

# 金匱肾气丸对肾阳虚大鼠垂体 ACTH 基因表达的影响

郑小伟 包素珍 刘明哲 宋 红 李荣群

**摘要** 目的 探讨金匱肾气丸(简称肾气丸)不同浓度、不同时间对肾阳虚大鼠垂体促肾上腺皮质激素(ACTH)基因表达的影响。方法 造模大鼠随机分成模型组、肾气丸高、中、低剂量组,在喂药后不同时间(10、20、30天),用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测肾气丸对垂体组织 ACTH 基因表达的影响。结果 与模型组比较,肾气丸中、高剂量组大鼠血清 ACTH 水平升高( $P < 0.05$  或  $P > 0.01$ )及垂体组织 ACTH 基因表达明显上调,差异有显著性( $P < 0.05$ );中剂量组与高、低剂量组比较明显增高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结论 肾气丸能上调 ACTH 基因表达可能是其治疗肾阳虚的机理之一。

**关键词** 金匱肾气丸;肾阳虚;大鼠垂体;促肾上腺皮质激素;基因表达

**Effect of Jingui Shenqi Pill on Pituitary Adrenocorticotrophic Hormone Gene Expression in Shen-Yang Deficiency Rats** ZHENG Xiao-wei, BAO Su-zhen, LIU Ming-zhe, et al *Zhejiang College of TCM, Hangzhou (310053)*

**Objective** To explore the effect of Jingui Shenqi pill (JGSQP) with various concentrations at different time points on pituitary adrenocorticotrophic hormone (ACTH) gene expression level in Shen-Yang deficiency rats.

**Methods** The Shen-Yang deficiency rats were randomly divided into the model control group and the high, medium and low dosage of JGSQP groups. Reverse transcriptase polymerase chain reaction was used to observe the effect of JGSQP on the ACTH mRNA of pituitary tissue in rats treated at different time points (10d, 20d, 30d). **Results** As compared with that in the model group, the ACTH gene expression level was significantly higher in the high dose JGSQP group ( $P < 0.05$ ), and the increment in the medium dosage group was significantly higher in comparing with that in the high and low dosage groups ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion** Through up-regulation on ACTH gene expression is possibly one of the mechanisms of JGSQP in treating Shen-Yang deficiency.

**Key words** Jingui Shenqi pill; Shen-Yang deficiency; rats; pituitary; adrenocorticotrophic hormone; gene expression

近年来国内外对肾虚本质和补肾药作用机制的探讨取得了多方面进展,广泛涉及神经、内分泌系统、免疫学和基础代谢等方面。现代研究表明,肾阳虚证具有下丘脑—垂体—肾上腺皮质轴功能紊乱的表现<sup>[1-3]</sup>并累及性腺轴、甲状腺轴。金匱肾气丸(以下简称肾气丸)为温补肾阳之名方,其治疗肾阳虚证,改善垂体—肾上腺皮质功能低下,是否通过调节促肾上腺皮质激素(ACTH)基因表达这一途径?对此我们从分子水平进行研究,为临床诊治提供现代化客观依据。

## 材料与方 法

1 动物 清洁级雄性 SD 大鼠 220 只,体重(270 ± 10g),由上海医学科学院实验动物中心提供。

2 药物 肾气丸由炮附子、肉桂、熟地、山萸肉、山药、茯苓、泽泻、丹皮组成,由本院制剂室按 1:1:8:4:4:3:3:3 加工制成(1.0g/ml)。中药饮片均购自浙江中医学院门诊部中药房,符合 2001 年版中国药典。

3 试剂及仪器 1640 培养液,美国 LIFE TECHNOLOGIES 公司产品;甲状腺素( $T_4$ )、睾酮(T)、皮质醇(F)、促肾上腺皮质激素(ACTH)试剂盒,均为北京北方生物技术研究产品;RT-PCR 试剂盒由上海博彩生物科技有限公司提供。 $\gamma$ 放射免疫计数仪(GC-1200)为安徽中佳光电仪器公司产品;2400 型 PCR 仪,英国 TECHNE 公司产品;UV200D 紫外分光光度计,美国 UNICO 公司产品;White/Ultraviolet Transilluminator 凝胶扫描仪,美国 Gene 公司产品;UR-4100 型酶标仪,美国 Dynatech 公司产品。

