补肾活血方对肾阳虚大鼠耳蜗组织 Fas mRNA 表达的影响

李莉[1]，李卫华[2]，王俊锋[1*]，宋红梅[3]，熊大经[4]
(1. 山西中医学院中西医结合临床医学系，太原 030024；
2. 解放军 264 医院，太原 030001；3. 中国中医科学院中医临床基础医学研究所，北京 100700；
4. 成都中医药大学耳鼻喉科教研室，成都 610075)

[摘要] **目的**：观察补肾活血方对肾阳虚后大鼠耳蜗组织 Fas mRNA 表达的影响。**方法**：将耳廓反应灵敏的健康 SD 大鼠随机选取 8 只用于空白对照组，其余 16 只用于肾阳虚造模。采用氢化可的松注射液 0.02 $g \cdot kg^{-1}$ im 的方法造成肾阳虚模型，造模 14 d 后，分为模型组、补肾活血方 ig 3.1 $g \cdot kg^{-1}$ 组。治疗组造模结束后开始给药，连续 ig 给药 2 周。给药结束后测试大鼠听性脑干反应(ABR)，随后处死动物。股动脉取血测试环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)；在超净工作台上剥离耳蜗，用 RT-PCR 的方法检测耳蜗组织 Fas mRNA 的表达。**结果**：空白组耳蜗 Fas mRNA 的表达为 0.210 1 ± 0.025 6，模型组 Fas mRNA 的表达为 0.551 4 ± 0.090 3，补肾活血方组 Fas mRNA 的表达 0.242 9 ± 0.052 5。经统计学分析，模型组大鼠耳蜗组织 Fas mRNA 的表达与空白组相比，明显上调，具有统计学意义($P<0.01$)；补肾活血方可降低肾阳虚大鼠耳蜗 Fas mRNA 的表达，与模型组比较，差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论**：耳蜗组织中 Fas 蛋白的改变可能是促进肾阳虚后耳蜗病变发展的因子之一，补肾活血方可能通过调节 Fas mRNA 的表达而起到提高听力，改善耳蜗结构的作用。

[关键词] 补肾活血方；肾阳虚；耳蜗；Fas mRNA；肾与耳
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)13-0197-04
[网络出版地址] http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120504.1219.022.html
[网络出版时间] 2012-05-04 12:19

[收稿日期] 201100929(002)
[基金项目] 四川省中医药管理局科研课题(200660)；山西省卫生厅科技攻关计划项目(2011070)
[第一作者] 李莉，讲师，博士，从事耳科疾病的中医药防治研究，E-mail：lili306871@126.com
[通讯作者] * 王俊锋，讲师，医学硕士，E-mail：wjf306@126.com

[参考文献]

[1] 杨企铮，贾淑杰，李德华. 中药藤黄的近代研究[J]. 中国肿瘤临床，1994，21(6)：464.
[2] 刘幸平，程康华. 薄层扫描法测定不同地区藤黄炮制品中藤黄酸及新藤黄酸的含量[J]. 中成药，1995，17(10)：20.
[3] 刘幸平，程康华. 薄层扫描法测定不同温度藤黄炮制品中藤黄酸及新藤黄酸的含量[J]. 南京中医药大学学报，1995，11(6)：33.
[4] 冯传平. 新藤黄酸冻干粉针剂的制备工艺研究[D]. 合肥：安徽中医学院，2006：10，65.
[5] 曲宝玺，纪远中，章萍，等. 藤黄Ⅱ号对白血病 L1210 细胞杀伤动力学研究 I-显微分光光度计观察[J]. 中国肿瘤临床，1991，18(1)：53.
[6] 曲宝玺，郝晓阁，李德华，等. 藤黄Ⅱ号抗癌作用的实验研究[J]. 中国肿瘤临床，1991，18(1)：50.
[7] 程卉，彭代银，王效山，等. 新藤黄酸体内外抗肿瘤作用研究[J]. 中草药，2008，39(2)：236.
[8] 赵斌，葛金芳，朱娟娟，等. 小议在 MTT 法测细胞增殖抑制率中 IC_{50} 的计算方法[J]. 安徽医药，2007，11(9)：834.
[9] 周一平. SPSS 软件计算新药的 LD_{50}[J]. 药学进展，2003，27(5)：314.

