

西北寒燥证证候模型下丘脑—垂体—肾上腺轴紊乱状态研究

高 振¹ 胡汉华² 刘莹莹² 哈木拉提·吾甫尔²

(1 新疆医科大学附属中医医院,乌鲁木齐市黄河路 116号, 830000; 2 新疆医科大学中医学院)

摘 要 目的 观察西北寒燥证证候模型小鼠下丘脑—垂体—肾上腺轴的功能状态,初步诠释新疆高发疾病的共性生物学基础。方法 通过人工气候箱模拟新疆寒燥环境,并作用于小鼠,21天后眼球取血处死,取下丘脑、垂体、肾上腺分别在光镜和电镜下观察其组织形态学和细胞超微结构的改变,并测定其外周血中促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质酮(CORT)、 β 内啡肽(β EP)含量的变化。结果 与空白组比较,西北寒燥证证候模型组小鼠下丘脑、垂体、肾上腺存在器官组织形态学和细胞超微结构的改变,血清中 ACTH 含量升高($P < 0.01$),CRH、CORT、 β EP 含量未见明显差异($P > 0.05$)。结论 西北寒燥证证候模型小鼠下丘脑—垂体—肾上腺轴存在结构和功能状态的紊乱,这些可能是寒燥环境导致机体产生不同于其他地区人群病理生理状态,进而一些疾病在新疆高发的微观机制之一。

关键词 证候模型;西北寒燥证;下丘脑—垂体—肾上腺轴

GAO Zhen¹, HU Hanhua², LIU Yingying², Hamurat·Upur²

(1. 新疆医科大学附属中医医院,乌鲁木齐市黄河路 116号, 830000; 2. 新疆医科大学中医学院)

Abstract To explore the functional state of hypothalamus pituitary adrenal axis of the cold dry syndrome model mice to explore the common biological basis of the diseases of high incidence in Xinjiang. An artificial cold dry environment of Xinjiang was created in a climatic chamber and the mice were exposed for 21 days. The mice were killed by eyeball blood release. The hypothalamus, pituitary, and adrenal were removed and the histomorphological and cell ultrastructural changes were observed under the optical and electron microscopes respectively. The content of corticotropin releasing hormone (CRH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH), cortisone (CORT), and Beta endorphin (β EP) in the peripheral blood was determined.

Compared with the normal control group, in the model group there existed the histomorphological and cell ultrastructural changes in the tissues of hypothalamus, pituitary, and adrenal, and the content of ACTH in the serum was increased ($P < 0.01$), while the content of CRH, CORT and β EP was not significantly different ($P > 0.05$). The structural and functional disorders exist in the hypothalamus pituitary adrenal axis of the cold dry syndrome model mice, which is the physiopathological state possibly caused by the cold dry environment, being one of the microcosmic mechanisms of some diseases of high incidence in Xinjiang.

Key words Models of syndromes; Cold dry syndrome in the Northwest of China; Hypothalamus pituitary adrenal axis

新疆维吾尔自治区地处中国西北部,气候干燥寒冷。受此环境影响,初入新疆之人,机体会出现一系列诸如干涩、焦虑、烦躁等异常反应,日久还可能成为诸如过敏性鼻炎、皮肤病、支气管炎等新疆特发高发疾病的共同原因之一^[1]。在这种寒燥环境应激下如不干预可使机体处于一种“亚健康”或者“疾病易感期”,甚至“发病前期”的状态,但缺少基于实验数据的生物学基础支持。按系统生物学的观点,机体是一个复杂系统,这个复杂系统会通过不同网络之间的信息传递和整合,使基因或蛋白质产生出最终的生物学功能,出现一些单独系统所不能反映的新行为^[2]。故本实验在建立西北寒燥证证候模型的基础上,观察神经—内分泌—免疫网络枢纽的下丘脑—垂体—肾上腺轴组织形态学和细胞超微结构的改变,藉此揭示新疆寒燥环境对

模型机体下丘脑—垂体—肾上腺轴功能状态的影响,初步揭示新疆高发病的共性生物学基础。

1 材料与方法

1.1 动物

ICR 小鼠 33 只,SPF 级,雄性,体重 (20 $\pm$ 2) g。新疆医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(新)2003-001。

