

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)23-2206-03

养阴抗毒胶囊 2 号对阴虚大鼠糖皮质激素受体蛋白表达的影响

丁鑫, 侯颖, 雒岩, 史恒军 (第四军医大学唐都医院中医科, 陕西西安 710038)

Effect of Nourishing Yin Antitoxic Capsule 2 on glucocorticoid receptor protein expression in Yin deficiency rats induced by hydrocortisone

DING Xin, HOU Ying, JU Yan, SHI Heng-Jun

Department of Traditional Chinese Medicine, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

【Abstract】 AIM: To observe the effect of Nourishing Yin Antitoxic Capsule 2 (YC2) on the expression of glucocorticoid receptor proteins (GR) in Yin deficiency rats induced by hydrocortisone, and to investigate how the YC2 relieves the side effects of Glucocorticoid. **METHODS:** Thirty-two SD rats were randomly allocated to 4 groups: normal control group, Yin deficiency model control (YD) group, YC2 group and Guifu Dihuang Balls (GFB) group. Radio-immunological method was used to observe the contents of corticosteroid (CORT). Immunohistochemistry was used to observe the expression of GR in the liver cell nucleus. **RESULTS:** Compared with the normal group, the contents of CORT were higher in YD group ($P < 0.05$), which was (9.92 ± 0.69) $\mu\text{g/L}$, and the expression of GR in the liver cell nucleus was lower for the optical density ratio of immunohistochemistry stain (0.316 ± 0.017 , $P < 0.05$). Compared with the YD group, the contents of CORT in YC2 group were lower ($P < 0.05$), which was (7.28 ± 0.72) $\mu\text{g/L}$, and the expression of GR in the liver cell nucleus was higher for the optical density ratio of immunohistochemistry stain (0.342 ± 0.013 , $P < 0.05$); the contents of CORT in GFB group were little lower ($P > 0.05$), and the expression of GR in the liver cell nucleus was little higher ($P > 0.05$). **CONCLUSION:** In this experiment, the contents of CORT in YD group were obviously higher than the normal group, and the expression of GR in the liver cell nucleus was lower. The YC2 can increase the expression of GR in the liver cell nucleus, and improve the hyperfunction of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis.

【Keywords】 Nourishing Yin Antitoxic Capsule 2; glucocorticoids; Yin-deficiency; glucocorticoid receptor; rats

【摘要】目的 观察养阴抗毒胶囊 2 号 (YC2) 对阴虚大鼠模型肝组织糖皮质激素受体 (GR) 蛋白表达的影响和对减轻激素副作用机理。方法 SD 大鼠 32 只, 随机分为空白对照组、阴虚模型组 (YD)、YC2 组和桂附地黄丸组 (GFB)。大鼠在中药预处理及造模给药 9 d 后处死, 用放射免疫方法检测各组血浆皮质醇 (CORT) 含量, 免疫组织化学染色技术测定肝组织细胞核内 GR 表达情况。结果: YD 组 CORT 含量为 (9.92 ± 0.69) $\mu\text{g/L}$ 与空白对照组相比, 明显升高, 肝组织细胞核内 GR 染色光密度比值为 0.316 ± 0.017 , 明显减少 ($P < 0.01$)。YC2 组血浆 CORT 含量为 (7.28 ± 0.72) $\mu\text{g/L}$, 均不同程度低于 YD 组 ($P < 0.05$), 同时肝组织细胞核内 GR 染色光密度比值为 0.342 ± 0.013 , 较 YD 组明显增加 ($P < 0.05$)。GFB 组与 YD 组相比, 血浆 CORT 含量稍低 ($P > 0.05$), 肝组织核 GR 蛋白表达稍增高 ($P > 0.05$)。结论 本实验中阴虚大鼠模型血浆 CORT 含量明显升高, 肝组织细胞核内 GR 表达明显减少, 而 YC2 能提高阴虚大鼠肝组织细胞核内 GR 表达, 改善下丘脑-垂体-肾上腺 (HPA) 轴功能亢进状态, 减轻激素副作用。

【关键词】 养阴抗毒胶囊 2 号, 糖皮质激素类, 阴虚, 糖皮质激素受体, 大鼠

【中图分类号】 R286 **【文献标识码】** A

0 引言

养阴抗毒胶囊 2 号 (yin antitoxic capsule 2, YC2) 已临床应用多年, 其作用为滋阴解毒, 清热活血。它对大剂量外源性糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 所致的阴虚症状有明显的改善作用。前期试验证明 YC2 能有效的保护模型动物肾上腺皮质网状带不受大剂量外源性 GC 的破坏, 明显改善 GC 作用下下丘脑-垂体-肾上腺 (hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) 轴功能亢进状态, 对 GC 所致的各种阴虚症状有很好的疗效^[1-2]。我们在前期研究的基础上继续观察该方对应用 GC 所致阴虚大鼠糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 的影响及调节作用, 为临床进一步应用 YC2 治疗激素副反应提供了实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 清洁级 SD 大鼠 32 只, 雄性, 体质量 (200 ± 20) g (第四军医大学实验动物中心), 合格证编号 SCXK(军)2002-005。饲养于第四军医大学实验

