

舒郁胶囊对 PMS 肝气郁证模型大鼠 下丘脑 μ -阿片受体的影响

王杰琼¹, 许莉莉¹, 张丽娜², 薛玲^{1*}

(1. 山东中医药大学 中医药经典理论教育部重点实验室, 济南 250355;

2. 威海市立医院, 山东威海 264200)

[摘要] **目的:**通过观察经前期综合征(PMS)肝气郁证模型大鼠下丘脑中 μ -阿片受体(MOR)的蛋白表达,探讨舒郁胶囊治疗 PMS 肝气郁证的机制。**方法:**Wistar 大鼠 56 只,随机分为正常组、模型组、舒郁胶囊组(0.408 g·kg⁻¹)和纳洛酮组(0.4 mg·kg⁻¹),每组 14 只,旷场实验和阴道涂片筛选动情周期规律非接受期大鼠进入实验,除正常组,其余各组采用慢性束缚应激法复制 PMS 肝气郁证模型,旷场实验对模型进行行为学评价,各组大鼠下丘脑采用免疫荧光化学技术(IF)和 Western blot 分别观察 MOR 分布及蛋白表达变化。**结果:**宏观行为学表明,与正常组比较,模型组大鼠旷场总分显著降低($P < 0.01$);免疫荧光结果显示,与正常组比较,模型组大鼠下丘脑细胞分布排列杂乱且增多,与模型组比较,舒郁胶囊、纳洛酮给药组均得到显著改善;蛋白免疫印迹结果显示,与正常组比较,模型组下丘脑中 MOR 表达水平显著升高($P < 0.01$),与模型组比较,舒郁胶囊、纳洛酮给药组 MOR 表达水平均显著下降($P < 0.01$)。**结论:**舒郁胶囊可通过对下丘脑中 MOR 的拮抗作用而改善 PMS 肝气郁证的症状,另外,下丘脑中 MOR 上调可能是 PMS 肝气郁证的发病机制之一。

[关键词] 舒郁胶囊; PMS 肝气郁证; μ -阿片受体; 下丘脑

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)13-0105-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015130105

Effect of Shuyu Capsule on Expression of μ -opioid Receptors in Hypothalamus of Premenstrual Syndrome of Liver-Qi Stagnation Rats WANG Jie-qiong¹, XU Li-li¹, ZHANG Li-na², XUE Ling^{1*} (1. Key Laboratory for Classical Theory of Traditional Chinese Medicine of Education Ministry, Ji'nan 250355, China; 2. Weihai City Hospital, Weihai 264200, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Shuyu capsule on μ -opioid receptors (MOR) expression in the hypothalamus of premenstrual syndrome (PMS) with liver-qi stagnation model rats, and to investigate its possible mechanism. **Method:** Rats were selected by using an open field test and vaginal smear in this experiment. The selected rats were divided into 4 groups: the normal group, the model group, the Shuyu capsule group (0.408 g·kg⁻¹) and the naloxone group (0.4 mg·kg⁻¹). The PMS with liver-qi stagnation model in rats was prepared by a chronic bondage stress method. The distribution and protein level of MOR in hypothalamus of rats were observed by immunofluorescence chemical technology and Western blot. **Result:** Compared with the normal group, the scores of open field test decreased, the distribution of messy-arranged MOR in hypothalamus increased, MOR protein expression increased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the scores of open field test increased, the distribution of messy-arranged MOR in hypothalamus decreased, MOR protein expression decreased in the Shuyu capsule and naloxone groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** Shuyu capsule could improve the symptoms of PMS with liver-qi depression syndrome, which may be achieved by regulating the MOR in the hypothalamus. In addition, the up-regulation of MOR in the central nervous system may be one of the pathophysiological mechanisms.