[责任编辑 聂淑琴]

Influence of Bushen Huoxue Fang on the Expression of Cochlea Fas mRNA in the Kidney-deficiency Rats

LI Li[1], *LI Wei-hua*[2], *WANG Jun-feng*[1*], *SONG Hong-mei*[3], *XIONG Da-jing*[4]

(1. *Department of Integrated Traditional and Western Medicine of Shanxi College of Traditional Chinese Medicine (TCM)*, *Taiyuan* 030024, *China*; 2. 264 *Hosptial of PLA*, *Taiyuan* 030001, *China*; 3. *Institute of Basic Research in Clinical Medicine*; *China Academy of Chinese Medical Sciences*, *Beijing* 100700, *China*; 4. *Ears*, *Nose*, *and Throat Department of the Chengdu University of TCM*, *Chengdu* 610075, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To observe the effect of Bushen Huoxue Fang on the expression of cochlea Fas mRNA in the kidney-deficiency rats. **Method**: Eight healthy SD rats with a sound auricle response were randomized into the control group, the other 16 rats were modeled into kidney-yang-deficiency by alternate injection of cetacort into their buttocks. After 14 days of modeling, rats were randomized into model group, Bushen Huoxue Fang group. The treatment lasted two weeksn. Rats in each group were chosen randomly to test auditory brain-stem response (ABR) on the day 15 of treatment, then all rats were sacrificed. The blood of the femoral artery was collected to measure the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP). Cochlea was isolated, and RT-PCR method was adopted to test the expressions of Fas mRNA. **Result**: The Fas mRNA expression in control group was 0.2101 ± 0.0256, and 0.5514 ± 0.0903 in model group, but Bushen Huoxue Fang was 0.2429 ± 0.0525. The model group enhanced the Fas mRNA expression compared with the control group ($P < 0.01$); Bushen Huoxue Fang decreased the Fas mRNA expression, compared with model group ($P < 0.01$). **Conclusion**: Bushen Huoxue Fang may regulates the mRNA expression of Fas, therefore can improve the hearing and protect the structure and function of cochlea.

[**Key words**] Bushen Huoxue Fang; kidney-yang-deficiency; cochlea; Fas mRNA; kindey and ear

中医早在《内经》中已提出了"肾主耳""肾开窍于耳"、"肾气通于耳,肾和则耳能闻五音矣"等理论。近年来细胞凋亡在耳鼻喉科疾病的发生、发展过程中的作用日益受到国内外学者的重视,而 Fas 系统是近来研究较多的介导细胞凋亡信号转导系统。在前期的研究中,作者发现补肾活血方在肾阳虚所诱发的耳蜗毛细胞凋亡发生的早期,能够对抗其凋亡的发生[1]。为了阐释传统理论的科学性,本研究采用逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)的方法,从基因水平研究肾阳虚大鼠耳蜗组织 Fas mRNA 的表达,为中医肾与耳相关性理论注入新的实验依据。

1 材料

1.1 动物 选用耳廓反应灵敏的健康 SD 大鼠 24 只,体重(200 ± 20)g,雌雄各半,四川大学实验动物中心提供(川实动管质 09)。饲养于成都中医药大学附属医院药理实验中心。

1.2 试剂 氢化可的松注射液(天津金耀氨基酸有限公司,生产批号 0503171),环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)放射免疫测定箱均购自上海中医药大学同位素室,批号 20060624。

1.3 仪器 GE-100 型微型水平电泳仪(HANGZHOU DAHE THERMO-MAGNETICS CO., LTD),Thermohybaid PX2 型梯度 PCR 扩增仪(Thermo 公司),凝胶成像分析系统(Bio-Rad 公司,软件 Quantity one-4.0 版本),824 型声级计(美国 Larson Davis 公司),MEB-2200 肌电图/诱发电位仪,YE-102J 耳塞式耳机(日本 Nihon Kohden 公司)。

2 方法

2.1 造模与分组 自由喂养 1 周后,按体重、性别随机选取 8 只用作空白对照组,其余 16 只用于造模。造模:每日上午给予氢化可的松 0.02 $g \cdot kg^{-1}$ im,左右臀部交替,共 14 d,动物出现活动减少,畏寒喜暖,食欲降低,四肢消瘦,脱毛,多尿,体重降低等情况,表明肾阳虚大鼠模型造模成功。

2.2 给药方法 补肾活血方由山茱萸 30 g,熟地黄 30 g,枸杞子 20 g,怀山药 30 g,红花 10 g,水蛭 5 g,黄芪 30 g 等组成。由成都中医药大学制剂室监制,

药液生药含量 0.31 g·mL^{-1}。造模后,空白组与模型组每天 ig 10 mL·kg^{-1}的生理盐水。补肾活血方组每天 ig 3.1 g·kg^{-1}的复方,每天 ig 1 次,连续给药 2 周。