1.2 主要仪器

RQH 350 型人工气候箱,上海精宏实验设备有限公司;Motic BA 400 显微镜,批号:80540066 麦克奥迪(中国)公司;JEM 1230 透射电镜,日本电子株式会社。

1.3 试剂

甲醛,乙醇,伊红等均为国产试剂;苏木色精为进口分装。戊二醛、铬酸、Epon 812 环氧树脂、铅—铀染色均为进口试剂。四甲基偶氮唑、中性红、25% 戊二醛溶液为国产试剂。小鼠血清促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)ELISA 试剂盒,促肾上腺皮质激素(ACTH)

ELISA 试剂盒、皮质酮 (CORT) ELISA 试剂盒、(GC) ELISA 试剂盒、β内啡肽 (βEP) ELISA 试剂盒均由美国 Ad litteram 诊断试剂公司提供。

1.4 分组

ICR 小鼠适应性喂养 3 天,去除体重偏离均数过大及性格表现特异者计 3 只。剩余 30 只小鼠用随机数字表法分为西北寒燥证模型组 (以下简称模型组)和空白组,每组 15 只。

1.5 模型制备

空白组予普通饲料喂养,室温 (25±3)℃,相对湿度 60%~80%,随意取食、饮水,不予任何施加因素;模型组亦予普通饲料喂养,每天上午 11:00 时放入人工气候箱,下午 9:00 时取出;系统温度设定为 6℃,相对湿度 25%~32.8%。空白组与模型组同样从上午 6:00~下午 6:00 提供正常光线。

1.6 光镜电镜样本的制备

至实验的第 21 天,将两组实验小鼠随机取出 6 只眼球取血处死,迅速取出下丘脑、垂体、肾上腺等组织,先取体积小于 1mm×1mm×1mm,用 4%戊二醛和 1%锇酸双固定,丙酮梯度脱水,Epon812 环氧树脂包埋,超薄切片,铅—铀染色,透射电镜观察。同样操作方法,取出所需组织后迅速固定于 10%的中性甲醛溶液中,经 5 天固定后取材、石蜡包埋,切片,HE 染色,光学显微镜组织形态学观察。

1.7 血清 CRH、ACTH、CORT、βEP 含量的测定

各组小鼠于第 21 天上午 10:00~12:00 眼静脉采血,1500 转/min,4℃离心分离血清,血清放置在一 80℃保存待测。小鼠血清 CRH、ACTH、CORT、βEP 采用酶联免疫法测定,参照试剂盒操作说明进行。

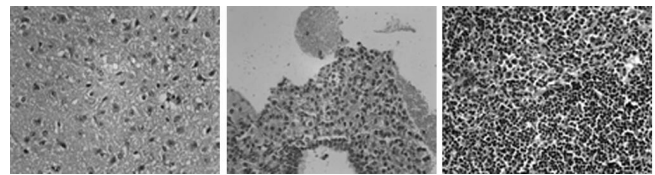
1.8 统计学方法

用 SPSS 15.0 统计软件进行数据处理,计量数据用均数±标准差表示,组间比较采用 t 检验。

2 结果

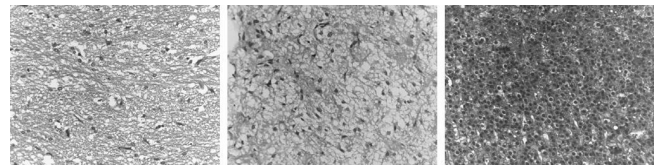
2.1 两组小鼠下丘脑、垂体、肾上腺组织形态学比较

模型组下丘脑:脑组织轻度水肿,胶质细胞轻到中度增殖,血管轻度扩张,淋巴细胞轻度增多;垂体:无水肿,轻度增殖,血管呈轻度扩张,淋巴细胞散在性轻度增多;肾上腺:结构不清楚,无皮质增生,血管呈轻度到中度扩张,淋巴细胞明显增多,浆细胞轻度增多,细胞核中度分裂。空白组下丘脑:神经细胞呈轻度增殖;垂体:细胞无水肿,轻度增殖,血管无扩张;肾上腺:架构较为清楚,无皮质增生,髓质无增生。提示西北寒燥证模型组下丘脑—垂体—肾上腺轴内分泌障碍、反馈调节机制破坏而引起组织细胞反应性增生、血管扩张等,见图 1~图 2。



