



Lewis 大鼠下丘脑中肾阳虚相关 mRNA 表达及超微结构观察

张利棕, 方明笋, 杨伟吉, 蔡月琴, 徐剑钦, 寿旗扬*, 陈民利

(浙江中医药大学, 杭州 310053)

【摘要】 **目的** 通过对 Lewis 大鼠下丘脑肾阳虚相关基因表达和超微结构的观察,进一步对 Lewis 大鼠肾阳虚体质进行研究。**方法** 采用 Lewis 大鼠与皮下注射氢化可的松法的肾阳虚模型进行比较,并通过检测各组大鼠下丘脑中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-10、CRH、MR、GR mRNA 表达和下丘脑、肾上腺组织超微结构的观察等,对 Lewis 大鼠肾阳虚体质机制进行研究。**结果** 与正常 Wistar 大鼠比较,Lewis 组大鼠下丘脑 GR、IL-2 mRNA 表达明显升高($P < 0.01$),而下丘脑 CRH、TNF- α 、IFN- γ 、IL-10 mRNA 表达明显降低($P < 0.01$);Lewis 大鼠肾上腺皮质束状带略变薄,线粒体减少,且有轻微变形肿胀;Lewis 大鼠下丘脑神经元细胞体胞核大,核形不规则,线粒体明显减少,神经细胞突触减少,突触前部的分泌小泡减少。**结论** Lewis 大鼠下丘脑和肾上腺存在一定程度的超微结构改变,且免疫相关细胞因子和 CRH mRNA 的异常表达,这可能与其自身 HPA 轴的功能失衡有关。

【关键词】 Lewis 大鼠;肾阳虚;mRNA 表达;超微结构

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)05-0511-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.05.013

Changes of the mRNA expression of "kidney yang deficiency"-related genes and ultrastructural observation of the hypothalamus in Lewis rats

ZHANG Li-zong, FANG Ming-sun, YANG Wei-ji, CAI Yue-qin,
XU Jian-qin, SHOU Qi-yang*, CHEN Min-li

(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 **Objective** To observe the changes of mRNA expression related to kidney yang deficiency and the ultrastructure of hypothalamus in Lewis rats, and further study the constitution of kidney yang deficiency in Lewis rats. **Methods** Ten 7-8-week old SPF male Lewis rats and twenty 7-8-week old SPF male Wistar rats were used in this study. The rats received subcutaneous injection of hydrocortisone to establish kidney yang deficiency model. The expressions of TNF- α , IFN- γ , IL-10, CRH, MR and GR mRNA in the hypothalamus of the two groups were detected and the ultrastructural changes of hypothalamus and adrenal gland were observed to compare the differences between the two groups, and to explore the mechanism of kidney yang deficiency constitution in the Lewis rats. **Results** Compared with the normal Wistar rats, the expressions of GR and IL-2 mRNA in the hypothalamus were significantly increased ($P < 0.01$), while the expressions of CRH, TNF- α , IFN- γ and IL-10 mRNA were significantly decreased in the Lewis rats ($P < 0.01$). The zona fasciculata of the adrenal cortex was slightly thinner, the mitochondria were slightly swollen and the amount of mitochondria was decreased. The nuclei of hypothalamic neurons were larger, and the mitochondria, neuron synapses and secretory vesicles in the presynaptic neurons were decreased. **Conclusions** There are abnormal expression of immune-related cytokines and CRH mRNA, and ultrastructural changes in the hypothalamus and adrenal gland of Lewis rats with kidney yang deficiency. Such changes may be related to the functional imbalance of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis.

【基金项目】浙江省公益性技术应用研究计划(2015C37091);国家自然科学基金(81573677);浙江省自然科学基金(LY15H280006);浙江中医药大学校级科技创新团队(XTD201301)。

【作者简介】张利棕(1981-),男,实验师,研究方向:实验动物与动物实验。E-mail: ryan_zlz@163.com

【通讯作者】寿旗扬(1979-),男,副研究员,研究方向:比较医学。E-mail: sqy133@126.com

【Key words】 Lewis rats; Wistar rat; Kidney yang deficiency; mRNA expression; Ultrastructure
Corresponding author: SHOU Qi-yang. E-mail: sqy133@126.com

