

## · 实验研究 ·

## 补肾健脾活血三类复方对下丘脑—垂体—肾上腺—胸腺轴及 CRF 基因表达的影响\*

钟历勇<sup>1</sup> 沈自尹<sup>2△</sup> 蔡定芳<sup>2△</sup> 郑仲承<sup>3△</sup> 陈晓红<sup>2</sup>

**内容提要** 目的: 为从分子水平来阐明药物对肾阳虚证的主要调节点。方法: 采用逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)化学发光定量法、放射免疫及细胞免疫技术, 观察补肾、健脾、活血三类复方分别对下丘脑—垂体—肾上腺—胸腺(HPAT)轴受抑制模型的下丘脑促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)mRNA 表达、神经内分泌和免疫功能的影响。结果: 唯有补肾药可通过提高下丘脑 CRFmRNA 表达来保护 HPAT 轴免受外源性皮质酮的抑制; 健脾药对免疫系统有直接的促进作用; 而活血药对 HPAT 轴无任何影响。结论: 药物对肾阳虚证的主要调节点定位在下丘脑。

**关键词** 补肾健脾活血 促肾上腺皮质激素释放因子 信使核糖核酸 下丘脑 皮质酮

**Effect of Three Kinds (Tonifying Kidney, Invigorating Spleen, Promoting Blood Circulation) Recipes on the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal-Thymus (HPAT) Axis and CRF Gene Expression** ZHONG Li-yong, SHEN Zi-yin, CAI Ding-fang, et al *Huashan Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai (200040)*

**Objective:** To observe the effect of tonifying Kidney (TK), invigorating Spleen (IS) and promoting blood circulation (PBC) recipes on the hypothalamus-pituitary-adrenal-thymus (HPAT) axis. **Methods:** reverse-transcription polymerase chain reaction, radioimmunoassay and cellular immunity techniques were used to observe the effects of TH, IS, PBC on the neuroendocrine and immune system of this experimental model which HPAT axis was inhibited by corticosterone. **Results:** only TK could avoid the depression of exogenous corticosterone, which by enhancing the expression of CRFmRNA in hypothalamus, and following the improvement of function of HPAT axis, that IS might have direct promotion on immune system, whereas without any effect of PBC on HPAT axis was observed. **Conclusion:** TK, IS and PBC recipes have different effects on HPAT axis.

**Key words** tonifying the Kidney, invigorating the Spleen, promoting blood circulation, Corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid, hypothalamus, corticosterone

自从肾本质研究中发现肾阳虚证具有下丘脑—垂体及其所属三个靶腺轴均有功能紊乱, 并由此推论肾阳虚证的主要发病环节在下丘脑<sup>①</sup>, 但尚未有直接的证据。本实验比较了三类不同复方对皮质酮大鼠下丘脑—垂体—肾上腺—胸腺(HPAT)轴及下丘脑促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)信使核糖核酸(mRNA)表达的影响, 试图从分子水平来阐明药物对肾阳虚证的

主要调节点。

## 材料与方法

1 药物制备 补肾药用右归饮(YG), 组成为附子、肉桂、熟地、山茱萸、山药、枸杞子、仙灵脾(代杜仲)、炙甘草, 用量比例为 2:1:3:2:3:3:3:1; 健脾药用四君子汤(SJ), 组成为党参、白术、茯苓、炙甘草, 按 1:1:1:1 比例组成; 活血药用桃红四物汤(TH), 组成为桃仁、红花、生地、白芍、当归、川芎, 用量比例 1.5:1:3:1.5:

\*国家自然科学基金重点项目(No.39230370)

