

金匱肾气丸、右归丸对肾阳虚小鼠模型以药反证的 脑基因芯片研究

杨裕华, 李 震*, 孙 静

(山东中医药大学, 山东 济南 250014)

[摘要] 目的:在基因水平上探讨补肾中药金匱肾气丸、右归丸对肾阳虚小鼠模型的作用机制。方法:昆明种小鼠分为正常组、模型组、金匱组和右归丸组。正常组和模型组每天灌胃蒸馏水 0.5 mL;金匱组和右归丸组每天分别灌胃金匱肾气丸混悬液和右归丸混悬液 0.5 mL,含生药 129 mg·kg⁻¹。造模组和治疗组均采用雄雌鼠比例 1:6 同笼喂养,雄鼠每日游泳 1 次,直至无力下沉时捞出,达 4 周,以诱导产生“劳倦过度、房室不节”肾阳虚证。观察动物的畏寒、活动及反应、饮食和皮毛等情况。用 36K mouse genome array 鼠脑芯片检测正常组和肾阳虚模型组鼠脑基因,并以二者荧光信号相对强度比值 ≥ 2 和 ≤ 0.5 筛选差异显著基因,用 qRT-PCR 对部分差异表达基因进行验证。结果:模型组/正常组上调基因,二药治疗组/造模组基因下调 23 个基因,主要是与炎症/免疫、神经传递/信号转导等相关基因;造模组/对照组下调基因而治疗组/造模组基因上调的基因有 6 个,其主要是与细胞周期/细胞结构、神经传递/信号转导、转录等有关基因。qRT-PCR 也证实了金匱组/模型组、模型组/正常组的 CHH 和 Scgb3a1 的差异表达。结论:金匱肾气丸、右归丸可使肾阳虚小鼠模型显著下调的激素、黑色素显著上调并促进细胞增殖,从而在基因水平上探讨了金匱肾气丸和右归丸的药物作用机制及其差别。

[关键词] DNA 芯片;肾阳虚;动物模型;金匱肾气丸;右归丸

基因芯片可同时研究上千条基因,具有高通量、所需样品少、微型化和自动化的特点^[1]。利用基因芯片技术研究复杂的中医“证候”的实质,是中医现代研究的重要课题。根据“以药反证”的原理,用基因芯片检测肾阳虚证用药前后的基因变化,以期从基因水平研究其药物作用的机制。

1 材料

1.1 动物

昆明种健康雄性小鼠,体重 35~40 g;雌鼠,体重 28~35 g,山东中医药大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(鲁)20050015。山东中医药大学实验动物中心提供普通饲料喂养。

1.2 药品

金匱肾气丸由山东中医药大学中医专家门诊药房提供。生地黄 40 g,山药 20 g,山茱萸肉 20 g,泽泻 15 g,丹皮 15 g,茯苓 15 g,肉桂 5 g,附子(炮)5

g,共 135 g。先将生地黄烘干,与其余药物共为细末,加炼蜜 153 g,作蜜丸 31 个,每丸重 9 g。右归丸由山东中医药大学中医专家门诊药房提供,熟地黄 40 g,山药 20 g,山茱萸 15 g,枸杞子 20 g,炒鹿角胶 20 g,菟丝子 20 g,炒杜仲 20 g,当归 15 g,肉桂 10 g,附子(炮)10 g,共 190 g。先将熟地黄烘干,与其余药物共为细末,加炼蜜 168 g,作蜜丸 39 个,每丸重 9 g。戊酸雌二醇(法国 Schering S A,批号 037B-2)。

1.3 试剂

KLENOW 酶标记, Cy5-dCTP, Cy3-dCTP (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ, USA); dNTP, 10 mmol·L⁻¹ each (上海英骏生物技术有限公司); Random Primer, 9 个碱基 (上海英骏生物技术有限公司)。