中医认为,肾阳是人之根本,肾阳亏虚造成机体酸冷、夜尿增多、脉象无力、舌淡苔白等虚寒症候,即为肾阳虚证^[1]。肾阳虚证动物模型是最早建立的中医证候动物模型之一。肾阳虚证涉及多系统和多器官的功能失衡,与神经内分泌免疫网络关系密切,诸多肾阳虚动物模型确有类似肾阳虚证的临床表现,但一定程度上有违肾阳虚患者下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)轴功能减退、血浆皮质醇减少的病理改变,尚需从整体、微观以及基因分子水平等方面对肾阳虚证进行更加深入的研究。

Lewis 大鼠作为一种实验性脑脊髓炎、类风湿关节炎等自身性免疫性疾病造模常用的实验动物,其自身存在 HPA 轴功能的缺陷^[2-3]。前期我们通过 Lewis 大鼠表现的一般体征、行为学和临床肾阳虚证相关指标(血清 ACTH、CRH、Cort、尿液 17OHCS)等的测定,发现 Lewis 大鼠可能具有先天性肾阳虚体质^[4]。

为进一步探寻 Lewis 大鼠自发性肾阳虚的基因、分子及超微结构等方面的证据,从微观层次来解释 Lewis 大鼠所具有的肾阳虚症状。本研究拟用 Lewis 大鼠与皮下注射氢化可的松(HYD)肾阳虚大鼠模型进行比较,并通过对各组大鼠下丘脑中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-10、CRH、MR、GR mRNA 表达和肾上腺、下丘脑组织超微结构的观察,为 Lewis 大鼠作为自发性肾阳虚体质模型提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物

SPF 级雄性 Lewis 大鼠 10 只,7~8 周龄,体重 240~260 g,购自北京维通利华实验动物有限公司【SCXK(京)2012-0001】;SPF 级雄性 Wistar 大鼠 20 只,7~8 周龄,体重 220~240 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2012-0002】。本实验所有手术、操作均在浙江中医药大学动物实验研究中心的屏障手术室中进行【SYXK(浙)2013-0184】;所有涉及到实验动物的使用与操作均遵循 3R 原则。

1.1.2 试剂

氢化可的松注射液:天津金耀药业有限公司,批

号:20130415,100 mg/20 mL(5 mg/mL),5 支/盒;戊巴比妥钠:德国进口分装,批号:WS20120112,规格:25 g/瓶,含量>99.0%;戊二醛:上海化学试剂采购供应五联化工厂,批号:20110415;丙酮:杭州化学试剂有限公司,批号:20120730;ERL-4221(脂环族环氧树脂)、DER(736 聚二醇二缩水甘油醚树脂)、DMAE(二甲氨基酸乙醇,美国 SPI 公司);四氧化钨(北京中镜科仪技术有限公司)。

1.1.3 仪器设备

MLS-3020 高压灭菌锅(日本三洋公司);AF100 雪花状制冰机(美国 Scotsman);超低温冰箱(Thermo);AG204-电子分析天平(瑞士 Mettler);荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad);匀浆机(IKA);冷冻高速离心机(Thermo);微量核酸测定仪(Thermo);生物安全柜(Thermo);透射电镜(日本 Hitachi H7650 型);超薄切片机(德国 Leica)。

1.2 方法

1.2.1 造模、分组及样本取样

(1) Lewis 组:取 10 只 Lewis 大鼠,不作任何干预,饲养于 IVC 中,自由采食饮水,连续 3 周。

(2) Wistar 正常组:随机取 10 只 Wistar 大鼠,处理同 Lewis 组。

(3) Wistar-HYD 组:随机取 10 只 Wistar 大鼠,每只大鼠以 15 mg/(kg·d)的剂量连续 3 周皮下注射 HYD,建立肾阳虚模型。

造模过程中一周 2 次对各组大鼠的体重、肛温、大便干湿程度、脱毛情况等体征指标进行测定和观察。一周 1 次对各组大鼠测定 24 h 代谢、饮水量、饮水量和尿量,并记录各项一般体征;处理动物前进行旷场实验和 Morris 水迷宫的行为学测定。造模完成后,各组大鼠麻醉后心脏抽血,断头取脑,在冰浴上分离出下丘脑,一部分装入冻存管后迅速置于液氮罐中;取小块肾上腺和下丘脑组织样本,置于装有 2.5% 戊二醛的离心管中,用眼科剪剪碎至每粒约 0.1 mm³ 大小。

