

附子理中汤对脾阳虚大鼠骨骼肌能荷 及 CNTF mRNA 的影响

唐汉庆*

(右江民族医学院, 广西 百色 533000)

[摘要] **目的:**观察附子理中汤对脾阳虚大鼠骨骼肌能荷及睫状神经营养因子(CNTF)mRNA 表达的影响。**方法:**大鼠分为对照组、模型组和附子理中汤组,模型组施行肩胛骨间棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)切除术,饲以高脂饲料,19℃环境喂养3周。附子理中汤组在模型组基础上以附子理中汤按5 mL·kg⁻¹体重ig,每日1次,连续ig4周。测定大鼠骨骼肌能荷值,RT-PCR法检测CNTF mRNA表达。**结果:**与对照组大鼠骨骼肌能荷(0.042±0.018)比较,模型组(0.032±0.014)与附子理中汤组(0.024±0.012)的能荷值均降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,附子理中汤组的能荷值降低明显($P < 0.05$)。对照组CNTF mRNA相对表达量为(0.862±0.072),模型组CNTF mRNA相对表达量(0.426±0.056)较对照组降低($P < 0.01$)。与模型组比较,附子理中汤组CNTF mRNA相对表达量(0.838±0.068)升高($P < 0.01$)。**结论:**附子理中汤对CNTF mRNA表达有调节作用,通过上调CNTF mRNA表达,增加CNTF含量,发挥CNTF对骨骼肌营养作用和能量代谢调节作用。

[关键词] 附子理中汤;脾阳虚证;能荷;睫状神经营养因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0248-04

Influence of Energy Charge and Expression of CNTF mRNA in Rats with Spleen Yang Deficiency Syndrome after Administrated Fuzi Lizhong Decoction

TANG Han-qing*

(Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the influence of energy charge and the expression of ciliary neurotrophic factor mRNA (CNTF mRNA) by Fuzi Lizhong decoction in rats with spleen yang deficiency syndrome. **Method:** Animals were divided into the control group, the model group and the Fuzi Lizhong decoction group. The model group was insised brown adipose tissue then fed with high fat diet under 19℃ circumstance, which lasted for 3 weeks. The Fuzi Lizhong decoction group was ig 5 mL·kg⁻¹ Fuzi Lizhong decoction based on the model group once a day, for 4 weeks. Testing energy charge of skeletal muscle and the expression of CNTF mRNA were assayed by the method of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Result:** Compared with the control group (0.042±0.018), energy charge decreased in the model group (0.032±0.014) and the Fuzi Lizhong decoction group (0.024±0.012) ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, energy charge decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with the control group (0.862±0.072), the expression of CNTF mRNA in the model group (0.426±0.056) decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of CNTF mRNA in the Fuzi Lizhong decoction group (0.838±0.068) increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** It is suggested that Fuzi Lizhong decoction can regulate the expression of CNTF mRNA, which indicated an effect on nutrition and energy metabolism of skeletal muscle by up-regulating the expression of CNTF mRNA and increasing the content of CNTF.

[Key words] Fuzi Lizhong decoction; spleen yang deficiency syndrome; energy charge; ciliary neurotrophic factor

[收稿日期] 20120626008

[通讯作者] *唐汉庆,博士,从事中西医结合基础研究, Tel:18978603776, E-mail: ilovyeouverymuchoooo@yahoo.com.cn

中医学理论认为“脾主运化”是脾的生理功能之一,通过运化营养物质到全身,发挥滋润濡养的作用,“脾主肌肉”是“脾主运化”功能的体现之一,肌肉得到营养,才能保持正常形态和舒缩功能,从能量代谢角度研究“脾主肌肉”的内涵值得探讨。

由于“脾主运化”的功能有赖于“脾阳升清”作用,如果脾阳虚衰,清阳不升,则脾运化功能减弱,肌肉得不到营养物质的支持就会发生萎缩松软等病变,本实验研究先建立脾阳虚大鼠模型,以对应方剂附子理中汤进行干预,观察大鼠骨骼肌能荷及睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF) mRNA 表达的变化,从调控肌肉能量代谢变化的因素讨论“脾主肌肉”的物质基础。

1 材料

1.1 动物 清洁级 Wistar 大鼠,雌雄不拘,体质量 160~210 g,本院科学实验中心提供,动物合格证号 SCXK(桂)2010-0004。

1.2 药物 附子理中汤由炮附子、党参、白术、干姜、炙甘草组成,实验所用单味药由本校药理教研室提供。经本院药理教研室鉴定:附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的子根;党参为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* (franch.) Nannf. 的干燥根;白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根;干姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥根茎;甘草为乌拉尔甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的根。

