

## 逍遥散对慢性不可预知温和应激大鼠下丘脑弓状核 JAK/STAT通路变化的影响

王一旭<sup>1</sup>, 李媛媛<sup>1</sup>, 张碧涛<sup>1</sup>, 王浩<sup>1,2</sup>, 王少贤<sup>1,2\*</sup>

(1. 河北中医学院, 石家庄 050200;

2. 河北省心脑血管病中医药防治研究重点实验室, 石家庄 050091)

**[摘要]** 目的: 观测慢性不可预知温和应激(CUMS)模型大鼠下丘脑弓状核(ARC)中瘦素受体(ob-R)-酪氨酸激酶Janus2(JAK2)/转录激活因子3(STAT3)通路变化及逍遥散的调节作用。方法: 60只SD雄性大鼠随机分为正常组、模型组、逍遥散组、氟西汀组。适应性喂养1周, 模型组、逍遥散组、氟西汀组大鼠通过不可预知温和刺激方式复制慢性心理应激大鼠模型, 同时灌服相应药物, 逍遥散 $19.27\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 氟西汀 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (按成人平均体质量60 kg用药量换算), 正常组和模型组大鼠灌服同体积生理盐水, 实验6周。观察各组大鼠体质量、摄食量、糖水消耗率、行为学变化; 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠下丘脑弓状核ob-R, JAK2, STAT3 mRNA和蛋白表达。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠体质量、摄食量明显下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 糖水消耗、旷场实验行为学总路程和中央区总路程均有明显减少, 下丘脑弓状核ob-R, JAK2, STAT3蛋白及mRNA表达升高明显( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 与模型组比较, 逍遥散组大鼠体质量于实验第7, 14, 21, 28天明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 大鼠摄食量于实验第21, 35天明显升高( $P<0.05$ ), 糖水消耗、旷场实验行为学总路程和中央区总路程均明显改善; 逍遥散对模型大鼠下丘脑弓状核ob-R, JAK2, STAT3蛋白及mRNA表达有相应的调节作用( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论: 逍遥散调节慢性不可预知温和应激大鼠体质量、食欲和能量代谢作用, 可能与下丘脑弓状核ob-R-JAK2/STAT3通路相关。

**[关键词]** 慢性不可预知温和应激; 弓状核; 瘦素受体; 酪氨酸激酶Janus2/转录激活因子3; 逍遥散

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)21-0021-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201881

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200725.1933.012.html>

**[网络出版日期]** 2020-7-27 11:27

### Effect of Xiaoyaosan on Changes of JAK/STAT Pathway in Hypothalamic Arcuate Nuclei of Rats With Chronic Mild Unpredictable Stress

WANG Yi-xu<sup>1</sup>, LI Yuan-yuan<sup>1</sup>, ZHANG Bi-tao<sup>1</sup>, WANG Hao<sup>1,2</sup>, WANG Shao-xian<sup>1,2\*</sup>

(1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China; 2. Hebei Key Laboratory of Chinese Medicine Prevention Research on Cardio-cerebrovascular Diseases, Shijiazhuang 050091, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the changes of leptin receptor-tyrosine kinase Janus2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway and the regulatory effect of Xiaoyaosan on the hypothalamic arcuate nuclei of rats with chronic mild unpredictable stress model (CUMS). **Method:** Sixty male sprague-dawley rats were randomly divided into normal group, model group, Xiaoyaosan group, and fluoxetine group. After one-week adaptive feeding, the rats in model group, Xiaoyaosan group and fluoxetine group were

**[收稿日期]** 20200525(029)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81673881, 81202644); 河北省自然科学基金项目(H2016423049); 河北省高层次人才项目(A201901038); 河北中医学院2019年研究生创新立项项目(XCXZZSS2019004); 河北中医学院优秀本科生科研能力提升项目(YXZZ2019011)

