

证 的 研 究

益气止血中药复方对脾不统血证大鼠脑组织
POMC mRNA 表达的影响

陈家旭* 瞿德斌* 李绍良*

摘要 目的:观察益气止血中药对脾不统血证模型大鼠前阿黑皮素(POMC)基因表达的影响。方法:以原位杂交结合图像分析的方法检测大脑皮层、海马、下丘脑前阿黑皮素信使核糖核酸(POMC mRNA)的积分光密度和面积。结果:脾不统血证模型大鼠脑组织 POMC mRNA 的积分光密度和面积均较正常显著增强,益气止血中药复方对各部位 POMC 的基因表达均有下调作用。结论:益气止血中药复方对各部位 POMC 的基因表达均有较好的调节作用,表现出单纯用药的协同作用,且其作用也略强于阳性对照药归脾丸。

主题词 脾不统血/中医药疗法 基因表达 脑/药物作用

一般认为,机体内外许多因素如精神过度紧张、忧伤、恐惧,过度劳累,环境和气候的骤变及其他全身性疾病,均可通过大脑皮层的神经递质影响下丘脑—垂体—卵巢轴的相互调节,导致卵巢功能的紊乱,而致子宫内膜异常出血。阿片肽(β -EP)是调控促性腺激素释放激素(GnRH)分泌及女性生殖的一种重要神经递质,在精神因素对生殖的影响中起重要的作用,前阿黑皮素(POMC)是 β -EP的前体。以往我们在建立脾不统血证模型的基础上,探讨了模型的出血因素、子宫内膜细胞凋亡及细胞周期的变化^[1-3],本实验通过研究脾不统血证大鼠模型脑组织 POMC 基因表达的变化,探讨益气止血中药对功血脾不统血证脑组织 POMC 基因表达的作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物:二级 Wistar 雌性大鼠,体重 210~230g,由中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所实验动物中心提供,尽量选择同一批出生并在一起饲养的大鼠,这样它们的性周期比较一致。

1.2 实验药物:治疗用药以益气止血为组方原则,主要由黄芪、三七等药物组成。黄芪以 60%乙醇回流提取 3 次,1.5~2h/次,合并回流液,过滤,水浴蒸发至稠

膏状,减压干燥得干浸膏。三七用 80%乙醇回流提取 3 次,1.5~2h/次,合并回流液,过滤,水浴蒸发至稠膏状,减压干燥得干浸膏。由本校中药学院制剂研究室制备。阳性对照药人参归脾丸由北京同仁堂制药厂生产(批号 9010233)。造模用药:(1)番泻叶水浸剂:将自来水放入烧杯中,置于电炉上煮沸后,迅速将番泻叶按照 1000ml 水 100g 药的比例投入沸水中浸泡,冷却后过滤出番泻叶,余液 4℃保存备用。(2)水蛭粉水溶液:将水蛭榨碎,研磨成粉,200 目网过筛,以 0.1g 水蛭粉 3ml 水的比例配置。(3)番泻叶水蛭粉溶液:以 0.1g 水蛭粉 3ml 番泻叶水浸剂的比例制成,4℃保存备用。上述各液在使用时,充分摇匀。

1.3 试剂:原位杂交检测试剂盒(组成:蛋白酶 K、HybA 液、HybB 液即生物素标记 POMC 探针、马血清、SPAP),NHR 公司产品;甲酰胺、碱性磷酸酶,Sigma 公司产品;多聚甲醛、乙醇、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠、盐酸、氯化镁、柠檬酸三钠·2H₂O:分析纯,北京化工厂产品。

1.4 动物分组:将 72 只大鼠按照体重随机分为 6 组, A 组为正常对照组;B 组为脾不统血证模型组(模型组);C 组为脾不统血证模型+益气药组(益气药组);D 组为脾不统血证模型+止血药组(止血药组);E 组为脾不统血证模型+益气止血药组(益气止血药组);F 组为脾不统血证模型+阳性对照药组(阳性对照药组)。每组 12 只。实验全过程中 6 组大鼠均在北京中医药大学中医证候病理生理实验室动物室(清洁级)中饲养。

