 ⁴⁾	0.98±0.06 ⁴⁾

2.4 鹿鞭对肾阳虚、肾阴虚小鼠物质代谢的影响
与空白组相比,肾阴虚模型组小鼠 LDH 活性显著降低($P<0.05$);与肾阳虚模型组相比,人参可以显著增加小鼠 LDH 活性($P<0.01$),低、中剂量的鹿鞭均可

增加小鼠 LDH 活性,但差异无统计学意义;与肾阴虚模型组相比,鹿鞭中剂量可以显著增加小鼠 LDH 活性($P<0.05$),西洋参及其他剂量鹿鞭均可增加小鼠 LDH 活性,但差异无统计学意义,见表 3、4。

表 3 鹿鞭对肾阳虚小鼠物质代谢的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)Table 3 Effect of Lubian on substance metabolism in mice with kidney Yang deficiency($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	LDH/ $U\cdot L^{-1}$	LD/ $mmol\cdot L^{-1}$	BUN/ $mmol\cdot L^{-1}$	肝糖原/ $mg\cdot g^{-1}$
空白	-	25 176.25±2 085.37	10.20±1.03	15.84±1.52	8.81±0.73
肾阳虚模型	-	23 116.88±2 370.42	13.66±0.85 ²⁾	14.16±0.79 ²⁾	7.77±0.53 ¹⁾
人参	1	28 668.83±2 535.20 ⁴⁾	9.19±1.31 ⁴⁾	19.16±1.09 ⁴⁾	8.92±1.37 ⁴⁾
鹿鞭	0.2	24 464.29±4 355.67	13.15±2.62	14.51±1.20	9.04±0.73 ⁴⁾
	0.4	24 383.12±5 804.54	11.51±1.56 ⁴⁾	16.09±1.06 ⁴⁾	8.55±0.56
	0.8	22 629.87±3 483.23	17.30±2.88 ⁴⁾	16.76±1.36 ⁴⁾	8.40±0.45

表 4 鹿鞭对肾阴虚小鼠物质代谢的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)Table 4 Effect of Lubian on substance metabolism in mice with kidney Yin deficiency($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	LDH/ $U\cdot L^{-1}$	LD/ $mmol\cdot L^{-1}$	BUN/ $mmol\cdot L^{-1}$	肝糖原/ $mg\cdot g^{-1}$
空白	-	25 176.25±2 085.37	10.20±1.03	15.84±1.52	8.81±0.73
肾阴虚模型	-	19 305.65±5 068.03 ¹⁾	11.94±1.09 ¹⁾	17.64±0.98 ²⁾	7.87±0.52 ¹⁾
西洋参	1	23 051.95±2 659.74	9.38±1.59 ⁴⁾	15.21±1.57 ⁴⁾	10.39±1.26 ⁴⁾
鹿鞭	0.2	20 129.87±3 331.36	10.62±1.64	15.11±1.32 ⁴⁾	8.35±0.57
	0.4	23 084.41±3 686.21 ³⁾	8.88±0.83 ⁴⁾	14.40±0.72 ⁴⁾	9.00±0.74 ⁴⁾
	0.8	20 503.25±4 780.53	10.89±1.75	16.80±1.10	8.57±0.51

与空白组相比,肾阴虚及肾阳虚组小鼠血清 LD 含量显著升高($P<0.05, P<0.01$);与肾阳虚模型组相比,人参及鹿鞭中剂量组小鼠血清 LD 含量显著降低($P<0.01$);与肾阴虚模型组相比,西洋参组及鹿鞭中剂量组小鼠血清 LD 含量显著降低($P<0.01$),见表 3、4。

与空白组相比,肾阳虚模型组小鼠血清 BUN 含量显著降低($P<0.01$),肾阴虚模型组小鼠血清 BUN 含量显著升高($P<0.01$);与肾阳虚模型组相比,人参组及鹿鞭中、高剂量组小鼠血清 BUN 含量显著升高($P<0.01$);与肾阴虚模型组相比,西洋参组及鹿鞭低、中剂量组小鼠血清 BUN 含量均显著降低($P<0.01$),见表 3、4。

与空白组相比,肾阴虚、肾阳虚模型组小鼠肝糖原含量显著降低($P<0.05$);与肾阳虚模型组相比,人参组及鹿鞭低剂量组小鼠肝糖原含量显著增加($P<0.01$);与肾阴虚模型组相比,西洋参组及鹿鞭中剂量组小鼠肝糖原含量显著增加($P<0.01$),见表 3、4。