1. 现在南京铁道医学院(南京 210009); 2. 上海医科大学华山医院; 3. 中国科学院上海生物化学研究所; △导师

1.5:1.5。上述三类复方自行制备,分别水煎醇提,过滤取上清,调药物浓度至200%,高压灭菌,4℃保存备用。

2 动物分组及标本制备 雄性SD大鼠50只,体重230~250g,由上海医科大学动物中心提供,室温(22±1)℃,光照与黑暗时间为每12h更替,随机分为5组,每组各10只,皮质酮(CORT)组为模型组,按10mg/kg皮下注射皮质酮,每天1次,连续14天,同时以蒸馏水代替药物灌胃;三个用药组为皮质酮加右归饮组(YG组)、皮质酮加四君子汤组(SJ组)、皮质酮加桃红四物汤组(TH组),除每天皮下注射皮质酮,同时按10g/kg各组所用药物灌胃;对照组以等体积灭菌豆油代替皮质酮及蒸馏水代替药物灌胃。实验第15天,所有动物快速断头处死,取新鲜下丘脑组织150~200mg抽提总RNA;无菌取脾脏置1640培养液作细胞免疫测定;留取血用4%EDTA抗凝分离血浆,放射免疫法测定促肾上腺皮质激素(ACTH)及CORT含量。

### 3 主要试剂及仪器

3.1 引物及探针的设计合成 CRF引物根据文献<sup>[2]</sup>合成,引物1(5'端引物)、引物2(3'端引物)均来源于外显子2,21mer。寡核苷酸探针依据CRF基因内部序列自行设计<sup>[3]</sup>,30mer。上述引物及探针均由DNA自动合成仪(ABI391A PCRmate EP,USA)合成。

3.2 总RNA抽提试剂及cDNA第一链合成试剂为GIBCOL BRL公司产品;PCR试剂为Promega公司产品;寡核苷酸生物素标记试剂盒为U.S.Bioch.公司产品;随机引物荧光素DNA标记盒、PCR-Light™化学发光定量系统以及链亲合素包被的聚苯乙烯珠均为TROPIX公司产品。仪器用DNA Thermal Cycler为Perkin Elmer公司产品,单光子计数器为Beckman公司产品。

3.3 皮质酮及刀豆蛋白A购自Sigma公司;<sup>3</sup>H-TdR购自中国科学院上海原子核研究所;<sup>125</sup>I-ACTH放射免疫药盒购自Diagnostic Products公司;<sup>3</sup>H-皮质酮放射免疫药盒购自上海市内分泌研究所;CTLL-2依赖细胞株购自上海医科大学肿瘤医院。检测按药盒说明及文献<sup>[4]</sup>。

### 4 下丘脑CRFmRNA的定量测定

4.1 CRFmRNA的RT-PCR扩增 按GIBCOL公司试剂说明书方法作下丘脑总RNA的抽提及第一链cDNA的合成,再分别以生物素和荧光素标记引物1和探针。扩增反应参数为94℃1min、

55℃1min、72℃1min20s,30个循环后,72℃延伸5min。鉴于PCR发光定量系统的高灵敏性,为确保定量检测是在对数增长期内进行,必须确定PCR循环数,制图可见在10~20个循环之间相对发光单位和循环数均呈线性关系,25~30个循环已达平台期,故选择15个循环数为本实验的循环参数,以确保定量检测是在线性范围内进行。取PCR产物于1.2%琼脂糖凝胶电泳,EB染色后,紫外光下可摄得阳性目的条带为720bp,与文献报告一致<sup>[2]</sup>,而未加CR-FcDNA的阴性对照未见此条带,故此720bp条带即为RT-PCR产物。

4.2 RT-PCR产物的定量检测 按TROPIX公司PCR化学发光定量系统说明书操作,用链亲合素包被的聚苯乙烯珠捕获生物素标记的5'端引物所扩增的PCR产物,通过碱变性去掉未标记的3'端引物,然后用一荧光素标记的寡核苷酸探针与之杂交,再采用抗荧光素碱性磷酸酶复合物、CSDD化学发光底物和Sapphire-II™增强剂反应后进行光信号定量测定,这种光信号与PCR产物浓度是成正比的。

