

补肾阳方拮抗外源性糖皮质激素下丘脑-垂体-肾上腺轴抑制及分解代谢效应的研究

曾洋 段晓红 孙伟 马方励 黄建华

【摘要】 目的 本研究观察了补肾阳方拮抗外源性糖皮质激素下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴抑制及分解代谢的效果及机制。**方法** SD大鼠分为对照组、模型组、模型+补肾阳复方低、中、高剂量组。采用皮质酮注射造成肾虚模型。第7天、第14天称动物体重。第14天称肾上腺重量,计算肾上腺重量指数(肾上腺/体重)。采用ELISA法检测血浆促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质酮浓度;取肾上腺,进行全基因组表达谱芯片检测及分析。**结果** 糖皮质激素造模导致大鼠体重降低,补肾阳方在第7、14天均能保持体重。补肾阳方治疗使模型组下降的肾上腺重量升高。对照组、模型组、模型+补肾阳复方低、中、高剂量组血浆ACTH水平分别为(324.46±132.92)pg/ml、(150.25±60.54)pg/ml、(315.64±285.51)pg/ml、(330.57±224.046)pg/ml、(305.57±209.57)pg/ml,各治疗组与模型组比较,显著升高($P<0.05$)。各组血浆皮质酮水平(16.22±7.65)ng/ml、(5.50±4.05)ng/ml、(7.70±2.67)ng/ml、(8.36±2.84)ng/ml、(7.85±3.59)ng/ml,补肾阳复方中剂量与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。基因芯片结果筛选出了模型组上调或下调的基因,而能被补肾阳复方逆转的基因828个,功能分析显示涉及类固醇合成酶和细胞增殖通路。**结论** 补肾阳方保护糖皮质激素肾虚证模型的HPA轴功能;能拮抗糖皮质激素分解效应。

【关键词】 肾阳虚; 基因表达; 肾上腺皮质

Effects of kidney-yang tonic formula on inhibition of HPA axis and catabolism by glucocorticoids ZENG Yang, DUAN Xiao-hong, SUN Wei, MA Fang-li, HUANG Jian-hua. Department of Nephrology, Antu Hospital, Shanghai 200093, China

Corresponding author: HUANG Jian-hua, Email: hzhzyj@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate effects and mechanisms of kidney-yang tonifying formula on inhibition of HPA axis and catabolism by glucocorticoids. **Methods** SD rats were divided into control, model, model plus low, middle and high dose of formula group. Model was generated by injection of corticosterone. Body weight was measured in the 7th and 14th day. Adrenal weight was weighed and adrenal index (adrenal weight/body weight) was calculated. The level of plasma adrenocorticotrophin (ACTH), corticosterone was measured by ELISA. Whole-genome microarray analysis was conducted on adrenal gland sample. **Results** Exogenous glucocorticoids resulted in decrease in body weight gain which was protected by kidney-yang tonic (KYT) formula. The formula also increased the adrenal weight. The plasma level of ACTH in control, model and drug treatment group was (324.46±132.92)pg/ml, (150.25±60.54)pg/ml, (315.64±285.51)pg/ml, (330.57±224.046)pg/ml, (305.57±209.57)pg/ml respectively. Compared to model, KYT significantly increased the level of ACTH ($P<0.05$). The plasma level of corticosterone was (16.22±7.65)ng/ml, (5.50±4.05)ng/ml, (7.70±2.67)ng/ml, (8.36±2.84)ng/ml, (7.85±3.59)ng/ml respectively. Compared to model group, the level of corticosterone in middle dose of KYT group significantly increased ($P<0.05$). 828 genes differentially regulated in model, and reversed by treatment group were captured, which were enriched in steroid biosynthesis and cell proliferation. **Conclusions** Kidney-yang tonifying drugs protect the inhibited adrenal function, and counteract the catabolic effects of glucocorticoids.

