

补肾中药对下丘脑 GnRH、垂体 FSH、LH 及成骨细胞 BGP 基因表达的调节作用

蔡德培¹ 张 炜²

摘要 目的:探讨补肾中药对下丘脑促性腺激素释放激素(GnRH)、腺垂体促性腺激素卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)及成骨细胞骨钙素(BGP)基因表达的调节作用。方法:采用定量的逆转录-聚合酶链式反应(定量的 RT-PCR)方法,观察青春期大白鼠喂饲滋阴泻火或益肾填精中药后,下丘脑 GnRH、腺垂体 FSH、LH 及成骨细胞 BGP 的信使核糖核酸(mRNA)表达水平的变化。结果:滋阴泻火药可使下丘脑 GnRH、腺垂体 FSH、LH 及成骨细胞 BGP 的 mRNA 表达水平显著下调,而益肾填精药可使下丘脑 GnRH、腺垂体 FSH、LH 及成骨细胞 BGP 的 mRNA 表达水平显著上调。结论:说明补肾中药可在转录水平调节下丘脑 GnRH、腺垂体 FSH、LH 及成骨细胞 BGP 基因表达,这可能是补肾中药调整性早熟患儿青春发育进程和改善骨骼发育的主要作用机理之一。

主题词 基因表达/药物作用 补肾药/药理学 下丘脑-垂体系统/药物作用

真性特发性性早熟患儿的下丘脑-垂体-性腺轴提前发动、功能亢进,血清促性腺激素卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)水平显著升高。患儿的骨骼往往生长加速、成熟提前,成骨细胞的功能活动显著亢进,血清骨钙素(BGP)水平明显升高,临床上采用滋阴泻火中药(以下简称滋阴泻火药)可使其下丘脑-垂体-性腺轴的功能亢进显著缓解,血清 FSH、LH 下降,同时其成骨细胞过度亢进的功能活动被明显抑制,血清 BGP 水平下降。当患儿到达正常青春年龄后,改用益肾填精中药,则可使其下丘脑-垂体-性腺轴及成骨细胞的功能重新活跃,血清 FSH、LH 及 BGP 水平升高。鉴于下丘脑的促性腺激素释放激素(GnRH)、成骨细胞 BGP 的分子结构均为多肽,而腺垂体 FSH、LH 的分子结构均为糖蛋白,它们的生物合成必然受到相应基因的调控,所以补肾中药治疗后,它们在外周血中浓度的变化很可能是相应基因调控变化的结果。为此,我们采用定量的逆转录-聚合酶链式反应(定量的 RT-PCR)方法,观察实验动物喂饲滋阴

泻火或益肾填精中药后,下丘脑 GnRH、腺垂体 FSH、LH 及成骨细胞 BGP 的 mRNA 表达水平的变化,以探讨补肾中药对相应的基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组:同窝的 SD 种雌性大白鼠,1 月龄,体重 180~190g(相当于青春期),共 30 只,分为 3 组,每组 10 只。对照组喂饲生理盐水,滋阴泻火药组喂饲滋阴泻火中药合剂,益肾填精药组喂饲益肾填精中药合剂。

1.2 补肾中药及剂量:滋阴泻火中药方由生地黄、炙龟甲、黄柏、知母等组成;益肾填精中药方由熟地黄、龟甲胶、淫羊藿、鹿角胶等组成。由本院中药制剂室煎制成浓缩合剂,每毫升约合生药 3g,每次每只大鼠用灌胃法喂饲 5ml,每日 1 次。疗程 2 个月。

1.3 实验室方法:各种 mRNA 的表达水平采用定量的 RT-PCR 方法测定。

1.3.1 标本制备:疗程完成时,将各组大鼠处死,立即断头取出下丘脑及垂体,同时截取包括骨髓软骨在内的一段后肢骨关节。标本置于-85℃冰箱保存。

1.3.2 总 mRNA 的提取:下丘脑及垂体组织经脱脂,制成匀浆,然后提取总 RNA,再经 Olig dT 柱纯化 mRNA 后,260nm 比色定量。骨髓软骨经肌肉消化液及裂解液处理后,提取总 RNA,再经 Olig dT 柱纯化 mRNA,然后用紫外光比色定量。比色定量的标准为光密度 1 OD=40μg/ml RNA。

