

· 药理 ·

缩泉丸对自然衰老大鼠逼尿肌 β_3 -肾上腺素能受体 mRNA 表达的影响

操红缨¹, 吴君², 吴清和^{1*}, 黄萍¹

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 山东中医药高等专科学校, 山东烟台 264100)

[摘要] **目的:**观察自然衰老大鼠逼尿肌 β_3 -肾上腺素能受体(AR)mRNA 表达的改变,探讨缩泉丸“缩尿”的机制。**方法:**取老年大鼠(20月龄)50只,青年大鼠(3月龄)10只。设置组别为:空白对照组、模型对照组、金匮肾气丸组($1.08 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、缩泉丸高、中、低剂量组($0.293, 0.585, 1.170 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 每组10只。空白对照组和模型对照组给予同体积蒸馏水,缩泉丸低、中、高剂量组给予相应浓度的缩泉丸药液,金匮肾气丸组予金匮肾气丸药液,连续4周。选用代谢笼法测量大鼠24h尿量及水负荷5h尿量,采用PCR方法检测自然衰老大鼠逼尿肌 β_3 -AR mRNA 表达。**结果:**缩泉丸中、高剂量组24h尿量明显减少,分别为(4.18 ± 2.07), (4.16 ± 1.54) $\text{mL} \cdot (100\text{g})^{-1}$;缩泉丸低、中、高剂量组水负荷后5h内尿量明显减少,分别为(1.08 ± 0.43), (0.99 ± 0.54), (0.96 ± 0.49) $\text{mL} \cdot (100\text{g})^{-1}$;自然衰老大鼠逼尿肌 β_3 -AR mRNA 表达明显下降($P < 0.05$),相对比值为 1.61 ± 0.045 ;给予缩泉丸后,中、高剂量可以显著提高自然衰老大鼠膀胱逼尿肌中 β_3 -AR mRNA 的表达($P < 0.05$),相对比值为 $1.63 \pm 0.036, 1.70 \pm 0.061$ 。**结论:**缩泉丸可以上调自然衰老大鼠逼尿肌 β_3 -ARmRNA 的表达,可能是其发挥“缩尿”作用的机制。

[关键词] 缩泉丸;自然衰老大鼠; β_3 -肾上腺素能受体 mRNA

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0125-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20111107.1625.005 **[网络出版时间]** 2011-11-07 16:25

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20111107.1625.005.html>

Effects of Suoquan Wan on β_3 -ARmRNA Expression of Detrusor in Natural Aging Rats

CAO Hong-yin¹, WU Jun², WU Qing-he^{1*}, HUANG Ping¹

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou Guangdong 510006, China;

2. Shandong College of Traditional Chinese Medicine, Yantai 264100, China)

[Abstract] **Objective:** The mechanism of Suoquan Wan (SQW) reducing urination was investigated by observing the change of the expression of β_3 -adrenergic receptor (AR) of mRNA in bladder detrusor of the natural aging rat. **Method:** Fifty aged rats (20 months) and 10 young rats (3 months) were chosen. Young rats were chosen as control, aged rats were randomly divided into five groups: model, Jinkui Shenqi pill group, SQW high, middle and low dose group, 10 rats in each group. The low, middle and high dose group of SQW were given the appropriate concentration ($0.293, 0.585, 1.170 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Jinkui Shenqi pill group was given appropriate liquid ($1.08 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), once everyday for four weeks. The urination after the water load in rats at 5 h and 24 h was measured in metabolic cages. β_3 -AR mRNA expression was detected by PCR in the detrusor of the natural aging

[收稿日期] 20110430(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873425);广东省中医药局科研项目(2009230)

[第一作者] 操红缨,副教授,医学博士,从事中药复方药理研究, Tel:020-39358086; E-mail:hycao@gzhtcm.edu.cn

[通讯作者] * 吴清和,教授,从事中药复方药理研究, Tel:020-39358024; E-mail:zyylb@gzhtcm.edu.cn

rats. **Result:** The 24 h urination of SQW middle and high dose group significantly decreased. The 5h urination after the water load in rats of SQW low, middle and high dose group also significantly decreased. β_3 -AR mRNA expression significantly decreased in the detrusor of the natural aging rats ($P < 0.05$). SQW high dose can remarkably elevate β_3 -AR mRNA expression in the detrusor of the natural aging rats after administration SQW. **Conclusion:** SQW can remarkably elevate β_3 -AR mRNA expression in the detrusor of the natural aging rats, which was the possible mechanism of SQW reducing urination.