**[第一作者]** 王一旭, 在读硕士, 从事中医证候病理生理基础研究, E-mail: wpp340398738@163.com

**[通信作者]** \* 王少贤, 博士, 教授, 从事中医证候病理生理基础研究, E-mail: muhudie@163.com

used to replicate the chronic psychological stress rat model through mild unpredictable stimulation. Meanwhile, they were simultaneously administered the corresponding drugs, Xiaoyaosan  $19.27 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , Fluoxetine  $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  (based on the average adult body weight of 60 kg), the rats in the normal group and the model group were given the same volume of normal saline for 6 weeks. The body weight, food intake, sucrose consumption ratios, and the experimental behavior in the open field test (OFT) of the groups were observed. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot were used to detect the expressions of ob-R, JAK2, and STAT3 in the arcuate nucleus of rat hypothalamus. **Result:** Compared with the normal group, the body weight and food intake of the model group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the sucrose consumption ratios, the total behavioral distance of the experimental field and the total distance of the central area were significantly reduced, the protein and mRNA expressions of ob-R, JAK2, STAT3 in the arcuate nucleus of hypothalamus in rats increased significantly ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the body weight of Xiaoyaosan group increased significantly on the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> days ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the food intake of rats increased significantly on the 21<sup>st</sup> and 35<sup>th</sup> days of the experiment ( $P < 0.05$ ), and the sucrose consumption ratios, the total distance of the experimental behavior in the open field test (OFT) and the total distance of the central area were significantly improved. Xiaoyaosan had a corresponding regulatory effect on the protein and mRNA expressions of ob-R, JAK2, STAT3 in the arcuate nucleus of hypothalamus in model rats ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Xiaoyaosan regulates the body weight, appetite, and energy metabolism of chronically mild and unpredictable stress rats, which may be related to the ob-R-JAK2/STAT3 pathway in the hypothalamic arcuate nucleus.

**[Key words]** chronic mild unpredictable stress; arcuate nucleus; leptin receptor; tyrosine kinase Janus2/transcriptional activator 3; Xiaoyaosan

伴随社会生活工作节奏加快,现代人面临各方面压力不断增加,功能性消化不良、肠易激综合征等心理应激性疾病日益增多。适度应激对人体有益,但过度的、慢性的、持久的心理应激会导致人体产生焦虑、抑郁、神疲乏力、便溏、消瘦、食后胃脘不适等不良反应。传统中药复方逍遥散(《太平惠民和剂局方》)具有疏肝解郁、养血健脾之功,现代研究为治疗应激的首选方药<sup>[1-3]</sup>。

课题组前期研究表明,慢性心理应激不但可引发大鼠出现抑郁、焦虑样情绪障碍,还可导致动物出现食欲减退、能量代谢障碍,而逍遥散调节下丘脑弓状核瘦素(leptin)-瘦素受体(ob-R)及下游摄食核团,与慢性心理应激模型大鼠摄食量变化具有一定的相关性<sup>[4-6]</sup>,但其干预ob-R与摄食核团之间的通路变化机制,尚未阐明。

本研究通过不可预知温和刺激方式复制慢性心理应激大鼠模型,以逍遥散作为干预用药,通过观察大鼠体质量,摄食量,行为学变化,糖水消耗,下丘脑弓状核(ARC)ob-R,酪氨酸激酶Janus2(JAK2),转录激活因子3(STAT3)的蛋白及mRNA的表达,进一步研究逍遥散调节食欲和能量代谢以抗应激的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 60只SPF级雄性SD大鼠,体质量120~150 g,由北京维通利华实验动物中心提供,合格证号SCXK(京)2016-0006。本研究经河北中医学院伦理委员会批准,符合国家对医学实验动物的有关要求。标准动物房饲养温度18~25℃,湿度30%~50%,光照时间明暗各12 h,6:00~18:00为明期,18:00~6:00为暗期。

**1.2 药物与试剂** 逍遥散(《太平惠民和剂局方》)组成:北柴胡、白芍、当归、白术、茯苓各30 g,薄荷(后下)10 g,炙甘草15 g,煨姜10 g。中药饮片均购自北京同仁堂健康药业(石家庄)股份有限公司,并经河北中医学院中药学院张一昕教授鉴定合格;氟西汀片(常州四药制药有限公司,批号20180610);戊巴比妥钠(北京化学试剂公司,批号020402);山羊血清,SDS-PAGE凝胶制备试剂盒,苯甲基磺酰氟(PMSF)(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为20190621,20181119,20190618);RIPA裂解液(美国Thermo公司,批号TH271222);Super Total RNA Extraction Kit, GoScript Reverse Transcription System, GoTaq实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Master Mix(美国Promega

公司,货号分别为LS1040, A5001, A6002);兔抗STAT3, JAK2,  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)多克隆抗体(美国Affinity公司,货号分别为AF6294, AF6022, AF7018);兔抗LEPR多克隆抗体(美国Proteintech公司,货号20966-1-AP);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(H+L)(上海Abways公司,货号AB0101)。

