

• 药理 •

# 健脾与补肾对脑内精氨酸加压素水平和基因表达的影响

钱会南\*, 胡雪琴, 沈丽波, 吴海霞  
(北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的: 比较健脾与补肾对脑内精氨酸加压素(AVP)水平和基因表达的影响。方法: 采用苦降泻下、饮食失节加劳倦过度法建立脾虚大鼠模型, 以免疫组化和原位杂交法检测下丘脑腹侧核、海马CA1区、前额叶皮层精氨酸加压素(AVP)基因表达变化。结果: 模型组上述脑区AVP免疫阳性反应物明显降低; 健脾组与补肾组上述脑区的AVP免疫阳性反应物明显升高。模型组下丘脑腹侧核、海马CA1区、前额叶皮层AVP mRNA表达显著下降; 健脾组与补肾组AVP mRNA表达明显升高。结论: 脾虚模型脑内对学习记忆有促进作用的AVP水平和基因表达有变化, 健脾与补肾可能通过调节AVP水平和基因表达而影响学习记忆能力。

[关键词] 脾虚模型; 精氨酸加压素; 基因表达

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)11-0030-03

## The Influence of Invigorating Spleen and Restoring Virility on the Arginine Vasopressin Level in Brain and Gene Expression

QIAN Hui-nan\*, HU Xue-qin, SHEN Li-bo, WU Hai-xia  
(The Chinese Medicine University of Peking, Beijing, 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To Study the influence of invigorating spleen and restoring virility to the AVP level in brain and gene expression. **Method:** Establishing the spleen insufficiency model of rat by adopting bitter decline diarrhea, wild eating and overworking, the hypothalamus ventral kernel, the hippocampi CA1 area and forehead cortex, the gene expression change of AVP were examined. **Result:** In the model group, the immunoreaction masculine substance of AVP, hypothalamus ventral kernel, hippocampi CA1 area and prefrontal cortex decreases obviously; The immunoreaction masculine substance of AVP on above mentioned parts in the group of invigorating spleen and restoring virility increases distinctly. In the model group, the expression of AVP mRNA on hypothalamus ventral kernel, hippocampi CA1 area and prefrontal cortex decreases obviously; While for the groups of invigorating spleen and restoring virility, they increases obviously. **Conclusion:** Invigorating spleen and restoring virility may affect study and memory ability by regulating the AVP level and gene expression.

[Key words] the spleen insufficiency model; Arginine Vasopressin; gene expression

[收稿日期] 2006-03-13

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题(NO. 30171188); 北京中医药大学科研课题(Y2000PT007)

[通讯作者] \* 钱会南, Tel: (010) 64286312; E-mail: qhnan2004-2001@yahoo.com.cn

脾与肾在神志活动中具有重要作用, 而且脾与肾后天与先天相互资生, 相互促进。脾虚证是临床常见的病证之一, 脾虚证的实验研究一直受到医界的关注, 其研究涉及中医脾虚与消化吸收功能、免疫功能、内分泌及生殖功能、微量元素和血液流变学指

标变化的关系,以及脾主运化、主肌肉、主统血等功能的专题研究等多方面<sup>[1]</sup>。但对脾藏意主思,脾虚之精神萎靡、健忘机制的实验研究甚少。本研究观察脑内与学习记忆密切相关的精氨酸加压素(AVP)水平和基因表达变化,以及健脾与补肾的干预作用,为阐发脾藏意、肾藏志理论提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 清洁级雄性 Wistar 大鼠,体重 160g ± 10g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物许可证号:SCXK(京)2002-0003。

**1.2 药物** 造模药物由大黄、厚朴、枳实组成,按 2:1:1 配备。健脾方为归脾汤原方<sup>[2]</sup>;补肾方为六味地黄丸原方<sup>[2]</sup>。药材由金象大药房提供。以上方药分别常规煎煮,过滤,常规浓缩为生药 1g/mL 药液,冰箱储存备用。

