

六味地黄汤对发育迟缓胎鼠脑 NGF、EGF 表达的影响

彭千元¹, 易健¹, 汤艳¹, 吴琨鹏¹, 黄昕², 刘柏炎^{1*}

(1.湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2.益阳医学高等专科学校, 湖南益阳 413000)

〔摘要〕目的 观察补肾益髓经典方六味地黄汤对发育迟缓胎鼠脑神经生长因子(NGF)、表皮细胞生长因子(EGF)表达影响,并为宫内细胞内脑发育迟缓的治疗提供支持。**方法** 10只孕鼠依照受孕先后顺序随机分成5组,正常组、模型组、六味地黄汤高剂量组、六味地黄汤中剂量组、六味地黄汤低剂量组,采用孕鼠被动吸烟复制胎鼠发育迟缓模型,正常组、模型组均灌胃蒸馏水,六味地黄汤高、中、低剂量组分别灌胃2.164、1.082、0.541 g/mL的六味地黄汤浓缩液。于孕19 d将5组孕鼠处死,称算每组活胎脑体质量比;采用免疫组化法检测胎鼠脑内NGF、EGF的表达。**结果** 被动吸烟可使胎鼠脑体质量比降低,六味地黄汤高剂量能增加脑体质量比;模型组NGF、EGF表达低于正常组($P<0.01$),治疗组NGF、EGF表达均高于模型组($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。**结论** 孕期被动吸烟可以导致胎鼠脑发育迟缓,六味地黄汤能通过调控脑内NGF、EGF改善胎鼠脑的发育。

〔关键词〕 胎鼠;脑;发育迟缓;六味地黄汤;神经生长因子;表皮细胞生长因子

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标识码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.03.004

Influence of Liuwei Dihuang Decoction on Expression of NGF and EGF in Brain Tissue of Intrauterine Growth Retardation Rats

PENG Qianyuan¹, YI Jian¹, TANG Yan¹, WU Kunpeng¹, HUANG Xin², LIU Baiyan^{1*}

(1.Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2.Yiyang College of Medicine, Yiyang, Hunan 413000, China)

〔Abstract〕 Objective To observe Liuwei Dihuang Decoction on the expression of nerve growth factor (NGF) and epidermal growth factor (EGF) in brain tissue of intrauterine growth retardation rats and provide support for the treatment. **Methods** 10 pregnancy animals according to the order of ngravitation were randomly divided into 5 groups: nomal group, model group, high dose of Liuwei Dihuang Decoction (HLWDHD) group, medium dose of Liuwei Dihuang Decoction (MLWDHD) group, low dose of Liuwei Dihuang Decoction (LLWDHD) group. The IUGR model was established by passive smoking. Nomal group and model group were fed by water. The HLWDHD, MLWDHD and LLWDHD groups were given 2.164, 1.082, 0.541 g/mL concentrated solution of Liuwei Dihuang Decoction by gavage, respectively. On the 19th day of pregnancy, 10 pregnant rats were killed. The body and brain weight of lively fetal rats were scaled, then the expression of NGF and EGF were determined by immunohistochemical method. **Results** Passive smoking can decrease brain weight of fetal rats, while the HLWDHD group increase brain weight. The expression of NGF and EGF in model group was lower than nomal group ($P<0.01$), the expression of NGF and EGF in treatment group was higher than that in model group ($P<0.01$ or $P<0.05$). **Conclusion** The passive smoking during pregnancy can lead to growth retardation, and Liuwei Dihuang Decoction can improve the growth of fetal rats by regulating NGF and EGF in brain.

〔Keywords〕 fetal rats; brain; growth retardation; Liuwei Dihuang Decoction; nerve growth factor; epidermal growth factor

中医认为肾主蛰守位,父母的生殖之精是子代先天之精的唯一来源,是禀赋子代的生命遗传物质,与生俱来,闭藏于肾中。先天发育不足是指母体因肾精虚损,而致子代禀赋不足,出现生长发育迟缓、智力障碍等^[1],其中关于脑的论述较多,如《灵枢·经脉别论》中说:“人始生,先成精,精成而脑髓生。”提示

脑髓由先天之精所化生。脑发育过程中存在大量神经元的增殖、分化、存活及凋亡,许多因子参与了此过程,其中神经生长因子(NGF)、表皮细胞生长因子(EGF)在营养神经、调节损伤神经修复功能、神经再生中有重要作用^[2-3]。本文利用补肾经典方六味地黄汤为干预因素,从脑体质量比、神经生长因子等方