**1.3 仪器** T10型电动匀浆机(德国IKA公司);3K15型低温离心机(德国Sigma公司);CFX96型Real-time PCR系统, Mini-PROTEAN Tetra小型垂直电泳槽, Mini Trans Blot Cell型小型转印槽(美国Bio-Rad公司); plus384型酶标仪(美国MD公司); Fusion FX5 Spectra型多功能成像系统(法国Vilber公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组、造模与给药** 60只大鼠适应性喂养1周,采用随机数字表法随机分为正常组、模型组、逍遥散组、氟西汀组,共4组,每组15只大鼠,每3只大鼠1笼进行饲养。模型制备参考文献[7-8],采用慢性不可预知温和应激(CUMS)方法制备动物模型,连续应激6周。包括束缚2 h,夹尾5 min,冰水游泳5 min,热水游泳5 min,潮湿环境24 h,昼夜颠倒24 h,禁食水24 h,倾斜24 h,噪音3 h在内9种刺激方法,每日2种48 h内不重复施加,对模型组、逍遥散组、氟西汀组3组进行造模。并于每日施加应激刺激前30 min灌胃给药,逍遥散组大鼠给予逍遥散混悬液 $19.27 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (按成人平均体质量60 kg用药量换算,经去离子水浸泡、煮沸、浓缩,得逍遥散混悬液, $1.927 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ );氟西汀组大鼠给予氟西汀水溶液 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (按成人平均体质量60 kg用药量换算,去离子水溶解);正常组和模型组大鼠灌服同等体积的生理盐水,实验6周。

### 2.2 指标检测

**2.2.1 体质量及摄食量** 实验前1 d(day0)和实验开始后第7, 14, 21, 28, 35, 42天(记作day7, day14, day21, day28, day35, day42)测量每只大鼠体质量及每笼大鼠24 h摄食量,每组5笼大鼠,以每笼每只大鼠平均摄食量纳入统计分析。

**2.2.2 旷场实验** 依据文献[9-10],分别于day0, day7, day14, day21, day28, day35, day42进行旷场行为学实验。旷场箱大小 $1 \text{ m} \times 1 \text{ m} \times 0.4 \text{ m}$ ,箱底均分为25个正方形小格,正中9个小格被称为中央区,正中部小格称为正中格,摄像头置于正中格正上方。使用上海新软信息科技有限公司Version 2.0行

为学记录分析软件记录并分析大鼠5 min旷场行为学总路程及中央区总路程。实验时将大鼠放置于中央区,2 min后开始记录,单只大鼠实验时长5 min,每只大鼠进行实验完毕后使用乙醇棉球对箱底部进行擦拭,待乙醇挥发后进行下1只,测试结果每组选取10只数据无异常大鼠纳入统计。

**2.2.3 糖水偏好实验** 实验开始前3天预先对大鼠进行糖水偏好实验训练,将2瓶1%蔗糖水溶液置于鼠笼上大鼠饮水处24 h,实验前第2天将其中1瓶蔗糖水溶液换为普通去离子水,实验第0天交换蔗糖水与去离子水水瓶位置。于实验day0, day7, day14, day21, day28, day35, day42晚20:00进行糖水偏好实验,记录1 h每笼大鼠对蔗糖水和去离子水的总饮水量,计算平均每只大鼠糖水消耗量/(糖水消耗量+纯水消耗量) $\times 100\%$ ,每组得到5个大鼠糖水消耗率数据。

**2.2.4 取材** 于实验第43天2%戊巴比妥钠( $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),麻醉,断头,于低温冰盒上进行剥脑,液氮速冻,抠取弓状核,置冻存管, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。

**2.2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠下丘脑弓状核ob-R, JAK2, STAT3蛋白表达** 低温环境下弓状核置离心管,称量净质量,加入RIPA  $10 \mu\text{L}$ , PMSF  $0.1 \mu\text{L}$ ,电动匀浆器匀浆,以离心半径12 cm,  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心15 min,取上清液,按照BCA蛋白检测试剂盒说明书进行总蛋白检测;按 $10 \mu\text{L}$ 每孔上样量进行计算,  $30 \mu\text{g}$ 蛋白进行上样电泳,湿转至 $0.45 \text{ mm}$  PVDF膜上;取下PVDF膜,使用TBST稀释至5%羊血清进行封闭,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 2 h;弃封闭液加入TBST稀释的一抗( $1:500$  ob-R,  $1:300$  JAK2,  $1:300$  STAT3,  $1:5\ 000$   $\beta$ -actin),  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育16 h;弃一抗TBST清洗后加入 $1:1$ 万HRP标记山羊抗兔IgG二抗,室温孵育1.5 h;TBST清洗后使用ECL PLUS发光液浸泡目的条带,使用多功能成像系统进行化学发光。以 $\beta$ -actin为内参,采用Image Pro Plus 6.0进行条带分析灰度值。