1.4 仪器

所用 36K mouse genome array 芯片系购自北京博奥生物有限公司,该芯片共有约 35 852 条 70 个碱基长度的 Oligo DNA,来自于 Operon 公司的小鼠全基因组 Oligo 库, Mouse Genome Version 4.0,共代表了约 25 000 个基因, 38 000 个转录本。芯片上的样品还包括小鼠的 4 个看家基因作为阳性对照, Hex 作为点样阳性对照,点样溶液 50% DMSO 作为阴性对照。

[收稿日期] 2008-08-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (30672573)

[通信作者] *李震,教授,博士生导师,山东中医药大学基础医学院。Tel: (0531) 82613448, E-mail: lizhen448@yahoo.com.cn

[作者简介] 杨裕华,主任医师,山东中医药大学中西医结合基础专业博士研究生,研究方向:中西医结合“肾”的研究。



2 方法

动情期雌鼠的制备:雌鼠每天灌胃戊酸雌二醇混悬液 0.5 mL (含药 0.004 68 mg),以阴道涂片检查角化细胞证实。雄鼠筛选:以雌雄鼠同笼,直视有否阴道栓决定取舍。

2.1 动物肾阳虚模型制备

劳倦过度+房室不节组(以下简称模型组)^[2]:取雄性小鼠 15 只,雄性小鼠每天下午游泳 1 次,以长 45 cm、宽 28 cm 和高 30 cm 长方形塑料水槽,水深 25 cm,水温 28~30℃,供雄性小白鼠游泳。于塑料水槽内强迫小鼠游泳至无力而下沉时捞出,以诱导劳倦过度,达 4 周。每只雄鼠与 6 只动情期雌鼠同笼,注意每天更换动情期雌鼠以诱导雄鼠房室不节,每天灌胃蒸馏水 0.5 mL。

2.2 分组及给药

正常组:雄性小白鼠 10 只,常规饲养,每天灌胃蒸馏水 0.5 mL。金匱肾气丸治疗组(以下简称金匱组)和右归丸组:取雄性小鼠 10 只,造模方法同模型组,每天分别对 2 组各灌胃金匱肾气丸混悬液和右归丸混悬液 0.5 mL,含生药 1.1 g·kg⁻¹(成人 2 丸/d 的剂量,2 丸溶于 58 mL 溶液中,按小白鼠体重计算得 0.5 mL/只/d,含药 0.084 2 g)^[3]。试验共进行 4 周。

2.3 脑组织总 RNA 提取

正常组、模型组、金匱组及右归丸组治疗 4 周后,小鼠颈椎脱臼法处死,于头骨骨缝处剪除骨片,完整取出小鼠全脑,放入液氮罐冻存。按 Trizol (Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA) 一步法提取脑组织细胞中的总 RNA (同组 2 只鼠脑混合),通过异丙醇沉淀法浓缩 RNA,并进一步采用 NucleoSpin[®] RNA clean-up 试剂盒 (MACHEREY-NAGEL, Germany) 对总 RNA 进行过柱纯化,最后用分光光度计定量,甲醛变性胶电泳质检。

2.4 对样品 RNA 进行荧光标记

2.4.1 双链 cDNA 合成 取 5 μg total RNA,以 T₇-Oligo (dT), (5'-AAACGACGGCCAGTGAA TTGTAA T-ACGACTCACTA TAGCGCTTTTTTTTTTTTTTTTIV-3, V 可以是 G, C 和 A, 上海博亚生物技术有限公司) 为引物,用 cDNA Synthesis Kit (Promega, USA) 合成双链 cDNA;双链合成后用 PCR NucleoSpin Extract Kit (MN) 纯化。

2.4.2 体外转录合成 cRNA 用 T₇ RibomAX Ex-

press Large Scale RNA Production System (Promega) 将双链 cDNA 进行体外转录合成 cRNA;然后用 RNA Clean-up Kit (MN) 纯化。

