

柴胡加龙骨牡蛎汤对创伤后应激障碍的疗效及机制研究

高鹏飞¹, 杜玉玲^{1*}, 徐月妹¹, 渡边贤治²

(1. 复旦大学附属金山医院中医科, 上海 201508;

2. 日本庆应义塾大学医学部汉方医学中心, 日本东京 160-8582)

[摘要] **目的:**柴胡加龙骨牡蛎汤(TJ-12)对创伤后应激障碍的疗效及机制。**方法:**应用 ICR 小鼠与 EL 小鼠建立社会失败应激模型, 随机分为 5 组, 即模型组及正常对照组、模型 + 柴胡加龙骨牡蛎汤高、中、低剂量组(1, 0.5, 0.1 g·kg⁻¹), ig 给药, 每天 1 次, 连续给药 4 周。观察条件性恐惧行为, 同时用实时 RT-PCR 法测小鼠海马糖皮质激素受体(GR)及脑神经源性营养因子(BDNF)的基因表达。**结果:**与正常对照组比较, 模型组小鼠出现“僵直”时间百分比延长、海马基因 GR 与 BDNF 表达增加, 有非常显著性差异。与模型组比较, TJ-12 治疗组不仅可以缩短“僵直”时间百分比, 且能降低海马 BDNF 基因的表达, 有显著性差异。**结论:**TJ-12 有效治疗创伤后应激障碍可能与调节海马 BDNF 基因相关。

[关键词] 柴胡加龙骨牡蛎汤; 创伤后应激障碍; 糖皮质激素受体; 脑神经源性营养因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0219-04

[doi] 10.11653/syfy2013120219

Efficacy and Mechanism of Chaihu Jia Longgu Muli Tang on Posttraumatic Stress Disorder

GAO Peng-fei¹, DU Yu-ling^{1*}, XU Yue-mei¹, Kenji Watanabe²

(1. Jinshan Hospital of Fudan University, Shanghai 201508, China;

2. Center for Kampo Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo 160-8582, Japan)

[Abstract] **Objective:** To investigate the efficacy and the mechanism of Chaihu Jia Longgu Muli Tang (TJ-12) on posttraumatic stress disorder. **Method:** ICR mice and EL mice were used to establish the social defeat stress (SS) model. The animals were divided into five groups: TJ-12 high, middle, low dose groups (orally given for 4 weeks, 1, 0.5, 0.1 g·kg⁻¹·d⁻¹), SS group and control group. Contextual fear conditioning test (CFC) was evaluated, and mRNA expression of glucocorticoid receptor (GR) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the hippocampus of the animals were measured by real time RT-PCR. **Result:** In SS group the freezing percent scores of CFC test were increased and the mRNA expression level of GR and BDNF in hippocampus of SS mice was also significantly higher than the controls; Compared with the SS group, freezing percent of CFC test and mRNA expression of BDNF in hippocampus were decreased in TJ-12 high, middle, low dose groups. **Conclusion:** TJ-12 may be effective for treating the posttraumatic stress disorder by altering the gene expression of BDNF in hippocampus.

[Key words] Chaihu Jia Longgu Muli Tang; posttraumatic stress disorder; GR; BDNF

当代人们学习工作中面临社会应激因素增多, 应激对神经^[1]、内分泌^[2]及免疫^[3]都有影响。突发

[收稿日期] 20121125(003)

[基金项目] 复旦大学校青年基金 A 类 (11L-5)

[第一作者] 高鹏飞, 博士, 主治医师, 从事应激的中医药治疗研究, Tel: 021-57039600, E-mail: pengfeigaoliver@hotmail.com

[通讯作者] * 杜玉玲, 主任医师, 从事中医心脑血管病研究, Tel: 021-57039600, E-mail: duyuling988@hotmail.com

的社会应激引起的典型精神障碍就是创伤后应激障碍 (PTSD)。这类患者精神症状表现为:持续性的重新体验创伤;持续性的回避与整体情感反应淡然木然;持续性的警觉性增高^[4-6];与健康人群不同, PTSD 患者存在下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA-axis) 过度抑制现象。目前 PTSD 治疗主要是心理治疗结合药物治疗。药物治疗如三环类抗抑郁药等西药, 存在价格昂贵、副反应大, 不符合我国国情。寻求中医药治疗 PTSD 的有效方剂是当务之急。柴胡类方在改善躯体症状、抑郁、烦躁易怒等主要精神症状有较好的疗效^[7-8], 但是对 PTSD 的研究报道很少。本研究以小鼠的社会失败应激建立 PTSD 模型, 来研究柴胡加龙骨牡蛎汤对 PTSD 的疗效及作用机制。

