

金匱肾气丸对肾阳虚小鼠睾丸组织端粒酶活性的促进作用

许翠萍¹ 朱庆均² 宋 洁³ 李 震² 张 丹²

摘要 目的 探讨金匱肾气丸对肾阳虚小鼠睾丸组织端粒酶活性的影响。**方法** 以“劳倦过度,房事不节”制备肾阳虚小鼠模型,随机分为模型组及金匱肾气丸治疗组(治疗组),每组 15 只,另选取 15 只正常雄鼠作为正常组。正常组常规饲养,每天灌胃蒸馏水 0.1 mL/10 g;模型组造模同时每天灌胃蒸馏水 0.1 mL/10 g;治疗组造模同时每天灌胃金匱肾气丸混悬液 0.1 mL/10 g(浓度 0.241 g/mL)。共干预 4 周。4 周后采用 ELISA 法检测各组小鼠睾丸组织端粒酶活性。**结果** “劳倦过度、房事不节”法复制肾阳虚模型成功,同时金匱肾气丸对肾阳虚模型小鼠的体征有一定的改善作用。与正常组比较,模型组小鼠睾丸端粒酶活性降低($P < 0.01$);与模型组比较,治疗组端粒酶活性升高($P < 0.01$)。**结论** “劳倦过度、房事不节”肾阳虚小鼠睾丸端粒酶活性较之正常小鼠明显降低,金匱肾气丸可使肾阳虚小鼠睾丸端粒酶活性得以恢复。

关键词 金匱肾气丸;肾阳虚;睾丸组织端粒酶活性

Acceleration of Jingui Shenqi Pill on the Testis Telomerase Activity in Mice of Shen-yang Deficiency XU Cui-ping¹, ZHU Qing-jun², SONG Jie³, LI Zhen², and ZHANG Dan² 1 Human Resource Department, Shandong Provincial Qianfoshan Hospital, Jinan (250014), China; 2 College of Basic Medical Sciences, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250355), China; 3 School of Nursing, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250355), China

ABSTRACT Objective To explore the effects of Jingui Shenqi Pill (JSP) on the testis telomerase activity in mice of Shen-yang deficiency syndrome (SYDS). **Methods** The SYDS model was prepared in 30 mice by over-fatigue and sexual overstrain. They were randomly divided into the model group and the JSP group, 15 in each group. Another 15 normal male mice were selected as the normal group. Mice in the normal group were fed routinely, with distilled water administered intragastrically at the daily dose of 0.1 mL/10 g. Mice in the model group were also administered intragastrically with distilled water at the daily dose of 0.1 mL/10 g while modeling establishment. Mice in the treatment group were administered intragastrically with JSP suspension at 0.1 mL/10 g (the concentration was 0.241 g/mL). The intervention lasted for 4 weeks. Four weeks later, the testis telomerase activity was detected in the three groups by ELISA. **Results** The SYDS model was replicated successfully by over-fatigue and sexual overstrain. JSP could improve the signs of mice of SYDS. Compared with the normal group, the activity of testis telomerase decreased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the testis telomerase activity markedly increased in the treatment group ($P < 0.01$). **Conclusions** The testis telomerase activity in mice of SYDS caused by over-fatigue and sexual overstrain obviously decreased, when compared with that in mice of the normal group. JSP could recover its activity.

KEYWORDS Jingui Shenqi Pill; Shen-yang deficiency; testis telomerase activity

“肾主生殖”理论是中医藏象学说的组成部分。

基金项目:国家自然科学基金重大研究计划资助项目(No. 90209014)

作者单位:1.山东省千佛山医院人力资源部(济南 250014);2.山东中医药大学基础医学院(济南 250014);3.山东中医药大学护理学院(济南 250014)

通讯作者:许翠萍, Tel: 0531 - 82967114, E-mail: xucui ping775@sohu.com

实验研究表明,肾阳虚存在下丘脑—垂体—性腺轴不同环节、不同程度的功能紊乱,补肾中药可从各个环节调节下丘脑—垂体—性腺轴功能状态,改善下丘脑—垂体—性腺轴功能紊乱,使生殖功能得到不同程度的改善^[1,2]。端粒酶(telomerase)是使端粒延伸的反转录 DNA 合成酶,其功能是合成染色体末端的端粒,使因每次细胞分裂而逐渐缩短的端粒长度得以补偿,