2.4.3 随机引物反转录 取 2 g cRNA,用 M-MLV 反转录酶, 200 U·μL⁻¹ (Invitrogen), 9 Random Primer 进行反转录,反转录产物用 PCR NucleoSpin Extract Kit (MN) 纯化。

2.4.4 cDNA 用 KLENOW 酶标记 取 2 μg cRNA 反转录产物,以 9 Random Primer 为引物进行 KLENOW 酶 (Takara, Japan) 标记,标记产物用 PCR NucleoSpin Extract Kit (MN) 纯化,纯化后抽干。标记过程中 dATP, dGTP, dTTP 终浓度为 120 μmol·L⁻¹, dCTP 终浓度为 60 μmol·L⁻¹, Cy5-dCTP, Cy3-dCTP 终浓度为 40 μmol·L⁻¹。以 Cy5 标记正常组、金匱组及右归丸组样品,以 Cy3 标记模型组样品。

2.4.5 杂交与清洗 标记的 DNA 溶于 30 μL 杂交液中 (3×SSC 3 倍的氯化钠柠檬酸钠缓冲液), 0.2% SDS, 5×Denhart's, 25% 甲酰胺), 于 42℃ 杂交过夜。杂交结束后,先在 42℃ 左右含 0.2% SDS, 2×SSC 的液体中洗 5 min,而后在 0.2×SSC 中室温洗 5 min。玻片甩干后即可用于扫描。

2.5 芯片扫描

芯片用 LuxScan 10KA 双通道激光扫描仪 (CapitaBio 公司) 进行扫描。

2.6 芯片图像的采集与数据分析

采用 GenePix Pro 4.0 图像分析软件 (Axon Instruments 公司) 对芯片图像进行分析,把图像信号转化为数字信号;然后对芯片上的数据用 Lowess 方法进行归一化;最后以差异为 2 倍的标准来确定差异表达基因,亦即荧光信号相对强度比值 ≥2 和 ≤0.5 筛选差异显著基因。

2.7 差异表达基因的功能归类

将基因输入北京博奥生物有限公司的生物分子注释系统进行功能归类检索,同时参阅有关文献^[4]。

2.8 Realtime RT-PCR

2.8.1 RNA 逆转录 逆转录反应体系 取经纯化的总 RNA 2~2.5 μg, Oligo (dT) 15 2 μL (500 mg·L⁻¹), DEPC H₂O 11.5 μL, 65℃ 变性 5 min, 冰浴 5 min, 加入 5×RT Buffer 4 μL, 0.1 mol·L⁻¹ 二硫苏糖醇 (DTT) 2 μL, dNTPs 1 μL (10 mmol·L⁻¹ each)、

RNA 酶抑制剂 0.5 μL ($40 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), M-MLV (反转录酶) 1 μL ($200 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 共 20 μL 体系。

逆转录程序: 25 10 min, 37 1 h, 加入 5 μL $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 终止逆转录反应, 70 10 min, 加入 1 μL $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸中和, 再加灭菌水至 50 μL , 4 低温保存。上述实验在 PCR 仪 (BD-RAD 产, PTC-225 型) 上进行。

2.8.2 RealTime PCR 反应 选取造模组 / 对照组和金匱肾气丸组 造模组差异表达基因生长激素 (GH) 和子宫珠蛋白相关蛋白 2 前体 (Scgb3a1) 位点设计并合成引物其 2 套引物: 上游引物 5'-TCAG-CAGGATTTTCACCAAC-3', 下游引物 5'-GGCGT-CAAACCTTGTCATAGG-3'; 上游引物 5'-TGACAA TGT-TCGGTTGAGGG-3', 下游引物 5'-GTGAGCAG-CAGGGTTTCCAG-3'。

RealTime PCR 反应体系: Template (模板 cDNA) 小于 500 ng (一般是逆转录反应体系 50 μL 中的 1 μL), 加入 2 \times PCR Buffer for EvaGreen 10 μL , 20 \times EvaGreen 染料 0.6 μL , 上、下游引物各 0.6 μL ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), Cap Taq 酶 0.3 μL ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 加不含核酸酶的水至 20 μL 。