[**Key words**] Suoquan Wan; natural aging rats; β_3 -adrenergic receptor mRNA

在膀胱的舒张机制中, β -肾上腺素能受体(β -AR)已被证实是调节逼尿肌舒张的主要因素。肾上腺素能神经通过 β 受体作用于逼尿肌,在膀胱充盈期能抑制逼尿肌反射,使逼尿肌松弛,从而保持膀胱顺应性^[1]。 β -AR分为3种亚型,这3种亚型都参与逼尿肌舒张功能的调节,但主要由 β_3 -AR介导逼尿肌松弛,有研究表明 β -AR的密度随年龄增加而逐渐降低,并且受体兴奋后第二信使cAMP的产生也减少,由此推测老年人不稳定膀胱发生率的增加可能与 β_3 -AR相关^[2]。本实验旨在探讨缩泉丸对自然衰老大鼠逼尿肌 β_3 -AR mRNA表达的影响,进一步阐明 β_3 -AR舒张逼尿肌的作用机制。

1 材料

1.1 动物及饲养条件 SD大鼠(3月龄),SPF级,雌雄各半,体重160~180g,由广州中医药大学实验动物中心提供,许可证号SCXK(粤)2008-0020。SD自然衰老大鼠(20月龄),SPF级,由成都达硕动物中心提供,许可证号SCXK(川)2008-24。饲养条件:温度(24±2)℃,湿度50%~70%,采用12h:12h昼夜间断照明;每天添加饲料1次,换水2次,更换垫料2次;动物自由进食、饮水。动物实验设施使用证明号0043550及0032584。

1.2 试剂与仪器 总RNA抽提试剂Trizol,美国MRC公司提供,目录号为TR-118;逆转录试剂cDNA试剂盒,Fermentas公司提供,批号00053704;实时荧光定量PCR试剂,Fermentas公司提供,批号00059932; β_3 -AR,GAPDH引物,上海生工生物有限公司提供;DEPC(Amresco),由广州美津生物技术有限公司提供;引物设计:根据Genbank GAPDH, β_3 -AR的mRNA序列,采用Primer Express 3.0软件设计3对引物,每对引物各跨一个内含子,并用BLAST检测其同源性。引物由生工生物工程(上海)有限公司提供。引物序列为:GAPDH序列(5'-3')上游引物TGCTGGG GCTGGCATTGCTC,下游引物CCCCAGGCCCTCTG TTGT,扩增长度为725bp; β_3 -AR序列(5'-3')上游引物GGGCCACATTGG-

CGCTGACT,下游引物TGGGTGTCCCGACTGTGGCA,扩增长度为314bp。

ABI实时定量PCR仪,低温离心机(Thermo),RODZ-50(H)-RE型纯水机锐思捷,高温灭菌柜(HVE-50),超低温冰箱(NEW Brunswick scientific, England),微型离心机(珠海黑马医学仪器有限公司),三用电热恒温水温箱(上海跃进医疗器械厂),JA1203N型电子天平(上海精密仪器有限公司产品)。

1.3 用具处理 塑料制品(包括枪头、EP管、枪头盒):将塑料制品逐个浸泡于0.2%DEPC水中,37℃过夜,送至120℃高压灭菌20min,然后在80℃烘烤箱中烘干,实验前将枪头放入枪头盒备用;玻璃制品(包括匀浆器、培养皿、研钵):先泡酸过夜,冲洗干净后,在0.2%DEPC水中浸泡8h左右,37℃烘干,用牛皮纸包裹,240℃烤4h后备用;金属制品(主要是手术器械):清洗干净,用锡纸包裹,240℃烘烤4h备用。

1.4 受试药物 缩泉丸,湖南汉森制药有限公司,批号100302,按设计剂量以蒸馏水配制成高、中、低3种浓度药液,给药前振荡混匀成为混悬液。金匱肾气丸,北京同仁堂科技股份有限公司,批号0030377,研钵研极细末,按设计剂量蒸馏水配制成药液,给药前振荡混匀成为混悬液。

1.5 剂量设置 参照Bios氏原法折算大鼠用药剂量,缩泉丸以临床用量折算等效剂量为中剂量,低、中、高剂量比例为1:2:4,分别为0.293,0.585,1.170g·kg⁻¹·d⁻¹;金匱肾气丸以临床用量折算等效剂量为1.08g·kg⁻¹·d⁻¹。

2 方法

2.1 动物分组与给药 取老年大鼠(20月龄)50只,青年大鼠(3月龄)10只。设置组别为:空白对照组、模型对照组、金匱肾气丸组、缩泉丸高、中、低剂量组,每组10只。根据动物公斤体重剂量折算系数法换算出给药组的剂量,空白对照组和模型对照组给予同体积蒸馏水,缩泉丸低、中、高剂量组给予