1.3.3 逆转录(RT)方法:各份提取出的 mRNA 样品,采用六分子随机引物以 AMV 逆转录其所有的 mRNA 为 cDNA,作为 PCR 的模板。

1.3.4 基因扩增(PCR)方法:引物合成采用 ENTREZ 软件检索出大鼠 GnRH、FSH、LH 及 BGP 的基因序列,根据各个靶基因的保护序列分别设计上游及下游引物各一条。见表 1。用 CHURMAN PS 250 DNA/RNA 自动合成仪合成引物,引物中的一条带有 Biotin 标记。反应体系的组成:25mM Tris-HCl pH8.9, 500 mM KCl, 2mg/ml GELTIN, 引物各 200pmol, 200nm dNTPs, Tag DNA 聚合酶 2U/50μl, cDNA 模板 2μl/50μl。扩增条件:在 PE-480 DNA 扩增仪上,94℃预变性 3min,然后按 94℃ 1min, 55℃

基金项目:中华人民共和国卫生部科研基金资助项目(98-1-172)

1 上海医科大学儿科医院中西医结合研究室,上海市枫林路 183 号(200032)

2 上海帕赛克生物工程研究所基因组研究室

收稿日期:2000-08-08;修回日期:2000-12-18

表1 GnRH、FSH、LH及BGP基因扩增的引物序列

	上游引物	下游引物
GnRH	5'CGAGAATTGTTGGAATGAAAGCC3'	5'AAGCCACAGGGTTAGTTGTAAGAGGCG3'
FSH	5'CTTGGTCTCCTCCTCCACCGCG3'	5'GCCTCAGAATCCCTTTTTCACC3'
LH	5'CGTCTAGAGGCCTGTGTTGTGTCC3'	5'CATGGAAGCCAGCCCCCTAGGAA3'
BGP	5'GACTCCAAACGGTCCACTTAACC3'	5'TGCAGGAGCAGCAGTTCTTACTGGCC3'

表2 GnRH、FSH、LH及BGP基因扩增产物的探针序列

	探 针
GnRH	5'GGAGTATTGTTGGGGGAAGGCGAGTGTGATTATGTAGAGAAGT3'
FSH	5'GGGCAACCACGCGCCCTGTCGCCCCGAAAA3'
LH	5'CGTCTAGAATTCCCCAGAAAGAAAAGTAGAAGTCATTGCTTCGAAGGA3'
BGP	5'CGGTCGTCGACTGCAAGTTCCCGAAAACAGCGGATCTCCTACGGCAAAGGCAAC3'

表3 各组动物下丘脑GnRH、腺垂体FSH、LH及成骨细胞BGP的cDNA扩增产物光密度值的比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	GnRH cDNA	FSH cDNA	LH cDNA	BGP cDNA
对照组	10	0.455 $\pm$ 0.008	0.566 $\pm$ 0.008	0.406 $\pm$ 0.019	0.433 $\pm$ 0.017
滋阴泻火药组	10	0.416 $\pm$ 0.013**	0.518 $\pm$ 0.012**	0.375 $\pm$ 0.009**	0.406 $\pm$ 0.026*
益肾填精药组	10	0.534 $\pm$ 0.011**	0.629 $\pm$ 0.011**	0.434 $\pm$ 0.022**	0.562 $\pm$ 0.033**

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

1min, 72℃ 2min, 做25次循环, 最后于72℃延伸5min。扩增产物及其电泳检测: 每个扩增产物均带有Biotin标记。预计的GnRH cDNA扩增产物片段大小为390bp, FSH者为280bp, LH者为320bp, BGP者为370bp。取10 μ l扩增产物进行2%琼脂糖凝胶电泳, 出现与预计扩增产物大小相等的电泳区带者为阳性。