2.3 观察指标

2.3.1 一般情况观察 实验期间观察大鼠的反应、活动情况、进食量、毛色、大小便等,隔日称体重。

2.3.2 放射免疫法测定 cAMP,cGMP 股动脉采血,加 0.5 mol·L^{-1} EDTA(pH 7.5)生理盐水溶液抗凝。严格按照说明书进行操作。

2.3.3 听性脑干反应(ABR)测定 以美国 Larson Davis 公司生产的声级计,校准日本 Nihon Kohden 公司生产的 MEB-2200 肌电图/诱发电位仪 YE-102J 耳塞式耳机,确定短声听力级分贝(dB nHL)与声压级分贝(dB SPL)的对应关系。大鼠 ip 盐酸氯胺酮注射液进行麻醉。记录针电极插入颅中线前囟皮下,参考电极和地线分别置于左侧和右侧耳后皮下。耳机插入耳廓内距鼓膜 1 cm 处并保持密闭,短声(click)刺激,刺激频率 20 次/s,滤波通频带 1 Hz ~ 3 kHz,灵敏度 10 微伏/格(μv/D),分析时间 1 毫秒/格(ms/D),叠加 200 次记录 ABR。

2.3.4 耳蜗组织 Fas mRNA 的表达 大鼠取血处死后,超净工作台上快速取右侧耳蜗,每组 6 只,液氮冷冻,−70 ℃冰箱保存备用,用于提取总 RNA。将于液氮中保存的耳蜗组织充分研磨,用 RT-PCR 法,进行耳蜗组织 Fas mRNA(信使 RNA)表达的检测。采用宝生物工程(大连)有限公司合成 Fas mRNA 引物:5’-GAATGCAAGGGACTGATA-3’ up,5’-TGGTTCGTGTGCAAGGCT-3’ dw,扩增长度为 506 bp。β-actin 基因作为内参照:5’-AAGATCCTGACCGAGCGTGG-3’ up,5’-CAGCACTGTGTTGGCATAGAGG-3’dw,扩增长度为 300 bp。

2.4 数据处理 SPSS 11.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用单因素方差分析。$P<0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 动物的一般情况 造模过程中模型组大鼠逐渐出现饮食减少,体温下降,蜷缩懒动、倦怠,畏寒喜暖,反应迟钝,毛发失去光泽,体重增长缓慢等不良反应。各组大鼠给药前体重比较无统计学意义。与空白组比较,模型组大鼠体重显著下降($P<0.01$)。用药后,大鼠饮食逐渐增加,毛发逐渐恢复光泽,脱毛现象逐渐减少,体重增加明显。空白对照组未见异常。见表 1。

表 1 补肾活血方对肾阳虚大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$) g

组别	剂量/g·kg^{-1}	给药前体重	给药后体重
空白	–	205.33 ± 9.12	236.83 ± 12.19
模型	–	210.24 ± 8.34	200.17 ± 16.89[2)]
补肾活血方	3.1	206.35 ± 7.89	220.17 ± 10.34[3)]

注:与空白组比较[1)] $P<0.05$,[2)] $P<0.01$;与模型组比较[3)] $P<0.05$,[4)] $P<0.01$(表 2 ~ 3 同)。

3.2 大鼠血浆 cAMP,cGMP 含量及 cAMP/cGMP 比较 模型组大鼠 cAMP 含量及 cAMP/cGMP 均显著降低,而 cGMP 含量显著增高,说明肾阳虚造模是成功的。见表 2。

表 2 补肾活血方对肾阳虚大鼠血浆 cAMP,cGMP 含量及 cAMP/cGMP 的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量 /g·kg^{-1}	cAMP /pmol·L^{-1}	cGMP /pmol·L^{-1}	cAMP/cGMP
空白	–	441.26 ± 39.23	126.14 ± 7.37	3.51 ± 0.42
模型	–	267.48 ± 29.89[2)]	183.65 ± 7.47[2)]	1.46 ± 0.15[2)]
补肾活血方	3.1	281.76 ± 30.24[2)]	141.59 ± 17.76[3)]	2.02 ± 0.352[3)]

3.3 大鼠 ABR 阈值及耳蜗 Fas mRNA 的表达 模型组大鼠 ABR 阈值升高,与空白组相比,有统计学意义,补肾活血方组较空白组虽有升高,但无统计学意义。模型组大鼠耳蜗组织 Fas mRNA 的表达与空白组相比,明显上调,具有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,补肾活血方组 Fas mRNA 明显下调($P<0.01$)。说明模型组大鼠耳蜗组织 Fas mRNA 的表达明显升高,中药能够下调其表达。见表 3。

表 3 大鼠 ABR 阈值及耳蜗 Fas mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/g·kg^{-1}	ABR(dB SPL)	Fas mRNA
空白	–	5.83 ± 3.76	0.210 1 ± 0.025 6
模型	–	31.67 ± 7.53[2)]	0.551 4 ± 0.090 3[2)]
补肾活血方	3.1	10.90 ± 3.65[4)]	0.242 9 ± 0.052 5[4)]

