

椰岛牌鹿龟酒对小鼠补肾壮阳作用实验研究

高雨^{1*} 展学孔² 卓书洪¹ 张翠侠² 肖礼勇²

1 海南药物研究所有限责任公司 2 海南椰岛酒业发展有限公司

DOI:10.12238/fcmr.v3i1.4614

[摘要] [目的]观察椰岛牌鹿龟酒的补肾壮阳作用,为其后续产品研发提供理论依据。[方法]观察椰岛牌鹿龟酒对肾阳虚小鼠模型体重、自主活动次数、交配能力、脏器系数的影响,对去势小鼠阴茎勃起功能及脏器系数的影响,对中老年小鼠附性器官重量及精子活力的影响。[结果]椰岛牌鹿龟酒在一定程度上能增加氢化可的松诱导的肾阳虚小鼠体重和自主活动次数,使附睾、脾脏、胸腺的脏器系数上升,可显著缩短小鼠的捕捉潜伏期,增加射精次数,与模型对照组比较差异性显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);椰岛牌鹿龟酒中、高剂量组可延长去势小鼠的勃起持续时间,缩短勃起潜伏期,高剂量组可提高小鼠的胸腺脏器系数,与模型组比较差异性显著($P < 0.05$);椰岛牌鹿龟酒对中老年小鼠的精子活率亦有增加,免疫系统影响以增强脾脏免疫功能为主($P < 0.05$)。[结论]椰岛牌鹿龟酒多方面作用于机体,有一定的补肾壮阳作用。

[关键词] 鹿龟酒; 肾阳虚; 补肾壮阳

中图分类号: R657.6 **文献标识码:** A

Experimental Study on the Effect of Yedao Lugui Wine on Tonifying Kidney and Strengthening Yang in Mice

Yu Gao^{1*} Xuekong Zhan² Shuhong Zhuo¹ Cuixia Zhang² Liyong Xiao²

1 Hainan Institute of Medicine Co., Ltd

2 Hainan Coconut Island Wine Industry Development Co., Ltd

[Abstract] [Objective] To observe the effect of Yedao Lugui wine on tonifying kidney and strengthening yang and provide theoretical basis for its follow-up product research and development. [Methods] To observe the effects of Yedao Lugui wine on the weight, number of independent activities, mating ability and organ coefficient of kidney yang deficiency mouse model, the penis bulging function and organ coefficient of castrated mice, and the weight of accessory organs and sperm motility of middle-aged and elderly mice. [Results] To a certain extent, Yedao Lugui wine can increase the weight and the number of autonomous activities of mice with kidney yang deficiency induced by hydrocortisone, increase the organ coefficient of epididymis, spleen and thymus, significantly shorten the capture latency and increase the number of ejaculation, which is significantly different from the model control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The medium and high dose groups of Yedao Lugui wine could prolong the duration of erection and shorten the latency of erection in ovariectomized mice. The high dose group could increase the thymus organ coefficient of mice, which was significantly different from the model group ($P < 0.05$). Yedao Lugui wine also increased the sperm viability of middle-aged and elderly mice, and the immune system was mainly affected by enhancing the immune function of spleen ($P < 0.05$). [Conclusion] Yedao Lugui wine has many effects on the body and has a certain effect of tonifying the kidney and strengthening yang.

[Key words] lugui wine; kidney yang deficiency; tonifying the kidney and strengthening yang

椰岛牌鹿龟酒是由鹿茸、鹿骨胶、龟板胶、黄精、党参等为主要原料制成的保健酒,具有抗疲劳、免疫调节的作用。经长期上市销售多数男性消费者反馈出现夜尿减少、基础代谢加大、性功能提升、免疫力增强等现象。因此,通过

建立相关疾病模型,多方面考察本品补肾壮阳的作用;

1 实验材料

1.1 仪器: TLS-1C小动物活动记录仪(济南益延科技发展有限公司)、UX6200H电子天平(岛津公司)、BSA124S-CW电子

天平(赛多利斯)、日本尼康病理显微镜(日本尼康)、YLS-9A生理、药理电刺激仪(济南益延科技发展有限公司)。

1.2 药品与试剂: 椰岛牌鹿龟酒(海南椰岛酒业发展有限公司提供,批号: 20210714),基酒(酒精浓度为50.5%(v/v),

加入适量纯化水调节酒精浓度为15%(v/v), 所得溶液作为鹿龟酒浓缩液的溶剂及基酒对照给药), 氢化可的松注射液(山西省芮城县红宝兽药有限责任公司, 批准文号: 兽药字(2016)040101269, 批号: 20210122), 黄体酮注射液(上海全宇生物科技(驻马店)动物药业有限公司, 批准文号: 兽药字163231439, 批号: 210304), 注射用青霉素钾(江西鸿图动物药业有限公司, 批准文号: 兽药字140021254, 批号: 21210405), 任氏液(飞净生物科技有限公司, 批号: 20210608)