【Key words】 KIDNEY-YANG DEFICIENCY; Gene expression; Adrenal cortex

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.23.015

基金项目: 国家自然科学基金(30901888)

作者单位: 200093 上海市杨浦区安图医院肾病科(曾洋); 复旦大学附属华山医院中西医结合研究所(段晓红、黄建华); 无限极(中国)有限公司(孙伟、马方励)

通讯作者: 黄建华, Email: hzhzyj@yahoo.com.cn

肾阳又被称为元阳,在机体功能的调节中占有重要的地位。肾阳虚证是指由于肾阳虚衰,温煦失职,气化失权所表现的一类虚寒证候。肾阳虚的现代研究发现肾阳虚患者特异性具有肾上腺皮质功能或储备功能低下,补肾阳药可对肾阳虚患者下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴功能进行调节^[1-3]。肾阳虚证的系列现代研究为在实验研究中制备肾阳虚证模型,并在此模型上评价补肾阳药物疗效、研究补肾阳药物的作用机制提供了基础。外源性糖皮质激素的大量长期应用,造成下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴的反馈抑制,模拟了临床肾阳虚患者的HPA轴的功能低下状况。由于糖皮质激素的长期应用,本模型也模拟了长期反复应激对HPA轴以及整个机体造成的损伤^[4]。本研究检测了补肾阳复方(自拟方)对皮质酮肾阳虚模型大鼠HPA轴功能的保护作用,并采用全基因组基因芯片技术,初步探索了补肾阳药物保护肾上腺皮质功能的分子机制。

材料与方 法

一、主要试剂及仪器

补肾阳复方(由巴戟天、枸杞、桂枝组成)粉末由无限极中国有限公司提供。皮质酮购自Sigma公司;促肾上腺皮质激素(ACTH)酶免试剂盒由Merk公司提供;皮质酮酶免试剂盒购自Caymen公司。

二、动物分组和实验

雄性SD大鼠75只,体重(200±6)g,随机分为正常对照组、皮质酮模型组、补肾阳复方低、中、高剂量组,每组15只。先适应喂养5d,并同时给予各组样品。第6天开始给予10mg/kg体重皮下注射皮质酮造模,对照组以等体积灭菌橄榄油代替皮质酮注射。补肾阳复方低、中、高剂量组分别将相应粉末溶于生理盐水,以29.2、292、876mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃(按人剂量的1倍、10倍、30倍比例);同时对照组和模型组灌胃等体积生理盐水。实验第21天(造模第15天),有动物直接断头取血,静置30min,3000r/min离心10min,取上清液,置于-85℃冰箱中保存备用。称动物体重、肾上腺重量、肾上腺重量指数(肾上腺重量/体重)。对照组、模型组、补肾复方中剂量组每组取3只大鼠的肾上腺,供基因芯片检测用。

三、检测方法

1. 血浆皮质酮检测:采用ELISA方法检测,具体方法按Caymen公司试剂盒说明。取样品10μl,加40μl缓冲液(稀释5倍),除空白孔,每孔加入50μl Tracer和50μl一抗。室温(23℃),在摇床上孵育2h,孵育完毕洗板5次。每孔加入200μl Ellman's Reagent,避光,在摇床上孵育75min,孵育完毕,用酶标仪在

412nm波长,读取OD值,计算浓度。

2. 血浆ACTH检测:采用ELISA方法检测,具体方法按Merk公司试剂盒说明操作。取待测样品5μl,加40μl缓冲液(稀释5倍),除空白孔,每孔加入50μl反应缓冲液和50μl一抗。室温(23℃),在摇床上孵育1.5h,孵育完毕洗板5次。每孔加入200μl过氧化物酶标记二抗,避光,在摇床上孵育75min,加入显色液,孵育30min,用酶标仪在630nm波长,读取OD值,计算浓度。