〔收稿日期〕 2015-07-15

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(81202694),湖南省自然科学基金项目(2015JJ2105)。

〔作者简介〕 彭千元,女,在读硕士研究生,从事中医药防治心脑血管疾病研究。

〔通讯作者〕 *刘柏炎,男,教授,博士研究生导师, E-mail:liubaiyan@126.com。

面探讨其对发育迟缓胎鼠的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 C57/BL/6 小鼠, SPF 级, 体质量 18~22 g, 购买自湖南斯莱克景达实验动物公司, 动物许可证编号: SCXK(湘)2011-0003, 自行繁殖。

1.1.2 实验药物 方药由熟地黄 24 g, 山药 12 g, 山茱萸 12 g, 泽泻 9 g, 茯苓 9 g, 牡丹皮 9 g 组成。以上药材均购于湖南中医药大学杏林大药房, 经鉴定, 符合药典标准。按照处方量 5 倍(共 375 g)称取, 加 10 倍量冷水浸泡 40 min 后用武火煎煮, 煮沸后改用文火煎煮 30 min, 滤出药液备用, 第 2 煎加 8 倍量冷水武火煎煮, 煮沸后改用文火煎煮 20 min, 滤出药液, 将两次药液混合, 置水溶锅中蒸发, 按 4:2:1 浓缩至高、中、低三个剂量, 分装冷藏备用。

1.1.3 试剂 红山茶卷烟(烤烟型, 每支烟含焦油量 11 mg, CO12 mg, 烟碱量 1.1 mg), 红云红河烟草有限责任公司; NGF 及 EGF 单克隆抗体、SP-9000, 武汉博士德生物有限公司。

1.1.4 仪器 自制烟箱; BX-51 光学显微镜及 IPP 图像分析仪系统(日本 Olympus 公司); TP-1000 电子天平(中国湘仪天平仪器厂); RM2235 切片机(德国 Leica 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与给药 孕鼠按怀孕先后顺序随机分为 5 组, 每组 2 只: 正常组、模型组、六味地黄汤低剂量组、六味地黄汤中剂量组、六味地黄汤高剂量组。药物治疗组均灌胃六味地黄汤, 正常组与模型组灌胃蒸馏水。根据 60 kg 体质量人体表面积临床等效剂量为小鼠中剂量给药量, 以 20 g 小鼠为例计算给药量约为 0.22 g, 1 kg 小鼠给药量为 10.82 g。所有动物按 10 mL/kg 灌胃, 则中剂量组给药浓度为 1.082 g/mL, 高剂量浓缩 2 倍为 2.164 g/mL, 低剂量组稀释 2 倍为 0.541 g/mL。受孕第 8 天开始灌胃直至受孕第 19 天处死, 每天 1 次, 总共灌胃 12 d。

1.2.2 动物造模 于下午 6:30 按雄雌 1:2 交配合笼, 次日 8:00 取出雌鼠, 查见有阴道栓时为受孕日(即 0 天), 记为 E0 天^[4]。按文献造模方法采用被动吸烟法^[5], 从 E4 天起将孕鼠置于长×宽×高为 35 cm×20 cm×20 cm, 上下各有直径 5 cm 圆形通风口的自制烟箱中(正常组除外), E4-E10 每天 9 am, 12 am, 2 pm, 5 pm 各 1 次, 每只小鼠每次燃尽香烟 1 支, E11-E19 每只小鼠每次燃尽香烟 2 支, 每天自由进食饮水活动。

1.2.3 取材和标本处理 每组孕鼠 E19 天于末次

熏烟、灌胃后, 颈椎脱臼处死, 剪开腹腔, 在子宫暴露子下, 剥离胚膜, 用 0.01 MPBS 冲洗干净, 称取活胎体质量与脑质量。再将胚胎鼠脑固定于 4% 多聚甲醛中, 依次用 50%、70%、80%、95%、100% 乙醇梯度脱水, 每级 4 h; 二甲苯透明 3 h; 石蜡包埋。