[Key words] Shuyu capsule; premenstrual syndrome with liver-qi depression syndrome; μ -opioid receptors; hypothalamus

[收稿日期] 20140803(014)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81173162)

[第一作者] 王杰琼,博士,讲师,从事中药调肝方药药理研究,Tel:0531-89628596,E-mail:jieqiong19820127@163.com

[通讯作者] *薛玲,硕士,教授,硕士生导师,从事中药调肝方药药理研究,Tel:0531-89628596,E-mail:xxueling@163.com

经前期综合征备受国际医学界关注,已被医学和生命科学家列为“对神经科学的挑战——未来 10 年要回答的 50 个重要问题”之一。美国妇产科学会 (ACOG) 将经前期综合征 (premenstrual syndrome, PMS) 定义为“严重影响正常生活的一组与月经周期密切相关、可预见的经前症状”^[1-2]。乔明琦依据流行病学调查,认为 PMS 肝气逆和肝气郁两证是 PMS 主要亚型^[3]。前期研究表明在 PMS 肝气逆证模型大鼠下丘脑中 μ -阿片受体 (μ -opioid receptor, MOR) mRNA 及蛋白电泳条带亮度减弱^[4]。国内外大量文献也证实 MOR 在情绪调控以及情感异常类疾病中发挥重要作用,参与调控抑郁、消极、低沉等情绪反应^[5]。舒郁胶囊在 PMS 肝气郁证的临床治疗中,疗效显著,故本文旨在探讨舒郁胶囊对 PMS 肝气郁证的治疗机制。因此本文主要通过免疫荧光标记技术和蛋白免疫印迹技术检测 MOR 在下丘脑中的分布模式及其蛋白表达,为进一步探明 PMS 肝气郁证的发病机制提供依据。

1 材料

1.1 动物 成年未孕雌性 Wistar 大鼠,150 ~ 180 g, SPF 级,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2012-0001,适应饲养 1 周。

1.2 药物及试剂 舒郁胶囊,主要由柴胡总皂苷、白芍总苷、香附挥发油等主要成分组成(青岛海川创新生物天然药物研究中心,批号 2010L11169);盐酸纳洛酮注射液(北京凯因科技股份有限公司,批号 20111209),MOR 兔多克隆一抗(美国 Abcam 公司,批号 ab10275), β -actin 小鼠抗大鼠单克隆抗体(美国 Sigma 公司,批号 A1978),HRP 标记山羊抗兔 IgG(远大晶美公司,批号 SB200),HRP 标记山羊抗小鼠(美国 Pierce 公司,批号 sc2005),FITC 标记山羊抗兔 IgG(北京中杉生物技术有限公司,批号 ZF-0311),封闭用正常山羊血清工作液(北京中杉生物技术有限公司,批号 ZLI-9022),抗荧光衰减封片剂(武汉博士德公司,批号 AR1109)。

1.3 仪器 LSM510 型激光共聚焦扫描显微镜(德国 Zeiss 公司),SDS-PAGE 型蛋白印迹转移装置(美国伯乐公司)。

2 方法

2.1 PMS 肝气郁证大鼠模型制备及分组 依据文献^[6]制备 PMS 肝气郁证大鼠模型。选取旷场得分相近、动情行为规则、处于动情周期非接受期的大鼠纳入本实验,选取大鼠 56 只,7 只 1 笼,分为 4 组,每组 14 只(7 只用于免疫荧光,7 只用于蛋白免疫印

迹)分别为①正常组:不给予任何刺激,放入鼠笼内,每天给予等体积的无菌饮用水。②模型组:采用束缚造模法大鼠前足与对侧后足用无菌纱布捆绑,妨碍其自由活动,以大鼠稍能活动、取食为度。刺激造模持续大鼠非接受期阶段,连续刺激造模 2 个周期(5 d)。造模同时给予与正常组相同体积的无菌饮用水。③舒郁胶囊给药组:按②造模,同时给予舒郁胶囊。舒郁胶囊 *ig* 给予 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ (即 1 mL 药液含原生药 0.081 6 g,相当于人临床 8 倍剂量^[7],剂量为 $0.408 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。④纳洛酮组:按②造模,同时每天 *ip* 纳洛酮 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 大鼠。

2.2 行为学评价 采用旷场实验^[8]进行行为学评价,旷场实验箱为实验室自制,其大小为 $1 \text{ m} \times 1 \text{ m} \times 0.5 \text{ m}$,四周内壁及底面均为黑色,底面用白线划分为大小均等的 25 个方格,沿四周内壁的方格称为外周格,其余为中央格。实验者手握距离大鼠尾根部 1/3 处,放入旷场正中格,用摄像系统记录动物 3 min 内的行为变化,观察者主要记录水平得分、垂直得分和旷场总分。实验前动物筛选和造模给药后模型各进行 1 次评价测定。