3. 基因芯片检测:提取总RNA,NanoDrop ND-1000测定浓度,标准变性琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性。每个样本取5μg总RNA用于标记和微阵列杂交。用Invitrogen Superscript ds-cDNA synthesis kit进行逆转录反应。用NimbleGen one-color DNA labeling kit进行ds-cDNA标记。用NimbleGen Hybridization System进行微阵列杂交,用NimbleGen wash buffer kit进行洗涤。用Axon GenePix 4000 B microarray扫描仪(Molecular Devices Corporation)进行阵列扫描。扫描图像(TIFF格式)导入到NimbleScan软件(2.5版)进行栅格匹配和数据分析。原始数据采用百分位数法进行归一化,并形成探针水平信号强度和基因水平信号强度。基因水平信号强度导入Agilent GeneSpring GX软件(11.5.1版)进行进一步分析。差异表达基因经t检验,P<0.05筛选。信号通路、Gene ontology分析采用DAVID在线程序。聚类分析采用Bioconductor软件包。

四、统计学分析

除基因表达数据,其他数据均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS 15.0 for windows软件包对样本进行单因素方差分析,组间两两比较采用Newmann-Keuls post-hoc检验,P<0.05表示差异有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠体重变化比较

在造模前,各组大鼠平均体重统计学无差异(P>0.05);在造模第7天时,造模组大鼠平均体重与正常对照组比较,显著降低(P<0.01),提示每天10mg/kg的皮质酮已具有明显的促分解代谢作用。

补肾阳复方各种剂量组平均体重与模型组比较明显升高(P<0.01),并与正常对照组比较没有统计学差异(P>0.05),表明对皮质酮应用第7天的动物体重有完全保护作用;造模第14天时,模型组平均体重与正常对照比较显著降低(P<0.01),治疗组与模型组比较,则显著升高(P<0.05),治疗组与正常对照组比较,明显降低(P<0.05),表明此时补肾阳复方能部分保护皮质酮大鼠的体重。补肾阳复方三个剂量组保护体重

的效果无统计学差异($P > 0.05$),见表1。

表1 补肾阳复方实验各组大鼠在不同造模时间的体重比较($g, \bar{x} \pm s$)

组别	只数	造模前	造模第7天	造模第14天
正常对照组	15	203.50 ± 3.34	305.75 ± 7.21	337.75 ± 6.54
模型组	15	200.25 ± 3.28	266.00 ± 10.80 ^a	303.50 ± 14.13 ^a
复方低剂量	15	202.00 ± 6.50	300.00 ± 9.24 ^c	321.14 ± 11.8 ^b
复方中剂量	15	199.45 ± 3.52	295.50 ± 8.35 ^c	320.00 ± 10.15 ^b
复方高剂量	15	202.70 ± 4.42	302.00 ± 11.40 ^c	325.50 ± 14.36 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$

二、各组大鼠肾上腺重量及肾上腺重量指数(肾上腺重量/体重)比较

造模第15天处死大鼠,正常对照组、模型组、各治疗组肾上腺重量分别为(49.63 ± 6.00)mg、(28.88 ± 9.45)mg、(34.97 ± 4.84)mg、(35.57 ± 7.53)mg、(36.45 ± 5.62)mg。统计学分析发现,正常对照组与模型组比较($P < 0.01$),治疗组与模型组比较($P < 0.05$),治疗组与正常对照组比较($P < 0.01$)都有差异,表明补肾阳复方对皮质酮大鼠肾上腺重量有部分保护作用。各组大鼠肾上腺重量分别除以各自体重,所得肾上腺重量指数正常对照组、模型组、补肾阳复方组分别为 0.147 ± 0.017 、 0.096 ± 0.032 、 0.107 ± 0.014 、 0.109 ± 0.020 、 0.112 ± 0.024 。经统计学分析未发现统计学差异,表明在该皮质酮剂量下大鼠肾上腺重量下降比体重下降慢,补肾阳复方对这种下降速度比例没有影响。