相应浓度的缩泉丸药液,金匮肾气丸组予金匮肾气丸药液,连续4周。

2.2 24 h 尿量及水负荷后 5 h 尿量 末次给药结束后,各组动物置于代谢笼中,禁食不禁水 18 h 后,留取 24 h 尿液测定尿量(放入和拿出前轻压大鼠下腹部排尽余尿)。根据大鼠体重 ig ,各组均以 $3 \text{ mL} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$ 的生理盐水做水负荷,然后按其下腹部,排尽尿液,放入代谢笼内,收集 5 h 内尿量。

2.3 采用 PCR 法进行 mRNA 测定

2.3.1 取材 处死动物后,即刻由腹部正中切口、于双侧输尿管汇入膀胱平面处横断并取出膀胱,于解剖镜下在冰块上仔细剔除膀胱外膜,纵行剖开膀胱,去除膀胱黏膜。用灭菌铝箔包好后置于液氮中,冻透后再转入 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

2.3.2 逼尿肌总 RNA 的提取 将 40 mg 膀胱组织加入 1 mL Trizol 液,用小剪刀快速剪碎,注意样品总体积不能超过所用 Trizol 体积的 10%;加入 0.2 mL 的氯仿,盖紧离心管,在振荡器上震荡离心管 15 s, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ $14\ 000 \times g$ 离心 15 min;取上层水相于一新的离心管,加入 0.5 mL 异丙醇,混匀, $14\ 000 \times g$ 离心 10 min;弃去上清液,加入 1 mL 75% 乙醇,涡旋混匀, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下 $14\ 000 \text{ g}$ 离心 5 min;小心弃去上清液,室温干燥 5 ~ 10 min,然后加入 30 μL DEPC 水。RNA 保存于 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$;RNA 纯度测定[260 nm/280 nm 吸光度(A)比值]取 2 μL 总 RNA,用 98 μL 的 DEPC 水稀释,混匀,在紫外分光光度仪上测 $A_{260/280}$ 比值。

$$\text{RNA 浓度}(\text{g} \cdot \text{L}^{-1}) = A_{260 \text{ nm}} \times 40 \times \text{稀释倍数} / 1\ 000$$

$$\text{RNA 含量}(\mu\text{g}) = \text{RNA 浓度} \times \text{RNA 原液毫升数}$$

2.3.3 RT 反应(cDNA 合成) 取灭过菌且无核酸酶的 PCR 反应板放在冰上,按试剂盒说明书,PCR 20 μL 的反应体系,依次加入总 RNA, Oligo(dt) 18 引物, $5 \times$ Reaction Buffer, RibolcokTM RNase inhibitor, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP Mix, RevertAidTM M-M μ IV Reverse Transcripase。用热循环仪 $42 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 h, $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min,进行逆转录,得到 cDNA。

2.3.4 实时荧光定量 RT-PCR 扩增程序 用 Fermentas 试剂盒,在 ABI 荧光定量 PCR 仪上扩增。25 μL 荧光定量 PCR 反应体系,依次加入 SYBR Green Realtime PCR Master mix, Forward Primer, Reverse Primer, Template(cDNA), Water, nuclease-free。每次扩增都设阴性对照,即不加模板而以水代替,用于检验是否存在 PCR 污染。PCR 扩增的反应程序如下:变性($95 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 s)、退火($60 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 s)及延伸($72 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 s)。以上 3 步为 1 个循环,如此进行

40 个循环。运用 7 500 System Software 分析结果,得出各组内参基因和目的基因 Ct 值。

2.4 统计方法 所有数据采用 SPSS 15.0 统计软件处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对 24 h 尿量及水负荷后 5 h 内尿量的影响 表 1 结果提示,与模型组比较,缩泉丸中、高剂量组 24 h 尿量明显减少($P < 0.05 \sim 0.01$),缩泉丸低剂量组 24 h 尿量与模型对照组比较无统计学差异;肾气丸组 24 h 尿量亦明显减少($P < 0.05$);与模型组比较,缩泉丸低、中、高剂量组水负荷后 5 h 内尿量明显减少($P < 0.05$);肾气丸组水负荷后 5 h 内尿量亦明显减少($P < 0.05$)。