2.3 免疫荧光检测舒郁胶囊对模型大鼠下丘脑中 MOR 的影响 各组大鼠行为学评价后,用戊巴比妥钠 ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 麻醉。将大鼠固定,用 300 mL 生理盐水及 4% 多聚甲醛固定液进行心脏灌注,直至全身变硬、僵直,迅速剥离鼠脑,依据大鼠脑立体定位图谱切取大脑中间段下丘脑部分约 4.5 mm。置于多聚甲醛固定液中 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置约 1 周。将组织块石蜡包埋,切片厚约 $5 \text{ }\mu\text{m}$,脱蜡、水化、微波热抗原修复;山羊血清封闭工作液封闭,室温反应 20 min,;加入含有 MOR 的一抗稀释液, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 湿盒过夜; $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 漂洗一抗,2 min \times 3 次;避光滴加 FITC 标记的二抗 $50 \text{ }\mu\text{L}$, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,取出湿盒, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 漂洗二抗,2 min \times 3 次;封片后激光共聚焦显微镜下观察 MOR 在下丘脑的分布状态及同位点表达情况。使用 Image-Pro Plus6.0 进行半定量统计。

2.4 Western blot 检测模型大鼠下丘脑中 MOR 的蛋白表达 各组大鼠模型评价后,迅速开颅,剥取大脑并分离下丘脑,置于 1.5 mL EP 管中,放入液氮罐中备用。裂解液室温放置解冻、组织称重;裂解组织(组织-裂解液 1:7.5;PMSF-裂解液 1:100);组织匀浆; $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $12 \text{ 000 r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清。BCA 试剂盒蛋白定量; $30 \text{ }\mu\text{g}$ 蛋白经 12% SDS-PAGE 胶分离,4% SDS-PAGE 胶浓缩后,转移到 NC 膜,5% TBST 脱脂牛奶封闭液中,室温孵育 1 h;加入一抗

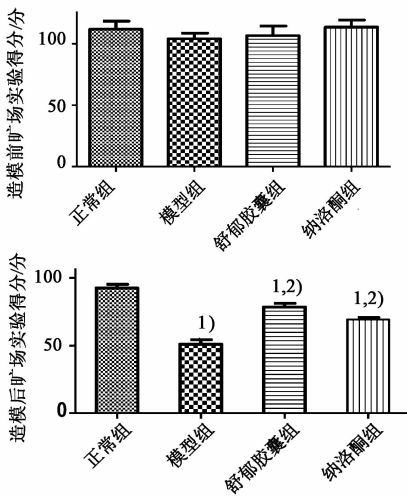
4 ℃ 过夜, TBS-Tween 洗膜后加 HRP 标记的二抗, 室温孵育 2 h; 加入 ECL 发光液, 经 ECL 检测系统检测。用 Gel-Pro analyzer 软件进行图像分析, 目的条带的积分吸光度 IA 与相应的 β-actin 条带的吸光度比值, 即目的蛋白的相对含量。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计学软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 GraphPad Prism 5 统计软件进行 one-way ANOVA 法检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠宏观行为学的影响 与正常组大鼠比较, PMS 肝气郁组大鼠对外界环境不敏感, 精神萎靡, 皮毛无光, 眼神呆滞, 体重下降, 不活跃; 用电笔刺激正常组大鼠, 大鼠反应迅速, 奔跑跳跃。模型组大鼠亦躲避, 但是行动缓慢, 反应迟钝。结合旷场实验结果, 初步判定该模型的制备应该是成功的。

3.2 对大鼠旷场实验结果的影响 旷场实验水平得分主要评价动物的兴奋性, 垂直得分主要评价动物对外周环境的感兴趣程度, 而旷场实验总分作为动物探索行为、适应性及兴奋性的总体反应。与正常组大鼠比较, 模型大鼠显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 舒郁组得分显著升高 ($P < 0.01$), 纳洛酮组也显著升高 ($P < 0.05$)。见图 1。



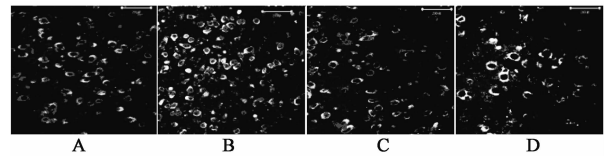
与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (图 3 同)

图 1 舒郁胶囊对各组大鼠旷场得分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

Fig. 1 Effects of Shuyu capsule on open field score of each group rats ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

