

左归丸和右归丸对老年大鼠海马 GRmRNA 表达与 HPA 轴活性的影响

姚建平^{1*}, 金国琴², 戴薇薇², 姚龄爱², 康湘萍², 张学礼², 夏花英², 黎志萍², 龚张斌², 徐品初³

(1. 河南中医学院方剂学科, 河南 郑州 450008; 2. 上海中医药大学生化教研室, 上海 201203;

3. 上海中医药大学老年研究所, 上海 201203)

[摘要] 目的: 观察左归丸和右归丸对老年大鼠海马糖皮质激素受体(GR)mRNA 表达和下丘脑-垂体-肾上腺皮质(HPA)轴活性的影响, 探索 GRmRNA 表达和 HPA 轴活性的关系。方法: 以自然衰老 SD 雄性大鼠(24 月龄)为肾虚衰老模型, 大鼠随机分为老年对照组、左归丸组和右归丸组, 每组 35 只, 另设青年对照组(5 月龄)35 只, 共 4 组。老年对照组大鼠常规喂养至 24 月龄。左、右归丸组大鼠自 20 月龄始, 均按相当于左、右归丸生药 $7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (成人临床用量的 15 倍) 自由饮用稀释药液, 每周停药 2 天, 连续 4 个月; 采用原位杂交法检测大鼠海马组织 GRmRNA 表达, 放免法检测大鼠血浆皮质酮(CORT)含量。结果: 与青年对照组相比, 老年对照组大鼠海马 CA1 区 GRmRNA 表达水平显著下降($P < 0.05$), 血浆 CORT 含量显著增高($P < 0.05$); 与老年对照组比较, 左归丸组和右归丸组大鼠海马 CA1 区 GRmRNA 表达水平显著升高($P < 0.05$), 血浆 CORT 含量显著降低($P < 0.05$)。结论: 左归丸和右归丸可能通过上调自然衰老 SD 雄性大鼠海马 GRmRNA 表达, 加强对 HPA 轴的抑制作用, 进而降低血浆 CORT 含量。

[关键词] 神经内分泌; 糖皮质激素受体; 皮质酮; 肾虚; 左归丸右归丸

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)10-0067-03

衰老学研究是生命科学研究的重大课题, 探索衰老的分子机理一直是国内外研究的热点。肾虚与神经内分泌紊乱衰老是衰老学说的重要内容, 大量研究表明, 机体衰老或肾虚时出现神经内分泌的紊乱。下丘脑-垂体-肾上腺皮质(HPA)轴是神经内分泌系统的重要组成部分, HPA 轴不仅自身可反馈调控, 且受海马糖皮质激素受体(GR)的调控。因此, 本研究从补肾角度对海马调控 HPA 的机理进行探索性研究。

1 材料

1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠, 清洁级, 105 只, 体重 $(400 \pm 50) \text{ g}$, 由上海中医药大学实验动物中心提供(动物许可证号: 2003-0002)。

1.2 主要试剂与药品 原位杂交检测试剂盒(武汉博士德); 大鼠皮质酮放免检测试剂盒(Diagnostic Systems Laboratories, Inc); 中药(饮片)。

1.3 主要实验仪器 P 型半导体制冷冰冻切片机(Germany); γ 射线计数器(Beckman Company)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药 105 只 SD 雄性大鼠, 随机分为 3 组: 老年对照组、左归丸组、右归丸组, 每组 35 只, 另设青年对照组 35 只, 共 4 组。温度 $18 \sim 22 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 光暗周期 12 h: 12 h, 群养, 5 只/笼, 常规喂养饲料, 自由饮水。以自然衰老 SD 雄性大鼠(24 月龄)为模型, 老年对照组大鼠常规喂养至 24 月龄。左、右归丸组大鼠从 20 月龄始, 均按左、右归丸生药 $7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (相当成人临床用量的 15 倍) 自由饮用稀释药液, 每周停药 2 d, 连续 4 个月。

2.2 药材及制剂 左、右归丸组方及用量均参照一版《方剂学》, 左归丸由熟地 24 g, 山药 12 g, 枸杞子 12 g, 山茱萸 12 g, 川牛膝 9 g, 菟丝子 12 g, 鹿角胶 12 g, 龟甲 12 g 组成。右归丸由熟地 24 g, 山药 12 g, 山茱萸 9 g, 枸杞子 9 g, 菟丝子 12 g, 鹿角胶 12 g, 炒杜仲 12 g, 当归 9 g, 肉桂 6 g, 炮附子 6 g 组成。中药饮片一次性购于上海华宇药业有限公司, 两方均按原方用量比例水煎, 浓缩成膏, $-30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.3 取材 大鼠腹腔麻醉(25% 乌拉坦, $0.75 \text{ g} \cdot$

[收稿日期] 2009-04-20

[基金项目] 国家自然科学基金(30371817)

[通讯作者] * 姚建平, Tel: (0371) 65949704; E-mail: yjp740719@yahoo.com.cn

kg^{-1}), 腹主动脉取血 5 mL, 分离血浆, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存; 打开胸腔, 将输液针头插入左心室, 剪开右心耳, 滴注灌流 200 mL 生理盐水, 再滴注灌流 200 mL 4% 多聚甲醛。灌流结束后, 取出整个脑组织, 置于 4% 多聚甲醛固定 6h, 再转入 30% 蔗糖至组织块下沉, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 待切片。

2.4 原位杂交检测 GRmRNA 表达 切片厚度为 30 μm , 预冷至 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 匀速切片, 切片放入 30% 蔗糖溶液的原位杂交保护液中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待测。

探针设计: 采用多相寡核苷酸探针, 地高辛标记 (探针由武汉博士德公司提供)。针对大鼠 GRmRNA 的寡核苷酸探针序列: 5'-AGGTT TCTGC GTCIT CACCC TCACT GGCTG-3'。