2.5 鹿鞭对肾阳虚、肾阴虚小鼠肝糖原合成相关指标的影响 与空白组相比,肾阳虚模型组小鼠肝脏

PI3K、Akt 蛋白表达显著下降($P<0.05, P<0.01$);与肾阳虚模型组相比,人参和鹿鞭中剂量均可以显著增加肝脏 PI3K、Akt 蛋白表达($P<0.05$);与空白组相比,肾阴虚模型组小鼠肝脏 PI3K、Akt 蛋白表达显著下降($P<0.05, P<0.01$);与肾阴虚模型组相比,西洋参和鹿鞭低、中剂量均可显著增加肝脏 PI3K、Akt 蛋白表达($P<0.05$),见图 3。

3 讨论

“阴虚则热,阳虚则寒”。现代研究表明机体寒热状态的产生与物质、能量、神经内分泌^[11]、免疫^[12]、环核苷酸水平^[13]状态的异常息息相关,环核苷酸中 cAMP 与 cGMP 作为细胞调控的第二信使,二者相互拮抗参与细胞功能的调节,就像阴阳概念一样,在动态的平衡中维持着机体稳态^[14]。并在寒热不同机体状态下有着明显的不同,在四气研究中显示了良好的指征作用,故在本实验中应用其指征机体寒热状态^[15]。氢化可的松组小鼠症状基本符合阳虚表观诊断指标,出现活动下降、反应迟钝、腹泻等症状,而在给予鹿鞭后可明显改善,降低肾阳虚小鼠 cGMP 含量,升高 cAMP/cGMP 比值,与温补药人参作用趋势相同。地塞米松组小鼠症状基本符合

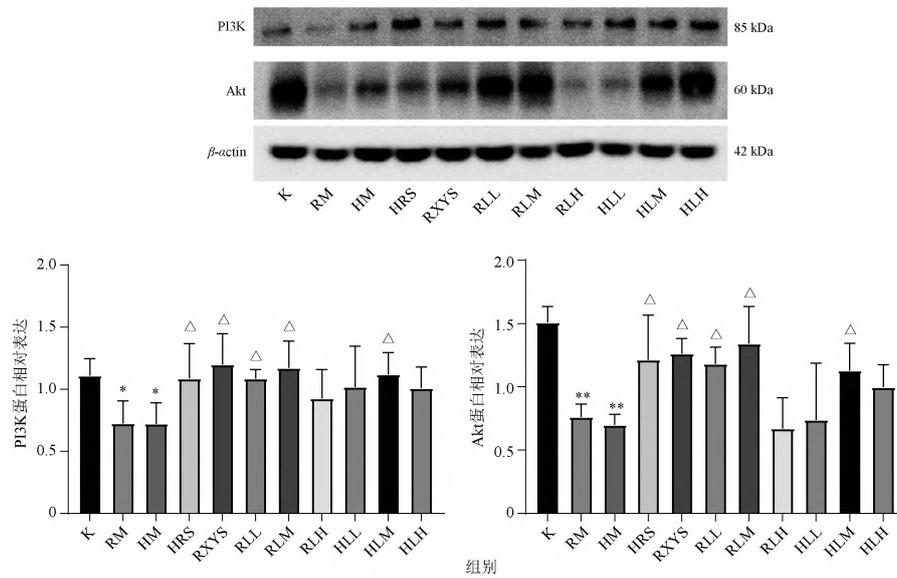


图3 鹿鞭对肾阳虚、肾阴虚小鼠肝脏 PI3K、Akt 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 3 Effect of Lubian on expression of PI3K and Akt proteins in the liver of mice with kidney Yang deficiency and kidney Yin deficiency($\bar{x}\pm s, n=3$)

阴虚表现诊断指标,出现躁动不安、大便干结、小便发黄等症状,而在给予鹿鞭后可明显改善其阴虚症状,增加肾阴虚小鼠血清 cGMP 含量,降低 cAMP/cGMP 比值,与凉补药西洋参作用趋势相同;可见鹿鞭对肾阴虚及肾阳虚小鼠均有一定的改善作用,具有“双向适用、条件显性”的平性药特征,与《名医别录》中性平记载相同。鹿鞭作为一种由多种类型成分构成的中药,其不同成分作用于肾阴虚、肾阳虚不同机体状态的纠偏作用可能存在着差异性,如周雪等^[16]对阿萨伊的不同组分进行寒热药性研究时发现其拆分组分与药材本身的药性不尽相同。

