

● 论著 ●

金匱肾气丸对“恐伤肾”模型小鼠醛固酮水平的调节作用

叶菁 邱丽瑛

(江西中医学院附属医院 南昌 330006)

摘要:目的:通过建立“恐伤肾”小鼠模型,观察其醛固酮水平的变化,探讨心理应激对醛固酮水平的影响及其机制,为进一步研究应激条件下动物免疫功能的变化提供实验依据。方法:采用自制小站台水环境实验,剥夺小鼠睡眠,使其活动受限,造成“恐惧”心理应激,建立“恐伤肾”模型。结果:应激 24h 组小鼠血清、组织中醛固酮水平的改变与正常对照组相比较,有极显著性差异($P < 0.01$);给予金匱肾气丸后,小鼠血清、组织中醛固酮水平均低于相应应激组,有显著性差异($P < 0.05$)。结论:心理应激可以引起小鼠醛固酮水平的改变,影响机体免疫功能,导致体质衰弱、病感或疾病;金匱肾气丸可以改善应激条件下小鼠醛固酮水平的变化,对心理应激小鼠的免疫功能有较好的调节作用。

关键词:金匱肾气丸;恐伤肾;心理应激;小鼠;醛固酮

Abstract:Objective:To observe the change about the level of aldosterone and to research the effect which can provides experimental basis for the role of immunological function under psychological stress via establishing “terror leading to disorder of kidney”mice model. Method: Use platform-over-water environment, deprive sleep of the mouse, restrict their activities in order to cause “terror” psychological stress and to establish the “terror leading to disorder of kidney” mouse model. Results: Compared with the normal control group, the serum and hormone level of the 24 hours stress group mice has extreme difference ($P < 0.01$).After being prescribed by Jin Kui Shen Qi Wan, the serum and hormone level of the mice was better than the corresponding group ($P < 0.05$).Conclusion: Psychological stress changes the level of aldosterone and immune function of the mouse, which lead to illness or disease ; Jin Kui Shen Qi Wan can improve the level, it also has better regulation of immunological function to the mouse which is under the psychological stress.

Key words:Jin Kui Shen Qi Wan; Terror leading to disorder of kidney; Psychological stress;Mice;Aldosterone

中图分类号:R 285.5

文献标识码:B

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2010.06.001

恐惧作为一种不良精神刺激,对肾气和肾精的直接损伤,扰乱肾脏及其它脏腑多种功能活动,影响机体正常的生理秩序,是“恐伤肾”的关键所在。笔者应用小站台水环境实验建立“恐伤肾”小鼠模型,并给予金匱肾气丸进行干预,以此研究金匱肾气丸对心理应激小鼠免疫功能的调节作用,并分析其抗心理应激损伤的作用机制,为临床防治心身疾病奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 动物分组与处理 雄性昆明种小鼠 120 只,体重(20 ± 1)g,年龄均为 10 月龄,将实验小鼠置于空气控制级别为 SPF(Specific Pathogen Free)二级、室温(24 ± 1)℃、湿度(55 ± 5)%、明暗条件 12h 转换(6 点开灯,18 点熄灯)的环境下进行实验。依据实验设计,将动物按体重随机分为 24h 应激组、24h 应激 + 给金匱肾气丸组、18h 应激组、18h 应激 + 给金匱肾气丸组、12h 应激组、12h 应激 + 给金匱肾气丸组、8h 应激组、8h 应激 + 给金匱肾气丸组、4h 应激组、4h 应激 + 给金匱肾气丸组、正常对照组、正常对照给药组,每组 10 只。动物称重后,按组放置不同的实验间。实验开始后,前十组动物站台应激,应激期间每天豆奶粉流质食物灌胃(4h 组小鼠不给予食物灌胃),每 4 小时 1 次,每次灌胃量为 0.8mL。正常对照组和正常对照给药组不参与应激实验,但同样灌

胃给食、给药。

1.2 血清醛固酮水平的检测 醛固酮含量的测定采用放免法。采集全血,尽快分离血清,将标本存放于 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 并于 24h 内测定;或置 -20°C 以下冷冻,至使用前于室温平衡,若有沉淀物形成,在平衡并混匀后 4°C 离心去除。测试试剂盒为天津九鼎医学生物工程有限公司生产的专用试剂盒,仪器为科大创新股份有限公司中佳分公司生产的 GC-911 γ 放射免疫计数仪。