1.3动物:SPF级昆明种小鼠, 由海南药物研究所有限责任公司提供。实验动物生产许可证号SCXK(琼)2020-0007。

2 方法

2.1对肾虚小鼠模型交配能力的影响。

2.1.1对肾虚小鼠自主活动次数与体重增长的影响 取健康成年雄性小鼠60只, 25~35g, 随机分成6组, 分别为模型对照组、空白对照组、基酒对照组、鹿龟酒低(0.2mL/kg)、中(0.4mL/kg)、高(0.8mL/kg)剂量组, 每组各10只。模型对照组与假手术组(空白对照组)均灌胃给予纯化水(0.4 mL/kgBW), 基酒对照组灌胃给予酒精浓度为15%(v/v)的基酒溶液(0.4 mL/kgBW)。分组后开始灌胃, 连续灌胃30d, 从给药第4天开始除空白对照组外, 其余各组均腹腔注射氢化可的松12.5mg/kgBW, 连续注射7d造模, 造模前(给药第4天)及造模后(给药第11天)进行小鼠一般行为学观察并称重。第30天末次给药后1h采用小鼠活动记录仪记录15min内小鼠自主活动次数。

2.1.2对肾虚小鼠模型交配能力的影响: 末次给药后24h, 另取健康成年雌性小鼠60只, 25~35g, 于交配前4h按500 μg/只皮下注射黄体酮。将雄性小鼠单独放入笼中, 适应环境5min, 随后放入1只雌性小鼠观察以下指标并记录: ①扑捉潜伏期: 雌鼠投入后雄鼠第一次扑捉雌鼠的时间; ②扑捉次数: 在20min内雄鼠扑捉雌鼠或爬背的动作次数; ③射精潜伏期: 雄鼠爬背成功后出现舔阴茎的时间; ④射精次数: 20min内雄鼠扑捉雌

表1 椰岛牌鹿龟酒对肾虚小鼠自主活动次数与体重增长的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 (mL/kg)	自主活动次数 (次)	体重(g)	
			造模前	造模后
模型对照组	—	181.00±22.73 ^{△△}	31.42±1.69	30.06±1.50 ^{△△}
基酒对照组	—	195.60±21.05 ^{△△}	31.09±1.20	31.16±1.00 ^{△△}
鹿龟酒低剂量组	0.2	192.40±21.72 ^{△△}	30.61±1.87	31.13±1.36 ^{△△}
鹿龟酒中剂量组	0.4	208.70±20.35*	31.06±1.70	31.55±1.10 ^{*△△}
鹿龟酒高剂量组	0.8	210.60±21.61*	30.91±1.33	31.36±0.81 ^{△△}
空白对照组	—	226.70±20.69**	30.73±1.29	36.43±1.00**

注: 与模型对照组比较, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$; 与空白对照组比较, [△]: $P<0.05$; ^{△△}: $P<0.01$ 。

表2 椰岛牌鹿龟酒对肾虚小鼠模型交配能力的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 (mL/kg)	扑捉		射精	
		潜伏期(min)	次数(次)	潜伏期(min)	次数(次)
模型对照组	—	11.01±1.91 ^{△△}	1.80±0.79 ^{△△}	0.30±0.18 ^{△△}	0.80±0.42 ^{△△}
基酒对照组	—	10.95±1.85 ^{△△}	2.00±1.05 ^{△△}	0.31±0.19 ^{△△}	0.90±0.57 [△]
鹿龟酒低剂量组	0.2	10.10±1.69 ^{△△}	2.20±0.63 ^{△△}	0.32±0.15 ^{△△}	0.90±0.32 [△]
鹿龟酒中剂量组	0.4	9.03±1.25*	2.70±0.82 ^{△△}	0.55±0.18**	1.30±0.48
鹿龟酒高剂量组	0.8	8.61±1.32**	3.00±0.82 ^{△△}	0.51±0.04*	1.40±0.52*
空白对照组	—	7.65±1.19**	4.40±1.08**	0.62±0.22**	1.50±0.53**

注: 与模型对照组比较, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$; 与空白对照组比较, [△]: $P<0.05$; ^{△△}: $P<0.01$ 。