杂交反应: 采用冰冻切片漂浮法。选择含有海马组织的脑片, DEPC 水洗涤 3 次 $\times 5\text{ min}$ 。0.6% 过氧化氢-甲醇溶液室温处理脑片 30 min, DEPC 水洗涤 3 次 $\times 5\text{ min}$ 。3% 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶 (1 mL 3% 柠檬酸加 1 滴浓缩型胃蛋白酶, 混匀) 消化 1 min, $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 洗 3 次 $\times 5\text{ min}$ 。将脑片转入盛有适量预杂交液的 Eppendorf 管中, $41\text{ }^{\circ}\text{C}$, 预杂交 3 h。将脑片转入盛有适量寡核苷酸探针杂交液的 Eppendorf 管中, $41\text{ }^{\circ}\text{C}$, 杂交过夜。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $2\times\text{SSC}$ 洗涤 2 次 $\times 5\text{ min}$, $0.5\times\text{SSC}$ 洗涤, 5 min, $0.2\times\text{SSC}$ 洗涤 5 min。滴加封闭液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 封闭 1 h, 不洗。将脑片转入盛有适量生物素化鼠抗地高辛的 Eppendorf 管中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 60 min, $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 洗 4 次 $\times 5\text{ min}$ 。将脑片转入盛有适量 SABC 的 Eppendorf 管中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min, $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 洗 3 次 $\times 5\text{ min}$ 。将脑片转入盛有适量生物素化过氧化物酶的 Eppendorf 管中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min, $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 洗 4 次 $\times 5\text{ min}$ 。DAB 显色 2~5 min, DEPC 水洗 3 次 $\times 5\text{ min}$, 二甲苯透明, 中性树胶封片。显微镜观察、拍片。

2.5 放免检测大鼠血清皮质酮 按试剂盒说明操作, γ -射线计数器检测。

2.6 数据、图像处理及结果分析 GRmRNA 表达以阳性面积/单位面积比值表示; 放免结果由分析软件将所测放射性比活度根据浓度曲线转化为浓度。所得数据均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, SPSS10.0 统计软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA)。

3 结果

3.1 对老年大鼠海马 CA1 区 GRmRNA 表达的影响 由表 1 可知, 与青年对照组比较, 老年对照组大鼠

海马 CA1 区 GRmRNA 表达水平均显著下降; 与老年对照组比较, 左归丸组和右归丸组大鼠海马 CA1 区 GRmRNA 表达水平显著升高。

表 1 大鼠海马 CA1 区 GRmRNA 表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量 (生药, $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	海马 CA1 区 GRmRNA 表达
青年对照组	—	$0.071\pm 0.020^{2)}$
老年对照组	—	0.021 ± 0.005
左归丸组	7.5	$0.044\pm 0.004^{1)}$
右归丸组	7.5	$0.032\pm 0.002^{1)}$

注: 与老年对照组比较¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ (下同)

3.2 对老年大鼠血清皮质酮 (CORT) 含量的影响

由表 2 可知, 与青年对照组比较, 老年对照组大鼠血清 CORT 含量显著增高; 与老年对照组比较, 左归丸组和右归丸组大鼠血清 CORT 含量显著下降。

表 2 大鼠血清 CORT 含量 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量 (生药, $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	CORT 含量 (ng/mL 血清)
青年对照组	—	$851.06\pm 164.48^{2)}$
老年对照组	—	1110.75 ± 43.20
左归丸组	7.5	$614.76\pm 210.13^{2)}$
右归丸组	7.5	$632.71\pm 126.36^{2)}$

4 讨论

HPA 轴是神经内分泌的重要组成部分, 神经内分泌学说认为 HPA 轴功能紊乱与衰老关系密切。糖皮质激素 (GC, 人类主要为皮质醇, 大鼠主要为皮质酮) 是 HPA 轴的终末激素。研究发现, 老年大鼠外周血中皮质酮水平增高^[1], 海马对 HPA 轴呈抑制性调控^[2]。海马含有丰富的 GR, 尤以海马 CA1 区含量最为丰富。它们是 GC 反馈作用的重要靶点。正常情况下, GR 对 GC 的亲和力较低, 只有在血浆 GC 水平很高的情况下才表现明显的结合占用率^[3]。高水平的 GC 激活海马 GR, 可抑制 HPA 轴的活性^[4]。本实验结果显示老年 SD 雄性大鼠海马 CA1 区 GRmRNA 表达均显著下降, 血清 CORT 含量增高; 左归丸和右归丸可上调老年大鼠海马 CA1 区 GRmRNA 表达, 降低血清 CORT 含量。推测老年大鼠由于海马 GRmRNA 表达的降低, 使其 GR 位点相应减少, 对抑制 HPA 轴作用减弱, 导致 HPA 轴功能亢进, CORT 分泌增高。左归丸、右归丸可能通过增强海马 GRmRNA 表达加强对 HPA 轴的抑制, 改善 HPA 轴的功能, 进而延缓机体的衰老。

[参考文献]

- [1] Amalia M. I. Wayne R, Serge G, *et al.* The Journal of Neuroscience[J]. 1990, 10(10): 3247.

- [2] Burn J. Hypothalamus-pituitary-adrenal activity during human sleep: Coordinating role for the limbic hippocampal system [J] . Exp Clin Endocrinol Diabetes, 1998, 106(3) : 153.
- [3] 王先远. 糖皮质激素受体表达与衰老[J] . 国外医学老年学

年学分册, 2000, 21(3) : 127.

- [4] De Kloet ER, van SA, Sibog RM, *et al.* Brain mineralocorticoid receptors and Centrally regulated functions [J] . Kiney Int, 2000, 57: 1329.