1.3 组织醛固酮水平的检测 将各组小鼠处死,用 75%酒精消毒后进入超净工作台,剖开胸腹腔,在冰面上完整地迅速取出肾上腺,滤纸吸干血后,将肾上腺加 5mL DMEM 培养液用细胞匀浆器匀浆,并置于 -70°C 冰箱保存备用。组织醛固酮含量的测定仍采用放免法。测试试剂盒为天津九鼎医学生物工程有限公司生产的专用试剂盒,仪器为科大创新股份有限公司中佳分公司生产的 GC-911 γ 放射免疫计数仪。

1.4 统计学方法 所有实验结果用 SPSS11.5 软件包进行统计,样品的显著性检验用方差分析和 t 检验,百分比数值用卡方检验。

2 结果

2.1 应激不同时间对小鼠血清醛固酮的影响及中药调节 见表 1。

表 1 各组小鼠血清醛固酮水平及中药调节作用 ($\bar{X} \pm S$) mg/mL

组别	n	血清醛固酮含量
正常对照组	10	128.56± 50.83
正常对照给药组	10	140.60± 31.25
4h 应激组	10	287.19± 121.54 [#]
4h 应激给药组	10	244.28± 132.00**
8h 应激组	10	476.48± 149.73 ^{##}
8h 应激给药组	10	457.84± 256.02**
12h 应激组	10	630.77± 212.66 ^{##}
12h 应激给药组	10	558.39± 170.40**
18h 应激组	10	741.22± 228.80 ^{##}
18h 应激给药组	10	709.32± 305.35**
24h 应激组	10	917.84± 478.92 ^{##}
24h 应激给药组	10	542.36± 296.71*

注：与正常对照组相比，[#] $P < 0.05$ ；^{##} $P < 0.01$ ；与对应应激组相比，* $P < 0.05$ ，** $P > 0.05$ 。

2.2 应激不同时间对小鼠肾上腺组织醛固酮的影响及中药调节 见表 2。

表 2 各组小鼠肾上腺组织醛固酮水平及中药调节作用 ($\bar{X} \pm S$) mg/mL

组别	n	组织醛固酮含量
正常对照组	10	164.90± 42.51
正常对照给药组	10	199.86± 35.74
4h 应激组	10	199.40± 29.87
4h 应激给药组	10	167.87± 57.94**
8h 应激组	10	231.92± 72.43 [#]
8h 应激给药组	10	221.12± 53.96**
12h 应激组	10	426.94± 84.41 ^{##}
12h 应激给药组	10	350.26± 73.26**
18h 应激组	10	485.34± 89.13 ^{##}
18h 应激给药组	10	365.82± 91.46**
24h 应激组	10	594.17± 113.99 ^{##}
24h 应激给药组	10	420.59± 79.62*

注：与正常对照组相比，[#] $P < 0.05$ ，^{##} $P < 0.01$ ；与对应应激组相比，* $P < 0.05$ ，** $P > 0.05$ 。

3 讨论

心理应激是机体通过认识、评价而察觉到应激原(Stressor)的威胁时引起的心理、生理机能改变的过程。情志内伤是中医病因学之一，心理应激理论是西医学的基本病理过程之一，两种理论框架上具有一定的共通之处。由于神经-内分泌系统的变化，进而影响到机体蛋白质、糖、脂肪的代谢变化，以及心血管系统、消化系统、免疫系统、血液系统、泌尿生殖系统的病理变化^[1]。应激反应是一种全身性的综合反应，它除了激活下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA 轴)和交感神经系统-肾上腺髓质释放糖皮质激素和儿茶酚胺类物质外，还引起多种其它激素、肽类物质、细胞因子等神经内分泌介质的分泌增多，从各个方面调整机体的适应能力，以保持应激状态下内环境的稳定^[2]。

醛固酮(aldosterone, ALD)是肾上腺盐皮质激素的主要成分，是肾上腺皮质球状带细胞分泌的一种甾体激素，是电解质排泄的重要调节因子，在维持机体内环境的稳定中起着重要作用。传统理论认为其由肾上腺皮质束状带分泌，作用于肾脏集合管增加钠水重吸收和钾的排泄，主要受血管肾张素 II(Ang II)和血浆 Na⁺、K⁺ 浓度调控。束状带分泌糖