鼠或爬背成功后出现舔阴茎的次数。

2.1.3对肾虚小鼠脏器系数的影响: 交配时间结束后, 处死上述各试验组雄性动物, 酒精消毒腹腔表面并开腹, 摘取附睾、睾丸、胸腺、脾脏称重, 计算脏器系数。

2.2对去势小鼠阴茎勃起功能及脏器系数影响: 取60只健康成年雄性小鼠, 25~35g, 用10%水合氯醛2mL/kgBW腹腔注射麻醉, 固定在手术台上, 用碘酊对小鼠的阴囊皮肤进行消毒处理。其中50只小鼠剪开阴囊分离睾丸, 结扎精管后将睾丸切除, 附睾完整保留, 塞回阴囊内, 缝合后消毒, 放回笼内继续饲养。其余10只小鼠切开阴囊不切除睾丸, 将阴囊切

口缝合作睾丸切除, 作为假手术组(空白对照组)。所有小鼠手术后连续7d肌注青霉素钾2万U/kg预防感染。7d后开始分组给药, 分别为模型对照组、假手术组(空白对照组)、基酒对照组、鹿龟酒低(0.2mL/kgBW)、中(0.4mL/kgBW)、高(0.8mL/kgBW)剂量组, 每组各10只。模型对照组与假手术组(空白对照组)均灌胃给予纯化水(0.4mL/kgBW), 基酒对照组灌胃给予酒精浓度为15%(v/v)的基酒溶液(0.4mL/kgBW)。连续灌胃30d, 末次给药后1h以生理电刺激小鼠阴茎局部, 电流强度为4mA, 观察阴茎勃起潜伏期及持续时间。随后处死动物, 取精液囊-前列腺、胸腺、脾脏称重, 计算脏器系数。

表3 椰岛牌鹿龟酒对肾阳虚小鼠脏器系数的影响 (mg/g, $\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	剂量 (mL/kg)	脏器系数			
		睾丸	附睾	胸腺	脾脏
模型对照组	—	4.90±0.18 [△]	1.88±0.04 ^{△△}	2.00±0.14 ^{△△}	2.16±0.06 ^{△△}
基酒对照组	—	4.95±0.29	1.96±0.18	2.08±0.08 [△]	2.19±0.08 [△]
鹿龟酒低剂量组	0.2	5.03±0.10	1.98±0.09	2.08±0.11 [△]	2.23±0.12
鹿龟酒中剂量组	0.4	5.09±0.10	2.02±0.09 ^{**}	2.12±0.09	2.27±0.11 [*]
鹿龟酒高剂量组	0.8	5.06±0.07	2.00±0.08 [*]	2.12±0.10 [*]	2.27±0.07 [*]
空白对照组	—	5.19±0.19 [*]	2.07±0.09 ^{**}	2.21±0.11 ^{**}	2.30±0.07 ^{**}

注: 与模型对照组比较, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$; 与空白对照组比较, [△]: $P<0.05$, ^{△△}: $P<0.01$ 。

表4 椰岛牌鹿龟酒对去势小鼠阴茎勃起功能及脏器系数影响 ($\bar{x} \pm s$, n=10)

分组	脏器系数 (mg/g)			勃起功能	
	精液囊-前列腺	胸腺	脾脏	勃起潜伏期 (s)	持续时间 (s)
模型对照组	0.65±0.08 ^{△△}	2.19±0.09 ^{△△}	2.27±0.10 ^{△△}	65.70±7.06 ^{△△}	3.30±0.82 ^{△△}
基酒对照组	0.70±0.07 ^{△△}	2.26±0.07	2.31±0.08 ^{△△}	62.10±7.08 ^{△△}	3.50±0.71 ^{△△}
鹿龟酒低剂量组	0.76±0.06 ^{**△△}	2.27±0.12	2.30±0.09 ^{△△}	60.10±7.51 ^{△△}	3.60±0.70 ^{△△}
鹿龟酒中剂量组	0.82±0.08 ^{**△△}	2.30±0.11	2.31±0.08 ^{△△}	56.70±7.89 ^{**△△}	4.30±0.95 ^{**△△}
鹿龟酒高剂量组	0.80±0.08 ^{**△△}	2.34±0.18 [*]	2.37±0.20	57.10±7.36 ^{**△△}	4.40±0.84 ^{**△△}
假手术组	5.90±0.78 ^{**}	2.38±0.09 ^{**}	2.53±0.08 ^{**}	23.50±3.69 ^{**}	6.30±0.95 ^{**}

注: 与模型对照组比较, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$; 与假手术组 (空白对照组) 比较, [△]: $P<0.05$, ^{△△}: $P<0.01$ 。