1.2.2 下丘脑中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-10、CRH、MR、GR mRNA 表达

以 Trizol 法提取 5 μ g 各组大鼠下丘脑的总 RNA,逆转录成 cDNA,用 SYBR Green 嵌合荧光法进行实时 PCR 检测 TNF- α 、IFN- γ 、IL-10、CRH、MR、GR 基因表达。实时定量 PCR 引物见表 1。

表 1 实时定量 PCR 引物

编号 Number	基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence
1	TNF-α	F-5'-ATACACTGGCCCGAGGCAAC R-5'-CCACATCTCGGATCATGCTTTC
2	IFN-γ	F-5'-GGTGAACAACCCACAGATCC R-5'-CAGAATCAGCACCGACTCCT
3	IL-10	F-5'- AGTGGAGCAGGTGAAGAATGA R-5'- CACGTAGGCTTCTATGCAGTTG
4	CRH	F-5'- AATCTGCCACTCATTGCTCA R-5'- TAATCGCCCTTTCCGACAT
5	MR	F-5'- GGACAGAGTTGGCAGAGGTT R-5'- CTCGGAAGGTGTAGAAGCAGA
6	GR	F-5'- CCGTGGATGATGTTACAGA R-5'- CGGGCTTGCTTGTATCTC
7	GAPDH	F-5'- GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG R-5'- ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA

操作步骤:①取 100 mg 左右的下丘脑,置于 2 mL 的 PE 管中,剪碎,加入 1 mL RNAiso Plus,冰浴上匀浆后抽提 RNA;②用分光光度计紫外吸收测定 RNA 浓度及检测其纯度,凝胶电泳对 RNA 纯度及完整性进行检测;③参考试剂盒说明书将样品 RNA 逆转录为 cDNA;④将转录好的 cDNA 模板参考说明书加入到 PCR 反应混合液中,进行实时定量 PCR 反应。根据标准曲线结果计算目的基因和内参基因的平均 CT 值以及 ΔCT 值,进一步通过 cDNA 浓度梯度的 log 值对 ΔCT 值作图,所得直线斜率绝对值接近于 0,说明目标基因和内参基因的扩增效率相同,就可以通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行相对定量。

1.2.3 肾上腺和下丘脑组织超微结构的观察

将采集到的肾上腺和下丘脑组织样本,进行脱水,包埋,切片,透射电镜观察组织超微结构的变化。

操作步骤:① PBS 漂洗(15 min × 3 次);② 锇酸固定(1~2 h);③ PBS 漂洗(15 min × 3 次);④ 脱水;⑤ 纯酒精脱水 3 次,每次 15 min;⑥ 纯丙酮脱水 3 次,每次 15 min;⑦ 包埋剂渗透:丙酮与包埋剂 1:1 配置溶液渗透 1 h;丙酮与包埋剂 1:3 配置溶液渗透 3 h;⑧ 包埋及 70 °C 聚合;⑨ 取出聚合完成的样品切片。

1.2.4 数据处理

用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,所有数据以均数 ± 标准误差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,并应用 ANOVA 方差分析及 LSD 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠下丘脑中 CRH、GR、MR mRNA 的

变化

由表 2 结果可见,与 Wistar 正常组比较, Lewis 组大鼠下丘脑 GR mRNA 表达明显升高 ($P < 0.01$),而下丘脑 CRH mRNA 表达明显降低 ($P < 0.01$); Wistar-HYD 组大鼠下丘脑 CRH、GR、MR mRNA 表达明显升高 ($P < 0.01$);说明未经干预的 Lewis 组大鼠自身存在 CRH 基因表达低水平的现象。

表 2 各组大鼠 CRH、GR、MR mRNA 的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

表 2 Changes of the expression of CRH, GR, MR mRNA in each group rats			
组别 Groups	CRH mRNA	GR mRNA	MR mRNA
Wistar 正常组 Wistar normal group	1.013 ± 0.089	0.994 ± 0.057	0.995 ± 0.099
Lewis 组 Lewis group	0.525 ± 0.179 **	1.228 ± 0.127 **	1.080 ± 0.191
Wistar-HYD 组 Wistar-HYD group	1.312 ± 0.213 **	1.284 ± 0.140 **	1.356 ± 0.219 **

注:与 Wistar 正常组比较, ** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the Wistar normal group, ** $P < 0.01$.