4 讨论

肾阳虚动物模型是最早建立的中医证候动物模

型之一。目前皮质激素造模法是应用最为广泛,经验证成为较公认的肾阳虚模型之一。本研究动物造模后,大鼠的表现符合肾阳虚证的临床特征。检测出血浆中 cAMP 含量降低,cGMP 含量升高,cAMP/cGMP 比值降低,这也是公认的肾阳虚证的特异性病理变化之一[2]。

补肾活血方是我国著名的中医耳鼻咽喉科专家熊大经教授在多年临证基础上,依据肾耳相关性的理论原则,结合"内耳属肾"、"久虚易致瘀"的认识而总结出的有效经验方。方中山茱萸、熟地黄、枸杞子、怀山药等肝、脾、肾三阴并补且微温生少火,内寓"阴中求阳"之奥妙,温肾而养耳窍;红花、水蛭活血而通利血脉,寓补于通;全方通过补肾温阳、活血通窍,达到肾实则耳能远听的目的。研究也显示补益类中药能改善免疫功能,维持机体生理功能平衡,补肾活血方可能通过提高机体的免疫功能,从而增强内耳对致病因子的抵抗力,即中医所谓"正气存内,邪不可干";同时通过活血化瘀药物(红花、水蛭)的作用,改善耳蜗微循环,起到保护耳蜗结构与功能的目的。

细胞凋亡是机体生长发育、细胞分化、生理及病理性死亡的重要机制。内耳作为生物体的重要器官,其胚胎的发育也经历着一系列特定区域的细胞增殖、细胞凋亡、细胞分化等形态发生过程。Fas 属于 TNF/NGF 受体家族成员,Fas 与 Fas 配体结合可以诱导细胞凋亡;它不仅与机体的正常生理有关,还与各种疾病的发生、发展有着密切的关系。有研究发现补肾方右归饮可下调高表达的促凋亡 FasL 及 TNFR1 基因的转录以及 caspase-8 和 caspase-3 的活性,从而明显降低老年大鼠细胞的过度凋亡[3]。中医认为机体的衰老与肾虚有着密切的关系。由附子、肉桂、山茱萸、淮山药等组成的右归饮及枸杞均具有补肾生精的功效,能逆转衰老时 T 细胞过度凋亡的趋势,从而有助于衰老机体免疫稳态的恢复和重建。本研究观察到模型组大鼠耳蜗组织 Fas mRNA 的表达与空白组相比,明显上调,具有显著性差异($P<0.01$);补肾活血方与空白组相比无显著性差异。说明模型组大鼠耳蜗组织 Fas mRNA 的表达明显升高,中药能够下调其表达。现代药理研究发现[4],补肾中药熟地黄、枸杞子等能够对抗自由基所致的氧化损伤及产生的细胞凋亡,通过提高免疫力而达到促进细胞凋亡的目的。补肾活血方中的熟地黄、山药、枸杞子、山茱萸都有增强机体免疫功能的作用,即具有增强正气,抗御邪气的作用,从而保护正常细胞发生凋亡,符合了中医理论"扶正固本"以"祛邪"的观点。红花、水蛭等提取液对细胞凋亡也具有明显的抑制作用,从而对缺血脑细胞起到保护作用[5-6]。活血化瘀中药作为氧自由基的清除剂,通过对氧离子的清除作用,能对抗耳蜗损害时产生的脂质过氧化反应,有效保护细胞膜的结构和功能,缓解细胞凋亡发生。补肾活血方可能通过下调 Fas mRNA 的表达起到改善听力,促进耳蜗结构恢复的功能,细胞凋亡可能是促进肾阳虚后耳蜗病变发展的因子之一,耳蜗组织中 Fas 蛋白在其中起重要调控作用。

[参考文献]

[1] 李莉,王俊锋,熊大经. 补肾活血法对肾阳虚大鼠内耳细胞 Caspase-3 凋亡影响的实验研究[J]. 山西中医学院学报,2010,11(4):17.

[2] 陈英华,欧阳铁强,宋琪,等. 肾阳虚证动物模型规范化研究中诊断指标选择的初步探讨[J]. 中国中医基础医学杂志,2003,9(10):26.

[3] 郭为民,沈自尹,陈瑜. 补肾、活血类复方对老年大鼠 T 细胞凋亡相关基因表达调控模式的比较研究[J]. 中国中西医结合杂志,2002,22(3):203.

[4] 李龙萱,赵斌,许志恩,等. 熟地黄抑制阿尔茨海默病样大鼠海马神经元凋亡的作用[J]. 中华神经医学杂志,2006,5(1):10.

[5] 曹翠丽,马常升,马文领,等. 中药水蛭对缺血/再灌注后脑细胞的抗凋亡作用[J]. 河北医科大学学报,2000,(4):193.

[6] 赖真,李丽珊,程少冰. 黄芪加红花对脑缺血再灌注后神经细胞凋亡及半胱氨酸蛋白酶-3 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(2):45.

[责任编辑 聂淑琴]