## 4 方 法

4.1 分组与给药 将大鼠随机分为 5 组,即正常

基金项目 浙江省自然科学基金资助课题(No. 399020)  
作者单位 浙江中医学院(杭州 310053)  
通讯作者 郑小伟, Tel: 0571-86613609, E-mail: zhongong@163.com

组 模型组, 肾气丸高、中、低剂量组, 每组 44 只。正常组大鼠每日给予 1.5ml 生理盐水灌胃, 每天 1 次, 共 30 天; 其余 4 组按文献<sup>[4]</sup>方法造模, 即给予大鼠腺嘌呤(30mg/100g 与蒸馏水混成悬浮液 1.5ml)灌胃, 每天 1 次, 共 30 天。在造模 30 天结束后, 观察动物体征变化。每组各随机取 8 只大鼠, 检测血清 F、T、T<sub>4</sub>、ACTH, 以观察大鼠造模成功情况。自 31 天起正常组、模型组给予生理盐水灌胃 30 天; 肾气丸高、中、低剂量组分别给予肾气丸 20.3g、13.5g、6.08g/(kg·d), 即相当于成人剂量的 15 倍、10 倍、5 倍, 连续灌胃 30 天。实验大鼠分别于第 10 天、20 天、30 天每组各处死 12 只, 摘眼球取血, 并迅速取出垂体 2 只为 1 个标本, 置于液氮中备用, 进行 RT-PCR 检测。

4.2 ACTH mRNA 的表达

4.2.1 引物设计 根据大鼠的 ACTH 的基因序列设计和合成一对寡核苷酸引物(由上海博彩生物科技有限公司合成)。

上游引物序列为 5'-GGGCAAGCGCTCCTACTCC-3',

下游引物序列为 5'-GGGGCGTCTGGCTCTTCTC-3', 长度 300bp。

4.2.2 垂体组织 RNA 提取 用异硫氰酸胍酸-氯仿一步提取法提取垂体组织总 RNA。所提取总 RNA 经电泳鉴定并在紫外分光光度计 260-280nm 处测定 OD 值, 计算出 RNA 浓度。

4.2.3 逆转录聚合酶链(RT-PCR)反应 按 RT-PCR 试剂盒中方法操作, 设 β 肌动蛋白的基因(β-actin)为内参基因。

4.2.4 PCR 扩增产物分析 PCR 产物电泳完毕后在凝胶扫描仪上观察结果, 用目的基因光密度值与 β-actin 光密度值的比值进行半定量分析, 得出结果。

5 统计学方法 采用统计软件包 SPSS 10.0 版统计, 采用 t 检验。

结 果

1 肾阳虚证造模情况 模型组动物造模 30 天内相继出现畏寒肢冷, 精神萎顿, 多尿, 体毛干枯不齐、稀疏、脱落现象, 反应迟钝, 少动闭眼, 尾部苍白等症状。1 个月后, 模型组大鼠血清 T<sub>4</sub>、F、T、ACTH 含量均明显下降, 与正常组大鼠比较差异有显著性(P<0.01, 见表 1)表明肾阳虚证造模成立。

2 各组大鼠不同时间血清 ACTH 测定结果 见表 2。模型组 ACTH 水平降低。肾气丸各剂量组用药 10 天后, ACTH 水平呈增高趋势; 用药 20 天时, 中剂

表 1 腺嘌呤对大鼠 T<sub>4</sub>、F、T 和 ACTH 的影响 (μg/L,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	T <sub>4</sub>	F	T	ACTH
正常	8	34.88±5.01	26.92±8.04	0.66±0.18	25.10±2.51
模型	8	24.62±3.96*	13.16±1.50*	0.32±0.12*	19.63±1.48*

注: 与正常组比较, \*P<0.01

量组 ACTH 水平增高明显, 与模型组比较差异有显著性(P<0.05); 用药 30 天时, 中、高剂量组 ACTH 水平升高, 与模型组比较, 差异有显著性(P<0.05 或 P<0.01); 高、低剂量组与中剂量组比较差异有显著性(P<0.05)。