2.2 各组大鼠下丘脑中 TNF-α、IL-2、IFN-γ、IL-10 mRNA 的变化

由表 3 结果可见,与 Wistar 正常组比较, Lewis 组大鼠下丘脑 TNF-α、IFN-γ、IL-10 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.01$),而下丘脑 IL-2 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.01$); Wistar-HYD 组大鼠下丘脑 TNF-α、IFN-γ mRNA 表达明显升高 ($P < 0.01$)。

2.3 肾上腺和下丘脑组织超微结构的观察

由图 1 结果可见,电镜下观察可见, Wistar 正常组大鼠肾上腺皮质细胞呈规则多边形,且成束排列,胞核呈圆形,较少异染色质,胞内存在大量形态规整的线粒体和较多的大而圆的脂滴。Lewis 组大鼠肾上腺皮质束状带略变薄,线粒体减少,且有轻微变形肿胀。Wistar-HYD 组大鼠肾上腺皮质细胞排列的束状带变薄,细胞萎缩变小,细胞核质比变大,胞核异染色质增多,线粒体减少,且有明显的变形肿胀,脂滴变小,并常见其中有高电子密度的物质。

由图 2 结果可见, Wistar 正常组大鼠下丘脑细胞核圆整,细胞器结构正常丰富,突触膜结构清晰。Lewis 组大鼠下丘脑神经元细胞体胞核大,核形不规则,线粒体明显减少,神经细胞突触减少,突触前部的分泌小泡减少。Wistar-HYD 组大鼠模型组下丘脑神经元细胞体胞核大,核基质变淡并出现空泡,核形轻微不规则,线粒体减少。

表 3 各组大鼠 TNF- α 、IL-2、IFN- γ 、IL-10 mRNA 的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Tab. 3 Changes of the expression of TNF- α , IL-2, IFN- γ , and IL-10 in each group of rats

组别 Groups	TNF- α mRNA	IL-2 mRNA	IFN- γ mRNA	IL-10 mRNA
Wistar 正常组 Wistar normal group	1.008 \pm 0.096	1.007 \pm 0.123	1.008 \pm 0.103	1.114 \pm 0.157
Lewis 组 Lewis group	0.618 \pm 0.166 **	1.504 \pm 0.216 **	0.514 \pm 0.159 **	0.460 \pm 0.133 **
Wistar-HYD 组 Wistar-HYD group	1.232 \pm 0.076 **	0.991 \pm 0.164	1.275 \pm 0.145 **	1.611 \pm 1.310

注:与 Wistar 正常组比较, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the normal Wistar rat group, ** $P < 0.01$.