1.3.5 PCR产物的定量检测: 根据每个扩增的序列分别设计出一条针对扩增产物的DNA探针, 见表2。

探针固定化: 在Nuae 96孔酶标板上以共价方式连接手臂分子BSA, 经活化后, 加入探针分子, 使成为载体—手臂—探针之复合物。

定量检测: 将PCR产物稀释100倍后, 取100 μ l加到已制备好有固定化探针的96孔酶标板中, 55℃保温4小时, 进行固—液杂交。反复洗涤后, 加入Avidin—HRP, 37℃反应1小时, 对杂交产物进行显色反应。最后用酶标仪(BID—RAD)读数定量检测。读出的各cDNA扩增产物的光密度值即代表相应的各mRNA的含量。

1.4 统计方法: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验。

2 结果

表3示, 滋阴泻火药组GnRH、FSH、LH及BGP的cDNA扩增产物的含量均较对照组显著或极显著降低, 说明滋阴泻火药可使下丘脑GnRH、腺垂体FSH、LH及成骨细胞BGP的mRNA表达水平显著下调。而益肾填精药组的GnRH、FSH、LH及BGP的cDNA扩增产物的含量均较对照组极显著增高, 说明益肾填精

药可使下丘脑GnRH、腺垂体FSH、LH及成骨细胞BGP的mRNA表达水平显著上调。

3 讨论

3.1 补肾中药对下丘脑—垂体促性腺激素基因表达的调节作用: 真性特发性性早熟患儿的下丘脑—垂体—性腺轴提前发动、功能亢进。其血清FSH、LH及雌二醇(E_2)水平较正常同龄儿显著升高, LHRH兴奋试验呈现功能亢进的特征性变化^[1]。中医辨证发现, 患儿均具有不同程度的阴虚火旺现象, 且大多十分显著。采用滋阴泻火相火中药治疗病情缓解后, 随着临床上阴虚火旺证的显著改善, 其下丘脑—垂体—性腺轴功能亢进的程度显著好转, 血清FSH、LH、 E_2 水平下降, 子宫卵巢回缩, 第二性征消退^[2]。本文的结果显示, 滋阴泻火药可使下丘脑GnRH及腺垂体FSH、LH的mRNA表达水平显著下调, 这可能是滋阴泻火药使性早熟患儿下丘脑—垂体—性腺轴功能亢进显著缓解的主要作用环节之一。当性早熟患儿到达正常青春年龄后, 临床上改用益肾填精中药, 可使其下丘脑—垂体—性腺轴功能重新活跃, 血清FSH、LH水平升高。本文的结果则显示, 益肾填精药可使下丘脑GnRH及腺垂体FSH、LH的mRNA表达水平显著上调, 这可能是益肾填精药使性早熟患儿在到达正常青春年龄后下丘脑—垂体—性腺轴功能重新活跃的主要作用环节之一。

3.2 补肾中药对成骨细胞骨钙素基因表达的调节作用: 真性特发性性早熟患儿骨骼生长加速、成熟提前, 但由于其骨骺过早融合, 故最终身高往往较矮。临床上

采用滋阴泻火中药可明显减慢患儿骨骼的线性生长,延缓骨骼的成熟,从而可防止骨骺过早融合并改善最终身高^[3]。进一步的研究显示,性早熟患儿体内反映成骨细胞功能活动状态的血清 BGP 水平较正常同龄儿显著增高,而经滋阴泻火中药治疗后,血清 BGP 水平显著降低^[3]。本文的结果显示,滋阴泻火药可使成骨细胞 BGP 的 mRNA 表达水平显著下调,这可能是滋阴泻火药抑制成骨细胞过度亢进的功能活动的主要作用环节之一。当性早熟患儿到达正常青春年龄后,临床上改用益肾填精中药,可使其成骨细胞的功能重新活跃,血清 BGP 水平升高。本文的结果显示,益肾填精药可使成骨细胞 BGP 的 mRNA 表达水平显著上调,这可能是益肾填精药使性早熟患儿成骨细胞功能重新活