1.3 试剂和仪器 水合氯醛,批号 20110612、高氯酸,批号 20100610、氢氧化钾,批号 110245(北京化学试剂公司)。三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)、一磷酸腺苷(AMP)对照品(批号 100304, Sigma 公司)。考马斯亮蓝蛋白检测试剂盒(批号 110425,南京建成生物科技公司)。Trizol(Gibcobl 公司)。莫罗尼鼠白血病毒(Moloney murine leukemia virus, M-MLV, Piomegan 公司)。Tag 酶、DNAMark(北京博奥公司)。CNTF 基因引物(Invitrogen 公司)。

AE160 型电子天平(瑞士 Mettler 公司),1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),PK121R 型高速低温离心机(ALC 公司),MK3 型酶标仪(Thermo Labsystem 公司),DY-89 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝公司),7900HT 型 PCR 仪(ABI 公司),DU530 型紫外分光光度计(Beckman 公司)。

2 方法

2.1 附子理中汤制备 炮附子、党参、白术、干姜、

炙甘草按照原方 3:5:4:3:2 的比例,诸药分开均先经蒸馏水浸泡 30 min,炮附子先煎 1 h,后纳入其余诸药,煎煮 2 次(40 min/次),期间将 2 次药液纱布过滤,合并,水浴加热浓缩至含生药量为 2 g·mL⁻¹ 浓度的药液,杀菌,贮存于 4 ℃ 冰箱内备用。

2.2 动物分组和造模 分 3 组,每组 20 只。对照组:普通饲料,自由饮水,常态环境喂养。模型组:施行肩胛骨间棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)切除术,术后饲以高脂饲料(83% 基本饲料,15% 甘油三酯,2% 胆固醇),19 ℃ 环境喂养 3 周。附子理中汤组:在模型组基础上,附子理中汤按 10 g·kg⁻¹(2 g·mL⁻¹,5 mL·kg⁻¹) ig,每日 1 次,连续 ig 4 周。4 周后第 1 天取大鼠左侧腓肠肌约 0.1 g 供检测。

2.3 能荷检测 将腓肠肌置于电动玻璃匀浆机,加入预冷的生理盐水在冰浴制备肌肉匀浆,取 500 μL 匀浆液,加入 500 μL 5% 的 HClO₄ 沉淀蛋白。4 ℃,3 000 r·min⁻¹,离心 10 min,取上清液 500 μL 加入 40 μL 20% 的 KOH 沉淀 20 min,高效液相色谱仪梯度洗脱,测定 ATP,ADP 及 AMP 的含量。色谱条件:Lichrosorb C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm)。流动相 A 液 0.05 mol·L⁻¹ KH₂PO₄-K₂HPO₄ 缓冲液(pH 7.0);B 液含 10% 甲醇的 A 液。流速 0.8 mL·min⁻¹,时间 18 min。检测波长 254 nm。样品进样体积 10 μL。以峰面积按回归方程式计算 ATP,ADP 及 AMP 的含量。用样本蛋白含量校正 ATP,ADP 及 AMP 的含量借以消除肌肉水肿等病变可能带来的对能荷测定的影响。最后,依据能荷公式计算能荷值。

$$EC = ([ATP] + 0.5 [ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$$

2.4 RT-PCR 法检测 CNTF mRNA 表达 取 100 μL 肌肉匀浆,用 Trizol 试剂提取总 RNA,氯仿和异丙醇抽提。紫外分光光度仪和琼脂糖电泳鉴定 RNA 的浓度和纯度,取 10 μL 根据逆转录试剂盒说明逆转录合成 cDNA, -70 ℃ 冻存备用。取 5 μL 逆转录产物进行 PCR 扩增反应,并以 β-actin 为内对照。CNTF 基因引物由 Invitrogen 公司设计合成。PCR 反应条件:56 ℃ 2 min → 95 ℃ 5 min → (95 ℃ 15 s → 70 ℃ 1 min) 共 35 个循环。β-actin 反应条件:95 ℃ 30 s 变性,56 ℃ 30 s 退火,70 ℃ 3 min 延伸。具体序列及扩增长度见表 1。

PCR 扩增反应产物经 2% 琼脂糖电泳,溴化乙啶染色,通过凝胶电泳分析系统读取目的基因灰度

表 1 引物序列及扩增长度

引物	引物序列(5'-3')	扩增长度 /bp
CNTF	CTAGACTAGCAAGGAATCGAGG GACGAACTTGCCACTGTCAACT	128
β -actin	TAGAGTTCTACAGCGCAGAAG GAGTTCATTGACAGCACAGACT	112