其次,力竭游泳实验结果表明,鹿鞭在缓解对肾阴虚、肾阳虚证小鼠阴虚、阳虚证状的同时对肾虚证小鼠的体力有一定增强作用,具有抗疲劳作用。疲劳的产生与机体能源物质的耗竭、代谢产物的堆积、离子紊乱、自由基大量生成密不可分^[17]。结果表明,鹿鞭能够改善机体物质代谢紊乱状态。代谢废物一般指无氧糖酵解产生的乳酸及蛋白分解代谢产生的尿素氮,代谢废物的大量堆积一方面降低肌肉组织的收缩能力,降低机体的运动能力,另一方面通过体液传输激发机体保护机制直接抑制中枢产生疲劳感^[18]。而鹿鞭则可以通过促进乳酸、尿素氮等的代谢、排泄降低对机体运动能力的抑制作用及疲劳

感的产生。

另一方面,糖原作为机体主要的供能物质,通过调节肝糖原以维持血糖平衡,提供机体能量^[19]。肾虚证小鼠在服用鹿鞭后能够增加机体肝糖原的含量,从而保证小鼠能具备较多的能源物质储备,以长时间维持血液中葡萄糖含量的稳定进而保证小鼠在运动中有更加充足的能量供给。

PI3K-Akt 通路能够促进代谢、增殖、细胞存活、生长和血管生成,通过磷酸化多种酶、激酶和转录因子等下游因子,发挥调节细胞功能的作用^[20-23]。研究表明 PI3K-Akt 通路可以通过调节糖原合成的关键蛋白糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK-3 β)以调节机体糖原的储存,促进肝脏糖原的合成^[24]。本实验结果表明,肾阴虚及肾阳虚小鼠肝脏 PI3K 和 Akt 的蛋白表达量明显下降,肝糖原储量明显低于正常小鼠,而鹿鞭可明显增加肾阴虚及肾阳虚小鼠肝脏 PI3K 和 Akt 蛋白表达,明显提高肝糖原含量。这就表明,鹿鞭可通过调节 PI3K-Akt 通路促进肝糖原的合成积累以增强肾阴虚、肾阳虚小鼠的体力。

本实验发现鹿鞭高剂量组小鼠状态较差,且部分指标效果比中、低剂量组差,分析原因可能由于鹿鞭为原粉入药,用增稠剂羧甲基纤维素钠配制高剂

量鹿鞭的液体较黏稠,长期灌胃对小鼠正常进食和消化产生一定影响,从而影响小鼠状态及相关药效指标,在后续的研究中会根据本批实验进一步优化实验剂量。

综上,鹿鞭具有平性药物的特点,具有“双向适用、条件显性”作用^[25],与菟丝子相似,虽归为补阳药,但其性平,平补阴阳,可作为阴阳双向调补之良药^[26]。既可以缓解肾阳虚小鼠的虚寒证症状,亦可以缓解肾阴虚小鼠的虚热证症状。可以通过提高机体对运动代谢产物的代谢水平、调节 PI3K-Akt 通路增加小鼠能源物质的储存量以增强肾阴虚及肾阳虚小鼠体力。PI3K、Akt 作为细胞内多种生物反应调节的关键蛋白,除调节糖原合成外,还可以通过影响过氧化物酶体增殖物激活受体-氧共激活因子 1 α (PPAR- γ coactivator 1 α , PGC1 α) 促进线粒体功能和生物合成,提高骨骼肌抗氧化能力,以提高肌肉运动的耐力水平^[27];通过激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 促进细胞生长及蛋白合成^[28-29]等,这些均与增强体力、缓解体力疲劳有一定联系,未来可进行深入研究。

[参考文献]

- [1] 郭岚,王平. 中华传统养生九大学术流派探析[J]. 中国中医基础医学杂志, 2013,19(6):699.
- [2] 王林元. 外来中药的发展及在中药学科建设中的地位和作用[J]. 北京中医药大学学报, 2022,45(10):1005.
- [3] 王林元,王淳,张建军,等. 辨证保健理论体系的构建[J]. 中华中医药杂志, 2022,37(9):4993.
- [4] 康樱樱,周婷婷,王春驰,等. 梅花鹿鞭提取物抗疲劳作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2020,27(5):694.
- [5] 王海璐,张晶,殷涌光. 鹿鞭的化学成分及药理活性研究现状[J]. 经济动物学报, 2016,20(1):54.
- [6] 王海璐,王全凯,张晶,等. 花鹿鞭和马鹿鞭抗疲劳作用的研究[J]. 食品科技, 2017,42(4):62.
- [7] 李继海,籍保平,赵兴杰. 鹿鞭酒的研制及功能和安全性评价研究[J]. 食品科学, 2005,26(1):231.
- [8] 宋彦显,闵玉涛,彭聪,等. 淫羊藿黄酮对大鼠血清内源睾酮水平的影响[J]. 中州大学学报, 2022,39(3):120.
- [9] 刘宏民,吴洁洁,陈欢,等. 基于 InsR/PI3K/Akt 通路研究岩黄连总碱纠正高脂喂养小鼠糖代谢紊乱的作用机制[J]. 中草药, 2022,53(12):3687.
- [10] 侯燕,王林元,乐娜,等. 霍山石斛不同提取物对肾阴虚证、肾阳虚证小鼠抗疲劳作用及物质基础研究[J]. 中华中医药杂志, 2021,36(2):1039.
- [11] 费文婷,王子晨,王玉杰,等. 玛咖对虚寒及虚热证大鼠环核苷酸及下丘脑-垂体-甲状腺轴水平的影响[J]. 中华中医药杂志, 2019,34(1):364.
- [12] 乐娜,周雪,费文婷,等. 玛咖对虚寒及虚热证大鼠环核苷

