

• 实验研究 •

强肌健力方对脾肾两虚证大鼠胸腺增殖细胞核抗原表达的影响

王立峰¹ 陈芝喜² 赵 慧^{2*} 何赞厚²

(1. 石家庄市第八医院井陉分院, 河北省石家庄市井陉县 11 号信箱, 050308; 2. 广州中医药大学)

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划) 资助项目(2005CB523502)

* 通讯作者: hh-zhao2008@yahoo.cn, (020) 36585561

[摘要] **目的** 观察强肌健力方对脾肾两虚证大鼠胸腺组织的作用及机理。**方法** 将 72 只 SD 大鼠随机分为 5 组, 即正常对照组(10 只), 模型组(16 只), 强肌健力方组(15 只), 黄芪减量方组(15 只), 单味黄芪组(16 只)。采用灌服大黄复制脾虚模型(14 天), 在脾虚基础上采用肌肉注射氢化可的松复制肾虚模型(10 天)。造模同时分别给予蒸馏水、强肌健力方、黄芪减量方、单味黄芪灌胃, 连续给药 24d 后, 取胸腺组织行 HE 染色, 光学显微镜下观察各组大鼠胸腺组织形态学的变化, 用免疫组化的方法测定增殖细胞核抗原(PCNA)表达。**结果** 模型组体质量比正常对照组显著减轻($P < 0.01$), 而各用药组均可使大鼠体质量升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 模型组大鼠胸腺组织有不同程度损伤, 而强肌健力方组、单味黄芪组能使已遭损伤的胸腺组织得以修复; 与正常对照组比较, 模型组胸腺组织 PCNA 蛋白表达减少, 阳性面积率显著降低($P < 0.01$); 而强肌健力方能使胸腺组织 PCNA 表达升高($P < 0.05$)。**结论** 强肌健力方能有效促进脾肾两虚证大鼠胸腺组织细胞增殖, 并对受损的胸腺组织具有保护作用, 其健脾益气的作用机理与升高 PCNA 表达有关。

[关键词] 强肌健力方; 脾肾两虚证; 组织形态学; 增殖细胞核抗原(PCNA); 胸腺

Effect of Qiangji Jianli Formula on the Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen of Thymus in Spleen-Kidney Deficiency Syndrome Model Rats

WANG Lifeng¹, CHEN Zhixi², ZHAO Hui², HE Zanhou²

(1. Jingjing Branch, the Eighth Hospital of Shijiazhuang City, Shijiazhuang 050308; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect and mechanism of Qiangji Jianli Formula (Herbal formula for strengthening muscles and bones) on the thymus of rat models with spleen-kidney deficiency syndrome. **Methods** Seventy-two SD rats were randomized into the following five groups: the normal control group ($n=10$), model group ($n=16$), Qiangji Jianli Formula group ($n=15$), Qiangji Jianli Formula with the Huangqi (*Radix Astragali seu Hedysari*) dosage reduced group ($n=15$), and Huangqi (*Radix Astragali seu Hedysari*) group ($n=16$). The spleen deficiency models were established by using Dahuang (*Radix et Rhizoma Rhei*) for 14 days, based on which, the kidney deficiency models were established by injecting cortisol for 10 days. At the same time, the distilled water, Qiangji Jianli Formula, Qiangji Jianli Formula with *Huangqi* reduced in dosage, and *Huangqi* were administered by gavage respectively. After the administration for 24 days in succession, the thymus of rats of all groups was obtained to observe the morphological changes under optical microscope and to determine the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) with the immunohistochemical method. **Results** Compared with the normal control group, the body weight of the model group was reduced significantly ($P < 0.01$), and that of all the treated groups was increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The thymus of the model group was damaged, while the Qiangji Jianli Formula group and Huangqi group got their damaged thymus repaired. Compared with the normal control group, PCNA expression in the model group was lowered and the rate of positive area was significantly lowered ($P < 0.01$), whilst Qiangji Jianli Formula group got its PCNA expression of thymus increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Qiangji Jianli Formula can promote the proliferation of cells of thymus of model rats with spleen-kidney deficiency syndromes, and protect the damaged thymus. Its mechanism of strengthening the spleen and replenishing qi is related to the increase of PCNA expression.