1.2.4 发育情况 于 E19 处死孕鼠, 按文献[6]进行称质量, 比较各组脑体质量比。

1.2.5 免疫组化检测脑内 NGF、EGF 每组选取 10 只胎鼠脑组织, 石蜡切片, 烤片(65 °C)2 h 后, 常规脱蜡至水; 高温柠檬酸盐液煮沸修复 2 min, 切片放入 3% 过氧化氢溶液中浸泡 10 min 灭活内源性过氧化物酶; 0.01 M PBS 泡洗 3 min×3 次; 滴加正常山羊血清封闭 15 min, 并用 PBS 作空白对照; 分别加入两种抗体(NGF 和 EGF, 浓度均为 1:100), 各 100 μL 37 °C(2h); 0.01 M PBS 泡洗 3 min×3 次; 加入通用型生物素化二抗 100 μL, 37 °C(15 min), 0.01 M PBS 泡洗 3 min×3 次; 加入过氧化物酶标记链霉卵白素 100 μL, 37 °C(20 min), 0.01 M PBS 泡洗 3 min×3 次; 滴加 DAB 显色剂, 梯度酒精脱水, 中性树胶封片。

1.2.6 观测方法 应用 Olympus BX-51 光学显微镜, 200 倍镜下随机选取 10 个不重复的视野, 由图像分析系统计数平均光密度。

1.2.7 统计学分析 计量资料用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 多个样本均数进行比较, 采用单因素方差分析, 所有数据经 SPSS17.0 软件进行处理。

2 结果

2.1 六味地黄汤对胎鼠脑体质量比的影响

孕鼠被动吸烟后, 各组胚胎数有一定差别, 因此, 对各组活胎脑体质量比进行比较。与正常组比较, 六味地黄汤各组、模型组脑体质量比明显降低($P < 0.01$), 与模型组比较, 六味地黄汤高剂量组脑体质量比增高, 两组差异有统计学意义($P < 0.05$), 与六味地黄汤高剂量组比较, 六味地黄汤低剂量组脑体比明显降低($P < 0.01$)。结果见表 1。

表 1 六味地黄汤对胎鼠脑体质量比的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	脑质量(g)	体质量(g)	脑/体质量
正常组	16	0.238±0.019	0.858±0.084	0.278±0.011
模型组	14	0.292±0.025	1.147±0.060	0.255±0.010**
六味地黄汤高剂量组	13	0.318±0.019	1.261±0.063	0.252±0.009***
六味地黄汤中剂量组	17	0.295±0.013	1.149±0.067	0.257±0.012**
六味地黄汤低剂量组	14	0.299±0.025	1.131±0.058	0.264±0.011***▲▲
<i>F</i>				14.367
<i>P</i>				0.000

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$; 与六味地黄汤高剂量组比较, ▲▲ $P < 0.01$ 。

2.2 六味地黄汤对 NGF、EGF 表达的影响

与正常组比较,六味地黄汤各组、模型组 NGF、EGF 表达水平降低,差异具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$);与模型组比较,六味地黄汤各组 NGF、EGF 表达明显增强,差异具有显著统计学意义($P<0.01$);与六味地黄汤高剂量组比较,六味地黄汤低、中剂量组 NGF 明显降低,差异具有显著统计学意义($P<0.01$),差异 EGF 无统计学意义($P>0.05$)。结果见表 2。

表 2 胎鼠脑组织 NGF、EGF 平均光密度表达($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	NGF	EGF
正常组	179.76±3.98	191.56±2.15
模型组	144.24±3.45**	167.51±9.73**
六味地黄汤高剂量组	168.05±1.62***	185.86±3.89***
六味地黄汤中剂量组	161.18±2.43***▲	183.93±2.50***
六味地黄汤低剂量组	156.76±4.46***▲	183.55±1.74***
F	154.862	32.508
P	0.000	0.000

注:与正常组比较,** $P<0.01$,* $P<0.05$,与模型组比较,### $P<0.01$;与六味地黄汤高剂量组比较,▲ $P<0.01$ 。

3 讨论

研究发现胎儿宫内窘迫窒息,围产儿死亡,远期体格发育不良及智力发育迟缓都与各种原因造成的胎儿宫内发育迟缓密切相关。母体、胎儿及胎盘由于各种原因受损而导致胎儿生长发育受限,围产期死亡率增高,常常会伴有新生儿缺血缺氧性脑病,乃至遗留永久精神、神经系统严重疾病,因此,积极干预治疗成为研究热点。