下丘脑 (×400) 垂体 (×400) 肾上腺 (×400)

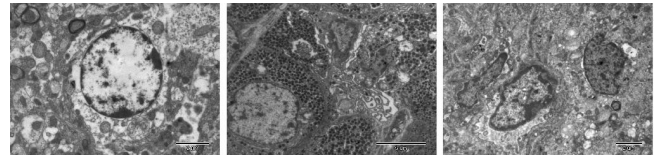
图 1 模型组小鼠脏器组织形态学改变



下丘脑 (×400) 垂体 (×400) 肾上腺 (×400)

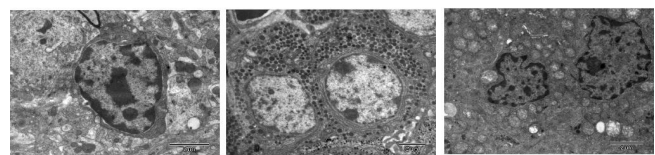
图 2 空白组小鼠脏器组织形态学改变

2.2 两组小鼠下丘脑、垂体、肾上腺轴细胞超微结构比较



下丘脑 (×12000) 垂体 (×6000) 肾上腺 (×8000)

图 3 模型组小鼠脏器组织超微结构改变



下丘脑 (×12000) 垂体 (×6500) 肾上腺 (×10000)

图 4 空白组小鼠脏器组织超微结构改变

模型组下丘脑:细胞基质变淡,核周隙变宽、线粒体轻度肿胀,细胞器减少;垂体:内质网扩张,线粒体空泡样变;肾上腺:核形不规则,核仁边集,核周隙增宽,异染色质增加。空白组下丘脑:细胞基质均匀一致,核基质均匀,轻微核周隙增宽;垂体:内质网无扩张,内分泌颗粒较多,线粒体基本正常;肾上腺:核仁明显,大而圆,异染色质较多,成团块状。提示模型组组织有缺氧,细胞合成代谢能力下降,见图 3~图 4。

2.3 两组小鼠下丘脑—垂体—肾上腺轴生物学基础的比较

表 1 示,与空白组比较模型组小鼠血清中 ACTH

表 1 两组小鼠血清 CRH、ACTH、CORT、βEP 含量比较 (ng/ml,抗±物)

组别	鼠数	CRH	ACTH	CORT	βEP
空白组	9	126.30±19.43	360.89±46.12	193.20±15.99	4.31±0.09
模型组	9	159.70±15.25	478.99±17.12	248.10±13.35	4.13±0.22

注:与对照组比较, t=0.01

含量升高 ($P < 0.01$), CRH、CORT、 β EP含量未见明显差异 ($P > 0.05$)。提示西北寒燥证模型下丘脑—垂体—肾上腺轴功能相对亢进,处于激活状态。

3 讨论

“邪之所凑,其气必虚”(《素问·评热病论》),“气”指正气,“虚”指正气虚。据此可以认为机体之所以发病,外感六淫是一个方面,但是机体正气虚弱则是起着关键作用的另一方面,两邪相感则疾病发作,即《灵枢·百病始生》所谓“风雨寒热不得虚,邪不能独伤人”。故而,可以认为某疾病在某个地方高发,与当地人群的内在生理病理状态有着极大的关系,即这种生理病理状态与当地高发疾病的发病因素和诱因具有一种先天的亲和力。寒燥环境作为一种应激源在新疆广泛长期存在,而下丘脑—垂体—肾上腺轴则是机体最主要的应激反应轴,在调节机体多种机能,维持内环境相对稳定方面发挥重要作用。在寒燥环境的作用下,机体CRH刺激垂体分泌ACTH,ACTH刺激肾上腺皮质合成和分泌CORT,而CORT反馈抑制ACTH和CRH的生成的HPA轴环行调节通路出现异常,CORT的负反馈抑制效应减弱,从而ACTH和CORT分泌增多,下丘脑—垂体—肾上腺轴功能亢进。