3.3 对大鼠下丘脑中 MOR 的形态及分布定位的影响 各组大鼠下丘脑中 MOR 阳性细胞呈绿色荧光, 分布模式无明显变化, MOR 阳性细胞形态为圆状或点状, 多分布于细胞膜中。与正常组比较, 造模后下丘脑中阳性细胞增多, 多为椭圆形, 有些细胞甚

至干瘪, 荧光强度显著增强; 给予舒郁胶囊的细胞形态接近正常组。见图 2。



A. 正常组; B. 模型组; C. 舒郁胶囊 0.408 g·kg⁻¹ 组; D. 纳洛酮 0.4 mg·kg⁻¹ 组 (图 3 同)

图 2 舒郁胶囊对 PMS 肝气郁证大鼠下丘脑中 MOR 分布的影响 (免疫荧光, ×400)

Fig. 2 Effects of Shuyu capsule on MOR distribution in hypothalamus of PMS rat (IF, ×400)

3.4 对大鼠 MOR 蛋白表达水平 与正常组比较, 模型组下丘脑中 MOR 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组大鼠比较, 给药组 MOR 蛋白表达水平明显下降 ($P < 0.01$), 但两组之间有显著性差异 ($P < 0.05$)。见图 3。

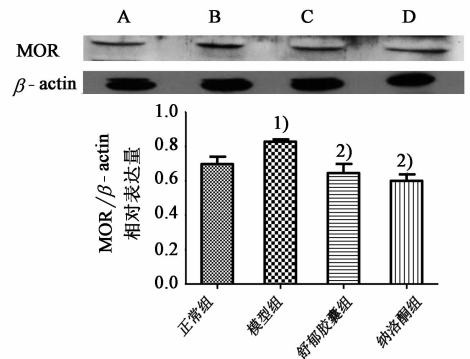


图 3 舒郁胶囊对 PMS 肝气郁证大鼠下丘脑中 MOR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

Fig. 3 Effects of Shuyu capsule on MOR protein expression in hypothalamus of PMS rat ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

4 讨论

PMS 肝气郁证的临床表现虽很复杂多样, 但其核心症状是黄体期 (月经周期最后两周内) 出现抑郁症状, 月经来潮后症状自行消失^[9-10]。本实验采用雌性大鼠动情非接受期束缚刺激的方法制备 PMS 肝气郁证模型, 限制其活动, 使其取食、自由活动愿望受挫, 呈现肝气郁证情志抑郁、胸闷纳减的临床特点^[11]。采用经典旷场实验于造模后非接受期进行行为学评价, 结果发现模型大鼠旷场总分显著降低, 说明其兴奋性下降, 对外周环境兴趣度下降。呈现抑郁的状态, 表明造模成功。

下丘脑被认为是情绪的躯体反应和内脏反应的整合部位^[12]。其调节情绪反应的区域主要位于下丘脑近中线两旁的腹内侧区。有文献报道悲伤情绪

可以引起腹内侧基底神经节和杏仁核 MOR 的激活^[13]。这都说明下丘脑与情绪反应关系密切。内啡肽(endomorphin, EM)为目前已知 MOR 选择性和亲和力最高的阿片肽^[14],前期基础研究表明,PMS 肝气郁证模型大鼠下丘脑中 EM 含量升高^[15]。

本文以 MOR 为检测指标进一步探查舒郁胶囊治疗 PMS 肝气郁证的机制。免疫荧光化学标记结果显示,MOR 在下丘脑细胞膜有高密度的表达,为经典的膜受体,这与国内外研究报道一致。本实验结果还可看出,MOR 在正常大鼠下丘脑分布较均匀,形态多为点状或椭圆状;造模后阳性细胞形态发生变化,多为椭圆形,阳性细胞数目、面积及其荧光强度明显增强,给予舒郁胶囊后得到显著改善。以上细胞形态的变化应与束缚模型应激刺激有关,进而也从侧面说明 PMS 肝气郁证的发生可能影响 MOR 在下丘脑的定位分布,而舒郁胶囊也可作用于 MOR 起到治疗作用。

Western blot 结果显示,与正常组大鼠比较,PMS 肝气郁模型组大鼠 MOR 在下丘脑的表达上调,这提示 PMS 肝气郁证的发生可能与 MOR 表达上升有关,结合前期研究可推测,由于 MOR 的上调,导致与之结合的配体增多,MOR 与配体结合的增加可升高其抑制效应,从而可能调节 5-HT 等神经递质含量,表现为兴奋性减弱,从而出现抑郁等情绪反应。与模型组相比,给予舒郁胶囊干预后,模型大鼠下丘脑 MOR 下调,抑郁情绪有所缓解。提示 MOR 的下调可能是舒郁胶囊干预 PMS 肝气郁证的中枢机制之一。