**2.2.6 Real-time PCR检测大鼠下丘脑弓状核ob-R, JAK2, STAT3 mRNA表达** 大鼠ARC低温下转移至无菌无RNA酶离心管中,称量净质量,加入RNA-Solv Reagent  $10 \mu\text{L}$ ,匀浆,按试剂盒说明书操作步骤提取总RNA;根据反转录试剂盒说明建立 $20 \mu\text{L}$ 反转录体系,于PCR仪上 $42 \text{ }^\circ\text{C}$  50 min,  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  5 min,逆转录合成cDNA;以cDNA为模板,按照Real-time PCR试剂盒说明书进行PCR扩增,建立

50 μL PCR反应体系,PCR反应采用两步法,设45个循环(95 °C预变性10 min,95 °C变性15 s,60 °C退火1 min),每个循环后退火阶段进行信号检测,根据 $RQ=2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算分析,以正常组1号大鼠RQ值设置为1,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,计算mRNA相对表达量。引物由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
ob-R	上游 GCCATCAATTCATCGGTGC	131
	下游 GTCCAGGAAAGGATGACGCA	
JAK2	上游 GTGTGGAGATGTGCCCTAT	175
	下游 GCACTGTAGCACACTCCCTT	
STAT3	上游 GTAGTGCTGCCCTTACCTG	77
	下游 CGGCAGGTCAATGGTATTGC	
GAPDH	上游 CCTCCTGAACTTGAGGCAGTTT	235
	下游 TGTATTGTAACCAGTCATCAGCA	

表2 逍遥散对CUMS大鼠体质量的影响( $\bar{x}\pm s, n=15$ )

Table 2 Effect of Xiaoyaosan on weight of CUMS rats ( $\bar{x}\pm s, n=15$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	day0	day7	day14	day21	day28	day35	day42
正常	-	228.2±8.90	284.6±12.53	334.0±20.21	371.0±24.58	398.1±32.98	420.6±37.83	438.6±35.46
模型	-	228.0±6.62	256.9±13.67 <sup>1)</sup>	284.8±17.71 <sup>1)</sup>	305.1±13.91 <sup>1)</sup>	328.4±15.41 <sup>1)</sup>	345.0±16.11 <sup>1)</sup>	357.6±14.56 <sup>1)</sup>
氟西汀	0.2	232.2±5.49	267.8±11.04 <sup>2)</sup>	300.1±16.82 <sup>3)</sup>	318.3±22.44	338.9±25.33	356.5±26.75	370.2±28.50
逍遥散	19.27	230.5±7.91	272.5±7.56 <sup>3)</sup>	307.7±9.32 <sup>3)</sup>	327.8±12.03 <sup>2)</sup>	352.3±15.06 <sup>2)</sup>	363.7±15.81	377.6±14.89

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>2)</sup>P<0.05,<sup>3)</sup>P<0.01(表6同)。

3.2 对CUMS大鼠摄食量的影响 实验前各组大鼠摄食量组间差异无统计学意义;应激因素施加后,与正常组比较,模型组大鼠于实验第7,14,21,

2.3 统计学方法 采用SPSS 21.0软件进行统计分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。对大鼠体质量、摄食量、旷场实验行为学、糖水偏好率采用一般线性模型的重复测量过程实现单变量方差分析,随后用多因素方差分析过程对每个时间点上组间的两两比较[最小显著性差异法(LSD)];其余数据满足正态分布采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐采用LSD,方差不齐采用Tamhane's T2(M)法;数据不满足正态分布采用非参数检验,P<0.05表示差异有统计学意义。

### 3 结果

3.1 对CUMS大鼠体质量的影响 实验前各组大鼠体质量组间差异无统计学意义;应激因素施加后,与正常组比较,模型组大鼠体质量于实验第7,14,21,28,35,42天显著降低(P<0.01);与模型组比较,氟西汀组明显升高大鼠体质量于实验第7,14天,逍遥散组明显升高大鼠体质量于实验第7,14,21,28天(P<0.05,P<0.01)。见表2。