酸水平及神经-内分泌-免疫网络的影响[J]. 中国中药杂志, 2020,45(5):1004.

- [13] GUAN W, LIU Y, LI X, et al. iTRAQ-based proteomics to reveal the mechanism of hypothalamus in kidney-yin deficiency rats induced by levothyroxine [J]. Evid Based Complement Alter Med, 2019,2019:3703596.
- [14] WANG X, DU Y, WU C, et al. UHPLC-MS/MS analysis of cAMP and cGMP in rat plasma as potential biomarkers of Yin-Yang disharmony in traditional Chinese medicine [J]. J Pharm Anal, 2021,11(4):458.
- [15] 周晓宇,赵海军,马柯,等. 虚寒证和虚热证模型的建立及其分子机制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2021,39(9):133.
- [16] 周雪,乐娜,张烁,等. 阿萨伊油、醇提及水提物对虚热及虚寒小鼠温度趋向性及代谢水平的影响[J]. 中国中药杂志, 2020,45(5):991.
- [17] FILIPPI M, KRAHENMANN R, FISSLER P. The link between energy-related sensations and metabolism: implications for treating fatigue [J]. Front Psychol, 2022,13:920556.
- [18] 张海信. 浅谈运动性疲劳之代谢产物堆积学说[J]. 科技信息, 2009(3):558.
- [19] 蒋彤,王亚雯,李裕倩,等. 苦荞低聚肽体外抗氧化活性及其对运动小鼠自由基代谢与疲劳恢复的影响[J]. 营养学报, 2022,44(1):79.
- [20] 张建业,李婧雯,张丽红,等. PI3K/Akt 信号通路及缺血性脑卒中的关系及中药干预的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022,28(22):265.
- [21] 马晓宇,刁浩然,乔会林,等. 芳香新塔花总黄酮调控 PI3K/Akt/mTOR 通路改善动脉粥样硬化的作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2023,48(2):465.
- [22] 刘超萍,李姣. 定坤丹对宫腔粘连大鼠血管生成及 PI3K/AKT/mTOR 通路的影响研究[J]. 世界中医药, 2022,17(18):2569.
- [23] 李中辉,董旺,陈敏,等. 大黄素下调 ILK/PI3K/Akt 信号通路抑制结肠癌 CACO-2 细胞增殖的机制研究[J]. 今日药学, 2020,30(2):116.
- [24] 代紫阳,董玉山,李继安,等. 施墨墨对药配方对 2 型糖尿病大鼠肝脏胰岛素抵抗及 PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路的影响[J]. 山东医药, 2020,60(14):35.
- [25] 汤如莹,张建军,赵子楠,等. 灵芝孢子粉性平偏温的中药药性研究[J]. 中华中医药杂志, 2020,35(3):1181.
- [26] 孙锡高. 菟丝子在治疗糖尿病中的应用[J]. 吉林中医药, 1997(4):33.
- [27] 高玮男. 人参皂苷 Rb₁ 激活 PI3K/AKT/PGC1 α 信号通路提高小鼠骨骼肌运动耐力的研究[D]. 长春:吉林大学, 2022.
- [28] 朱丽娟,罗建云,宋润泽,等. 当归挥发油通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路影响人结肠癌 LOVO 细胞自噬研究[J]. 中国现代应用药学, 2022,39(4):437.
- [29] 梁伟,孙禹,陈丽新,等. 消瘿丸基于 PI3K/Akt/mTORC1 通路对实验性甲状腺肿大鼠的干预机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022,28(8):30.

[责任编辑 马超一]