1.5 造模方法:实验动物置于室温 24℃动物实验室中,6 只一笼,自由进食饮水,适应环境 3 天。第 4 天除正常对照组外其余 5 组开始造模。每组每天予以番泻叶水蛭粉溶液 3ml 灌胃,并游泳 15min,水深 75cm,水温 22±1℃,每 6 只一组;实验第 11d,C 组大鼠每天予以益气中药 3ml 灌胃(其中生药含量,黄芪 3g/只),D 组大鼠每天予以止血中药 3ml 灌胃(其中生药含量,三七 0.6g/只),E 组大鼠每天予以益气止血中药 3ml 灌胃(其中生药含量,黄芪、三七分别为 3g/只,0.6g/

基金项目:国家中医药管理局资助课题(2000-J-B-20),高等学校博士基金课题

* 北京中医药大学基础医学院诊断教研室,北京市北三环东路 11 号(100029)

收稿日期:2002-07-19

只),F 组大鼠每天予以归脾丸(同仁堂制药厂生产,用量为等效量的 2 倍)水溶液 3ml 灌胃。第 16 天、17 天实验结束,每天每组半数大鼠处死取材。

1.6 测定方法:大鼠 10%水合氯醛麻醉(400mg/kg)、取血、断头后,立即取出脑组织,从下丘脑中间将脑组织分为前后两部分,分别放在硬纸片上,并用锡纸包好,放入液氮中,后置-70℃冰箱保存。于-20℃在 LEICA-CM1900 型恒冷箱切片机中制备 10μm 切片,裱贴在预先经 2%APES(购自北京中山生物技术有限公司)胶处理的载玻片上,置-20℃冰箱中备用。含 POMC cDNA 片段的质粒(克隆载体为 PGEM-4Z,含 442bp 的 POMC cDNA 片段)由澳大利亚 Dr. DOMINIC AUTELTANO 赠送。质粒的转化、扩增、提取及生物素标记探针的制备,由北京大学医学部病理室进行。原位杂交按常规方法进行,以 SPAP(1:500 稀释)及 NBT-BCIP(1:100 稀释)显色。采用 TN-8520 型图像分析系统(USA Tracor Northern Co),对 POMC 杂交阳性细胞进行定量检测。每组随机测试 6 张切片,每一部位随机测试 1 个视野。分别测量 POMC 阳性物面积(%)及积分光密度。图像分析在北京中医药大学组胚教研室进行。

1.7 统计学方法:实验结果以($\bar{x} \pm s$)表示。组间差异的比较采用 Duncan's 检验及方差分析。

2 结果

2.1 光镜下观察:POMC 杂交阳性信号位于胞浆内,胞核不着色,呈深蓝色颗粒,阳性细胞广泛分布于皮质、海马、丘脑、下丘脑等脑区及其核团。

2.2 各组大鼠额叶皮层前阿黑皮素信使核糖核酸(POMC mRNA)表达图像分析结果比较:表 1 示,脾不统血证模型组 POMC 阳性信号在额叶皮层的积分光密度及面积均较正常组显著增加($P < 0.01$)。各中药治疗后,积分光密度均较脾不统血证模型组显著降低($P < 0.01$),但益气止血药组及阳性对照药组却显著高于正常对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);除止血药组阳性物面积较模型组高以外($P < 0.01$),其余各中药组面积均较模型组及止血药组显著降低($P < 0.01$),但止血药组、益气药组仍显著高于正常($P < 0.01$),而益气止血药组及阳性对照药组与正常组比较无显著性差异($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠海马 CA₁ 区 POMC mRNA 表达图像分析结果比较:表 2 示,模型组 POMC 阳性信号在海马 CA₁ 区的积分光密度及面积均较正常组显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各中药组治疗后,积分光密度

表 1 各组大鼠额叶皮层 POMC mRNA 表达图像分析结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	积分光密度	面积(%)
正常对照组	6	42.16 ± 5.23	0.49 ± 0.24
模型组	6	340.64 ± 41.59**	5.81 ± 0.49**
益气药组	6	60.50 ± 17.85**△	1.41 ± 0.13**△▲
止血药组	6	49.81 ± 15.27△	9.73 ± 2.96**△
益气止血药组	6	56.55 ± 6.66△	0.83 ± 0.17△▲
阳性对照药组	6	58.08 ± 6.12**△	0.86 ± 0.17△▲