Key Words Qiangji Jianli Formula (herbal formula for strengthening muscles and bones); spleen-kidney deficiency syndrome; histomorphology; proliferating cell nuclear antigen (PCNA); thymus

强肌健力方是著名中医专家邓铁涛教授治疗重症肌无力的经验方,功能健脾益气,强肌健力,该方以重用黄芪甘温大补脾气为其特色。在前期实验研究中,强肌健力方可以有效防治大鼠脾虚、肾虚、脾肾两虚等证,增加胸腺质量^[1-3],其机制可能与重用黄芪有关。本实验通过观察不同剂量黄芪各组在促进胸腺增殖细胞核抗原(PCNA)表达及防止胸腺病理损伤等方面的疗效变化,探讨强肌健力方防治大鼠脾肾两虚证的机制及方中重用黄芪的意义。

1 材料和方法

1.1 动物

清洁级SD大鼠72只,雄性,体重(180±20)g,由广东省实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(粤)2003-0002。

1.2 药物

强肌健力方由黄芪、党参、白术、当归、升麻、柴胡、陈皮、甘草组成(均购自广州致信药业有限公司,经广州中医药大学中药学院鉴定),用回流提取法,经过两次提取药液并收集挥发油,浓缩至1.6g/ml,黄芪含量:0.74g/ml;黄芪减量方组成同强肌健力方,但黄芪减量,浓缩至0.85g/ml,黄芪含量为0.22g/ml;单味黄芪含量为0.74g/ml。以上药液提取后4℃保存备用。大黄购自广州致信药业,按1:5加入沸水煮沸,沸后小火继续加热煮12min,趁热过滤,在残渣内继续加蒸馏水,浸过残渣,加热至沸腾,过滤,两次滤液合并,在恒温水浴箱中(60℃~70℃)浓缩至2kg/L,存放4℃冰箱备用。氢化可的松注射液由天津金耀氨基酸有限公司生产,国药准字H12020886。

1.3 试剂

PCNA,即用型SABC试剂盒;DAB显色试剂盒均为武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.4 模型制备及给药方法

大鼠在适应性喂养2天后,采用随机数字表法将72只大鼠随机分为5组,正常对照组10只,模型组16只,强肌健力方组15只,黄芪减量方组15只,单味黄芪组16只。造模分两个阶段完成。第一阶段复制脾虚模型(脾虚期);第二阶段在脾虚基础上继续复制肾虚模型(脾肾两虚期),形成脾肾两虚证模型。

脾虚期:①正常对照组:每天上、下午各灌蒸馏水2ml/d;②模型组:上午灌服200%的大黄水煎液2ml/d,下午灌服蒸馏水2ml/d;③强肌健力方组:上

午同模型组,下午灌服强肌健力液2ml/d,给药剂量为15.6g/kg;④黄芪减量方组:上午同模型组,下午灌服黄芪减量方2ml/d,给药剂量为10.52g/kg;⑤单味黄芪组:上午同模型组,下午灌服单味黄芪2ml/d,给药剂量为7.26g/kg。连续14天。

脾肾两虚期:①正常对照组:肌肉注射生理盐水1ml/d,同时灌服蒸馏水2.5ml/d;②模型组:肌肉注射同模型组,并灌服蒸馏水2.5ml/d;③强肌健力方组:肌肉注射同模型组,并灌服强肌健力方2.5ml/d;④黄芪减量方组:肌肉注射同模型组,并灌服黄芪减量方2.5ml/d;⑤单味黄芪组:肌肉注射同模型组,并灌服黄芪水煎液2.5ml/d。连续10天。

造模灌药期间,每日观察动物的一般状态(包括饮食、毛发、精神、活动等)。于实验第24天断头处死大鼠,每组各取10个胸腺,置于10%甲醛液内固定,石蜡包埋,切片。

1.5 PCNA 抗原检测

主要步骤如下:①石蜡切片于二甲苯及阶梯浓度酒精中脱蜡至水,蒸馏水洗;②过氧化氢溶液室温孵育10min抑制内源性过氧化物酶活性,PBS冲洗;③切片浸入0.01M枸橼酸盐热修复抗原;④加入牛血清蛋白室温孵育20min;⑤切片加入一抗PCNA,置湿盒内4℃冰箱内孵育,过夜;⑥加入第二抗,湿盒内室温孵育20min;⑦加入SABC溶液,室温孵育20min;⑧DAB显色剂显色,镜下控制反应时间,自来水冲洗终止反应。⑨苏木精复染,阶梯浓度酒精脱水,二甲苯透明,树胶封片。用PBS替代一抗作为阴性对照组。