进而稳定端粒长度。目前已证实在大多数正常人体细胞中无端粒酶活性,而在干细胞、生殖细胞和 90% 的恶性肿瘤细胞中有端粒酶活性表达^[3,4]。生殖细胞中端粒酶活性被认为在保证全长的染色体转移至子代细胞及生殖细胞减数分裂中起重要作用^[5]。肾虚导致生殖能力下降^[1]。端粒酶在睾丸组织中的活性可作为评价生殖能力的指标,也反映了肾虚的严重程度^[5,6]。近年来,端粒与端粒酶的研究已成为国际研究热点,其与人类的衰老及肿瘤的发生发展密切相关^[6,7]。

本研究主要观察“劳倦过度、房事不节”肾虚小鼠睾丸组织端粒酶活性表达的变化,探讨金匱肾气丸对肾虚小鼠睾丸组织端粒酶活性的影响,从而探明金匱肾气丸治疗肾虚的作用机制,为临床治疗肾虚证提供实验依据。

材料与方法

1 动物 昆明种健康小白鼠,SPF 级,2~3 月龄,雄性 45 只,雌性 180 只,体质量(32 ± 2)g,由山东大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(鲁)2003-0004。普通饲料:山东大学实验动物中心提供,合格证号:鲁动饲字:20001002。

2 药物 金匱肾气丸(9 g,由熟地黄、山药、山萸肉、茯苓、泽泻、丹皮、附子、肉桂组成,由济南宏济堂制药有限公司生产,批号:20060312),研碎溶于水中,配制成浓度 0.241 g/mL 的混悬液。戊酸雌二醇由法国 Schering S.A 公司生产,批号:037B-2。

3 试剂及仪器 考马斯亮兰蛋白测定试剂盒(20081222)购自南京建成生物工程研究所,TeloTAGGG TelomerasePCR ELISA 试剂盒(Catalog Number: 11854666910)购自美国 ROCH 公司。PCR 仪(T1 Thermocycler, Biometra, 美国);ELISA 酶标仪(MK3 Muttiscan, Thermo Lab., 美国);721 分光光度计(CN20000, Unico, 上海);电动匀浆机(T18 Basic, IKA, 德国);恒温振荡器(THZ-C, 江苏太仓)。

4 模型制备及分组 动情期雌鼠的准备及雄鼠的筛选:雌鼠每天灌胃戊酸雌二醇混悬液(0.033 mg/mL, 0.1 mL/10 g),以阴道涂片检查角化细胞证实动情期的出现。将每只雄鼠与 2 只动情期雌鼠共笼,次日凡雌鼠有阴道栓的笼中的雄鼠为交配功能正常的健康雄鼠,用作实验用雄鼠。选取 30 只实验用雄鼠,随机分为模型组及金匱肾气丸治疗组(治疗组),每组 15 只,制备劳倦过度+房事不节模型:

每天上午 8:00 在水深 25 cm、水温 25 ℃、容积 5 000 mL 的圆型玻璃缸内强迫小鼠游泳至无力而下沉时捞出,造成劳倦过度;每只雄鼠与 6 只动情期雌鼠同笼,注意每天更换动情期雌鼠以诱导房事不节。实验共进行 4 周。小鼠出现自主活动减少,倦怠,精神萎靡,弓背,蜷缩,拥挤在一起,体毛枯疏、失去光泽、采食量、饮水量减少,游泳时间缩短,耐寒能力明显下降,大便变稀,尿量增多,腹部皮毛潮湿,阴囊皱缩,睾丸回升,舌色淡白,舌体胖嫩,舌边有齿痕为造模成功^[8]。另选取 15 只正常雄鼠作为正常组。

5 干预方法 正常组:常规饲养,每天灌胃蒸馏水 0.1 mL/10 g。模型组:造模同时每天灌胃蒸馏水 0.1 mL/10 g。治疗组:造模同时每天灌胃金匱肾气丸混悬液 0.1 mL/10 g(相当于临床临床用药剂量 7 倍)。共干预 4 周。