28,35,42天摄食量明显降低(P<0.05,P<0.01);与模型组比较,各给药组明显升高大鼠于实验第21,35天摄食量(P<0.05)。见表3。

表3 逍遥散对CUMS大鼠摄食量影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 3 Effect of Xiaoyaosan on food intake of CUMS rats ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	day0	day7	day14	day21	day28	day35	day42
正常	-	25.84±1.03	26.45±1.60	26.11±2.58	28.47±2.61	29.70±2.10	28.71±1.79	27.80±2.60
模型	-	26.25±0.94	22.84±0.49 <sup>2)</sup>	21.99±1.27 <sup>2)</sup>	23.12±2.68 <sup>2)</sup>	24.85±1.47 <sup>2)</sup>	24.05±2.10 <sup>1)</sup>	24.64±1.55 <sup>1)</sup>
氟西汀	0.2	24.79±2.28	22.41±0.95	23.34±0.78	26.33±1.07 <sup>3)</sup>	25.51±2.26	26.98±1.40 <sup>3)</sup>	26.25±1.87
逍遥散	19.27	25.26±0.78	23.86±1.16	24.58±0.42	26.89±1.36 <sup>3)</sup>	26.23±1.23	26.90±0.91 <sup>3)</sup>	26.62±1.70

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>3)</sup>P<0.05(表4同)。

3.3 对CUMS大鼠旷场实验行为学总路程和中央区总路程的影响 实验前各组大鼠行为学总路程和中央区总路程组间比较差异无统计学意义;应激因素施加后,与正常组比较,模型组于实验第7,21,42天行为学总路程明显降低(P<0.05,P<0.01),实

验第42天模型组中央区总路程显著降低(P<0.01);与模型组比较,各给药组大鼠旷场行为学总路程和中央区活动总路程均有增加趋势,但只有实验第7天旷场行为学总路程具有统计学意义(P<0.05)。见表4,5。

表 4 逍遥散对 CUMS 大鼠行为学总路程的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 4 Effect of Xiaoyaosan on total behavioral distance of CUMS rats ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

m

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	day0	day7	day14	day21	day28	day35	day42
正常	-	31.01±4.74	25.0±4.75	20.92±4.78	32.18±5.89	21.64±7.78	22.48±8.68	22.32±5.88
模型	-	28.73±4.38	15.84±4.85 <sup>2)</sup>	16.83±9.02	19.10±4.50 <sup>2)</sup>	17.08±8.29	16.28±5.12	17.17±5.41 <sup>1)</sup>
氟西汀	0.2	29.61±4.91	23.29±10.57 <sup>3)</sup>	18.73±9.01	21.01±6.47	18.64±4.05	20.89±8.29	19.27±4.29
逍遥散	19.27	32.57±3.78	23.61±5.40 <sup>3)</sup>	18.89±9.75	24.06±7.85	19.27±8.26	22.16±8.05	21.34±5.63

表 5 逍遥散对 CUMS 大鼠行为学中央区总路程的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 5 Effect of Xiaoyaosan on total behavioral distance of central area of CUMS rats ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

m

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	day0	day7	day14	day21	day28	day35	day42
正常	-	6.14±2.02	2.92±1.24	3.87±1.58	5.78±2.54	4.73±1.65	4.94±1.55	5.25±1.44
模型	-	4.83±2.23	2.38±1.09	3.20±1.97	3.39±2.08	3.10±2.77	3.03±2.28	2.23±1.09 <sup>1)</sup>
氟西汀	0.2	6.12±2.51	2.83±1.36	3.44±3.21	4.02±2.53	4.12±1.05	4.06±2.77	3.89±2.90
逍遥散	19.27	5.92±2.51	2.76±2.10	3.88±2.71	3.82±1.86	3.64±2.85	3.41±2.55	3.85±2.42

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.01。

3.4 对 CUMS 大鼠糖水消耗率的影响 与正常组比较,模型组大鼠于实验第 0,7,14,21,28,35,42 天糖水消耗率显著下降(P<0.01);与模型组比较,逍遥

散组明显升高于实验第 7,21,28,35,42 天糖水消耗率(P<0.05,P<0.01),氟西汀组明显升高只在实验第 28,35,42 天(P<0.05,P<0.01)。见表 6。

表 6 逍遥散对 CUMS 大鼠糖水消耗率影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 6 Effect of Xiaoyaosan on sucrose consumption ratios in CUMS rats ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	day0	day7	day14	day21	day28	day35	day42
正常	-	74.81±7.04	76.68±2.29	73.03±5.91	75.89±3.34	80.71±2.10	82.56±2.01	81.71±2.99
模型	-	71.05±2.29	64.01±3.67 <sup>1)</sup>	58.71±8.64 <sup>1)</sup>	53.95±7.77 <sup>1)</sup>	54.68±3.42 <sup>1)</sup>	53.49±6.19 <sup>1)</sup>	50.21±11.59 <sup>1)</sup>
氟西汀	0.2	74.03±2.13	68.49±4.89	64.14±6.33	58.76±7.54	67.09±12.97 <sup>2)</sup>	70.31±4.02 <sup>3)</sup>	75.05±4.65 <sup>3)</sup>
逍遥散	19.27	74.89±4.70	70.38±3.91 <sup>2)</sup>	64.78±6.77	63.41±6.39 <sup>2)</sup>	69.53±3.37 <sup>2)</sup>	73.92±6.38 <sup>3)</sup>	72.88±4.74 <sup>3)</sup>