收稿日期 2006-04-13; 接受日期 2006-08-29

通讯作者: 史恒军。Tel (029) 84777441 Email zmsleep@fmmu.edu.cn

作者简介: 丁鑫, 硕士生 (导师史恒军)。Tel (029) 84777927

Email dlingxin105@163.com

动物中心清洁级动物实验室。

1.1.2 试剂 YC2(第四军医大学唐都医院药剂科)批号 20050406。药物组成:羚羊角、西洋参、石斛、生地黄、茜草、连翘、仙鹤草、大蓟、小蓟等。将胶囊内药物再次粉碎,过 100 目筛,使用前 1 d 加入蒸馏水配制成浓度为 200 g/L 的混悬液,4℃ 保存备用;桂附地黄丸(浓缩丸)(兰州佛慈集团),批号 2005464 将药丸加蒸馏水化解,制成含 200 g/L 药物的混悬液,4℃ 保存备用;氢化可的松(山东新华制药有限公司)批号 0504041,使用前加入蒸馏水配制成浓度为 5 g/L 的混悬液;速眠新 II 注射液(军事医学科学院军事兽医研究所),批号(2004)005013;皮质醇(CORT)放射免疫分析试剂盒(北京北方生物技术研究所),批号 051020;兔抗大鼠多克隆抗体,批号:sc1004(美国 Santa Cruz 公司);即用型非生物素免疫组化 EliVision plus 检测试剂盒(福建迈新),批号:kit5901。

1.1.3 主要仪器 美国 16 探头全自动测量 γ 计数仪;恒温离心机(TJL-16G-A,上海安亭);奥林巴斯显微照相系统。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组 SD 大鼠 32 只,随机分为空白对照组,阴虚模型(yin deficiency model control, YD)组, YC2 组,桂附地黄丸(guifu dihuang balls, GFB)组(阴性对照组)4 组,每组 8 只。

1.2.2 动物药物处理 YC2 组和 GFB 组在每天早晨按 10 mL/kg 浓度给予相应的药液灌胃,空白对照组及 YD 组给予同样体积饮用水灌胃,共 3 d。第 4 日起除空白对照组外,其余各组均按阴虚大鼠模型复制方法^[3-4],每日 17:00 按 50 mg/kg 剂量给予氢化可的松灌胃,连续 4 d,空白对照组给予相应量饮用水。各组均在造模结束 1 d 后(第 9 日)处死取血。

1.2.3 大鼠血浆皮质醇测定 各组大鼠于第 9 日 08:00~12:00 间,以 1 mL/kg 剂量给速眠新 II,麻醉后心脏取血 4 mL,4℃ 3000 r/min 离心 10 min 分离血清,用放射免疫法(RIA)测定血浆 CORT(corticosteroid, CORT)。

1.2.4 大鼠肝脏 GR 免疫组织化学分析 大鼠处死后取适量肝脏组织,置体积分数为 40 g/L 的甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋切片。切片经常规脱水后,在体积分数为 3 mL/L 甲醇于室温下放置 10 min。去除内源性过氧化物酶,加人体积分数为 100 mL/L 山羊血清封闭非特异性背景 15 min。加 1:100 稀释的兔抗大鼠 GR 一抗 24 h 过夜,再使用非生物素免疫组化 EliVision plus 检测试剂盒,按试剂盒说明添加 A

液 B 液, DAB 显色,苏木素轻度复染,脱水,透明,中性树胶封固。阴性对照用 0.01 mol/L PBS 代替一抗,其余步骤不变。

统计学处理 大鼠血浆 CORT 测定的原始数据;免疫组化照片经灰度扫描转化为吸光度比值(image-pro 5)。采用 SPSS 13.0(ONE-WAY ANOVA)程序进行方差齐性检验后,继而进行方差分析和 LSD 检验。