跃的主要作用环节之一。

综合本文的研究结果,我们认为补肾中药可以在转录水平调节下丘脑 GnRH、腺垂体 FSH、LH 及成骨细胞 BGP 的基因表达,这可能是补肾中药调整性早熟患儿青春发育进程和改善骨骼发育的主要作用机理之一。

参考文献

- 1 蔡德培,时毓民,陆英. 女性特发性性早熟下丘脑-垂体-卵巢轴功能及内生殖器官的发育规律. 中华内分泌代谢杂志,1993,9(1):24-26.
- 2 蔡德培,时毓民. 性早熟女童阴虚火旺证本质的探讨. 中国中西医结合杂志,1991,11(7):397-399.
- 3 蔡德培. 滋阴泻火中药改善性早熟儿童骨骼发育的作用及机理探讨. 中医杂志,1997,38(10):615-617.

北京高等中医药培训学校招生

药线植人排毒疗法:3月27日~4月1日。5月27日~6月1日。学费600元。函授:480元(含教学光盘、教材、证书)。不孕症及妇科疑难病治疗提高班:4月1日~8日;特聘不孕症研究所所长孙逊教授扩宫治疗不孕症的方法及多种治疗不孕症的有效方药,旁及男性不育及月经病、子宫肌瘤、更年期综合征,盆腔炎等妇科疑难杂症的有效治疗方法,如:中西药内服外用,阴道冲洗,药浴等。学费800元。**肛肠病治疗新技术学习班:**4月13~21日。特聘全国著名肛肠专家胡伯虎教授讲授肛肠解剖及肛裂、肛瘘、内外痔、肛周脓肿等各种肛肠病的中西医多种治疗方法,痔瘘灵注射的临床运用。天津市南开医院肛肠科主任田淇第教授亲自讲授其发明的肛肠小针刀治疗各种肛肠病的新技术。内容:肛肠解剖,手法操作,肛裂、瘘、脱肛、内外痔、肛门瘙痒、肛门直肌狭窄等小针刀疗法。学习期间安排医院临床见习;学费:900元;函授:600元(含光盘、函授证书)。**中药验方推广及自制方法培训班:**4月21日~29日;主要内容:①水丸、蜜丸、冲剂、膏剂、膏药、袋泡中药制作方法;②外用止痛药物的配方及制作;③中药穴位贴敷的特效配方及临床应用方法;④特效药酒、药茶的配方及临床应用;⑤药浴的常用配方、药物制备及临床应用;⑥有毒中药的临床运用;⑦中药饮片的加工炮制及保管等;本班以临床实用为主,方法有效、简单易学,大部分方法无须复杂设备。学习期间部分制药方法有现场操作,各种制药方法录像配合教学,并介绍大量特效处方,适合各级医院临床医生、药剂师及个体医生学习。学费:1000元。**风湿病特效治疗提高班:**3月28~4月3日;5月28~6月3日。该班本着简便廉效的原则,以中医为主兼以西医治疗,突出特色疗法。并介绍鼻医、鼻药治疗风湿、类风湿、痛风的特效方法。学费:700元。**皮肤、性病高级进修班:**4月3~9日。特聘北京中医药大学、中日友好医院、北京中医医院、中国中医研究院、中国医药学会科技中心的专家突出实用、高效的特点,讲授常见难治性皮肤、性病的临床经验和中西医特效方法。内容:①银屑病的辨证规律、用药筛选及疗效等;②白癜风的诊疗及预后,顽固者的对策;③湿疹、痤疮、黄褐斑、酒渣鼻、扁平疣特效疗法;④手足皮肤病、脱发的治疗;⑤红斑狼疮、硬皮病、皮肌炎、鱼鳞病等常见、疑难性皮肤病的诊断及中西医内外治法;⑥性病的诊断、鉴别诊断及中西医药物内服外用治疗淋病、霉菌、非淋菌性尿道炎、软下疳、生殖器疱疹、艾滋病、尖锐湿疣、泌尿生殖系感染、性病综合征、性病后综合征等,同时讲授性病预防、康复。学费:700元。**椎间盘突出症特效治疗提高班:**4月9~14日;我校特聘有关专家系统讲授本病的规范治疗及确有疗效的各种特色疗法。内容:①X线、CT诊断、物理诊断、鉴别诊断;②本病各期的规范治疗;③牵引及手法治疗;④骶管疗法;⑤小针刀疗法;⑥特殊针具疗法;⑦中西药物特色疗法;⑧蒙医五疗法治疗椎间盘突出症;⑨药浴疗法及专用药物配制。学费:600元。**基层疑难病杨氏综合疗法进修班:**4月20~27日。特聘全国疑难病专家杨同福教授亲自主讲:如何运用现代疼痛治疗学理论,采用多种方法治疗颈肩腰腿痛、关节炎等疼痛性疾病;特技注射、灌注、硬化疗法等治疗下肢静脉曲张、疝气、腋臭、面瘫、睾丸炎、关节腔积液、附件囊肿、血管瘤、阳痿早泄、前列腺增生和炎症、牛皮癣、白癜风等;中西医综合疗法治疗:气管炎、哮喘、乳腺增生、脉管炎、鼻炎、咽炎、扁桃腺炎、耳鸣耳聋、便秘、腹泻、肛裂、遗尿等;埋线疗法治疗胃病、癫痫等。本班适合基层医生学习。学费800元。