与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.01$;与止血药组比较,▲ $P < 0.01$

表 2 各组大鼠海马 CA₁ 区 POMC mRNA 表达图像分析结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	积分光密度	面积(%)
正常对照组	6	20.55 ± 3.55	0.98 ± 0.57
模型组	6	231.66 ± 61.09**	4.16 ± 1.32*
益气药组	6	181.23 ± 38.97**	2.23 ± 0.93*
止血药组	6	56.96 ± 4.14**△△☆	1.20 ± 0.15△
益气止血药组	6	37.26 ± 21.73△△☆	0.57 ± 0.42△△
阳性对照药组	6	23.87 ± 5.52△△▲☆	0.81 ± 0.25△

与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与止血药组比较,▲ $P < 0.01$;与益气药组比较,☆ $P < 0.01$

表 3 各组大鼠下丘脑 POMC mRNA 表达图像分析结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	积分光密度	面积(%)
正常对照组	6	17.74 ± 1.93	3.06 ± 0.42
模型组	6	139.48 ± 28.18**	3.98 ± 0.28*
益气药组	6	57.67 ± 20.07**△	2.30 ± 1.12*▲
止血药组	6	104.17 ± 30.06**	7.04 ± 1.94*
益气止血药组	6	26.89 ± 10.49△△▲	1.84 ± 0.31**△△▲
阳性对照药组	6	46.97 ± 9.55**△△▲	2.78 ± 0.63△▲

与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与止血药组比较,▲ $P < 0.05$

及面积均较模型组下降,且止血药组、益气止血药组及阳性对照药组较模型组显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但益气药组及止血药组的积分光密度仍显著高于正常组($P < 0.01$),益气药组还显著高于其它 3 个治疗组($P < 0.01$),止血药组显著高于阳性对照组($P < 0.01$)。

2.4 各组大鼠下丘脑 POMC mRNA 表达图像分析结果比较:表 3 示,模型组 POMC 阳性信号在下丘脑的积分光密度及面积均较正常组显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各中药组治疗后,积分光密度均降低,且益气药组、益气止血药组及阳性对照药组显著下降($P < 0.01$),但益气药组、止血药组及阳性对照药组仍

显著高于正常组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 止血药组显著高于益气止血药组及阳性对照药组 ($P < 0.05$); 除止血药组阳性物面积高于模型组外, 其余 3 个治疗组均下降, 且益气止血药及阳性对照药组显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 益气止血药组还显著低于正常组 ($P < 0.01$), 而止血药组却显著高于其它 3 个治疗组及正常组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

前阿黑皮素 (proopiomelanocortin, POMC) 是由于含有 β -EP、促黑激素 (MSH) 和促肾上腺皮质激素 (ACTH) 而得名。主要在垂体合成, 除垂体之外, POMC 基因表达部位还有下丘脑、杏仁核、大脑皮质以及卵巢和睾丸、肾上腺髓质^[3]、胃肠道、肺、脾^[4,5]与免疫细胞^[6]等。POMC 纤维少量分布于下丘脑弓状核, 但腹侧正中至前连合区域有大量的 POMC 神经分布^[7]。应激与 POMC 系统有关^[8]。

β -EP 是调控 GnRH 分泌及女性生殖的一种重要的神经递质。有学者认为, β -EP 神经元内有 ER 存在, 而 GnRH 神经元内无 ER^[9]。另外, 电镜观察到 β -EP 神经元和 GnRH 神经元有突触连接^[10]。多种应激因素如剧烈运动、焦虑、节食等可引起功能性子宫出血, 心理因素在功能性子宫出血发生中也起着重要作用。有人提出 β -EP 调控正常生殖机能的作用是通过以下途径完成的: 应激可以导致促肾上腺皮质释放因子 (CRF)、ACTH 及 β -EP 分泌增加, 由此导致 (1) 直接或间接抑制性腺分泌; (2) 减弱垂体对 GnRH 的应答, 使 LH 分泌减少^[11]; (3) 直接刺激下丘脑 CRF 的分泌, 从中枢机制减少 GnRH 的分泌。体内外实验均表明, 内源性 CRF 可促进下丘脑内的 β -EP 分泌, 从而抑制 GnRH 释放^[12]。