表 1 缩泉丸对 24 h 尿量及水负荷后 5 h 内尿量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$) $\text{mL} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	尿量	
		24 h	水负荷后 5 h 内
空白	-	$4.51 \pm 2.07^{1)}$	$0.99 \pm 0.46^{1)}$
模型	-	5.90 ± 1.41	1.42 ± 0.60
缩泉丸	0.293	4.82 ± 1.65	$1.08 \pm 0.43^{1)}$
	0.585	$4.18 \pm 2.07^{1)}$	$0.99 \pm 0.54^{1)}$
	1.170	$4.16 \pm 1.54^{2)}$	$0.96 \pm 0.49^{1)}$
肾气丸	1.08	$4.50 \pm 1.04^{1)}$	$0.96 \pm 0.59^{1)}$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 对自然衰老大鼠逼尿肌 β_3 -AR mRNA 表达的影响 与模型组比较,缩泉丸高剂量组显著提高自然衰老大鼠膀胱逼尿肌中 β_3 -AR mRNA 的表达($P < 0.05$);金匮肾气丸组亦显著提高自然衰老大鼠膀胱逼尿肌中 β_3 -AR mRNA 的表达($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 缩泉丸对自然衰老大鼠逼尿肌 β_3 -AR mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	β_3 -AR mRNA 相对比值
空白	-	$1.69 \pm 0.08^{2)}$
模型	-	1.61 ± 0.05
缩泉丸	0.293	1.64 ± 0.09
	0.585	1.63 ± 0.04
	1.170	$1.70 \pm 0.06^{1)}$
肾气丸	1.08	$1.68 \pm 0.04^{1)}$

4 讨论

本实验选用自然衰老大鼠为肾虚多尿模型,缩泉丸可以明显减少其 24 h 尿量及水负荷后 5 h 内的

尿量。为了进一步阐明缩泉丸“缩尿”机制,采用 RT-PCR 对各组动物膀胱逼尿肌上 β_3 -AR mRNA 的表达进行了实验研究。肾上腺素 β -受体主要分布在膀胱体,兴奋后可以使膀胱松弛。

β_3 -AR 能够介导逼尿肌松弛,具有拮抗 M 受体的作用,可维持膀胱的顺应性和稳定性^[2],其结构与功能的变化与老年人膀胱储尿功能障碍关系密切。研究表明 β 肾上腺素能受体对人逼尿肌舒张的调节可能主要是通过 β_3 -AR 亚型^[3-5]。基于以上理论,本实验采用荧光定量 PCR 检测膀胱逼尿肌 β_3 -AR mRNA 的表达,结果表明自然衰老大鼠与正常组比较膀胱逼尿肌 β_3 -AR mRNA 的表达明显下降,说明大鼠 β_3 -AR 的表达随着年龄的增加而下降,导致对逼尿肌的舒张作用减弱,膀胱储存尿液容量减少,较易引起排尿反射,增加尿液的排泄,产生多尿、尿频等症状。这与 Nishimoto^[6] 等报道大鼠膀胱 β -AR 的密度随年龄增加而逐渐降低基本相一致,并且受体兴奋后 cAMP 的产生也减少,推测老年人逼尿肌不稳定膀胱发生率增加可能与此相关。缩泉丸中、高剂量显著增加了自然衰老大鼠膀胱逼尿肌上 β_3 -AR mRNA 的表达,可以有效的舒张膀胱逼尿肌,增加膀胱的有效容量,从而减少排尿次数。

综上所述,缩泉丸治疗肾虚多尿的分子机制之一可能是通过调节逼尿肌 β_3 -AR mRNA 的表达来进行调节其舒缩的作用,从而使膀胱松弛减少尿量。

为了更进一步阐明 β_3 -AR 舒张逼尿肌的作用机制,本课题将从其信号转导进行更深入的探讨。

[参考文献]

- [1] 曹文峰,宋波,陈昭颀,等. 逼尿肌不稳定与肾上腺能 β_3 受体及其亚型关系的实验研究[J]. 成都军区医院学报,2003,5(2):3.
- [2] Yamanishi T, Christopher R, Yoshida K, et al. The role of beta (3) adreno receptors in mediating relaxation of porcine detrusor muscle[J]. Br J Pharmacol, 2002, 135 (1):129.
- [3] Uvelius B. Relation between mechanical and morphological characteristics in urinary bladder smooth muscle [J]. Acta Physiol Scand (supply),1980,483:1.
- [4] Igawa Y, Yamazaki Y, Taceda H, et al. Functional and molecular biological evidence for a possible beta3-adrenoceptor in the human detrusor muscle [J]. Br J Pharmacol,1999,126(3):819.
- [5] Fujimura T, Tamura K, Tsutsumi T, et al. Expression and possible functional role of the beta3-adrenoceptor in human and rat detrusor muscle [J]. J Urol, 1999, 161 (2):680.
- [6] Nishimoto T, Iatifeur J, Wheeler A M, et al. Age-dependent alteration in-adrenergic responsiveness of rat detrusor smooth muscle[J]. J Urol,1995,153(5):1701.

[责任编辑 聂淑琴]

本刊欢迎网上投稿

《中国实验方剂学杂志》2010 年正式施行网上投稿,请登录本刊网站 www.syfjxzz.com 注册会员,登陆采编系统之后按照提示在线投稿。本刊对网上来稿免收稿件处理费。编辑部对来稿有修改权。经审后,如录用,请按通知要求交纳论文发表费。详见本刊稿约。