舒郁胶囊中有效成分为其主要提取物:柴胡总皂苷、白芍总苷及香附挥发油等,其治疗机制尚不明确,本研究通过与 MOR 拮抗剂纳洛酮的对比,发现该方药也能发挥 MOR 的拮抗作用。纳洛酮作为 MOR 拮抗剂,结构与内啡肽极为相似,与 MOR 受体有较强的亲和力,可竞争性抢夺内源性内啡肽的结合位点,从而起到拮抗作用。舒郁胶囊发挥 MOR 拮抗作用可能是由于某些有效成分和/或代谢产物的结构与纳洛酮相似。

综上所述,通过本文研究可初步推断 PMS 肝气郁证的发病可能与下丘脑细胞形态改变、结构受损有关,另外,结合前期研究,可推测下丘脑中 MOR 的表达上调引起 EM 含量升高,导致神经递质 5-HT 降低,是经前出现抑郁症状的机制之一,同时,舒郁胶囊可通过对 MOR 的拮抗而改善 PMS 肝气郁证模型大鼠的症状,但舒郁胶囊中的哪些有效成分具有

MOR 拮抗作用,通过何种方式起到治疗作用尚需下一步实验的深入研究。

[参考文献]

- [1] ACOG Practice Bulletin. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. Premenstrual syndrome[J]. *Obstet Gynecol*,2000,95:1-9.
- [2] Kessel B. Premenstrual syndrome. *Advances in diagnosis and treatment*[J]. *Obstet Gynecol Clin North Am*,2000, 27 (3):625-639.
- [3] 魏盛. 经前期综合征肝气逆、肝气郁证动物模型改进及肝失疏泄微观机制研究[J]. *山东中医药大学学报*,2007,31(5):404-408.
- [4] 王芙蓉,薛玲,张惠云. 经前平颗粒对经前期综合征肝气逆证大鼠下丘脑和海马 μ 阿片受体表达的影响[J]. *中医杂志*,2011,52(15):1308-1311.
- [5] Morales-Mulia M, Estrada-Camarena E. Anxiolytic effects of ethanol are partially related to a reduced expression of adenylyl cyclase but not to μ -opioid receptor activation in rat nucleus accumbens [J]. *Behav Brain Res*, 2012,35(2):189-194.
- [6] 乔明琦,张惠云,陈雨阵,等. 肝郁证动物模型研究的理论思考[J]. *中国医药学报*,1997,12(5):42-44.
- [7] 徐淑云,卞如濂,陈修. 药理实验方法[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:202-203.
- [8] Maryam A-Imohaisen, Arturo, Cardounel, Mohammed Kal-imi. Repeated immobilization stress increases total cytosol glucocorticoid receptor in rat liver[J]. *Steroid*, 2000, 65:8S-15S.
- [9] ACOG Practice Bulletin. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. premenstrual syndrome[J]. *Obstet Gynecol*,2000,95:1-9.
- [10] Kessel B. Premenstrual syndrome. *Advances in diagnosis and treatment*[J]. *Obstet Gynecol Clin North Am*,2000, 27 (3):625-639.
- [11] 杨维益,王天芳,陈家旭,等. 肝脏在五脏中的地位演变[J]. *中华中医药杂志*,1995(3):10-13.
- [12] 吴斌. 大鼠杏仁核-下丘脑神经通路研究[J]. *自然科学杂志*,2000,201(1):75-77.
- [13] Prossin A R, Koch A E, Campbell P L. Association of plasma interleukin-18 levels with emotion regulation and μ -opioid neurotransmitter function in major depression and healthy volunteers [J]. *Biol Psychiatry*, 2011, 69 (8):808-812.
- [14] Ide S, Fujiwara S, Fujiwara M, et al. Antidepressant-like effect of venlafaxine is abolished in μ -opioid receptor-knockout mice[J]. *J Pharmacol Sci*, 2010,114 (1):107-110.
- [15] 马晶,张惠云. 经前期综合征模型大鼠下丘脑和外周血内啡肽含量变化的实验研究[J]. *药学与临床研究*,2008,16(5):343-346.

[责任编辑 周冰冰]