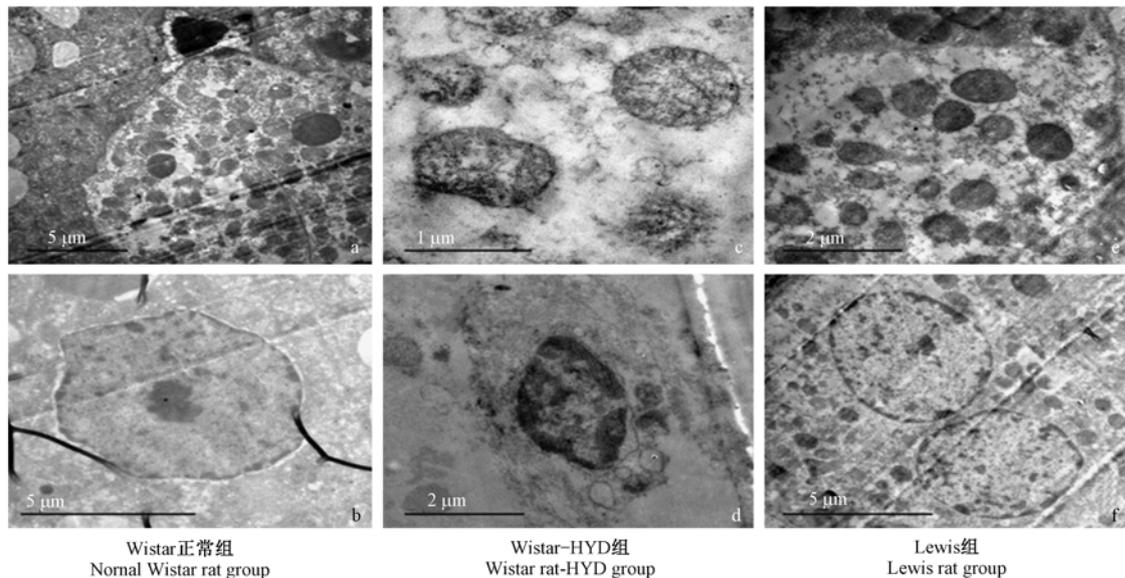


图 1 三组大鼠肾上腺超微结构观察

Fig. 1 Observation of the ultrastructure of adrenal gland in rats of the three groups

通过电镜观察发现, Lewis 大鼠在肾上腺和下丘脑组织的超微结构上均有与 HYD 组肾阳虚大鼠有着类似的病变, 与 Wistar 正常组大鼠均有明显的差异, 提示 Lewis 大鼠自发性肾阳虚体质的发生可能与 HPA 轴有关组织的超微结构改变有着密切联系。

3 讨论

肾阳虚证常伴有体重、体温下降, 饮水尿量增多, 下丘脑、垂体、肾上腺的病理改变以及 HPA 轴的功能失调等。现代医学研究表明, HPA 轴在维持着中枢神经系统结构稳定方面起着重要作用, 在 HPA 轴功能低下时, 皮质类固醇能抑制 Th1 细胞的产生, Th1 细胞则分泌 IL-2、INF- γ 和 TNF- α 能刺激 B 淋巴细胞而产生大量的自身抗体, 同时诱导 TGF- β 的生成, 使机体易患自身免疫性疾病^[5]。HPA 轴不同环节和不同程度的功能失调是肾阳虚证的主要病理

环节之一^[6-7], 而肾阳虚证的主要病理基础是下丘脑细胞的损伤和功能紊乱^[8]。

构建肾阳虚动物模型是肾阳虚证研究规范化、客观化乃至科学化的重要环节。常见的肾阳虚模型主要有: 药物造模方法、手术造模方法及根据中医病因病机造模方法等^[9], 其中经典的是外源性糖皮质激素所致的肾虚模型。上述肾阳虚模型造模方法多单纯模拟肾阳虚证某一方面的机体变化和病理损伤, 虽建立了多种客观诊断指标, 但总体上这类模型缺乏方法学和相关影响因素的研究, 与临床肾阳虚病症表现及病机并不相符^[10]。因此, 建立符合中医疗理论与中医临床证候特点相近, 基于病因和病机的肾阳虚动物模型是肾阳虚证研究方面迫切需要解决的难题。

我们前期实验证明了 Lewis 大鼠体内存在 HPA 轴缺陷, 与 Wistar 正常大鼠比较, Lewis 大鼠体温、抓力、旷场中水平运动总距离均明显降低; 水迷宫上平台时间和尿量略微明显升高; 尿液中 17OHCS 和血