6 检测指标及方法 干预后称动物体重,快速颈椎脱臼处死,取小鼠睾丸。

6.1 睾丸组织中提取物的制备 取 -80 ℃ 保存的睾丸组织(每组 3 个),用手术刀片切取米粒大小组织,加入 200 μ L 裂解液,电动匀浆机冰浴匀浆 20 s;冰上孵育 30 min;4 ℃,12 000 r/min 离心 20 min;取上清调整浓度至 1 μ g/ μ L。

6.2 端粒酶重复序列扩增步骤(TRAP 反应) 反应体系:25 μ L PCR Mixture + 23 μ L 无菌去离子水 + 2 μ L (2 μ g) 组织裂解液。反应条件:(1)25 ℃ 1 min;(2)94 ℃ 5 min;(3)94 ℃ 30 秒,50 ℃ 30 s,72 ℃ 1.5 min,25 个循环;(4)72 ℃ 10 min,4 ℃ 保存。

6.3 端粒酶活性检测 采用 ELISA 法。每个样品取 20 μ L 变性试剂加入离心管中,加入 5 μ L 扩增产物,室温孵育 10 min,每个反应产物做两复孔;每个离心管内加入 225 μ L 杂交缓冲液,用振荡器完全混匀;取 100 μ L 混合物加入试剂盒中已包被的微孔板的每个孔中,并用自粘贴盖住小孔以防蒸发,将微孔板置于恒温振荡器中,37 ℃,300 r/min 孵育 2 h;仔细弃去全部杂交液,以清洗缓冲液洗 3 次,每孔 250 μ L 每次 30 s,小心弃去冲洗液;每孔加入 100 μ L 抗-DIG-POD 工作液,盖微孔板,置于恒温振荡器中,20 ℃,300 r/min 孵育 30 min;完全弃去溶液,以每孔 250 μ L 清洗缓冲液冲洗 5 次,每次 30 s,小心弃去冲洗缓冲液;每孔加入 100 μ L TMB 底物溶液预热至室温,盖上盖子,在恒温振荡器中,20 ℃,300 r/min,孵育 15 min。不弃去反应底物,每孔加入 100 μ L 终止试剂以终止反应,等已反应的 POD 底物的颜色从蓝

转黄,使用 ELISA 酶标仪,测定标本 450 nm 吸光度值。

6.4 结果判断 吸光度值为 A450 nm,参照空白对照读数 A690 nm。(1)阴性对照:随意取 1 个 1 μg/μL 的组织提取物,85 ℃ 加热 10 min 灭活端粒酶,作为阴性对照,阴性对照最大的吸光度值低于 0.25 (A450 ~690 nm)。(2)阳性对照:阳性对照的吸光度值在底物反应 20 min 后检测,高于 1.5 (A450 ~690 nm)。(3)样本:将样本的吸光度值减去阴性对照的值,即为样本端粒酶活性的检测值,该值应 >0.2 方可认为有端粒酶活性。

7 统计学方法 采用 SPSS 10.0 软件,所得计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠一般状态比较 与正常组比较,模型组自主活动明显减少,倦怠,精神萎靡,弓背,蜷缩,拥挤在一起,体毛枯疏、失去光泽、采食量、饮水量减少,游泳时间缩短,耐寒能力明显下降,大便变稀,尿量增多,腹部皮毛潮湿,阴囊皱缩,睾丸回升,舌色淡白,舌体胖嫩,舌边有齿痕。与模型组比较,治疗组自主活动次数明显增加,游泳时间延长,耐寒能力明显提高,与雌鼠同笼时可见阴道栓,舌色淡白,舌边齿痕不明显。造模期间模型组 2 只小鼠死亡,治疗组 1 只小鼠死亡,其余小鼠均造模成功,成功率 90%。提示“劳倦过度、房事不节”法复制肾阳虚模型成功,同时金匱肾气丸对肾阳虚模型小鼠的体征有一定的改善作用。

2 各组小鼠端粒酶活性比较(表 1) 与正常组比较,模型组小鼠睾丸端粒酶活性降低($P < 0.01$);与模型组比较,治疗组端粒酶活性升高($P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠端粒酶活性比较 ($\bar{x} \pm s$)		
组别	n	端粒酶活性(OD)
正常	15	1.38 ± 0.23 *
模型	13	0.60 ± 0.15
治疗	14	1.45 ± 0.26 *