皮质激素，网状带分泌性激素，两带主要受垂体分泌的促肾上腺皮质激素(ACTH)调控。ACTH 不但促进糖皮质激素的合成与分泌，而且是维持束状带和网状带正常结构的决定因素。ALD 通过对血流动力学的影响以及直接细胞作用两种主要机制参与肾脏损伤。心理应激后可引起水盐代谢紊乱，应激和应激适应的产生通过 HPA 轴的不同位点产生神经内分泌效应，参与应激反应。在应激反应中，肾素-血管紧张素-醛固酮系统起到了重要作用。万瑜等^[3]的研究显示，肾素-血管紧张素系统与经典的应激激素反应系统(下丘脑-垂体-肾上腺皮质系统及交感-肾上腺髓质系统)之间存在密切关系。陈新等^[4]发现，在心理应激时，循环血中的血管紧张素 II 及醛固酮水平可明显升高。心理应激刺激了下丘脑-腺垂体系统，释放出更多的 ACTH，ACTH 对 ALD 的分泌有促进作用。小站台水环境作为应激原使多种激素水平升高，如肾上腺素、去甲肾上腺素、促肾上腺皮质激素、β-内啡肽、β-促脂素、血管紧张素等。这些激素均为刺激 ALD 分泌的激素，应激原持续存在，ALD 等激素水平亦持续升高。ALD 分泌调节比较复杂，它既受垂体 ACTH 的调控，又受血钠、血钾、细胞外容积的影响。在机体处于应激状态下，血浆和脑脊液中 Ang II 含量增高，大量的 Ang II 促使 ALD 分泌增加，且直接收缩血管，使患者血管强烈收缩，水钠潴留，进一步加重血液动力的障碍。如此反复，使血浆中 ALD 浓度持续上升。

中医学认为，肾主纳气，最为首要的是调节气机。从中医学角度而言，不良情志刺激首先是影响了机体正常的气机，进而气血津液及脏腑功能失调，阴阳失衡，机体的正气受到损害，这与现代应激学说的应激原理有许多相似之处，而肾主气的功能对机体的应激反应具有重要的调节作用。恐惧应激可致机体下丘脑-垂体-靶腺轴的损伤，而这又是中医肾的功能基础，这些器官的损伤必然导致“肾”的功能减退，这既证明了恐会伤肾，又初步表明了“恐伤肾”的病理机制，本研究亦为进一步研究中医肾脏与慢性心理应激的关系提供了一定的实验依据，对中医“恐伤肾”理论的研究等都具有良好的理论价值和现实意义。

本实验研究表明，金匱肾气丸抑制慢性心理应激小鼠 HPA 轴的兴奋性，可以有效地改善小鼠的心理应激反应。本方为一首治疗肾虚证的方剂，其组方以及药物的配伍特点为补阴药与助阳药相互为用，以阴生阳长，阴阳互根；其作用为温补肾阳，能调节肾的生理功能，肾主气化，为生命之本，本方具

益气养阴活血法对胃癌前病变大鼠 MEK/ERK 的影响

刘小莲 谢晶日 李明
(黑龙江中医药大学 哈尔滨 150040)

摘要:目的:研究益气养阴活血法对胃癌前病变大鼠 MEK/ERK 的影响。方法:75 只 Wistar 大鼠被随机分成模型组、空白组、中药低剂量组、中药高剂量组和维霉素组,每组 15 只。采用以 MNNG 为主的四因素联合造模法建立胃癌前病变的大鼠模型,维霉素组给予维霉素混悬液 1.0g/kg 每日 1 次灌胃;中药低剂量组、中药高剂量组大鼠分别给予生药浓度为 1.0g/mL、2.0g/mL 的益气养阴活血方中药煎剂(10mL/kg)每日 1 次灌胃。16 周后观察大鼠胃黏膜病理变化,以及对 MEK1 和 ERK1 水平的影响。结果:模型组大鼠胃黏膜 MEK1、ERK1 水平与空白组比较升高 ($P<0.05$),中药高剂量组大鼠胃黏膜 MEK1、ERK1 水平与模型组比较降低($P<0.05$),中药高剂量组大鼠胃黏膜病理改变得到改善。结论:益气养阴活血法可改善胃癌前病变大鼠胃黏膜病理状况,下调胃黏膜 MEK1 及 ERK1 水平。