中医学认为先天发育迟缓主要表现为生长发育不良,出现智力水平低下、五迟五软等。其病机与母体亏损,肾气衰,导致子代禀受父母的生殖之精不足密切相关。管威等^[7]认为肾与脑在脏腑结构功能上是密切关联的,脑髓皆源于肾精,由此脑髓的盈亏及大脑功能的正常发挥与肾精的充盈亏损密切相关。被动吸烟致宫内发育迟缓是目前较公认的发育迟缓模型,因为香烟烟雾中存在大量有毒物质,如肿瘤促进因子、诱变剂、前致癌剂等。母体吸收后大量有毒物质经过胎盘屏障而进入胎儿全身血液循环系统,诱发多种病理机制,最终影响胎儿血流量及血氧含量^[8]。根据中医理论并结合我们课题组前期实验研究结果,先天禀赋不足模型可利用孕鼠被动吸烟致宫内胎鼠发育迟缓来复制。

近年来发现,NGF 和 EGF 能营养神经,促进神经细胞增殖分化,修复受损神经元,减少神经细胞凋亡,是神经生物学研究的热点。NGF 是具有 118 个氨基的蛋白质分子,具有营养神经的作用。对于胚胎脑组织而言,NGF 可以抗损伤性刺激,抑制组织损伤所致的神经细胞凋亡,诱导神经元、突触再生及修复受损神经。因此,NGF 在脑内分泌水平与脑的发育密切相关^[9]。EGF 是具有 53 个氨基酸残基的单链多肽类物质,相对分子量 6045 道尔顿,具有促进神经生长的作用。宫内发育迟缓时刺激其受体,通过催化底物蛋白产生络氨酸磷酸化而达到细胞的修复补充及分裂增殖。此外,EGF 在胎盘中表达明显,能促进胎盘细胞增殖分化,提高胎盘通透性,增加营养物质的转运,为胎儿提供充足的营养物质以维持脑正常发育^[10],因此 EGF 对中枢神经系统具有重要的营养和保护作用。

本实验研究发现,孕鼠被动吸烟导致胎鼠脑体质量比减轻,NGF、EGF 表达下调,而六味地黄汤能上调 NGF、EGF 表达、恢复脑体质量比,高剂量组最明显,由此提示六味地黄汤通过补肾、填精、益髓作用,间接调控脑内 NGF、EGF 表达,营养神经,使受损神经细胞得到修复,从而使脑部发育得到改善。

参考文献:

- [1] 蔡光先,刘柏炎,陈奕安,等.六味地黄汤对宫内发育迟缓胎鼠脑发育的影响[J].中华中医药杂志,2007,22(9):642-644.
- [2] 李爱丽,吴杰,朱洪权,等.全脑缺血再灌注大鼠额叶、海马、丘脑 EGF 和 NT-4/5 的动态表达[J].2009,10(5):948-951.
- [3] 张文凤,梁茂新.肉桂水提液对慢性脑缺血大鼠认知能力及脑组织 NGF、BDNF 表达的影响[J].中药药理与临床,2009,25(6):58-59.
- [4] 李彦清,邵龙江,李森,等.大鼠阴栓的实验观察和孕鼠模型鉴定方法的比较[J].中国实验动物学杂志,2002,12(1):17-20.
- [5] 金慧慧,赵永聚.胎儿宫内发育迟缓(IUGR)动物模型研究进展[J].中国比较医学杂志,2013,23(10):71-75.
- [6] 李勇,张天宝.发育毒理学研究方法和实验技术[M].北京:北京医科大学出版社,2000:143.
- [7] 管威,胡建鹏,王键,等.从肾精与脑髓关系谈补肾生髓法在缺血性中风恢复期治疗中作用[J].安徽中医学院学报,2011,4(30):3-5.
- [8] 徐绍叶,曹山虎,张大红,等.被动吸烟对大鼠卵泡发育和胚胎发育的影响[J].现代预防医学,2014,41(17):3194-3197.
- [9] 李芳兰.被动吸烟对幼鼠学习记忆及小脑皮质神经生长因子含量的影响[J].南京医科大学学报,2010,30(2):188-190.
- [10] Cellini, Xu J, Arriaga A, et al. Effect of epidermal growth factor infusion on fetal rabbit intrauterine growth retardation and small intestinal development[J]. J Pediatr Surg, 2004, 39(6):891-897.