我们借鉴沈自尹院士^[3]报告肾阳虚证具有下丘脑—垂体—肾上腺轴功能紊乱的研究结论,首先对模型的下丘脑—垂体—肾上腺轴进行形态结构和微观指标的研究。结果显示,小鼠机体下丘脑、垂体、肾上腺等脏器存在组织形态学和细胞超微结构的改变,从组织结构上表现出其处于应激激活状态。由于寒燥环境可以诱使机体的血液循环障碍,导致部分组织血流量减少,进而导致部分组织缺氧。即中医所谓燥性干涩,易伤津液,更与寒合,一则耗损、一则凝滞,故不仅出现津液的耗损,更有作为“阴”功能的抑制。化学感受性反射对脑血管的缩血管效应很小, CO_2 分压升高和低氧对脑血管的直接舒血管效应非常明显,进而会出现脑、垂体的血管扩张。线粒体是维持细胞呼吸和氧化磷酸化的多酶系统的载体、细胞生物氧化产生能量的重要场所。细胞生命活动所需能量有95%来自线粒体,本实验发现部分组织线粒体出现轻度肿胀甚至空泡样变。淋巴细胞在免疫应答过程中起核心作用,实验发现血管中淋巴细胞增多,考虑与应激激活免疫系统有关。这些可能是导致下丘脑—垂体—肾上腺轴功能紊乱的结构基础所在。

正常情况下,垂体对ACTH的分泌受到下丘脑CRH的促进性影响,又受到血浆糖皮质激素负反馈作用的影响,还受昼夜节律的影响,因此,ACTH的释放

调节极为复杂。本研究发现,寒燥环境可以引起CORT分泌增加,考虑寒燥环境引起肾上腺皮质功能的增强,主要是通过外周化学感受器的刺激,反射性引起CRH和垂体释放ACTH增多。在后续的实验中我们发现ACTH含量的升高与寒燥环境下机体的免疫功能紊乱有密切的联系。一定程度上证实了免疫系统和下丘脑—垂体—肾上腺轴之间存在着正反馈通路,二者的相互激活使得西北寒燥证内在的病理生理状态得以持续。ACTH可经神经—内分泌—免疫系统调节下行通路,通过糖皮质激素诱发多种免疫细胞功能受抑制。所以ACTH的升高也可能是寒燥环境导致过敏性鼻炎、皮肤病、支气管炎等新疆特发高发疾病有多发倾向的间接原因之一。

CRH还有抑制食欲的作用,本实验模型组CRH水平较空白组并无明显差异,与后期小鼠进食逐渐恢复正常^[4]相一致。CORT具有很强的生物毒性,可参与神经细胞凋亡作用,所以如果血清中CORT持续升高,长时间作用于神经细胞,可导致神经细胞进一步受损,甚至死亡。这和本实验21天小鼠渐趋安静,以抑郁为主的精神状态有关。

总之,西北寒燥证证候模型下丘脑—垂体—肾上腺轴存在结构和功能状态的紊乱,这可能是寒燥环境导致机体产生不同于其他地区人群病理生理状态,其可能是一些疾病在新疆高发的微观机制之一。本模型目前的判定主要依据病因、生物表征、内在生物学基础,下一步拟从地域特色药物的应用及方剂反证的角度对所建立的动物模型加以干预反证。

参考文献

- [1]周铭心.西北燥证研究概述[J].上海中医药杂志,2005,39(11):43-45
- [2]沈自尹.系统生物学和信息医学在中西医结合中的应用[J].中西医结合学报,2006,4(2):111
- [3]沈自尹.肾阳虚证的定位研究[J].中国中西医结合杂志,1997,17(1):51
- [4]高振,阿地力江·阿布力米提,哈木拉提·吾甫尔.干燥寒冷环境对小鼠生物表征的影响[J].科技导报,2008,26(14):84-87.

收稿日期:2009-09-24 修回日期:2010-01-12

编辑:行 之]

长期销售空心胶囊

本产品严格按照国家标准和《中国药典》规定的质量要求生产,符合药用各项指标,有0号、1号、2号等多种型号、多种颜色可供选择。本公司以合理的价格欢迎单位和个人来电来函咨询。对用量少的单位和个人将办理邮购业务(价格,每万粒335元含邮资)。地址:浙江新昌县诺胶丸有限公司,邮政编码:312560 电话:(0575)86061888 013706852676 联系人:潘炎锋