5 统计学处理 组间比较采用t检验。

## 结 果

1 三类复方对皮质酮大鼠血浆CORT及ACTH的影响 见表1。模型组在注射大剂量皮质酮14天后,可见血浆CORT及ACTH含量明显下降,与对照组比较, $P<0.01$ ;YG组血浆CORT及ACTH含量均受到保护,而有明显上升,与模型组比较, $P$ 均 $<0.05$ ;SJ组血浆CORT和ACTH有轻微上升,但统计学无明显差异;TH组对血浆CORT及ACTH无影响。

表1 5组大鼠血浆CORT和ACTH含量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别 | 鼠数 | CORT<br>(ng/dl) | ACTH<br>(pg/ml) |
|----|----|-----------------|-----------------|
| 对照 | 10 | 14.60±3.97      | 80.30±48.95     |
| 模型 | 10 | 1.54±0.97*      | 31.30±25.58*    |
| YG | 10 | 2.82±1.22△      | 66.05±23.57△    |
| SJ | 10 | 2.05±1.68       | 57.63±50.25     |
| TH | 10 | 1.86±1.61       | 37.41±26.05     |

注:与对照组比较,\* $P<0.01$ ;与模型组比较,△ $P<0.05$

2 三类复方对皮质酮大鼠淋巴细胞增殖反应及白细胞介素-2(IL-2)诱生和活性的影响 见表2。模型组淋巴细胞对ConA的增殖反应和ConA诱生的IL-2水平明显下降,与对照组比较, $P<0.05$ ;YG

组和 SJ 组均可使受抑制的淋巴细胞增殖反应和 IL-2 水平升高, 与模型组比较,  $P$  均  $<0.05$ ; 而 TH 组对受抑的免疫功能无影响。

表 2 5 组大鼠淋巴细胞增殖反应及 IL-2 水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别 | 鼠数 | 淋巴细胞增殖反应<br>(cpm)           | IL-2<br>(u/ml)             |
|----|----|-----------------------------|----------------------------|
| 对照 | 10 | 125613 $\pm$ 44803          | 81.20 $\pm$ 8.90           |
| 模型 | 10 | 86393 $\pm$ 38548*          | 37.47 $\pm$ 5.34*          |
| YG | 10 | 101130 $\pm$ 36334 $\Delta$ | 62.92 $\pm$ 12.89 $\Delta$ |
| SJ | 10 | 151917 $\pm$ 68770 $\Delta$ | 65.21 $\pm$ 10.53 $\Delta$ |
| TH | 10 | 78340 $\pm$ 47687           | 33.82 $\pm$ 9.45           |

注: 与对照组比较, \* $P<0.05$ ; 与模型组比较,  $\Delta P<0.05$

3 三类复方对皮质酮大鼠下丘脑 CRFmRNA 表达的影响 见表 3。模型组 CRFmRNA 无论是单光子计数或产物浓度均受明显抑制, 与对照组比较,  $P<0.01$ ; YG 组能明显提高已受抑制 CRFmRNA 的表达量( $P<0.01$ ); 而 SJ 组和 TH 组对已受抑制的下丘脑 CRFmRNA 表达并无调节作用。

表 3 YG, SJ, TH 对皮质酮大鼠下丘脑 CRF 基因扩增产物浓度的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别 | 鼠数 | 单光子计数<br>( $1 \times 10^6$ ) | 产物浓度<br>(fmole)           |
|----|----|------------------------------|---------------------------|
| 对照 | 10 | 12.4 $\pm$ 5.4               | 52.53 $\pm$ 10.51         |
| 模型 | 10 | 5.5 $\pm$ 0.8*               | 10.51 $\pm$ 0.16*         |
| YG | 10 | 8.7 $\pm$ 1.7 $\Delta$       | 32.41 $\pm$ 0.68 $\Delta$ |
| SJ | 10 | 5.9 $\pm$ 0.7                | 11.39 $\pm$ 0.14          |
| TH | 10 | 5.3 $\pm$ 0.6                | 9.69 $\pm$ 0.11           |