3.5 对 CUMS 大鼠下丘脑弓状核 ob-R, JAK2, STAT3 mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠下丘脑弓状核 ob-R, JAK2, STAT3 mRNA 表达均明显升高(P<0.05);与模型组比较,各给药组明显降低大鼠 ob-R, JAK2, STAT3 mRNA 表达(P<0.05, P<0.01)。见表 7。

表 7 逍遥散对 CUMS 大鼠下丘脑弓状核 ob-R, JAK2 及 STAT3 mRNA 表达影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 7 Effect of Xiaoyaosan on mRNA expression of ob-R, JAK2 and STAT3 in hypothalamic arcuate nucleus of CUMS rats ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

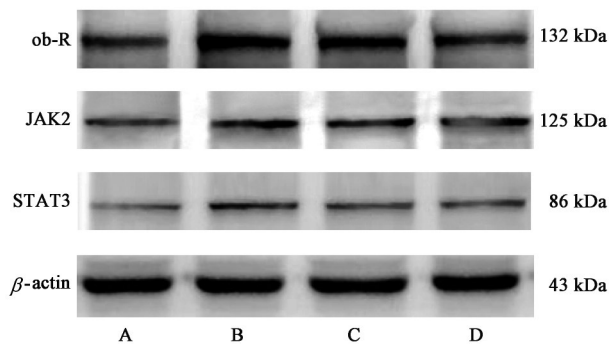
组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	ob-R	JAK2	STAT3
正常	-	1.00±0.18	1.00±0.14	1.04±0.19
模型	-	1.52±0.32 <sup>1)</sup>	1.42±0.39 <sup>1)</sup>	1.37±0.36 <sup>1)</sup>
氟西汀	0.2	1.18±0.25 <sup>2)</sup>	1.05±0.30 <sup>2)</sup>	1.06±0.20 <sup>3)</sup>
逍遥散	19.27	1.14±0.14 <sup>3)</sup>	1.03±0.2 <sup>2)</sup>	1.05±0.20 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.05;与模型组比较<sup>2)</sup>P<0.05,<sup>3)</sup>P<0.01。

3.6 对 CUMS 大鼠下丘脑弓状核 ob-R, JAK2, STAT3 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠下丘脑弓状核 ob-R, JAK2, STAT3 蛋白表达显著升高(P<0.01);与模型组比较,各用药组显著降低大鼠下丘脑弓状核 ob-R, JAK2, STAT3 蛋白表达(P<0.01)。见图 1,表 8。

#### 4 讨论

中医无“心理应激”一词,从其发病病因病机而言,应属于中医情志致病,从中医藏象具体功能特点,主要责之于肝,肝主疏泄是调节心理应激反应的核心<sup>[11-12]</sup>,起决定性作用。而肝失疏泄会导致气机郁滞,横逆犯脾从而出现脾胃运化失常,出现消瘦、食少、便溏等不良反应。逍遥散(《太平惠民和剂局方》)为调肝健脾经典方药,具有疏肝解郁,养血健脾之功,主要用于肝郁血虚脾弱证。方中柴胡调达肝郁,当归养血和血,白芍养血柔肝,白术、茯苓、甘草,健脾益气,薄荷疏散郁遏之气,煨姜辛散



A. 正常组; B. 模型组; C. 氟西汀组; D. 逍遥散组

图1 各组大鼠下丘脑弓状核 ob-R, JAK2, STAT3 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of ob-R, JAK2, STAT3 protein expression in hypothalamic arcuate nucleus

表8 逍遥散对 CUMS 大鼠下丘脑弓状核 ob-R, JAK2, STAT3 蛋白表达影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 8 Effect of Xiaoyaosan on expression of ob-R, JAK2 and STAT3 proteins in hypothalamus arcuate nucleus of CUMS rats ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	ob-R/ $\beta$ -actin	JAK2/ $\beta$ -actin	STAT3/ $\beta$ -actin
正常	-	0.119±0.007	0.140±0.014	0.055±0.009
模型	-	1.082±0.031 <sup>1)</sup>	0.369±0.010 <sup>1)</sup>	0.191±0.006 <sup>1)</sup>
氟西汀	0.2	0.769±0.001 <sup>2)</sup>	0.253±0.001 <sup>2)</sup>	0.108±0.005 <sup>2)</sup>
逍遥散	19.27	0.212±0.005 <sup>2)</sup>	0.232±0.015 <sup>2)</sup>	0.098±0.008 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>2)</sup>P<0.01。