2 结果

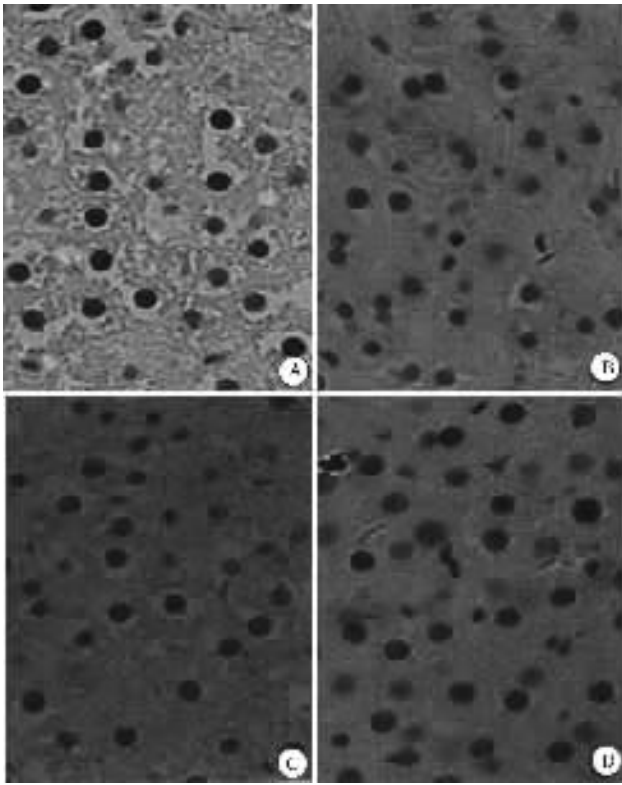
2.1 大鼠的表现 YD 组和 GFB 组自氢化可的松灌胃第 2 日起出现易怒,躁动不安,毛色不光。YC2 组大鼠的情况与空白对照组相似,未出现上述表现。

2.2 大鼠肝组织血浆 CORT 含量 空白对照组血浆 CORT 含量为 $(5.27 \pm 0.57) \mu\text{g/L}$; YD 组血浆 CORT 含量为 $(9.92 \pm 0.69) \mu\text{g/L}$,明显高于空白对照组 ($P < 0.05$) 约为空白对照组的 1.88 倍,说明动物模型造模成功。YC2 组血浆 CORT 含量为 $(7.28 \pm 0.72) \mu\text{g/L}$,明显低于 YD 组 ($P < 0.05$) 约为 YD 组的 0.73 倍,提示滋阴药对外源性 GC 应用早期所致阴虚大鼠血浆 CORT 亢进有明显抑制作用。GFB 组大鼠血浆 CORT 含量为 $(9.03 \pm 0.69) \mu\text{g/L}$,与 YD 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 提示助阳药对外源性 GC 应用早期所致阴虚大鼠血浆 CORT 亢进没有抑制作用。

2.3 大鼠肝组织细胞核 GR 蛋白表达 免疫组化染色结果显示,正常情况下 GR 在肝脏组织细胞核内广泛表达,免疫组化阳性反应较强,呈棕褐色,其吸光度比值为 0.425 ± 0.017 (图 1A)。YD 组与空白对照组相比肝组织核内 GR 蛋白表达减少,吸光度比值为 0.316 ± 0.017 ($P < 0.01$),提示阴虚模型建立成功(图 1B)。YC2 组较 YD 组肝组织核内 GR 蛋白表达增多,吸光度比值为 0.342 ± 0.013 ($P < 0.05$),但仍然与正常组水平相差较大 ($P < 0.05$,图 1C)。GFB 组肝组织核 GR 蛋白表达较 YD 组无统计学差异 ($P > 0.05$),其吸光度比值仅为 0.328 ± 0.007 (图 1D)。

3 讨论

GC 作为临床广泛应用的药物,具有抗炎、抗过敏、抗休克和免疫抑制作用,但同时又有许多副作用。临床观察已证实大剂量应用 GC 阶段,副作用主要表现为亢奋、焦躁不安、潮热、盗汗等类肾上腺皮质功能亢进症状,中医辨证为肾阴虚证;在 GC 撤停阶段,则表现为乏力、纳差、精神不振、低血压等肾上腺皮质功能减退症状,中医辨证为肾阳虚证。既往实验大多观察助阳药对抗激素副作用,已证实其机制与



A: 空白对照组大鼠肝组织; B: YD 组大鼠肝组织; C: YC2 组大鼠肝组织; D: GFB 组大鼠肝组织。

图1 各组大鼠肝组织细胞核 GR 蛋白表达的改变 DAB × 400

HPA 轴功能减退密切相关, 补阳药物对于改善 HPA 轴功能减退有很好疗效^[5-6]。随着激素服用方法的改进, 在足量激素应用阶段, 患者更多地出现面色潮红、心悸、烦躁、脉细数等阴虚症状。中医辨证为阴虚内热, 认为药毒伤阴, 唯有用滋阴润燥、养阴益气之药, 才能保证激素的疗效, 减少其毒副作用的发生。我们通过在规定时间内给予大鼠大剂量 GC, 复制出外源性 GC 应用期肾上腺皮质功能亢进的实验动物模型。该模型是现阶段应用较多, 并较为公认的模型之一, 能在较大程度上反映肾阴虚证患者体内的病理变化。本实验明显可见阴虚模型组大鼠易怒、躁动不安、毛色不光, 血浆皮质醇水平明显高于空白对照组, 说明动物模型复制成功。