RealTime PCR 程序: 酶激活 95 , 10 min, 扩增反应 95 , 15 s 变性; 50 ~ 60 , 15 s 退火; 72 , 20 s 延伸; 76 , 3 s 荧光检测; 共 40 个循环。溶解曲线 75 ~ 95 。以上实验在定量 PCR 仪 (Roche

公司产, 1.2 型) 上进行。

RealTime PCR 产物 1.5% 非变性 (不加甲醛) 琼脂糖凝胶电泳检测: 取 RealTime PCR 产物 2 ~ 4 μL , 加 2 \times Loading Buffer 4 μL , 总体积 6 ~ 8 μL 上样。

2.8.3 循环次数差值 CP 循环次数差值为正常组与模型组、金匱组和右归丸组循环次数的差值。

3 结果

3.1 动物的一般表现

正常组: 活动正常, 皮毛光泽, 反应灵活。模型组: 随着时间延长, 动物逐渐出现萎靡不振, 畏寒怕冷, 拱背少动, 反应迟钝, 拥挤在一起, 饮食减少, 皮毛无光泽, 竖毛现象明显, 腹部皮毛潮湿等肾虚表现。金匱组和右归丸组: 随着时间延长, 动物未出现明显的萎靡不振、畏寒及竖毛等肾虚表现。

3.2 各组差异表达基因分析

二药治疗组 / 模型组均下调而模型组 / 正常组上调的基因共有 23 个, 主要有炎症 / 免疫、代谢、神经传递 / 信号转导、和氧化还原有关基因, 还有酪氨酸生成多巴和儿茶酚胺类的限速酶 酪氨酸羟化酶。二药治疗组 / 模型组均上调的基因而模型组 / 正常组基因下调共有 6 个, 其涉及转录 / 翻译、细胞周期 / 细胞结构、神经传递和孤儿核受体基因 (表 1)。表 1 中倍数 1 和倍数 2 分别为模型组 / 正常组与金匱 / 模型组和模型组 / 正常组与右归丸组相互上调基因是下调基因的倍数。

表 1 各组小鼠出现基因上、下调表达的部分基因

基因符号	基因名称	模型 / 金匱	右归丸 / 正常	模型 / 正常	倍数 1	倍数 2	基因编号
Scgb3a1	Uteroglobin-related protein 2 precursor (Cytokine HN-1) (High in normal)	5.675 8	0.317 8	0.166 7	17.860	34.051 19	NM-054037
Cp	Ceruloplasmin precursor (Ferroxidase)	2.543 2	0.187 3	0.305 2	13.567	8.324 05	AK043248
Dfy	Duffy antigen / chemokine receptor	2.778 8	0.325 5	0.483 6	8.536 7	5.746 07	NM-010045
Agt2l1	alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1	2.241 5	0.280 9	0.232 6	7.978 9	9.636 72	NM-027907
Ly6f	Lymphocyte antigen 6 complex, Locus	3.204 1	0.414 0	0.414 4	7.739 6	7.731 9	AK129115
TY3H-MOUSE	Tyrosine 3-monooxygenase (Tyrosine 3-hydroxylase) (TH)	2.032 3	0.283 1	0.376 6	7.177 5	5.396 4	NM-009377
Sgk	Serine / threonine kinase Sgk1 (serum / glucocorticoid-regulated kinase 1)	3.168 5	0.480 0	0.299 9	6.601 4	10.565 2	NM-011361
Lrrc8	Leucine-rich repeat-containing protein 8 precursor	2.610 8	0.403 9	0.377 1	6.464 0	6.923 3	NM-177725
Ly6a	Lymphocyte antigen Ly-6A. 2 / Ly-6E. 1 precursor (Fragment)	2.689 6	0.439 4	0.444 2	6.120 5	6.054 9	NM-010738
Q8C0J4	ANTISENSE RNA OVER-LAPPNGMCH protein	0.087 0	5.033 0	5.057 8	57.834 9	58.120 1	XM-125861
Gng12	Guanine nucleotide-binding ProteinG (D) / G(S) / G(O) gamma-12 subunit	0.178 0	4.600 1	4.835 0	25.837 0	27.254 6	NM-025278
Timm10	transmembrane protein 10; transmembrane protein TMP10	0.200 2	3.674 3	3.058 9	18.350 8	15.277 5	NM-153520
Cap1	Adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP 1)	0.263 9	3.709 9	2.814 7	14.058 0	10.665 8	NM-007598
Nr4a1	Orphan nuclear receptor Nr4a1 Orphan nuclear receptor HMR Nuclear hormone receptor NUR / 77	0.339 2	4.681 8	2.212 1	13.803 3	6.522 0	NM-010444
Pcsk1n	proprotein convertase subtilisin / kexin type1 inhibitor; granin-like neuropeptide precursor; pancreas protein 3; basic protein A-4	0.434 6	3.305 5	2.754 4	7.606 2	6.338 1	NM-013892