表5 椰岛牌鹿龟酒对中老年小鼠附性器官重量及精子活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	精子活率 (%)	脏器系数 (mg/g)			
		睾丸	附睾	胸腺	脾脏
老年对照组	36.00±4.00 ^{△△}	4.62±0.27 ^{△△}	2.02±0.06 ^{△△}	1.73±0.11 ^{△△}	2.19±0.13 ^{△△}
基酒对照组	35.20±4.15 ^{△△}	4.78±0.31 [△]	2.06±0.08 [△]	1.79±0.17 ^{△△}	2.25±0.11 [△]
鹿龟酒低剂量组	38.75±3.75 ^{△△}	4.78±0.27 [△]	2.08±0.06	1.79±0.04 ^{△△}	2.26±0.11 [△]
鹿龟酒中剂量组	41.50±3.16 ^{△△}	4.93±0.25 [*]	2.13±0.08 [*]	1.82±0.05 ^{△△}	2.31±0.07 [*]
鹿龟酒高剂量组	40.80±3.79 ^{△△}	4.89±0.23	2.11±0.10	1.81±0.05 ^{△△}	2.32±0.10 [*]
青年对照组	89.10±4.94 ^{**}	5.10±0.10 ^{**}	2.16±0.12 ^{**}	2.15±0.09 ^{**}	2.38±0.05 ^{**}

注: 与老年对照组比较, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$; 与青年对照组比较, [△]: $P<0.05$, ^{△△}: $P<0.01$ 。

2.3对中老年小鼠附性器官重量及精子活力的影响: 取中老年小鼠50只, 6~12月龄, 随机分成5组, 分别为老年

对照组、基酒对照组、鹿龟酒低 (0.2mL/kgBW)、中 (0.4mL/kgBW)、高 (0.8mL/kgBW) 剂量组, 另取10只青年小鼠6~8周龄, 25

~30g, 作为青年小鼠对照组, 每组各10只。老年对照组与青年对照组均灌胃给予纯化水 (0.4mL/kgBW), 基酒对照组灌胃给予酒精浓度为15% (v/v) 的基酒溶液 (0.4mL/kgBW)。连续灌胃30d, 于末次给药后1h处死动物, 取附睾、睾丸、胸腺、脾脏称重, 计算脏器系数。随后立即取左侧附睾, 置于盛有任世液的培养皿中剪碎, 用镊子夹住组织反复洗涤, 使精子游离出来, 盖上平皿置于37±1℃生化培养箱内孵育15min, 即为附睾精子悬液。吸取一滴精子悬液滴于载玻片上, 立即置正置显微镜下观察, 计数200个精子, 计数其中的活精子, 计算精子活率。

2.4统计方法: 采用SPSS20.0统计软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异采用方差分析, 以 $P<0.05$ 为具有统计学意义。

3 结果

3.1对肾阳虚小鼠自主活动次数与体质量增长的影响。与空白对照组比较, 鹿龟酒各剂量组小鼠造模后体重偏低, 模型对照组小鼠活动次数明显减少, 造模后体重增长缓慢且偏低, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。与模型对照组比较, 鹿龟酒中、高剂量组能提高小鼠的自主活动次数 ($P<0.05$), 其中, 鹿龟酒中剂量组对增加小鼠体质量有显著性差异 ($P<0.05$)。结果见表1。

3.2对肾阳虚小鼠模型交配能力的影响。结果显示, 与模型对照组比较, 鹿龟酒中、高剂量的扑捉潜伏期明显缩短 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)、射精潜伏期明显延长 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 差异有显著性。其中, 鹿龟酒高剂量对提高小鼠的扑捉次数和射精次数有统计学意义 ($P<0.05$); 鹿龟酒低剂量无显著性差异 ($P>0.05$); 结果见表2。

3.3对肾阳虚小鼠脏器系数的影响。结果显示, 与空白对照组比较, 模型对照组小鼠附睾、睾丸、胸腺、脾脏的脏器系数均明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型对照组比较, 鹿龟酒中剂量组能显著增加小鼠的附睾脏器系数 ($P<0.01$); 鹿龟酒高剂量组小鼠的附睾、胸腺系数以及鹿龟酒中、高剂量组小鼠的脾脏系

数均偏高($P<0.05$)。结果见表3。

3.4对去势小鼠阴茎勃起功能及脏器系数影响。结果显示,与模型对照组比较,鹿龟酒低、中、高剂量的精液囊-前列腺脏器系数有显著提高的效果($P<0.05$ 或 $P<0.01$),但与空白对照组相比,该指标仍无法恢复正常。鹿龟酒高剂量胸腺显著性提高($P<0.05$),鹿龟酒中、高剂量组的勃起潜伏期均明显缩短、勃起时间均明显延长($P<0.05$)。结果见表4。