三、各组大鼠血浆中 ACTH 和皮质酮激素水平的比较

正常对照组、模型组、补肾阳复方各剂量组血浆 ACTH 和皮质酮浓度见表2,与正常对照组比较,肾虚模型组血浆中 ACTH 和皮质酮水平有明显降低趋势,空白对照组大鼠血浆 ACTH 和皮质酮含量分别为(324.46 ± 132.92)pg/ml 和(16.22 ± 7.65)ng/ml,而造模后模型对照组大鼠血浆 ACTH 和皮质酮含量分别为(150.25 ± 60.54)pg/ml 和(5.50 ± 4.05)ng/ml。与模型对照组比较,补肾阳各治疗组血浆中 ACTH 含量明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);皮质酮含量在补肾阳复方各剂量组均升高,但仅在中剂量组具有统计学意义($P < 0.05$)。

表2 补肾阳复方实验各组大鼠血浆中 ACTH 和皮质酮激素浓度的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	ACTH(pg/ml)	皮质酮(ng/ml)
正常对照组	12	324.46 ± 132.92	16.22 ± 7.65
模型组	12	150.25 ± 60.54 ^a	5.50 ± 4.05 ^a
复方低剂量	12	315.64 ± 285.511 ^b	7.70 ± 2.67
复方中剂量	12	330.57 ± 224.046 ^b	8.36 ± 2.84 ^b
复方高剂量	12	305.57 ± 209.573 ^b	7.85 ± 3.59

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

四、基因芯片结果

差异基因情况:所有差异表达基因均为差异调节2倍以上,组间比较 $P < 0.01$ 。模型组与正常组比较,1098个基因上调;补肾复方作用后,共有1135个基因下调,其中模型组上调的基因表达被逆转的有735个。模型组与正常组比较,603个基因下调;补肾复方作用之后,共有477个基因上调,其中模型组下调的基因表达被逆转的有93个。因此,皮质酮导致的基因表达改变中,补肾复方共有828个基因表达被逆转,被逆转的基因通过聚类分析显示能将对照组、模型组、补肾复方组显著分开(图1)。这些基因组间的基因表达模式如图2所示,被明显逆转。

被补肾复方逆转的基因信号通路分析:为进一步探索保护HPA轴的功能,我们对被补肾阳复方逆转的828个基因进行了信号通路分析。结果发现在被补肾复方调节的基因富集的信号通路中,有两个引起了我们的重视:MAPK信号通路和类固醇合成通路,见表3。

讨 论

大剂量糖皮质激素长期应用对机体多方面产生药理效应,如激活肝脏糖原分解酶使糖原分解加速,血糖升高;激活脂肪分解酶使脂肪分解加速,血脂升高;与淋巴细胞中糖皮质激素受体结合,发挥抗炎症的效应,诱导淋巴细胞凋亡^[5-6]。超过一定量的血浆糖皮质激素水平也通过负反馈抑制下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素分泌,进而抑制垂体ACTH分泌,导致机体内肾上腺自身分泌糖皮质激素减少,并且长期大剂量糖皮质激素的反馈抑制使HPA轴发生形态学改变,如下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素神经元减少,肾上腺皮质细胞凋亡及肾上腺萎缩^[7-8],高水平的糖皮质激素还

表3 补肾复方逆转的基因富集的信号通路

ID	通路名称	所含基因	P 值	FDR
Map00140	Steroid biosynthesis	CYP11A、CYP17、HSD3B、HSD11B1、AKR1D1、CYP7A1	0.00000459611	0.00007979
Ko04010	MAPK signaling pathway (rat)	CACNB3、CACNB4、CDC25B、DUSP10、DUSP6、FGF18、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FLNA、FLNC	0.0000171072	0.00018818