达郁,诸药合用,使肝郁得舒,血虚得养,脾弱得复。逍遥散广泛应用于皮肤科、妇科、儿科等诸多疾病中,其中在治疗应激导致的头痛、高血压、抑郁症、失眠、帕金森等疾病方面具有良好的效果,为国内研究抗应激作用首选方药<sup>[1-3]</sup>;盐酸氟西汀是一种选择性5-羟色胺再摄取抑制剂,可以改善情感状态,为研究心理应激首选阳性对照药<sup>[13]</sup>。

本实验采用目前较为公认的不可预知温和刺激方法制备慢性心理应激动物模型。旷场行为学实验是目前较为常用的一种模型评价方法,其主要是通过观测大鼠在新奇环境中的自主行为来评价动物焦虑、抑郁状态的一种方法<sup>[9-10]</sup>;糖水偏好实验可以评价大鼠快感的缺失情况<sup>[14]</sup>。本实验结果显示,大鼠随慢性应激因素的施加出现了自主活动行为能力下降、糖水消耗率明显降低的趋势,说明模型大鼠出现了抑郁、焦虑、快感缺失等表现,同时大鼠体质量增长缓慢,摄食量减少,也说明模型大鼠出现了一定程度的能量代谢功能下降。氟西汀和逍遥散对大鼠旷场实验行为学、糖水消耗、体质量、摄食量均有一定的调节作用。

下丘脑是能量代谢调节的重要脑区,其中 ARC 在中枢食欲调节和能量平衡中起到关键作用<sup>[15-16]</sup>。leptin 是由机体脂肪组织细胞分泌的一种信号因子,具有抑制食欲、促进能量代谢的作用。leptin 的效应直接由 ob-R 介导<sup>[17]</sup>,其中 ob-Rb 是 leptin 信号传导功能的主要受体,负责瘦素的主要生物学作用,而 ob-Rb 在下丘脑 ARC 中广泛分布<sup>[18-19]</sup>。慢性应激状态下,来自外周的瘦素进入血液循环后,于第三脑室处通过血脑屏障,进入下丘脑弓状核,与其受体 ob-R 结合,ob-R 是 I 型细胞因子受体<sup>[20]</sup>,自身不具有酪氨酸激酶活性,其通过招募酪氨酸蛋白激酶家族 JAK2<sup>[21-22]</sup>,使 ob-R 上 Tyr-1138 位点磷酸化,活化 STAT3,促使 STAT3 发生磷酸化、二聚化转移入核,继而影响下游的食欲调控因子,发挥其调节食欲和能量代谢的中枢作用<sup>[23-26]</sup>。

本实验研究结果表明,模型大鼠出现体质量增长缓慢、食欲下降,下丘脑 ARC 的 ob-R, JAK2, STAT3 蛋白和 mRNA 表达明显升高,逍遥散则具有一定的调节作用。结合前期系列研究结果,慢性心理应激刺激大鼠外周血 leptin 水平明显升高<sup>[4-5, 27-28]</sup>,外周血中激增的 leptin 进入下丘脑 ARC 与 ob-R 结合,可能激活了 JAK2/STAT3 通路来调控下游食欲调控因子,逍遥散则有可能通过 leptin-ob-R/JAK2/STAT3 发挥调节食欲和能量代谢以抗应激效应,但具体机制仍需进一步深入探究。

#### [参考文献]

- [1] 秦雪梅,高晓霞.从逍遥散证与逍遥散抗应激研究看中医药现代化的思路[J].世界科学技术—中医药现代化,2010,12(4):521-525.
- [2] 马晓雪,裴媛.逍遥散治疗应激性疾病研究概述[J].环球中医药,2019,12(7):1129-1132.
- [3] GAO Y, ZHAO Y X, XU T, et al. Research progress on antidepressant therapeutic biomarkers of Xiaoyaosan[J]. World J Tradit Chin Med, 2020, 6(2): 171-179.
- [4] 王霞,王少贤,方朝义,等.慢性束缚应激大鼠下丘脑 ARC 中 Ob-R、AgRP 及 NPY 的表达及逍遥散的调节作用[J].中华中医药杂志,2018,33(7):2798-2802.
- [5] 旷湘楠,王少贤,方朝义,等.慢性束缚应激大鼠下丘脑弓状核 ob-R 与 CART 变化及逍遥散的调节作用[J].中华中医药杂志,2018,33(8):3317-3321.
- [6] WANG S X, CHEN J X, YUE G X, et al. Xiaoyaosan decoction regulates changes in neuropeptide y and leptin receptor in the rat arcuate nucleus after chronic immobilization stress [J]. Evid Based Complement