**1.3 试剂** AVP (AVP1 抗多克隆兔抗)免疫组化试剂盒由上海第二军医大学神经解剖教研室提供。正常羊血清 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 抗(生物素标记的 IgG) 3 抗(ABC 复合物) PBS 枸橼酸钠 3-3 二氨基联苯胺(DAB)均购自北京中山生物公司;多聚甲醛购自北京鼎国生物公司。AVP 原位杂交试剂盒由上海第二军医大学神经解剖教研室提供。(试剂盒包括:杂交液、地高辛标记的 AVPcRNA 探针,BCIP/NBT 显色剂等)。Anti-Digoxigenin AP (Roche 公司);牛血清蛋白冻干粉、蛋白酶 K、DEPC Sigma 公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

**1.4 主要仪器** OLYMPUS 光学显微镜(日本);OLYMPUS 自动显微镜照相系统(日本);DH3600AB 电热恒温培养箱(天津);TS-100 脱色摇床(北京);BDS1 电热三用水浴箱(北京);DHG9075A 电热恒温鼓风干燥箱(上海);Leitz 切片机(德国)。

## 2 方法

**2.1 动物分组和处理** 大鼠常规适应性饲养 1 周后,40 只大鼠随机分成正常组,模型组,健脾组,补肾组,每组各 10 只。采用苦降泻下、饮食失节加劳倦过度法造模<sup>[3]</sup>。造模组每日灌胃造模药 7.5g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>,隔日禁食,自由饮水,每日于 25℃水中游泳至力竭。健脾组(造模处理加胃饲归脾汤) 7.5g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>;补肾组(造模处理加胃饲六味地黄丸) 7.5g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>。每日上午对除正常组外的 3 个组胃饲造模药,正常组予等量生理盐水;下午予健脾组补肾组分别胃饲相应中药。并观察大鼠活动状态、排便、

进食量、体重等。连续处理 6 周。

**2.2 标本的采集与制备** 大鼠造模及药物处理 6 周以后,各组大鼠经 10% 水合氯醛(0.4mL/100g 体重)麻醉后,立即打开胸腔,暴露心脏,经左心室插管至升主动脉,首先灌注预冷的生理盐水,然后灌注预冷的 4% 多聚甲醛溶液;取脑,用蒸馏水漂洗后,置 4% 多聚甲醛溶液中固定 45min;常规石蜡包埋。石蜡切片机冠状连续切片,片厚 6μm,常温保存备用。(注:用于原位杂交的所有试验用品均用 DEPC 浸泡,高温高压灭菌,保证样品无 RNA 酶污染。)

**2.3 AVP 免疫组化操作方法** 按照试剂盒使用说明,常规切片脱蜡至水;甲醇配 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,室温孵育 30min;0.01M PBS 洗 3 次 × 5min;0.01M 枸橼酸缓冲液热修复;0.01M PBS 洗 3 次 × 5min;蛋白酶 K 消化 30min(37℃);0.01M PBS 洗 3 次 × 5min;滴加正常羊血清 30min(37℃);滴加 1 抗(浓度 1:80);(阴性对照组滴加正常羊血清代替 1 抗);0.01M PBS 洗 3 次 × 5min;滴加 2 抗,2h(37℃);0.01M PBS 洗 3 次 × 5min;滴加 3 抗 2h(37℃);0.01M PBS 洗 3 次 × 5min;DAB 显色;常规脱水、二甲苯透明;树胶封片。