本实验采用原位杂交方法, 显示 POMC 阳性细胞广泛分布于大脑皮质、海马、丘脑、下丘脑等脑区及其核团。对于脾不统血证大鼠模型, POMC 的积分光密度及面积在额叶皮质、海马、下丘脑均较正常组显著增加。经过中药治疗后, 单纯益气药对海马 CA₁ 区 POMC 积分光密度降低作用不明显, 但对额叶皮质及下丘脑的 POMC 积分光密度和面积均有较好的作用; 单纯止血药组对下丘脑 POMC 积分光密度作用不显著, 而使额叶皮质及下丘脑 POMC 面积进一步增加; 益气止血中药复方及阳性对照药均使 3 个部位 POMC 的基因表达下降。相比较而言, 阳性对照药除使海马 CA₁ 区 POMC 积分光密度降低较益气止血中药复方明显外, 对其它部位的作用均略逊于益气止血中药复方。

心理、精神因素在功能性子宫出血的发生中有重要作用, 而这些因素常可导致脑内神经肽的改变。本研究证实了功能性子宫出血脾不统血证动物模型脑组织 β -EP 的前体 POMC 基因表达增强, 其它实验也得出下丘脑 β -EP 含量增加 (待发表), 而 β -EP 与 HPOA 及心血管系统有密切的联系, 可影响女性内分泌生殖功能及心血管状态, 可能导致雌激素的降低、血管舒缩因子或血液出、凝血系统的失衡, 出现功血脾不统血证的一系列病理生理改变。可见, 脑组织 POMC 基因表达的增强是功血脾不统血证的主要病理生理基础之一。

此实验结果表明, 脾不统血证大鼠模型脑组织中 POMC 基因表达增强是脾不统血证主要和基本的病理生理基础, 单纯益气药对额叶皮质及下丘脑 POMC 基因表达增强的降低作用较好, 单纯止血药对海马 CA₁ 区 POMC 的治疗作用较好, 而益气止血中药复方对各部位 POMC 的基因表达均有较好的治疗作用, 表现出单纯用药的协同作用, 且其作用也略强于阳性对照药归脾丸。

参考文献

- 1 陈易新, 陈家旭, 季绍良, 等. 脾不统血证中脾气虚状态与出血因素关系的研究. 中医药研究, 2001, 17(1): 38-40.
- 2 瞿德斌, 陈家旭, 季绍良, 等. 脾不统血证大鼠模型子宫内膜细胞凋亡及细胞周期的研究. 北京中医药大学学报, 2002, 25(1): 29-31.
- 3 Pinar JE. Characterization and localization of proopiomelanocortin messenger RNA in adult rat testes. Science, 1984, 225: 632-637.
- 4 Jung HH. Tissue distribution of messenger RNAs coding for opioid peptide precursors and related RNA. Eur J Biochem, 1984, 132: 411-418.
- 5 Autelitano DJ. Hormonal regulation of POMC gene expression. Annu Rev Physiol, 1989, 51: 715-722.
- 6 Bateman A. The immune-hypothalamic pituitary-adrenal axis. Endocr Rev, 1989, 10: 92-99.
- 7 Mechanick JL. Proopiomelanocortin gene expression in a distinct population of rat spleen and lung leukocytes. Endocrinology, 1992, 131: 518-526.
- 8 Khachaturian H. Anatomy of the CNS opioid systems. Trends Neurosci, 1985, 8: 111-118.
- 9 Przewlocki R. Opioid systems and stress. IN: Albert Herz. Opioids. T. Springer-verlag, 1995: 294-304.
- 10 Chen WP, Witkin JW, Silverman AJ. Beta-endorphin and gonadotropin releasing hormone neurosecretory cells in the male rat. J Comp Neurol, 1989, 286: 89-98.
- 11 Leranck C, Macluskay NJ, Shanabrough M et al. Immunohistochemical evidence for synaptic connections between proopiomelanocortin-immunoreactive axons and LHRH neurons by the preoptic area of the rat. Brain Res, 1988, 449: 167-180.
- 12 McArthur J. Endorphins and exercise in females: possible connection with reproductive dysfunction. Med Sci Sports Exerc, 1985, 17(1): 82-87.