3.5对中老年小鼠附性器官重量及精子活力的影响。结果显示,与青年对照组比较,老年对照组的脏器系数和精子活率明显低于青年对照组($P<0.01$);与模型对照组比较,鹿龟酒中、高剂量下的精子活率和脾脏系数有统计学意义($P<0.05$);鹿龟酒中剂量睾丸、附睾系数有显著性提升($P<0.05$),胸腺无显著性($P>0.05$)。结果见表5。

4 讨论

通过注射氢化可的松建立肾虚小鼠模型^[1]试验,实验结果表明,椰岛牌鹿龟酒在一定程度上对阳虚症状所引发的小鼠自主活动次数减少、附睾和脾脏脏器系数降低、扑捉潜伏期延长和射精潜伏期缩短有一定的缓解作用。在鹿龟酒高剂量的条件下,均对阳虚症状所引发的小鼠胸腺脏器系数降低、射精次数减少有一定的抑制作用。小鼠的交配能力从小鼠的扑捉次数和交配次数表现出来,本实验中通过雌激素诱导的发情期雌鼠^[2]和肾虚小鼠模型交配考察椰岛牌鹿龟酒壮阳作用。交配实验结果表明,椰岛牌鹿龟酒在一定程度上能提高其交

配能力的作用,主要表现为合笼后缩短扑捉雌鼠的潜伏期,并且延长射精潜伏期,20min内扑捉雌鼠的次数及射精次数明显增加,从一定意义上有提高小鼠的交配能力与预防早泄功能的作用。

性腺和性器官的发育与成熟是维持男性第二性征和性功能正常的重要因素,睾丸除产生精子之外,还兼有分泌性激素的功能,有助于附性器官的发育、生殖。当性腺组织萎缩或重量减轻,那么由性腺所分泌的激素则相应减少,从而导致性功能的异常^[3]。通过对雄性成年小鼠去势实验,可明显观察到椰岛牌鹿龟酒对勃起潜伏期的影响,从而判断其补肾壮阳的作用。椰岛牌鹿龟酒在高剂量的条件下,对去势小鼠胸腺的脏器系数有一定程度的提高作用。在鹿龟酒中、高剂量的条件下,对其勃起潜伏期也有缩短的作用,同时可延长其起勃持续时间。但对其精液囊-前列腺、脾脏的脏器系数均未见明显提高作用。

人类的衰老与性腺的结构和功能的退化有密切的关系,睾丸是合成雄激素和产生精子的主要器官,随着年龄增长,睾丸组织会出现退行性变化,到老年期则更进一步出现结构萎缩和功能退化^[4]。根据实验结果提示,椰岛牌鹿龟酒在中、高剂量的条件下,对性腺内分泌有一定的促进作用,对精子存活率亦有一定的提升功效,同时对小鼠脾脏脏器系数的改善作用较佳,表明其对中老年小鼠的免疫系统影响具有一定的选择性,主要以增强脾脏免疫功能为主,对胸腺无明显影响。

综上所述,椰岛牌鹿龟酒对机体的

综合改善作用较强,发挥补肾壮阳的药效学作用,为后续产品研发、保健功效确认提供了实验依据。

[参考文献]

[1]张子怡,陈宝军,张庆,等.肾虚证动物模型的造模方法与评价指标[J].福建中医药,2014,045(002):61-63.

[2]阮氏锦秀,廖遥灵,罗俊.方刺参酒补肾壮阳作用的实验研究[J].广西中医药大学学报,2016,19(4):5-8.

[3]赵鹏.“壮阳促孕散”补肾壮阳作用的研究[J].动物医学进展,2008,29(6):62-65.

[4]辛钟成,刘武江,田龙,等.老年人睾丸组织退化的基因表达谱研究[J].北京大学学报(医学版),2003,(04):364-368.

作者简介:

高雨(1990--),女,汉族,海南人,本科,助理工程师,研究方向:药理;从事工作:药理学。

展学孔(1977--),男,汉族,甘肃人,硕士研究生,高级工程师,研究方向:中药及复方研究与开发;从事工作:中药及药食同源食品的研究与开发。

卓书洪(1987--),女,汉族,海南人,大专,初级,研究方向:药理;从事工作:药理学。

张翠侠(1983--),女,汉族,河南人,硕士研究生,中级工程师,研究方向:保健食品研发;从事工作:保健食品的研究与开发。

肖礼勇(1981--),男,汉族,四川人,硕士研究生,工程师,研究方向:保健酒的研发;从事工作:保健食品研究与开发。