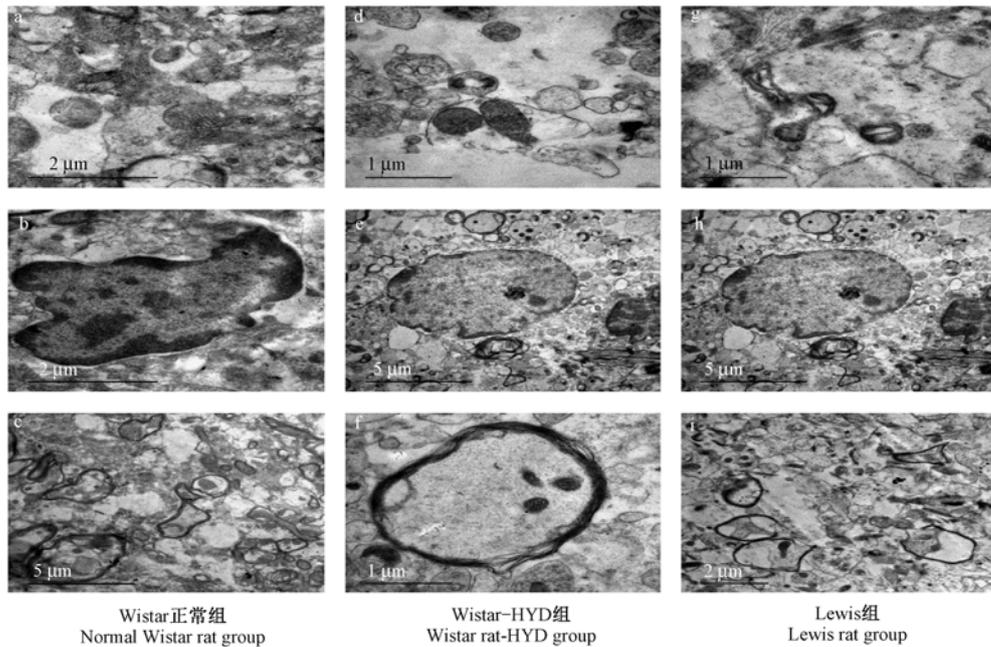


图 2 三组大鼠下丘脑超微结构观察

Fig. 2 Observation of the ultrastructure of hypothalamus in rats of the three groups

清中 Cort、CRH、ACTH、cGMP 均显著降低 ($P < 0.01$)^[4]。这些研究结果表明 Lewis 大鼠与肾阳虚大鼠在一般体征、行为学和 17OHCS、Cort、CRH 等肾阳虚标志性指标上存在着相似之处,因此我们认为 Lewis 大鼠可能具有自发性肾阳虚体质。

本实验拟基于 Lewis 大鼠肾阳虚体质的外在表现,通过 Lewis 大鼠与肾阳虚大鼠下丘脑中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-10、CRH、MR、GR mRNA 表达和肾上腺、下丘脑组织超微结构的对比,进一步深入探寻 Lewis 大鼠自发性肾阳虚体质的内在证据。

通过实验发现,与正常 Wistar 大鼠比较,Lewis 组大鼠下丘脑 GR、IL-2 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.01$),而下丘脑 CRH、TNF- α 、IFN- γ 、IL-10 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.01$);Lewis 大鼠肾上腺皮质束状带略变薄,线粒体减少,且有轻微变形肿胀;Lewis 大鼠下丘脑神经元细胞胞核大,核形不规则,线粒体明显减少,神经细胞突触减少,突触前部的分泌小泡减少。以上实验结果证明,未经干预处理的 Lewis 组大鼠存在自发性的 CRH 基因低水平表达、HPA 轴的功能失衡,存在免疫相关细胞因子基因的异常表达,下丘脑和肾上腺组织一定程度的病理改变,提示 Lewis 大鼠具有自发性肾阳虚体质,关于 Lewis 大鼠肾阳虚体质机制有待进一步的深入研究。

参 考 文 献

[1] 彭成. “氢化考的松阳虚”动物模型的反思 [J]. 中国中医基础医学杂志, 1998, 4(2): 55-57.

- [2] Sternberg EM, Young WS, 3rd, Bernardini R, et al. A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin-releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989, 86(12): 4771-4775.
- [3] Sternberg EM, Hill JM, Chrousos GP, et al. Inflammatory mediator-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation is defective in streptococcal cell wall arthritis-susceptible Lewis rats [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989, 86(7): 2374-2378.
- [4] 寿旗扬, 张利棕, 蔡月琴, 等. Lewis 大鼠肾阳虚体质及其 HPA 功能失衡 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(9): 8-13.
- [5] Hofstetter HH, Shive CL, Forsthuber TG. Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells [J]. J Immunol. 2002, 169(1): 117-125.
- [6] 闵友江, 姚海华, 张辉, 等. 基于正交试验设计研究不同穴位及刺激量对肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(4): 236-240.
- [7] 沈自尹. 肾的研究(续集) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990: 313.
- [8] 王秀凤, 张磊, 伍庆华, 等. 基于支持向量回归机的肾阳虚大鼠垂体-肾上腺轴与垂体-性腺轴功能动态分析 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(11): 1487-1489.
- [9] 邹海森, 辛雪, 孙伟, 等. 肾阳虚生化指标的现代研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(30): 5989-5993.
- [10] 孙蓉, 杨倩. 肾阳虚证动物模型研制进展与中药药效评价的思考 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(1): 22-24.

[收稿日期] 2016-01-22