值,将目的基因灰度值与 β -actin 基因灰度值的比值作为目的基因 mRNA 的相对表达量。

2.5 统计学处理 数据统计采用 SPSS 13.0 软件。符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。 t 检验分析组间差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 标准曲线方程式 以 ATP, ADP, AMP 对照品峰与样品峰的保留时间以及两者紫外光谱作为判定依据。以纯水配 ATP, ADP, AMP 标准液, 稀释为 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准液, 分别加样 10 μL , 以峰面积为纵坐标, 样品浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 直线回归, 结果表明在 6.25 ~ 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。ATP 的回归方程为 $Y = 12.321X - 6.851 (n = 6, r = 1.2011)$, ADP 的回归方程为 $Y = 27.353X - 1.832 (n = 6, r = 1.4233)$, AMP 的回归方程为 $Y = 42.386X + 4.356 (n = 6, r = 1.5620)$ 。

3.2 大鼠骨骼肌能荷及 CNTF mRNA 表达的变化 和对照组比较, 模型组和中药组的能荷值均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。附子理中汤组的能荷值降低明显, 和模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

和对照组比较, 模型组 CNTF mRNA 相对表达量降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。附子理中汤组 CNTF mRNA 表达量升高, 接近对照组水平, 与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 附子理中汤对脾阳虚大鼠骨骼肌能荷及 CNTF mRNA 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	能荷值	CNTF mRNA 相对表达量
对照	-	0.042 \pm 0.018	0.862 \pm 0.072
模型	-	0.032 \pm 0.014 ¹⁾	0.426 \pm 0.056 ²⁾
附子理中汤	10	0.024 \pm 0.012 ^{2,3)}	0.838 \pm 0.068 ⁴⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

《素问集注·五脏生成》指出:“脾主运化水谷之精,以生养肌肉,故主肉”。脾运化功能正常,气血精微物质输布得当,肌肉得以濡养,则肌肉腠理密实,外观丰满,收缩有力。脾运化功能有赖于脾阳升清作用,如果脾阳虚弱,影响脾运化功能,四肢肌肉得不到水谷之精濡养,则“肌肉不仁,发为肉痿。”(《素问·痿论篇》)。本研究建立脾阳虚动物模型,采用附子理中汤为干预药物,以对肌肉具有营养作用并参与肌肉能量代谢的 CNTF^[1] 为观察指标,结合肌肉能荷变化讨论“脾主肌肉”的部分机制。

4.1 脾阳虚动物模型制备 本实验研究在参考有关脾阳虚大鼠造模文献和评价标准的基础上^[2,4], 采用 BAT 切除术, 由于 BAT 是成年动物主要的产热物质^[5-6], 切除 BAT 后, 减少大鼠产热物质, 大幅衰减其阳气, 而后采用高脂饮食并置大鼠于较低温度环境下, 模拟“肥甘厚腻”、“寒伤中阳”导致的脾虚, 使脾虚和阳虚症状同时具备, 从而制备了脾阳虚大鼠模型, 该模型的制备法自然需要同道的指正和实践的检验。

4.2 CNTF 和能荷的联系 对 CNTF 的研究, 以往集中于其对神经营养的作用, 但近来的研究已表明其对肌肉也有营养作用, 改变骨骼肌细胞钠电位, 从而影响肌细胞兴奋性, 维持正常骨骼肌的形态和功能^[7], 可能在肌肉收缩过程中发挥着调控作用, 作为一种有希望用来防治肌无力、肌肉萎缩、运动性肌肉酸痛和损伤等肌肉病变的药物, 值得重视。

CNTF 对肌肉收缩具有可能的调控作用, 那么, 肌肉收缩涉及到能量代谢, 能荷作为机体高能磷酸键的衡量指标, 反映能量代谢和产热状况, 有研究初步表明 CNTF 通过影响线粒体呼吸链, 调节解偶联蛋白 (UCP), 加快线粒体能量代谢速度和解偶联速度, 使线粒体氧化作用产生的能量以热量的形式散发掉^[8], 推测 CNTF 的升高可能抑制高能腺苷的合成, 表现为能荷值的下降。

4.3 CNTF mRNA 和能荷变化的讨论 在本实验研究中, 观察到模型组和附子理中汤组的能荷值均降低, 和对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 这和我们以往的实验结果一致^[9]。是由于采用 BAT 切除术后加以高脂饮食的造模方法, 使游离脂肪酸增加, 抑制了高能腺苷的合成, 表现为脾阳虚组能荷值的降低。附子理中汤组采用附子理中汤干预后, 能荷值继续下降, 推测是提高了 CNTF mRNA 的表达 [接近对照组水平, 和模型组比较, 差