表 2 各组大鼠不同时间血清 ACTH 测定结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	ACTH (nmol/g)		
		10d	20d	30d
正常	6	24.51±3.48	24.20±2.58	25.27±1.80
模型	6	18.49±1.66	18.59±2.62	19.12±1.35
肾气丸高剂量	6	19.40±1.73	20.00±1.98	21.39±1.41*△
中剂量	6	19.55±1.15	21.40±2.06*	23.53±1.77**
低剂量	6	19.49±2.23	19.24±2.12	20.15±2.09△

注: 与模型组比较, \*P<0.05, \*\*P<0.01; 与肾气丸中剂量组比较, △P<0.05

3 肾气丸对 ACTH mRNA 表达的影响 见图 1-3。用药 10 天时, 肾气丸各剂量组电泳色带强度无明显差异; 用药 20 天时, 正常组电泳色带明显比模型组增强, 模型组电泳色带最暗, 其次为肾气丸低剂量

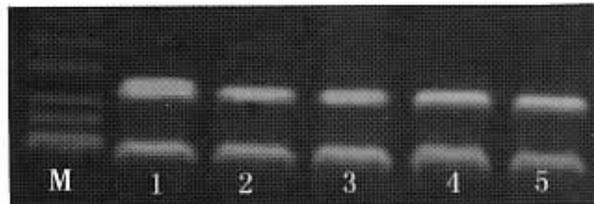


图 1 用药 10 天时各组 ACTH mRNA 表达

注: M 为 DNA Marker; 1 正常组; 2 模型组; 3 肾气丸高剂量组; 4 肾气丸中剂量组; 5 肾气丸低剂量组(下图同)



图 2 用药 20 天时各组 ACTH mRNA 表达

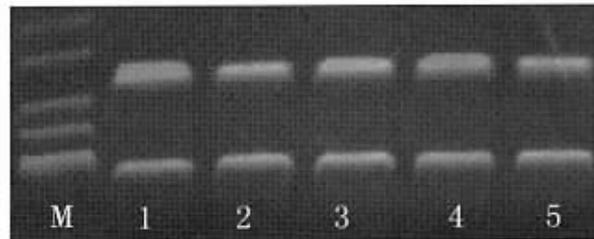


图 3 用药 30 天时各组 ACTH mRNA 表达

组、高剂量组、中剂量组;30 天时,各组电泳色带趋势同前,强度达到最明显。说明肾气丸可以增强 ACTH mRNA 的表达,并与浓度有关系。在不同的时间,基因表达不同,随时间延长,电泳色带比同组增强。

4 各组大鼠垂体 ACTH/ $\beta$ -actin 光密度值比较见表 3。灰度测量分析结果表明,10 天时肾气丸高、中、低剂量组 ACTH mRNA 的表达量与模型组比较差异无显著性;20 天时肾气丸中剂量组与模型组比较差异有显著性( $P < 0.05$ );30 天时肾气丸高、中剂量组比模型组显著升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),且中剂量组比高、低剂量组 ACTH mRNA 的表达量明显( $P < 0.05$ )。

表 3 各组大鼠垂体 ACTH/ $\beta$ -actin 光密度值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	ACTH/ $\beta$ -actin		
		10d	20d	30d
正常	6	1.81 $\pm$ 0.08	1.81 $\pm$ 0.10	1.83 $\pm$ 0.10
模型	6	0.84 $\pm$ 0.08	0.89 $\pm$ 0.09	0.93 $\pm$ 0.12
肾气丸高剂量	6	0.92 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.08	1.06 $\pm$ 0.11* $\Delta$
中剂量	6	0.94 $\pm$ 0.09	1.04 $\pm$ 0.11*	1.22 $\pm$ 0.09**
低剂量	6	0.87 $\pm$ 0.09	0.94 $\pm$ 0.11	1.05 $\pm$ 0.08 $\Delta$

注:与模型组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与肾气丸中剂量组比较, $\Delta P < 0.05$