3.3 Realtime RT-PCR 检测

用 Realtime RT-PCR 对模型组 / 正常组和金匱组 / 模型组差异表达基因生长激素 (GH) 和子宫珠蛋白相关蛋白 2 前体 (Scgb3a1) 位点进行验证, 结果

表 2 两差异表达基因的 Realtime RT-PCR 检测

样品	基因名称	基因符号	基因编号	交叉点	CP	扩增效率	PCR 检测	芯片检测
正常	生长激素	GH	NM-008117	18.15				
模型	生长激素	GH	NM-008117	23.95	- 5.80	1.865	0.030321925	0.0306
金匱	生长激素	GH	NM-008117	22.43	- 4.28		0.078688151 ¹⁾	4.4525 ²⁾
正常	子宫珠蛋白相关蛋白 2 前体	Scgb3a1	NM-054037	27.02				
模型	子宫珠蛋白相关蛋白 2 前体	Scgb3a1	NM-054037	24.46	2.56	1.855	5.478408839	5.6758
金匱	子宫珠蛋白相关蛋白 2 前体	Scgb3a1	NM-054037	28.60	- 1.58		0.42700344 ¹⁾	0.3178 ²⁾

注: ¹⁾ 为芯片检测的金匱丸组 / 模型组的比值; ²⁾ 为 Realtime RT-PCR 检测的金匱组 / 正常组的比值。

模型组 / 正常组上调而二药治疗组均下调的基因共有 23 个, 涉及炎症 / 免疫, 特别是子宫珠蛋白相关蛋白 2 前体 (Scgb3a1, 比值 5.6758) 是类固醇依赖分泌蛋白, 有显著地抗炎和免疫调节作用。丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶 Sgk1 (血清 / 糖皮质激素调节激酶) (NM-011361), 其为参与信息传递的蛋白激酶, 也是 DNA 激活的蛋白激酶, 主要参与信号转导并可因脑损伤诱发上调而起抗凋亡作用^[5], 以及达菲抗原 / 趋化因子受体 (NM-010045) 是红细胞趋化因子受体, 属于 G 蛋白的偶联受体, 同样也参与信号转导, 同时还有抗炎作用。二治疗组显著上调模型组显著下调的反义 RNA 重叠黑色素 (MCH) 蛋白基因, 说明用药后显著改善机体抵御寒冷的能力, 而机体是通过增加下丘脑分泌黑色素, 从而使暴露于寒冷下的机体提高其产热的利用率, 增加御寒能力^[6]。同时二治疗组可显著下调模型组小鼠上调的酪氨酸 3 羟化酶基因 (NM-009377) 和血管紧张肽前体 (NM-007428), 前者是酪氨酸生成多巴及进一步生成儿茶酚胺、黑色素的限速酶, 显著下调其基因将会增加多巴、儿茶酚胺和黑色素的生成, 提高神经递质和黑色素水平, 也有助于提高御寒能力^[7]。重要的是儿茶酚胺生成减少, 并殃及生殖系统内分泌功能紊乱^[8]。而血管紧张肽前体 (含血管紧张素) 可通过神经元巨噬细胞移动抑制因子 (MIF) (脑中表达) 介导分解去甲肾上腺素 (NE) 递质的作用来调节 NE 的代谢^[9], 较多的分解 NE 会导致去甲肾上腺素能反应直至功能紊乱。用二药后均可显著下调血管紧张肽前体基因, 有益于 NE 神经元的功能。二治疗组可显著上调 D 点结合蛋白,