ABSTRACTS FROM ORIGINAL ARTICLES

Effect of Needling Method for Regulating Mental Activity and Tonifying the Kidney on Aromatase Cytochrome P450 mRNA Expression in the Ovary of Climacteric Rats

Shen Xiaoming, Du Yuanhao, Hu Ling, et al.

Objective: To study the effect of needling method for regulating mental activity and tonifying the kidney on expression of aromatase cytochrome P450 (P450 arom) in climacteric rats. **Methods:** Hybridization in situ and computer-aided image analysis were adopted. **Results:** Expression of P450 arom mRNA in cells of sinusoidal follicles and the mature corpus luteum of the ovary decreased and in the interstitial adenocytes basically kept normal in climacteric rats. After acupuncture, expression of P450 arom mRNA in these parts, particularly in the sinusoidal follicle and the mature corpus luteum were significantly strengthened. **Conclusion:** Promotion of expression of P450 arom mRNA in the ovary is beneficial to increase of the content of rate-limiting enzyme for synthesis of estrin, which is possibly one of molecular mechanisms of the needling method for regulating mental activity and tonifying the kidney increasing estrin level in the body.

Author's address: Second Clinical Medicine Department of Anhui TCM College, Hefei 230038

Key Words: Cytochrome P450/acup-mox eff. Climacterium/acup-mox eff. @ Needling method for regulating mental activity and tonifying the kidney

(Original article on page 589)

Clinical Observation on Protective Action of Xinmaitong Capsules on Survival Myocardium in the Patient of Acute Myocardial Infarction

Qiu Ruixiang, Feng Jun, Meng Jun

Objective: To study protective action of TCM complex prescription Xinmaitong Capsules on survival myocardium in the patient of acute myocardial infarction (AMI). **Methods:** 46 cases of AMI who had successfully received PTCA operation were randomly divided into treatment group and control group with 20 cases in each. On the basis of routine treatment of AMI, 3 days before the operation, treatment group began to take Xinmaitong Capsules for 4 weeks. Nuclide resting myocardium development segment numbers, nuclide myocardium perfusion defect range score (ES) and nuclide myocardium perfusion defect severe extent cumulative scores (SS), as well as the level of blood vascular endothelial growth factor (VEGF) were investigated before and after treatment. **Results:** The varying rate of the resting myocardium development segment number from score 1 to 2 was

58.33% in treatment group, significantly higher than 53.33% in control group ($P < 0.05$), and ES and SS in treatment group was significantly lower than those in control group ($P < 0.05$). VEGF levels of 3 days and one week after the operation in treatment group were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Xinmaitong Capsules can promote metabolic activity of the survival myocardium and expression of blood VEGF, exerting positive protective action on ischemic myocardium in the patient of AMI. Chinese drug for supplementing Qi and promoting blood circulation is of action like blood vessel neogenesis activity, contributing to formation of neonatal vessels and establishment of collateral circulation in the infarction region, which plays an important role in improvement of low perfusion state in ischemic survival myocardium.

Author's address: TCM Department, First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen Medical University, Guangzhou 510080

Key Words: Myocardial infarction/TCM ther. Myocardium/metabolism. @Xinmaitong Capsules

(Original article on page 598)

Effect of TCM Complex Prescription for Invigorating Qi and Hemostasis on POMC mRNA Expression in the Brain Tissue in Rats of Failure of Spleen to Control the Blood

Chen Jiaxu, Qu Dehong, Ji Shaoliang

Objective: To explore the effect of Chinese drugs for invigorating Qi and hemostasis on POMC mRNA expression in the model rats of failure of spleen to control the blood. **Methods:** Hybridization in situ and image analysis were used for determination of cumulative optical density and area of POMC mRNA in the cortex, hippocampus and hypothalamus. **Results:** The cumulative optical density and area of POMC mRNA in the brain tissues in model rats of failure of spleen to control blood were increased as compared with control rats, and the complex prescription for invigorating Qi and hemostasis could down-regulate the expression of POMC gene in the brain tissues. **Conclusion:** The complex prescription for invigorating Qi and hemostasis has a better regulative action on POMC gene expression in the brain tissues with a stronger action than Guipi Pills.

Author's address: College of Basic Medicine, Beijing University of TCM, Beijing 100029

Key Words: Failure of spleen to control blood/TCM ther. Gene expression. Brain/drug action

(Original article on page 612)