1.6 免疫组织化学结果判断

倒置显微镜下观察PCNA的表达变化,以细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性表达信号。阴性对照组除细胞浆染成蓝色外,胞核内无棕黄色反应物。采用Image-Pro Plus 5.1软件对表达细胞进行分析,每张切片随机选取5个完整而不重叠的高倍镜视野(×400),测定每个视野下阳性反应的阳性反应面积和所有细胞总面积,计算阳性面积率。以每例5个视野的阳性面积率的平均值作为该例的测量值。阳性面积率越大,表示相关的抗原表达越强。

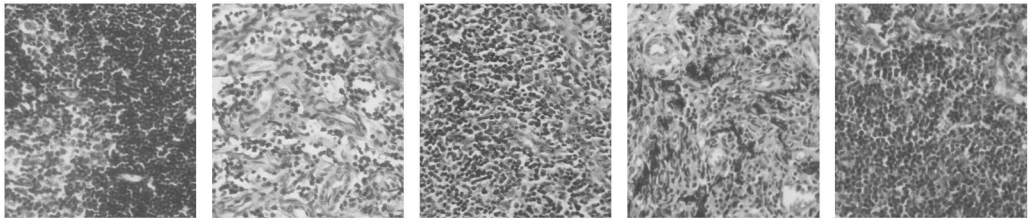
1.7 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件处理,计量数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异性比较采用 t 或 t' 检验。

表1 各组大鼠造模期间体质量变化(g, $\bar{x} \pm s$)

组别	给药前	造模后14d	造模后24d
正常对照组	(10) 183.40 $\pm$ 14.86	(10) 266.40 $\pm$ 18.19	(10) 297.20 $\pm$ 23.73
模型组	(16) 182.06 $\pm$ 13.37	(16) 220.19 $\pm$ 16.37 *	(16) 241.81 $\pm$ 20.18 *
强肌健力方组	(15) 182.73 $\pm$ 14.37	(14) 243.79 $\pm$ 20.15 $\triangle\triangle$	(14) 276.50 $\pm$ 21.44 $\triangle\triangle$
黄芪减量方组	(15) 184.87 $\pm$ 11.78	(15) 236.40 $\pm$ 18.66 $\triangle$	(15) 266.47 $\pm$ 22.48 $\triangle\triangle$
单味黄芪组	(16) 184.88 $\pm$ 7.79	(16) 240.19 $\pm$ 11.53 $\triangle\triangle$	(14) 269.07 $\pm$ 21.45 $\triangle\triangle$

注:与正常对照组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$;括号内为大鼠数



A 正常对照组 B 模型组 C 强肌健力方组 D 黄芪减量方组 E 单味黄芪组

图1 各组大鼠胸腺组织形态学比较($\times 400$)

2 结果

2.1 各组大鼠的一般状态观察

实验过程中因操作原因引起强肌健力方组死亡1只,单味黄芪组死亡2只,共损失3只,最终进入实验结果分析,第一阶段为71只,第二阶段为69只。

正常对照组大鼠表现为:毛发顺滑,体质量日渐增加,双目有神,反应、活动灵活敏捷,叫声响亮,正常进食饮水。模型组大鼠于第2天出现便溏,以后逐渐加重,体质量增长缓慢,精神日渐萎靡;第14~24天时症状更加明显:体质量减轻,毛发枯燥、肢冷,身体瘦削,喜蜷缩扎堆,目光无神,反应迟钝,少动,眯眼或闭眼,行动迟缓,叫声低而无力,饲食和饮水量减少,小便次数及小便量增多。而用药各组大鼠的症状较模型组有所改善。