GC 在体内通过受体 GR 的介导而发挥作用。GR 是 GC 发挥作用的关键因素。GR 作为一种核转录因子只有被激素激活而由胞浆进入胞核后才能发挥其效应。GC 通过与 GR 结合后与靶基因相互作用, 进而调节基因转录或改变特定 mRNA 的稳定性而发挥作用。因而, GC 效应的强弱在很大程度上决定于细胞核内 GR 含量的多少^[7-8]。我们发现 YD 组与空白对照组比较, 肝组织核内 GR 蛋白表达减少, 而 YC2

组肝组织核内 GR 蛋白表达较 YD 组明显升高。同时实验动物观察发现 YC2 组动物的易怒、躁动不安、毛色不光的表现较少。这些提示我们在大量应用激素早期出现“阴虚”证副作用时, 结合使用 YC2 可提高肝组织核内 GR 蛋白表达。因此我们可以考虑在临床应用激素同时应用 YC2 可适当减少激素用量, 直接减少大量激素应用产生的副作用。

YD 组血浆 CORT 含量较空白对照组有显著升高, 说明大剂量 GC 所致的阴虚证与 HPA 轴功能亢进关系密切, 但其功能亢进的发生机制仍不明确。YC2 组血浆 CORT 含量较阴虚组减少, 提示 YC2 对外源性 GC 应用早期所致阴虚大鼠血浆 CORT 增多有明显抑制作用, 能够明显改善 HPA 轴亢进状态, 减轻激素副作用。

GFB 是临床常用的、经典的滋补肾阳的中药复方, 用于治疗以肾阳虚证为主证的各种疾病有肯定的临床疗效, 把 GFB 设为阳性对照组意在比较两类补肾中药对同一证候的作用, 本实验结果提示在辨治激素副作用时, 仍然需要坚持辨证论治的原则。

针对激素使用过程中出现的阴虚证, 史恒军组方的 YC2 滋阴益气, 清热解毒, 凉血消痛, 安神除烦。可明显改善临床患者盗汗、潮热、精神亢奋等类肾上腺皮质功能亢进症状。本实验结果说明, YC2 能够显著降低 GC 所致阴虚大鼠模型血浆 CORT 含量, 同时提高阴虚大鼠模型肝细胞核内 GR 表达表达, 抑制 HPA 轴功能亢进状态, 减轻激素副作用, 更好的使 GC 的抗炎、抗自身免疫等作用得以发挥。亦为临床应用 YC2 治疗激素副作用提供理论基础。

【参考文献】

- [1] 张立勇, 史恒军, 赵宁侠. 养阴抗毒胶囊对强的松所致大鼠肾上腺皮质网状带细胞超微结构损伤的影响[J]. 第四军医大学学报 2005, 26(12): 1146-1148.
- [2] 唯岩, 史恒军, 侯颖. 养阴抗毒胶囊对糖皮质激素致阴虚大鼠血浆 ACTH、CORT 的影响[J]. 安徽中医学院学报, 2006, 25(2): 34-37.
- [3] 施新猷. 比较医学[上册 I M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 2002, 12: 233.
- [4] 刘旭光, 宋开源, 余曙光, 等. 阴虚阳虚大鼠促肾上腺皮质激素及皮质酮昼夜节律的差异研究[J]. 四川中医, 2002, 20(1): 6-8.
- [5] 宋春风, 尹桂山, 侯洁. 补肾中药对肾阳虚大鼠垂体-肾上腺超微结构的影响[J]. 中医药研究 2001, 17(2): 41-42.
- [6] 郑小伟, 宋红, 李荣群. 金匮肾气丸对肾阳虚大鼠垂体细胞增殖影响的实验研究[J]. 中国医药学报 2003, 18(7): 413-415.
- [7] 王军平, 栗永萍, 赵景宏, 等. 严重烫伤大鼠肝组织核蛋白中糖皮质激素受体表达的变化及地塞米松对其的影响[J]. 中华创伤杂志 2002, 18(4): 210-213.
- [8] 许泼实, 黑洁, 孙长义. 小柴胡汤中具有糖皮质激素样作用单剂的实验研究[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2004, 7(8): 781-783.