**2.4 AVP 原位杂交方法** 按照试剂盒使用说明,常规切片脱蜡至水;浸入 0.2% tritonX-100/PBS 重新水化,PBS 洗 2 次 × 3min;1μg/mL 蛋白酶 K 的渗透液中 37℃孵育 15min;0.1mol/L 甘氨酸 PBS 溶液室温孵育 5min,终止蛋白酶 K 活性;4% 多聚甲醛室温固定核酸 3min;PBS 洗 3 次 × 3min;浸入 0.1mol/L 三乙醇胺中,加入醋酸酐到 0.25%,室温孵育 10min;DEPC 水中漂洗,晾干;探针溶于 42℃杂交液中,浓度为 5ng/μL,每张片滴加杂交液 50μL(阴性对照组不滴加探针);封口膜覆盖,置于 5 × SSC 的湿盒,42℃杂交 18h;浸入 42℃的 2 × SSC 0.1% SDS 溶液,去掉封口膜;2 × SSC 0.1% SDS 溶液 42℃洗 4 次 × 5min;0.1 × SSC 0.1% SDS 溶液 42℃洗 2 次 × 10min;2 × SSC 溶液 42℃洗 10min;PBS 洗 10min;室温下浸入 buffer I,10min;加入 buffer II 配制的地高辛抗体,4℃过夜;buffer I 洗 3 次 × 3min;buffer III 中平衡 10min;NBT/BCIP 显色剂,室温下显色 3h 时;TE 中终止显色反应;常规脱水、二甲苯透明;中性树胶封片。

**2.5 光镜观察及图像处理** 利用 Olympus 显微镜和真彩色病理图像分析系统 4.0 版进行图象采集和处理,测量海马 CA1 区、前额叶皮层、下丘脑腹内侧核 AVP 免疫阳性反应物和 AVP mRNA 阳性反应物的平

均光密度。每组切片的每个部位测 5 个视野。

**2.6 统计学处理** 结果均采用 SPSS10.0 统计分析, 所用数据用平均值 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间差异采用方差分析(ANOVA)分析。

### 3 结果

**3.1 各组大鼠脑内 AVP 免疫组化检测结果** 下丘脑腹侧核、海马 CA1 区、前额叶皮层 AVP 免疫阳性反应物的变化结果见表 1。

表 1 各组大鼠脑内 AVP 免疫阳性反应物平均光密度比较  
( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	下丘脑腹侧核	海马 CA1 区	前额叶皮层
正常组	17.87 ± 7.68	23.11 ± 5.87	26.61 ± 4.42
模型组	1.93 ± 0.56 <sup>2)</sup>	12.41 ± 3.80 <sup>2)</sup>	12.81 ± 2.41 <sup>2)</sup>
健脾组	22.25 ± 4.24 <sup>4)</sup>	20.99 ± 3.93 <sup>3)</sup>	27.50 ± 3.79 <sup>4)</sup>
补肾组	19.54 ± 4.25 <sup>4)</sup>	21.67 ± 5.56 <sup>4)</sup>	27.09 ± 1.65 <sup>4)</sup>

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ (下同)。

**3.2 各组大鼠脑内 AVP mRNA 表达变化** 下丘脑腹侧核、海马 CA1 区、前额叶皮层 AVP mRNA 的表达变化结果见表 2。

表 2 各组大鼠脑内 AVP mRNA 阳性反应物平均光密度  
( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	下丘脑腹侧核	海马 CA1 区	前额叶皮层
正常组	10.22 ± 2.53	2.20 ± 0.90	6.76 ± 1.63
模型组	3.20 ± 0.76 <sup>2)</sup>	1.62 ± 0.33 <sup>1)</sup>	3.78 ± 0.75 <sup>2)</sup>
健脾组	9.95 ± 2.59 <sup>4)</sup>	3.31 ± 1.04 <sup>4)</sup>	7.43 ± 1.67 <sup>4)</sup>
补肾组	8.58 ± 1.95 <sup>4)</sup>	3.17 ± 0.59 <sup>4)</sup>	8.09 ± 0.91 <sup>4)</sup>