见表 2。表中比值 1 和比值 2 分别为 Realtime RT-PCR 检测法所得和基因芯片检测所得; 金匱组 2 个比值 2 为金匱组 / 模型组的比值。

4 讨论

即清蛋白 D 盒功能在于识别并与激素反应元件 (HRE) 结合。而 HRE 由两大类组成: 糖皮质激素 / 孕激素反应元件; 含雌激素、维生素 D₃ [1, 25 (OH) D₃] 反应元件和甲状腺激素反应元件。HRE 是基因启动子和增强子中能与核内激素受体结合的 DNA 序列^[10]。另外, 孤儿核受体 (一类蛋白转录因子) 显著上调, 可提高机体其他激素, 如类固醇激素, 以及非类固醇激素的^[11]。加之上调神经颗粒蛋白基因 (NM-022029) 表达, 都说明用药后可提高机体的激素水平。由于鸟苷酸结合蛋白、跨膜蛋白参与细胞蛋白质的合成、信号转导、生长及分化, 从而调节细胞周期, 二治疗组显著上调模型组 / 正常组显著下调的鸟苷酸结合蛋白 G (I) / G (s) / G (0) 亚基基因 (NM-025278) 此促进了细胞增殖, 减少细胞凋亡^[12]。还有二治疗组显著上调腺苷酰环化酶相关蛋白 (Cap1) 基因, 也说明可以显著改善肾虚小鼠模型氧化磷酸化不活跃、全身功能及代谢低下的状态^[13]。下调铜蓝蛋白前体基因则与抗氧化和铜的解毒、存储以及氧自由基清除有关^[14]。通过定量 PCR 检测进一步证实了金匱、模型、正常组均有生长激素和子宫珠蛋白相关蛋白 2 前体 (Scgb3a1) 位点, 并给出三者的定量关系。

本研究表明, 在用金匱肾气丸和右归丸后, 可下调炎症 / 免疫反应和抗氧化基因, 上调黑色素、激素、促增殖基因, 改善机体的功能和代谢情况。

【参考文献】

[1] Schena M, Shalon D, Dais R W, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray [J]. Science, 1995, 270 (20): 467.
[2] 李 震, 吴素菊, 王华云, 等. 应用诱导劳倦过度、房室不节法