关键词:益气养阴活血法;胃癌前病变;MEK;ERK

Abstract:Objective:To study the effect of Yiqi Yangyin Huoxue principle on the MEK/ERK pathway in rats with precancerous lesions of gastric carcinoma. Method: 75 Wistar rats were randomly divided into model group, normal control group, low dose group, high dose group and weimeisu group. The rat model of precancerous lesions of gastric carcinoma (PLGC) was established by four pathogenic factors in which MNNG was mainly used. Weimeisu was given 1.0g/kg per day in weimeisu group; Yiqi Yangyin Huoxue recipe of 1.0g/mL, 2.0g/mL drug concentration were given 10mL/kg per day in low dose group and high dose group. After 16 weeks, to observe the pathological changes in rat gastric mucosa as well as MEK1 and ERK1 levels. Result: The level of MEK1 and ERK1 in model group was significantly increased compared with normal control group ($P<0.05$). The level of MEK1 and ERK1 in high dose group was significantly reduced compared with the model group ($P<0.05$). The pathological changes were significantly improved in high dose group. Conclusion: Yiqi Yangyin Huoxue principle can improve the pathological conditions of gastric mucosa in rat with PLGC, and it can also prevent the progress of PLGC by reducing MEK1 and ERK1 levels.

Key words: Yiqi Yangyin Huoxue principle; Precancerous lesions of gastric carcinoma; MEK; ERK

中图分类号: R 735.2

文献标识码: B

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2010.06.002

胃癌前病变 (PLGC) 是指胃黏膜上皮异型增生、胃黏膜肠上皮化生等病理组织学改变,是胃黏膜从正常向胃癌转化过程中的一个重要阶段。我们的临床实践和研究发现,发生在慢性萎缩性胃炎基础上的胃癌前病变往往具有口干渴、裂纹舌、胃黏膜萎缩、胃液分泌不足等胃阴不足等特征,提出以益气养阴活血法为主治疗 PLGC 的理论。前期研究表明益气养阴活血法可使 PLGC 大鼠胃黏膜炎症、超微结构明显改观,可部分逆转胃黏膜的肠化生和异型增生,有效地抑制胃癌前病变的发展^[1,2]。本实验目的在于研究益气养阴活血法对胃癌前病变大鼠 MAPK 通路核心因子 MEK1、ERK1 的影响。

1 实验材料

1.1 实验动物 Wistar 雄性大鼠 75 只,体重 60~80g,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供。

1.2 药物与试剂 益气养阴活血方系黄芪、焦术、沙参、石斛、三棱、莪术、白花蛇舌草等组成,由黑龙江中医药大学附属医院制剂室制成 1.0g/mL、2.0g/mL 的中药煎剂。维酶素片购自北海阳光药业有限公司, N- 甲基 -N'- 硝基 -N- 亚硝基胍 (MNNG) 购自日本东京化成工业株式会社,食用酒精购自黑龙江华润酒精有限公司, ELISA 试剂盒购自美国 ADL 公司。

江中医药大学附属第一医院药剂室制成 1.0g/mL、2.0g/mL 的中药煎剂。维酶素片购自北海阳光药业有限公司, N- 甲基 -N'- 硝基 -N- 亚硝基胍 (MNNG) 购自日本东京化成工业株式会社,食用酒精购自黑龙江华润酒精有限公司, ELISA 试剂盒购自美国 ADL 公司。

2 实验方法

2.1 动物模型 将 MNNG 溶于水中让大鼠自由饮用, 饮水瓶用油漆涂黑避光, MNNG 应用时新鲜配制, 浓度为 100μg/mL, 灌胃量 2 mL/ 只。辅以 35% 无水乙醇 2 mL/ 只每周一、四下午灌胃各 1 次, 60℃ 热面糊 2mL/ 只每周二、五下午灌胃各 1 次。含雷尼替丁 0.3g/kg 的标准饲料喂养, 造模时间 16 周。

2.2 分组与处理 75 只大鼠随机分为空白组、模型组、维霉素组、中药低剂量组 (简称低剂量组)、中药高剂量组 (简称高剂量组), 每组 15 只, 在相同条件下, 分笼饲养, 适应性饲养 3d 后开始实验。空白组损伤作用。

参考文献

[1]金惠铭.病理生理学[M].北京:人民卫生出版社,2009.136-138
[2]邵枫,林文娟,王玮雯.心理应激的免疫抑制作用及神经内分泌反应的相关性[J].心理学报,2001,33(1): 43-47
[3]万瑜,杨钢,万曙霞,等.肾素-血管紧张素系统-应激激素反应系统[J].生理学报,1996,48(6): 521-522
[4]陈新,赵英,何爱桃,等.心理应激前后血液中部分血管活性物质浓度的变化[J].中国行为医学科学,2003,12(2): 148-149

(收稿日期: 2010-05-06)