注:与模型组比较, * $P < 0.01$

讨 论

对肾虚本质和补肾中药作用机制的探讨,广泛涉及神经系统、内分泌系统、免疫学和基础代谢等方面,研究结果表明肾虚证累及下丘脑—垂体—性腺轴,存在下丘脑—垂体—性腺轴不同环节、不同程度的功能紊乱^[1,2,9,10],补肾中药可从各个环节调节下丘

脑—垂体—性腺轴功能状态,使其生殖功能得到不同程度的改善。

金匱肾气丸为中医学经典补肾壮阳方药,是治疗肾阳虚的经典方剂,首见于《金匱要略》,又名八味肾气丸。原方由“干地黄八两、山茱萸四两、薯蓣四两、泽泻三两、茯苓三两、牡丹皮三两、桂枝一两、附子(炮)一两”共八味药物组成,研末,“炼蜜和丸”,以酒下之。干地黄为君,山药、山萸肉、桂枝、附子为臣,茯苓、泽泻、丹皮为佐。张景岳之“阴中求阳”理论,奠定了肾气丸为温补元阳之理论基础。金匱肾气丸既可以补阳、又可以补阴,阴中求阳、阳中求阴,从阴引阳、从阳引阴,为阴阳双补开辟了广阔的天地^[11]。其具有提高机体免疫功能、抗衰老、抗突变、抗辐射损伤、调节神经体液、影响实验动物的生殖、神经内分泌、造血及免疫等系统,改善心血管、血糖、血脂代谢等多方面的作用^[12,13]。

前期研究发现“劳倦过度、房事不节”所致肾阳虚小鼠出现了下丘脑—垂体—性腺轴的功能紊乱,导致睾丸的生精功能受损^[1,2]。在此基础上,进一步进行了“劳倦过度、房事不节”肾阳虚小鼠生殖力实验^[2],发现“劳倦过度、房事不节”肾阳虚小鼠雌鼠妊娠率较正常组显著降低($P < 0.01$),金匱肾气丸治疗组较模型组显著升高($P < 0.01$);模型组雌鼠每窝平均活胎数较正常组显著下降($P < 0.01$),金匱肾气丸治疗组较模型组显著升高($P < 0.01$)。说明“劳倦过度、房事不节”肾阳虚小鼠生殖力较之正常小鼠明显降低,金匱肾气丸治疗后可使肾阳虚小鼠生殖力得以恢复。端粒酶缩短和功能不足可使细胞凋亡增加^[14],本研究结果表明肾阳虚小鼠睾丸端粒酶活性降低,与前期研究“劳倦过度、房事不节”导致肾阳虚小鼠睾丸生殖细胞凋亡率上升,金匱肾气丸可以通过提高睾丸内睾酮含量,调节 Fas、FasL 表达,可以降低肾阳虚小鼠的睾丸生殖细胞凋亡^[2]一致。

本研究利用 TRAP-ELISA 法检测了“劳倦过度、房事不节”肾阳虚小鼠睾丸组织端粒酶活性,结果显示,模型组小鼠睾丸端粒酶活性较正常组显著降低,肾气丸治疗后端粒酶活性较模型组显著增高;说明“劳倦过度、房事不节”肾阳虚小鼠睾丸端粒酶活性降低,金匱肾气丸可以通过增强端粒酶活性表达,改善下丘脑—垂体—性腺轴功能紊乱,通过鼓舞肾阳,提高小鼠生殖力,从分子水平揭示了“肾”与生殖的关系。本研究不足之处在于没有对端粒酶活性表达与细胞增殖、凋亡的关系进行深入研究,同时不同肾虚造模方法性腺端粒酶活性表达及细胞凋亡的差异也需要进一步

探讨。

参 考 文 献

[1] 李震,刘黎青,颜亭祥,等.“劳倦过度、房室不节”肾阳虚模型小鼠睾丸乳酸脱氢酶-X 活性的测定[J]. 天津中医药, 2008, 25(2): 52-54.

[2] 朱庆均,张丹,李震,等.“劳倦过度、房事不节”肾阳虚小鼠生精功能的改变及金匱肾气丸的治疗作用[J]. 山东中医药大学学报, 2008, 32(3): 65-67.