- 建立肾虚模型的研究 [J]. 山东中医学院学报, 1994, 18 (6): 418.
- [3] 陈 奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 184.
- [4] Kendrew J. 英汉分子生物学百科全书 [M]. 英汉分子生物学百科全书翻译委员会译. 上海: 上海科技出版社, 2004: 375.
- [5] Treadwell J A, Singh S M. Microarray analysis of mouse brain gene expression following acute ethanol treatment [J]. Neurochem Res, 2004, 29 (2): 357.
- [6] Pereira-DA-Siva M, Torsoni M A, Nourani H V, et al. Hypothalamic melanin-concentrating hormone is induced by cold exposure and participates in the control of energy expenditure in rats [J]. Endocrinol, 2003, 144 (11): 4831.
- [7] 周爱儒. 生物化学 [M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 184.
- [8] Grimm J, Mueller A, Hefti F, et al. Molecular basis for catecholaminergic neuron diversity [J]. The National Academy of Science of the USA, 2004, 101 (38): 13891.
- [9] Busche S, Gallinat S, Fleegal M A, et al. Novel role of macrophage migration inhibitory factor in angiotensin II regulation of neuro modulation in rat brain [J]. Endocrinology, 2001, 142 (11): 4623.
- [10] 陆金春, 黄宇烽, 张锡然, 等. 英汉细胞与分子生物学词典 [M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2004: 242, 413.
- [11] Michael Conn P, Means Anthony R. 分子调节原理 [M]. 曹又佳, 张翠竹主译. 北京: 高等教育出版社, 2004: 393.
- [12] Krauss G. 信号转导与调控的生物化学 [M]. 3 版. 孙 超, 刘景生译. 北京: 化学工业出版社, 2005: 82.
- [13] 毛向明, 冯春琼, 邹亚光, 等. 应用基因芯片技术研究成年男性精子的基因表达 [J]. 中华男性学杂志, 2006, 12 (5): 401.
- [14] 王金发, 刘 兵. 英汉细胞生物学词典 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 93.

Gene chip study on cerebral gene of effect of Jinkui Shenqiwan and Youguiwan on mouse model of kidney-yang asthenia with syndrome disproved according to therapeutic efficacy of drugs used

YANG Yuhua, LI Zhen*, SUN Jing

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

[Abstract] Objective: To inquire into the cerebral gene change of effect of Jinkui Shenqiwan and Youguiwan for animal model of kidney-yang asthenia caused by excessive physical and sexual activities, which may study the effect mechanism of the medicine with syndrome disproved therapeutic efficacy of drugs used. **Method:** Male mice of Kunming species, weight 35-40 g, and female weight 28-35 g were randomly divided into four groups: control group, model group and treatment groups of Jigui Shenqiwan and Youguiwan in which there were ten male mice, fifteen ones, ten ones and ten ones, respectively. All of them were fed normally, and poured into their stomach with 0.5 mL of distill water for each mouse in the control group and model group, and with 0.5 mL suspension of the drugs (including 1.1 g · kg⁻¹ drug) for each one in the treatment groups every day. The mice in the model group and treatment groups were kept by means of each male mouse with six female mice in the same cage, and all male mice swam until they gradually submerged and were scooped up from water once everyday for lasting four weeks to induce the kidney-yang asthenia with excessive physical and sexual activities. Animals' manifestation such as fearing cold, activity and responses, mouse' fur and so on were observed. The brain gene were detected with the mouse brain gene chip of 36K Mouse genome array made by CapitalBio Corp. Beijing, China, and the differential expression gene were screened according to the ratio equal to or above 2 and equal to or below 0.5 with the related fluorescent intensity comparing the two groups, which could be further verified in the light of partly differential expression gene with qRT-PCR. **Result:** The mouse model of kidney-yang asthenia in the model group was successfully induced by way of excessive physical and sexual activities. There were twenty-three genes among up-regulated genes in the model group versus control group but down-regulated genes in the treatment groups versus model group, chiefly including the genes association with inflammation/immunization, neurotransmissions/signal transduction and so on. There were six genes among the down-regulated genes in the model group versus control group but up-regulated in the treatment groups versus model group, mainly involving the related genes of cellular cycle and structure, neurotransmissions/signal transduction, transcription and et al. **Conclusion:** Jigui Shenqiwan and Youguiwan may make it markedly up-regulated to notably down-regulated genes of hormone and melanin-concentrating hormone (MCH) for model of mouse of kidney-yang asthenia, and promote cellular proliferation, which can inquire into effect mechanism of the drug in genetic level at the same time.

[Key words] DNA microarray; kidney-yang asthenia; animal model; Jinkui Shenqiwan; Youguiwan [责任编辑 古云侠]