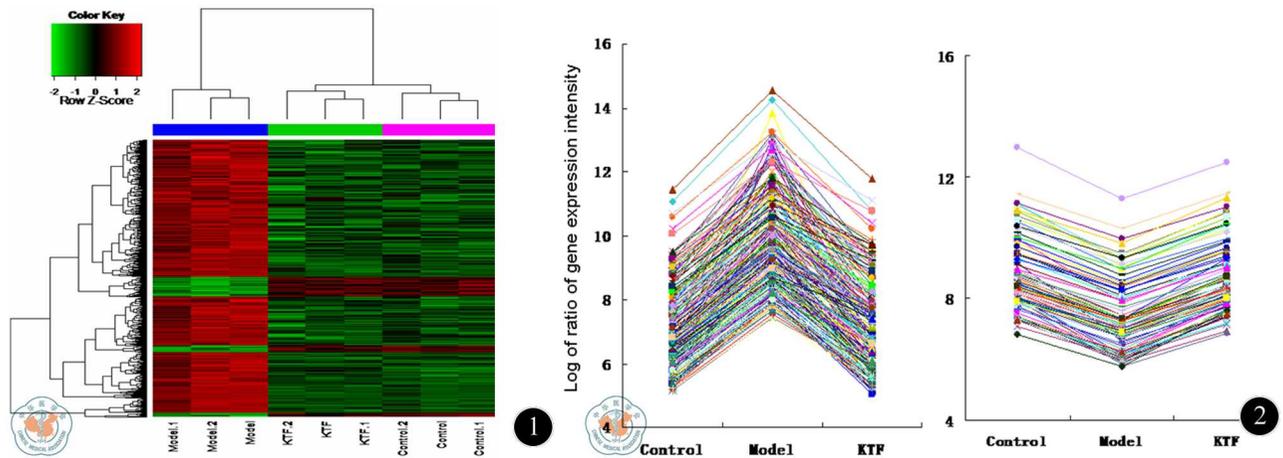


图1 补肾复方逆转基因表达的聚类分析。Medel: 模型组; KTF: 补肾复方组; Control: 对照组 图2 补肾复方逆转皮质酮模型大鼠的基因表达模式。Medel: 模型组; KTF: 补肾复方组; Control: 对照组

会引起免疫系统的抑制和胸腺淋巴细胞凋亡^[9]。

国际上已有研究探索如何促进 HPA 轴恢复,但仍未取得成功。Markowska 等^[10]报道一个十肽 Pneumadin (PNM),通过促进精氨酸加压素 (AVP) 和 ACTH 的释放,防止肾上腺皮质细胞数量和体积的减少,可增加肾上腺组织皮质酮和醛固酮的含量,但不能引起两种激素血浆水平的变化。Keh 等^[11]在应用地塞米松后的抑郁患者中发现 5-羟色胺 1A 受体兴奋剂丁螺旋酮能升高血浆 ACTH 和可的松浓度,并提出丁螺旋酮通过促进 ACTH 合成和释放使应用地塞米松后的抑郁患者免于 HPA 抑制,但作为抗抑郁药丁螺旋酮能否用于其他 HPA 轴受抑情况还没有应用方面的报道。本研究中,我们明确的观察到补肾阳复方能升高 ACTH 以及肾上腺皮质酮的水平,提示具有提高 HPA 轴功能的作用。

本研究我们进而采用基因表达谱对补肾阳复方保护肾上腺皮质功能的机制进行了初步探索。结果发现在皮质酮造成的基因表达改变中,补肾复方逆转了 828 个,包括在模型组上调,后被补肾阳复方下调的;也包括在模型组下调,后被补肾阳复方上调的。我们认为这些基因可能是补肾阳复方发挥作用的候选基因。信号通路分析结果有两条通路引起了重视,一是 MAPK 信号通路,有 11 个基因属于该通路,特别是其中的 FG-Fs,研究表明对肾上腺皮质的再生起着关键作用^[12]。另外一条通路是类固醇合成通路,共有 6 个基因被上调,均是皮质酮生物合成中的各种酶,这一结果为补肾阳复方升高血浆皮质酮水平提供了部分解释。