[3] Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer[J]. Eur J Cancer, 1997, 33(5): 787-791.

[4] 叶哲伟,陈晓春,鲁功成,等.端粒酶 hTERT 基因在睾丸肿瘤组织中的表达及其意义[J]. 中华实验外科杂志, 2001, 18(5): 34-35, 98.

[5] Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, et al. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells[J]. Dev Genet, 1996, 18(2): 173-179.

[6] 陈志宏,杨国军.D-半乳糖衰老大鼠睾丸生精细胞端粒酶表达的变化[J].承德医学院学报, 2006, 23(2): 109-111.

[7] Yang L, Suwa T, Wright WE, et al. Telomere short-

ening and decline in replicative potential as a function of donor age in human adrenocortical cells[J]. Mech Ageing Dev, 2001, 122(15): 1685-1694.

[8] 张丹,李哲,朱庆均,等.“劳倦过度、房室不节”肾阳虚小鼠模型的建立及评价[J]. 实验动物学, 2008, 25(4): 13-15.

[9] 周英.脾虚和肾虚雌性大鼠生育能力的实验观察[J]. 广州中医药大学学报, 1998, 15(3): 36-40.

[10] 陈健安,高崎悦司,铃木辙.六味地黄汤对大鼠下丘脑-垂体-性腺轴组织器官形态和性激素的影响[J]. 江苏中医, 1999, 20(3): 46-47.

[11] 阎菊.金匱肾气丸补气说[J]. 现代中医药, 2003, 23(3): 47.

[12] 张家玮,张爱林.金匱肾气丸药理研究进展[J]. 浙江中医杂志, 2001, 36(9): 42-43.

[13] 张瑞,宋建平.肾气丸实验研究近况[J]. 中成药, 2004, 26(3): 65-67.

[14] Ichiyoshi H, Kiyoxuka Y, Kishimoto Y, et al. Massive telomere loss and telomerase RNA expression in dexamethasone induced apoptosis in mouse thymocytes[J]. Exp Mol Pathol, 2003, 75(2): 178-186.

(收稿:2011-05-06 修回:2012-10-08)

《中国中西医结合杂志》第八届编委会名单

总 编 辑 陈可冀

副总编辑 沈自尹 肖培根 雷 燕

顾 问 吴咸中 辛育龄 陈凯先 陈维养 邓铁涛 王永炎 侯 灿 曹洪欣

编辑委员(以姓氏笔画字母为序)

于德泉	马必生	王一涛	王卫霞	王文健	王宁生	王 伟	王 阶	王拥军	王昌恩
王学美	王宝恩	王硕仁	王 舒	车镇涛	尹光耀	叶文才	史大卓	史载祥	白彦萍
吕志平	吕爱平	吕维柏	朱 兵	朱明军	危北海	庄曾渊	刘干中	刘 平	刘 良
刘建平	刘建勋	刘猷枋	齐清会	阮新民	孙汉董	孙 燕	杨任民	杨宇飞	杨秀伟
李乃卿	李大金	李玉光	李廷谦	李军祥	李连达	李国栋	李国勤	李顺成	李 恩
李 涛	李焕荣	连 方	吴伟康	吴泰相	吴根诚	时毓民	邱 峰	张大钊	张永贤
张永祥	张伯礼	张荣华	张亭栋	张家庆	张敏州	陆付耳	陈士奎	陈小野	陈冬燕
陈香美	范维琥	林志彬	林求诚	林瑞超	郁仁存	果德安	周文泉	周 俊	周霭祥
赵一鸣	赵伟康	赵健雄	胡义扬	胡镜清	饶向荣	洪传岳	栗原 博(日本)	顾振纶	
徐治鸿	徐 浩	殷惠军	郭 军	郭赛珊	唐由之	唐旭东	凌昌全	黄光英	黄怡超
黄晓愚	黄 熙	曹小定	崔 红	麻 柔	梁晓春	葛秦生	董竞成	董福慧	韩济生
谢竹藩	谢明村	谢 恬	蔡定芳	裴正学	廖家桢	廖福龙	衡先培	戴瑞鸿	

Yung-chi CHENG(美国) Sheng-xing MA(美国) Qun-hao ZHANG(美国)