异有统计学意义($P < 0.01$),增加了 CNTF 含量, CNTF 通过增强 UCP 的活性,加快线粒体能量代谢速度和解偶联速度,使线粒体氧化作用产生的能量以热量的形式散发掉,高能腺苷的合成进一步减少,能荷值进一步下降。

附子理中汤通过调节 CNTF 水平,进而通过 CNTF 调控 UCP,影响线粒体能量代谢,体现在能荷值的变化;在另外的实验中,我们观察到附子理中汤对 UCP 也有直接的调节作用^[10],似乎说明附子理中汤恢复“脾主肌肉”作用是在多节点起效的。从侧面也说明要阐明“脾主肌肉”机制的复杂性。

CNTF 从 20 世纪 90 年代开始用于临床治疗肌肉退行性疾病和神经肌肉系统损伤,但临床疗效仍有待提高,从中医理论中觅取研究思路并找到有效方药,对降低治疗肌肉病变费用、推广中医药有现实意义。

[参考文献]

- [1] Peroulakis M E, Forger N G. Ciliary neurotrophic factor increases muscle fiber number in the developing levatorani muscle of female rats [J]. *Neurosci Lett*, 2000, 296:73.
- [2] 张文通,唐汉庆,卢阿娜,等. 附子理中丸对脾阳虚证大鼠肝脏能荷的下调机制[J]. *世界华人消化杂志*, 2010, 18(35): 3782.

- [3] 杨雪,杨文思,王勇,等. 脾阳虚证中阳虚症状群的实验评价[J]. *中华中医药杂志*, 2008, 23(3):244.
- [4] 杨雪,杨文思,王勇,等. 脾阳虚消化不良症状群客观评价的实验研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2008, 14(4):271.
- [5] Smith R E, Horwitz B A. Brown fat tissue and thermogenesis [J]. *Physiol Rev*, 1969, 49 (2):330.
- [6] Nicholls D G, Locke RM. Thermogenic mechanisms in brown fat [J]. *Physiol Rev*, 1984, 64 (1):1.
- [7] Talon S, Giroux Metges M A, Pennec J P, et al. Rapid protein kinase C-dependent reduction of rat skeletal muscle voltage-gated sodium channels by ciliary neurotrophic factor [J]. *Physiol*, 2005, 565 (3): 827.
- [8] Lezza A M, Pesce V, Cormio A. Increased expression of mitochondrial transcription factor A and nuclear respiratory factor-1 in skeletal muscle from aged human subjects[J]. *FEBS Lett*, 2001, 501(1): 74.
- [9] 唐汉庆,张文通,卢阿娜,等. 附子理中丸对脾阳虚证大鼠骨骼肌能荷影响的实验研究[J]. *中国药师*, 2010, 13(12): 1691.
- [10] 吴云起,唐汉庆,吴翠松,等. 脾阳虚证大鼠棕色脂肪组织和解偶联蛋白 1 关联性的实验研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(14):206.

[责任编辑 聂淑琴]

《天津中医药》2013 年征订启事

《天津中医药》(原名《天津中医》)创刊于 1984 年,是由天津市卫生局主管、天津中医药大学、天津中医药学会和天津中西医结合学会主办的综合性中医药学术期刊。本刊继承与发展并重,中医与中药兼顾,理论与实践并举,坚持中医特色,内容丰富,实用性强,是中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊、《CAJ-CD 规范》执行优秀期刊、美国《化学文摘》(CA)俄罗斯《文摘杂志》(AJ)和波兰哥白尼索引(IC)源期刊、天津市一级期刊。2011 年被评为天津市优秀期刊、获得全国高校优秀科技期刊二等奖、第 3 届全国中医药优秀期刊奖。本刊设有专家论坛、名医精粹、博士之窗、临床论著、针灸与推拿、理论探讨、实验研究、中药研究、国际交流、留学生园地、科研动态、综述等专栏,以满足广大读者日益增长的需要。

本刊国内外公开发售,ISSN:1672-1519,CN:12-1349/R。国内邮发代号为 6-83,国外发行代号:1040-BM,2013 年每期定价 6.00 元,全年 6 期定价为 36 元。合订本 60 元。本刊编辑部也办理邮购。邮购地址:天津市南开区鞍山西道 312 号《天津中医药》编辑部收,邮编:300193,电话:(022)59596310,传真:(022)59596595,E-mail:xuebaobj@tjctcm.edu.cn; xuebaobj@126.com