心脑血管病特效治疗高级进修班

心脑血管病占人类死亡率的第二位,为了使各级临床医生提高其治疗技术,特聘承担国家级心脑血管病课题的北京中医药大学和中国中医研究院西苑医院、中日友好医院的专家们讲授(1)脑血管病的CT诊断;(2)急性脑血管病、急性心梗、高血压急症的中西医救治;(3)高血压、冠心病、心绞痛、心衰的中西医结合治疗;(4)中风及眩晕的中药治疗经验;(5)针灸治疗中风及各种顽固性后遗症、头痛、高血压、心绞痛等;(6)药浴治疗高血压、高血脂、中风。时间:4月14~20日。学费:700元。

以上各班报到地址:北京中医药大学主楼,以下各班报到地址:中国中医研究院刮痧培训基地2楼。

白癜风、牛皮癣新疗法专题培训班:3月28日~4月3日。介绍维医治疗白癜风的特效五联法,包括:(1)维医对该病因、病机、病理变化的独特认识。(2)如何检查、诊断该病。(3)如何根据病情组方、用药。(4)如何判定疗效预后。(5)如何观察治疗过程中的生理病理变化,如:健皮岛现象。并聘请中国中医研究院著名皮肤科专家魏雅川教授讲述“养血柔肝法”根治牛皮癣和银屑病临床运用、牛皮癣各期中西药用药特点、辨证分型各型治疗经验。结合病例分析治疗失败的原因。学费700元。**药浴新技术推广培训班:**4月6~9日。学费:360元。**中医美容特色疗法综合进修班:**4月3日~4月28日。系统介绍各种中医美容方法,包括针灸减肥、美容;埋线减肥、中医药减肥、美容;耳穴减肥、美容;火针除痣、减肥、美容特殊手法;药浴、刮痧减肥美容。学费:3600元。报名费100元。本班适合中医基础薄弱或无基础者学习。限额30名,学员必须提前报名,额满为止。

以上各班第1天为报到时间,报到时带身份证及2张2寸照片,学习结束后发本校钢印结业证书,欢迎索取招生简章。咨询电话:(010)64286738,64202604;地址:北京市北三环东路11号北京中医药大学主楼,邮编:100029。

京教社广字(东城)2002046号 (广告编号:200203-17)