### 4 讨论

《灵枢·本神》云:“脾藏营, 营舍意。”“肾藏精, 精舍志。”认为脾胃为五脏六腑之大海, 纳化水谷精微而生营血, 是神志活动的物质基础。

归脾汤具有健脾养心, 益气补血之功, 而且以健脾为主, 临床是治疗脾虚引起的健忘、失眠、怔忡等的常用方。六味地黄丸为滋补肾阴之基础方<sup>[4]</sup>, 近来研究表明, 六味地黄汤可改善快速老化模型小鼠(SAM)学习记忆能力, 并显著降低该模型血浆皮质酮水平, 发挥益智作用<sup>[5,6]</sup>。

近年来研究表明, 外源性 AVP 可使神经细胞长时程效应正常化<sup>[7]</sup>。AVP 是学习和记忆的调节器, 并能理智地加工信息, 巩固记忆和形成条件反射等<sup>[8]</sup>。研究 AVP 片断类似物 NC-1900, 对记忆巩固和再现的促进作用, 结果显示其通过 AVP 的 V1 受

体对记忆巩固和再现的促进调节, 而且起促进效应主要是通过 V1 受体来激活蛋白激酶 K(PKC)的信号传递通路<sup>[9]</sup>。本课题组的研究显示, 脾虚模型组学习记忆能力下降<sup>[11]</sup>, 与学习记忆密切相关的神经肽 P 物质(SP)、血管活性肠肽(VIP)、胆囊收缩素(CCK)也有明显变化<sup>[12]</sup>。本研究说明, 脾虚模型组 AVP 免疫阳性反应物及 AVP mRNA 表达在下丘脑腹侧核、海马 CA1 区、前额叶皮层显著减少; 提示脾虚精神萎靡、健忘等学习记忆障碍与上述脑区 AVP 水平减少和基因表达降低有关。归脾汤与六味地黄丸治疗后, 上述脑区 AVP 及 AVP mRNA 表达显著增加, 说明二者可能通过对脑内 AVP 水平及 mRNA 表达的调节作用而影响学习记忆功能。

### [参考文献]

[1] 钱会南. 论脾虚证现代研究的特点与存在问题及对策[J]. 北京: 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(12): 63-64.

[2] 段富津. 方剂学[M]. 上海: 科学技术出版社, 1995. 126, 130.

[3] 陈小野. 脾气虚证动物模型初步规范化的造模方法和思路[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, (1): 3-5.

[4] 李瑞, 鲁兆麟. 六味地黄丸方证及病因病机考释[J]. 中国医药学刊, 2003, 21(3): 1-4.

[5] 魏小龙. 海马学习记忆功能有关基因及六味地黄汤益智作用与基因表达关系的研究[J]. 生理科学进展, 2000, 31(3): 227-231.

[6] 周建民, 张永祥, 周金黄. 六味地黄汤对快速老化模型小鼠(SAM)学习记忆能力的改善作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 1999, 5(4): 29-33.

[7] Van Den Hooff P, Urban IJA, De Wied D. Vasopressin maintains long term potentiation in lateral septum slices[J]. Brain Res, 1989, 505: 181-185.

[8] 王景周, 李强, 高唱, 等. 血管性痴呆 50 例脑脊液血管紧张素 II、精氨酸加压素变化与 P300 潜伏期的相关性[J]. 中国临床康复, 2003, 7(10): 1500-1505.

[9] Sato T, Tanaka K, Teramoto T, Ohnishi Y, Hirate K, Irifune M, Nishikawa T. Facilitative effect of a novel AVP fragment analog, NC-1900, on memory retention and recall in mice[J]. Peptides, 2004, 25(7): 1139-1146.

[10] 钱会南, 沈丽波, 胡雪琴, 等. 脾虚模型大鼠学习记忆障碍及归脾汤的改善作用[J]. 中国行为医学科学, 2006, 15(3): 202-204.

[11] 钱会南, 沈丽波, 胡雪琴, 等. 脾虚大鼠模型脑内胆囊收缩素、P 物质、血管活性肠肽变化及归脾汤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(5): 29-31.