### 讨 论

生理条件下,在下丘脑—垂体—肾上腺皮质轴中,肾上腺皮质束状带、网状带产生皮质醇、雄激素及少量雌激素。这两个带主要由 ACTH 调节<sup>[5]</sup>。本实验显示肾阳虚大鼠 T<sub>4</sub>、F、T、ACTH 较正常大鼠明显降低。经用肾气丸治疗后大鼠阳虚症状减轻的同时各组血清 ACTH 水平均明显改善。由此可知,ACTH mRNA 表达量的多少可直接影响到肾上腺皮质类固醇激素的分泌量。

本实验用药 10 天时肾气丸各剂量组与模型组在多项指标测定结果比较时,两者之间差异无统计学意义。可能由于药物作用时间短暂,影响不明显,也存在由于肾上腺皮质功能严重低下,引起机体自身的代偿性增强,而使实验结果对比不明显。在用药 20、30 天时,血清 ACTH 水平有了明显的升高。推测这可能与中药调控了 ACTH 的基因表达有关。在观察了肾气丸对 ACTH mRNA 的基因表达影响中,肾阳虚大鼠 ACTH 升高的同时伴有 ACTH mRNA 水平升高,说明肾气丸有改善 ACTH 的功能,进而影响肾上腺皮质激素分泌。

本研究表明,虽然肾气丸各剂量均有上调 ACTH 万方数据

mRNA 表达的作用,而以肾气丸中剂量最佳。高剂量时,可能由于药物浓度太高,药液黏稠,影响机体的吸收功能,且方中熟地味甘而腻,高剂量服用,有碍消化,亦影响药效。再有肾气丸存在着双相调节作用,当肾气丸浓度过高时,可能引起某种拮抗作用,而使药效受影响,低剂量时,可能药物浓度过低,致药效不显。在不同的时间段,肾气丸对血清 ACTH 水平、ACTH 基因表达的影响又各不相同,但总的实验结果显示,随着用药时间的延长,基因表达更加明显。从而可推测在临床用药时足疗程为佳。本研究表明,肾气丸通过增高 ACTH mRNA 的表达,进而增高 ACTH 的含量,这可能是其治疗肾阳虚的作用机制之一。肾气丸对中枢如下丘脑是否有调节作用,是否还通过其他途径进行调节,调节机制如何,有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- 1 魏美娟,俞瑾.补肾中药对雄激素致不孕大鼠肾上腺皮质形态学观察.中国中西医结合杂志 1994;14(12):736—738.  
Wei MJ, Yu J. Effect of kidney tonifying herbs on morphological changes of adrenal cortex androgen-sterilized rats. Chin J Integr Tradit West Med 1994;14(12):736—738.
- 2 马正立,施玉华,汪丽亚,等.填精补肾中药对老年大鼠肾上腺皮质、睾丸的一些脱氢酶的作用.上海中医药杂志 1995;(3):43—46.  
Ma ZL, Shi YH, Wang LY, et al. Effect of essence and Shen tonifying herbs on adrenal cortex and testicular dehydrogenation enzyme in aged rats. Shanghai J TCM 1995;(3):43—46.
- 3 沈自尹.对中医基础理论研究的思路.中国中西医结合杂志 1997;17(11):643—645.  
Shen ZY. The train of thought in the research of basic theory of traditional Chinese medicine. Chin J Integr Tradit West Med 1997;17(11):643—645.
- 4 岳广平,陈琼,戴宁.补肾生精汤对肾阳虚睾丸功能损害大鼠模型作用的实验研究.中国中西医结合杂志 1997;17(5):289—292.  
Yue GP, Chen Q, Dai N. Experimental study on effect of Bushen Shengjing decoction on Shen- yang Deficiency and testicular dysfunction in rats. Chin J Integr Tradit West Med 1997;17(5):289—292.
- 5 史轶繁,王垣,吴从原,等.协和内分泌和代谢学.北京:科学出版社,1999:1110.  
Shi YF, Wang Y, Wu CY, et al. Xiehe endocrinology and metabolism. Beijing: Publishing House of Science, 1999:1110.

(收稿 2002-12-23 修回 2003-11-28)