2.2 各组大鼠体质量变化

表1示,与正常组对照比较,模型组体质量增长缓慢($P < 0.01$),而强肌健力方、黄芪减量方、单味黄芪使体质量趋向于正常,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 各组大鼠胸腺病理形态学变化

模型组胸腺小叶皮质淋巴细胞大量减少,纤维组织增生,皮质与髓质区别度基本消失,髓质胸腺小体少见,与正常对照组比较存在明显的差别。强肌健力方组、单味黄芪组胸腺小叶皮质淋巴细胞密度高于模型组。黄芪减量方组胸腺小叶组织结构近似模型组,未见趋向正常的迹象,见图1。

2.4 各组大鼠胸腺组织PCNA 表达的比较

表2示,模型组胸腺组织PCNA 蛋白表达减少,表达细胞的阳性面积率明显低于正常对照组($P < 0.01$);强肌健力方组胸腺组织PCNA 表达较模型组多($P < 0.05$);其他用药各组效果一般,与模型组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表2 各组大鼠胸腺组织PCNA 表达阳性面积率(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	阳性面积率
正常对照组	10	0.26 $\pm$ 0.06
模型组	16	0.16 $\pm$ 0.04 *
强肌健力方组	14	0.22 $\pm$ 0.06 $\triangle$
黄芪减量方组	15	0.18 $\pm$ 0.06
单味黄芪组	14	0.16 $\pm$ 0.05

注:与正常对照组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, $\triangle P < 0.05$

3 讨论

本实验在复制大鼠脾肾两虚证模型时,首先采用大黄灌胃,苦寒泻下损及脾阳,致使脾脏运化失职,后天失养,日久传变,累及肾阳,后期采用氢化可的松肌肉注射,更加剧了肾虚的程度,同时由于肾脏虚损,前期受损脾阳亦不能恢复,最终出现脾肾两虚,元气虚损的症状。

中医学认为元气是构成人体的本原,与脾肾关系最为密切。脾肾两虚时,元气推动人体生长发育的功能降低,影响到机体内相应脏腑的正常生理活动,从而出现相应的病理变化。在本实验中,模型组大鼠前期便溏,体质量增长缓慢,后期毛发枯燥松弛、肢冷,身体瘦削,喜蜷缩扎堆,小便次数及小便量增多,

符合临床脾肾两虚, 元气虚损的表现。

PCNA 为DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白, 参与DNA 的合成, 是反映细胞增殖的一个特异指标, PCNA 含量的变化与DNA 合成一致^[4-5]。本次实验镜下发现胸腺PCNA 蛋白表达明显减少, 这与前期实验脾虚小鼠胸腺DNA 合成减少^[1]一致, 说明脾肾两虚大鼠胸腺功能已经受到影响, 胸腺细胞正常增殖过程受到阻碍, 同时也导致了胸腺小叶皮质淋巴细胞大量减少等病理形态学的改变, 这可能是因为脾胃功能受损, 营养物质匮乏, 肾失温煦, 元气推动人体生长发育的功能降低所致。胸腺是T 细胞发育成熟的场所, 是重要的中枢免疫器官, 本身也是内分泌器官, 产生和分泌胸腺素和激素类物质, 在神经内分泌免疫网络调节中占有重要地位, 如果出现病理损伤, 无疑会对机体免疫调节、内分泌系统等造成不良影响, 出现多系统脏器的病理反应。强肌健力方中重用黄芪大补元气, 其他药物协助君药补脾益气, 使机体内元气得以补充, 从而推动胸腺的正常发育, 促进胸腺内PCNA 的表达($P < 0.05$), 与以往强肌健力口服液能促进胸腺组织细胞DNA 合成相符^[1]。相关药理学研究也表明黄芪、党参、白术、当归等药物对胸腺都有调节作用^[6-8], 可以增加胸腺重量。因此诸药合用, 达到了很好的防治效果。