注: 与对照组比较, \* $P<0.01$ ; 与模型组比较,  $\Delta P<0.01$

## 讨 论

1 三类复方对皮质酮大鼠 HPAT 轴的影响 本实验选用皮质酮大鼠模型是因为在肾的研究中表明肾阳虚患者 HPA 轴功能低下, 健康人给以外源性含皮质醇的激素使得血浆皮质醇升高, 可对下丘脑的 CRF 和垂体的 ACTH 呈负反馈调节, 从而抑制自身肾上腺皮质以及胸腺也会造成 HPAT 轴功能低下。对大鼠采用皮质酮比皮质醇更符合其生理, 故以此模拟在 HPAT 轴上的肾阳虚功能状态。在三类药物组中唯有补肾组对 HPAT 轴的受抑制具有全面的保护作用; 健脾组能直接提高细胞免疫功能; 而活血

组则无任何保护作用。说明补肾的调节作用侧重于对神经内分泌系统, 并影响免疫, 而健脾则侧重于对免疫功能的调节, 这和以往的实验结果是相符的<sup>(5)</sup>。

2 关于检测下丘脑 CRFmRNA 表达的方法 近年研究应急状态下的下丘脑 CRFmRNA 表达多采用原位杂交技术, 利用一个与 CRFmRNA 互补的探针, 在标记了同位素、地高辛或生物素后与下丘脑组织切片杂交, 通过光密度扫描能相对地对 CRFmRNA 表达进行半定量分析。至于 Northern 印迹杂交也只有在基因表达量剧增情况下才能检出, 故敏感性低。本实验动物模型属于下丘脑受抑制, 其 CRFmRNA 表达量少, 用上述方法不易测出。1993 年 Louis 和 Fraser 分别改用高灵敏度的 RT-PCR, 成功地从 CRFmRNA 表达极微少的组织, 如胃肠、心脏、脾脏、胸腺、睾丸等检出较弱的 CRFmRNA 表达, 说明 RT-PCR 技术是检测 mRNA 低水平表达的高灵敏手段, 尤其通过新颖的化学发光法, 使得定量结果准确可靠。

3 本研究采用药物验证在三类复方对比中, 证明唯有补肾药能提高下丘脑 CRFmRNA 表达量与 HPAT 轴功能, 说明补肾的右归饮对皮质酮大鼠是直接作用于下丘脑, 使受抑制的 CRFmRNA 表达水平在一定程度上得以恢复, 从而调节了 HPAT 轴的受抑制状态, 从药物验证的角度可以更具体地说肾阳虚证的主要调节点定位在下丘脑。

## 参 考 文 献

1. 沈自尹, 王文健, 陈响中, 等. 肾阳虚证的下丘脑—垂体—甲状腺、性腺、肾上腺皮质轴功能的对比观察. 医学研究通讯 1983; 10: 21—27.
2. Fraser A, Charles V, Clevenger J, et al. Corticotropin-releasing factor mRNA in rat thymus and spleen. Proc Natl. Acad Sci. USA 1993; 90(8): 7104—7108.
3. Hisato J, Noboru M, Hideo T. Cloning and sequence analysis of cDNA for rat corticotropin-releasing factor precursor. FEBS 1985; 191(1): 3025—3028.
4. 蔡定芳, 沈自尹, 张玲娟, 等. 右归饮对皮质酮大鼠细胞免疫和细胞因子的影响. 中国免疫学杂志 1995; 71(4): 248—251.
5. 沈自尹, 胡国让, 许得盛, 等. 补肾和健脾在延缓衰老作用中的对比研究. 中西医结合杂志 1987; 7(10): 584—587.

(收稿: 1996—08—05 修回: 1996—09—01)