在实验中,我们还观察到补肾阳复方对动物体重均有明显的保护作用。在造模第 7 天时,模型组大鼠体重与正常对照组比较显著下降,而补肾阳药物治疗

组体重与正常对照组比较统计学没有差异,表现了对皮质酮大鼠体重具有完全保护作用。造模第 14 天,我们也发现对大鼠体重具有保护作用,这些在器官水平的结果提示补肾阳药物不仅对 HPA 轴,而且对糖皮质激素造成的过度分解代谢状态具有保护作用。关于拮抗糖皮质激素促分解代谢的副作用,国外有一些研究报道^[13-14],补肾阳中药在这些方面表现了显著效果,其具体机制值得深入研究。

参 考 文 献

- [1] 蔡定芳,沈自尹,张玲娟,等. 右归饮对皮质酮大鼠下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺轴的影响. 中国免疫学杂志, 1994, 10: 236-239.
- [2] 蔡定芳,沈时谋,陈晓红,等. 仙灵脾减轻外源性糖皮质激素抑制神经内分泌免疫作用的临床与实验研究. 中国中西医结合杂志, 1998, 18: 4-7.
- [3] 沈自尹,张玲娟,蔡定芳,等. 淫羊藿总黄酮和多糖对大鼠垂体-肾上腺-免疫网络作用的研究. 中国中西医结合杂志: 理论特辑, 1998, 18: 238.
- [4] 陈英华,孙琪,欧阳轶强,等. 肾阳虚证动物模型造模方法综述. 中国医药学报, 2003, 18: 370-372.
- [5] Edgerton DS, Jacobson PB, Opgenorth TJ, et al. Selective antagonism of the hepatic glucocorticoid receptor reduces hepatic glucose production. *Metabolism*, 2006, 55: 1255-1262.
- [6] Fryer CJ, Kinyamu HK, Rogatsky I, et al. Selective activation of the glucocorticoid receptor by steroid antagonists in human breast cancer and osteosarcoma cells. *Biol Chem*, 2000, 275: 17771-17777.
- [7] Kozyra EF, Wax RS, Burry LD. Can 1 microg of cosyntropin be used to evaluate adrenal insufficiency in critically ill patients. *Ann Pharmacother*, 2005, 39: 691-698.
- [8] Siraux V, De Backer D, Yalavatti G, et al. Relative adrenal insufficiency in patients with septic shock: comparison of low-dose and conventional corticotropin tests. *Crit Care Med*, 2005, 33: 2479-2486.
- [9] Flammer JR, Rogatsky I. Minireview: glucocorticoids in autoimmunity: unexpected targets and mechanisms. *Mol Endocrinol*, 2011, 25: 1075-1086.
- [10] Markowska A, Andreis PG, Miskowiak B, et al. Effects of pneumadin (PNM) on the adrenal glands. 6. Further studies on the inhibitory effect of PNM on dexamethasone-induced atrophy of the rat adrenal cortex. *Histol Histopathol*, 1997, 12: 677-682.

- [11] Keh D,Boehnke T,Weber-Cartens S,et al. Immunologic and hemodynamic effects of "low-dose" hydrocortisone in septic shock;a double-blind, randomized, placebo-controlled, crossover study. Am J Respir Crit Care Med,2003,167 :512-520.
- [12] Chu,Y,Ho WJ,Dunn JC. Basic fibroblast growth factor delivery enhances adrenal cortical cellular regeneration. Tissue Eng Part A, 2009,15:2093-2101.
- [13] Horber FF, Haymond MW. Human growth hormone prevents the protein catabolic side effects of prednisone in humans. J Clin Invest, 1990,86:265-272.
- [14] Mauras N,Beaufriere B. Recombinant human insulin-like growth factor-I enhances whole body protein anabolism and significantly diminishes the protein catabolic effects of prednisone in humans without a diabetic effect. J Clin Endocrinol Metab,1995,80:869-874.

(收稿日期:2012-04-17)

(本文编辑:戚红丹)

曾洋,段晓红,孙伟,等. 补肾阳方拮抗外源性糖皮质激素下丘脑-垂体-肾上腺轴抑制及分解代谢效应的研究[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版, 2012,6(23):7556-7560.