同时可以看到, 各用药组治疗效果也不相同, 在促进PCNA 蛋白表达时, 只有强肌健力方组有统计学差异($P < 0.05$), 其他各用药组无统计学差异。而在病理上, 强肌健力方组、单味黄芪组胸腺小叶皮质淋巴细胞密度高于模型组, 黄芪减量方组则近似模型组。通常疾病在发展中一般首先是功能性的, 功能异常发展到一定程度才表现为器质性病变及其机能的异常。因此我们推测模型组首先是PCNA 表达降低, 胸腺功能下降, 后期才出现病理变化。而重用黄芪能够延迟大鼠从功能失常到病理损伤这一过程的进展速度, 所以单味黄芪组PCNA 蛋白表达已减少, 而病理变化却好于黄芪减量方和模型组; 其他药物则起到了辅助作用, 使强肌健力方组防治效果好于单味黄芪组。

总之, 在复制大鼠脾肾两虚证时, 胸腺正常功能受到影响, PCNA 蛋白表达降低, 胸腺小叶皮质淋巴细胞大量减少, 纤维组织增生, 而应用强肌健力方可以有效防治脾肾两虚时对胸腺的损伤, 其机制可能与促进PCNA 蛋白表达有关, 而方中重用黄芪起

到了关键作用, 减少黄芪剂量后, 效果明显下降。

参考文献

- [1] 陈芝喜, 徐志伟, 刘小斌, 等. 强肌健力口服液对脾虚小鼠DNA 合成的影响[J]. 中国临床康复, 2006, 10(15): 141-143.
- [2] 赵慧, 陈芝喜, 陈津岩, 等. 强肌健力饮对肾虚大鼠CRH·ACTH·Cor 水平的影响[J]. 放射免疫学杂志, 2007, 20(4): 324-326.
- [3] 王立峰, 陈芝喜, 赵慧, 等. 强肌健力方对脾肾两虚证大鼠血浆性激素水平的影响[J]. 放射免疫学杂志, 2008, 21(2): 147-149.
- [4] Bravo R, Frank R, Blindell PA, et al. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein to DNA polymerase- δ [J]. Nature, 1987, 326(6112): 515-517.
- [5] Takada M, Tanaka H, Yamada T, et al. Antibody to thrombin receptor inhibits neointimal smooth muscle cell accumulation without causing inhibition of platelet aggregation or altering hemostatic parameters after angioplasty in rat[J]. Circ Res, 1998, 82(9): 980-987.
- [6] 许杜鹃, 陈敏珠. 黄芪总提物对小鼠免疫功能调节作用研究[J]. 中药药理与临床, 2006, 22(6): 40-41.
- [7] 彭新国, 邱世翠, 李彩玉, 等. 白术对小鼠免疫功能影响的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(5): 396-397.
- [8] 孙红旭, 赵鹏, 颜春鲁, 等. 当归多糖影响小鼠胸腺细胞凋亡的实验研究[J]. 甘肃中医, 2005, 18(11): 41-42.

(收稿日期: 2010-08-17; 修回日期: 2010-12-10)

[编辑: 行之]

当代名医诊断与治疗疑难病学术研讨会征文通知

为研究挖掘当代名医治疑难病症的新思路、新方法和新经验, 拟于2011年9月在北京召开“当代名医诊断与治疗疑难病创新经验学术研讨会”。征文内容: 1. 运用中医、针灸、推拿、按摩、刮痧、熏蒸、药浴、穴位埋线、小针刀、脊柱疗法等方法治疗各科难治病、疑似病的经验总结与创新研究。2. 有关诊断与治疗疑难病相关的论述、学术讨论、学术动态等。请注明“疑难病”会议。截稿日期: 2011年6月10日。

中医学源远流长, 历代名医都为世人留下了宝贵的实践经验, 为落实《传世经典·名医经验》(暂定名)系列卷书的编纂工作, 现面向全国征集如下文稿: 1. 各地名老中医学术思想与经验总结; 2. 名老中医、民间医生经验总结及医案、医话、经验方药介绍与整理。请在来稿上注明“传世经验”字样; 截稿日期: 2011年6月28日。

以上来稿请挂号寄至: 北京市100166-1信箱, 北京国苏医学研究院学部收, 邮编: 100166。电子文稿: bjb@gsyxy.com。联系电话: (010) 57201765、57201766。

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160元(含邮资)。

地址: 浙江新昌县一诺胶丸有限公司, 邮政编码: 312560, 电话: (0575) 86061888, 013706852676, 联系人: 潘炎锋