- Alternat Med, 2012, doi: 10. 1155/2012/381278.
- [ 7 ] 李晓娟. 肝郁脾虚证-逍遥散(方证)弓状核的全基因组DNA甲基化及其调控[D]. 北京:北京中医药大学, 2018.
- [ 8 ] DAI Y, LI Z, XUE L, et al. Metabolomics study on the anti-depression effect of xiaoyaosan on rat model of chronic unpredictable mild stress [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 128(2):482-489.
- [ 9 ] HU C, LUO Y, WANG H, et al. Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress[J]. PLoS One, 2017, 12(9):e0185129.
- [ 10 ] JIN S, ZHAO Y, JIANG Y, et al. Anxiety-like behaviour assessments of adolescent rats after repeated maternal separation during early life[J]. Neuroreport, 2018, 29(8):643-649.
- [ 11 ] 陈家旭, 杨维益. 神经-内分泌-免疫网络研究概况及其与中医肝脏关系的探讨[J]. 北京中医药大学学报, 1995, 18(4):7-11.
- [ 12 ] 于峥, 黄晓华, 滕静如, 等. 肝主疏泄畅情志的理论内涵及临床应用[J]. 中医杂志, 2013, 54(22):1914-1916.
- [ 13 ] 焦海燕. 抑郁症肝郁脾虚证大鼠海马TPH2与IDO1的变化及逍遥散的调节机制[D]. 北京:北京中医药大学, 2017.
- [ 14 ] FARON-GÓRECKA A, KUŚMIDER M, KOLASA M, et al. Chronic mild stress alters the somatostatin receptors in the rat brain [J]. Psychopharmacology (Berl), 2016, 233(2):255-266.
- [ 15 ] LENARD N R, BERTHOUD H R. Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: pathways and genes [J]. Obesity (Silver Spring), 2008, 16(Suppl 3):S11-S22.
- [ 16 ] KONTUREK P C, KONTUREK J W, CZESNIKIEWICZ-GUZIŁ M, et al. Neuro-hormonal control of food intake: basic mechanisms and clinical implications[J]. J Physiol Pharmacol, 2005, 56(Suppl 6):5-25.
- [ 17 ] HARLAN S M, MORGAN D A, AGASSANDIAN K, et al. Ablation of the leptin receptor in the hypothalamic arcuate nucleus abrogates leptin-induced sympathetic activation [J]. Circ Res, 2011, 108(7):808-812.
- [ 18 ] MORASH B A, IMRAN A, WILKINSON D, et al. Leptin receptors are developmentally regulated in rat pituitary and hypothalamus [J]. Mol Cell Endocrinol, 2003, 210(1/2):1-8.
- [ 19 ] COUTURIER C, SARKIS C, SERON K, et al. Silencing of OB-RGRP in mouse hypothalamic arcuate nucleus increases leptin receptor signaling and prevents diet-induced obesity [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(49):19476-19481.
- [ 20 ] GORSKA E, POPKO K, STELMASZCZYK-EMMEL A, et al. Leptin receptors [J]. Eur J Med Res, 2010, 15(S2):50-54.
- [ 21 ] BAUMANN H, MORELLA K K, WHITE D W, et al. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(16):8374-8378.
- [ 22 ] BJORBEBK C, UOTANI S, DA SILVA B, et al. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor [J]. J Biol Chem, 1997, 272(51):32686-32695.
- [ 23 ] JEQUIER E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance [J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 967:379-388.
- [ 24 ] SHPAKOV A O. The brain leptin signaling system and its functional state in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus [J]. Zh Evol Biokhim Fiziol, 2016, 52(2):161-176.
- [ 25 ] MEISTER B. Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus [J]. Vitam Horm, 2000, 59:265-304.
- [ 26 ] UDAGAWA J, HATTA T, NAORA H, et al. Expression of the long form of leptin receptor (Ob-Rb) mRNA in the brain of mouse embryos and newborn mice [J]. Brain Res, 2000, 868(2):251-258.
- [ 27 ] 王杰鹏. 慢性应激肝郁脾虚模型大鼠下丘脑外侧区Orexin A与Orexin receptor 1变化及逍遥散调节作用[D]. 石家庄:河北医科大学, 2017.
- [ 28 ] 王霞, 王少贤, 方朝义, 等. 慢性束缚应激大鼠下丘脑弓状核食欲调控因子的变化[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(3):473-478.

[责任编辑 周冰冰]