1 材料

1.1 动物 本研究使用 6 周龄 ICR 小鼠为实验对象, 选用 EL 小鼠作为攻击小鼠。购于日本 CLEA 公司, 小鼠分别养在高 × 长 × 宽 (10 cm × 14 cm × 8 cm) 的小笼里, 自由饮水与摄食。动物房室温保持在 (21 ± 1) °C。动物房照明从早晨 7 点到晚上 7 点。小鼠提前一周购入, 常规饲养。本研究所有的动物实验根据美国国立健康卫生书指导且获得日本庆应义塾大学医学部动物伦理委员会的认可。

1.2 药品 柴胡加龙骨牡蛎汤 (代名为 TJ-12) 是由日本津村药业生产的复方颗粒剂, 组成药物为柴胡 5 g, 姜半夏 4 g, 桂皮 3 g, 茯苓 3 g, 黄芩 2.5 g, 大枣 2.5 g, 人参 2.5 g, 牡蛎 2.5 g, 龙骨 2.5 g, 生姜 1 g。TJ-12 颗粒剂以注射用水稀释, 给药质量浓度为 1.0 g·mL⁻¹, 低温保存备用。

1.3 仪器 条件性恐惧测试仪 (USA, Med Associates Inc.), iCycler iQTM Real-Time PCR 测试仪 (Japan, Bio-Rad)。

2 方法

2.1 分组与给药 取 ICR 雄小鼠 60 只, 按体重随机共分 5 组, 每组 12 只, 即正常对照组, 实验模型组, 柴胡加龙骨牡蛎汤高、中、低剂量组 1, 0.5, 0.1 g·kg⁻¹ 剂量组 (高剂量组相当于成年人 60 kg 体重剂量的 20 倍), 每日 1 次, 连续给药 4 周。实验模型组给予 0.5 mL 的生理盐水。

2.2 建立社会失败应激模型 从实验第 1 天开始起, 把 EL 小鼠放入 ICR 小鼠笼内攻击 ICR 小鼠 1 h, 1 h 后小鼠笼中间用玻璃板将 ICR 小鼠与 EL 小鼠隔开饲养。每天 1 次, 连续 4 周。

2.3 条件性恐惧实验 在应激实验结束后次日开始, 分 2 d 进行, 设计步骤如下: 第 1 天将小鼠编号

依次放在恐惧测试仪系统里, 小鼠在 3 min 内间断经历 2 次持续 3 s 的噪音, 其脚部同时遭受电击, 然后取出小鼠, 每只实验小鼠测试 1 次。24 h 后再按第 1 天顺序依次将每只小鼠放在条件性恐惧测试仪里, 小鼠在 3 min 内间断经历 3 次持续 3 s 的噪音而无电击, 观察小鼠在听到噪音时的“僵直”行为 (freezing behavior), 记录小鼠僵直行为时间占全部测试时间 (3 min) 的百分比, 来比较各组小鼠恐惧水平情况。

2.4 实时 RT-PCR 法测海马基因 GR 与 BDNF 的相对表达 小鼠恐惧行为测试后第 2 天, 解剖各组小鼠, 脑中取出海马, 立即放在液氮里冷却, 储存在零下 80 °C 冰箱里待检。采用实时 RT-PCR 法测海马基因 GR 与 BDNF, 具体步骤: 先用试剂盒 (Cat. 74104, Qiagen, Tokyo, Japan) 从海马中抽取总 RNA; 再运用逆转录试剂盒 (Cat. A3800, Promega, Madison, WI, USA). 将 RNA 转录成 cDNA, 具体设计步骤为: 反应混合物在 25 °C 孵化 5 min, 42 °C 孵化 60 min, 70 °C 孵化 10 min。最后用实时荧光 PCR 试剂盒 QuantiFast[®] SYBR Green RT-PCR kit[®] (Qiagen K. K. USA) 将所有 cDNA 产品根据实验步骤放在 iCycler iQTM Real-Time PCR 探测系统进行目的基因 PCR 扩增。其中所用引物核苷酸序列如下: GR-F (5'-3'), AAGCCGTTTCACTGTCCATGG, GR-R (5'-3'), GAAAGTCTGTTTCCCCAGAGG; BDNF-F (5'-3'), CATACTTCGTTGCATGAAG, BDNF-R (5'-3'), ATTCACGCTCTCCAGAGTC; GAPDH-F (5'-3'), AGGAAGCTCACTGGCATGG, GAPDH-R (5'-3'), CCTGCTTACCACCTTCTT。PCR 反应具体设计步骤为: 循环参数设计在 95 °C 初始化 5 min, 然后在 95 °C 下 10 s 为周期进行连续 40 个循环的变性、延伸、扩增, 最后在 60 °C 退火 30 s, 扩增后将样品放在 55 °C 温育 1 min, 并将温度逐渐每 10 s 上升 0.5 °C, 根据其溶解曲线, 以 GAPDH 基因作参照基因, 用 2^{-ΔΔC_t} 法^[9] 测 GR 与 BDNF 基因的相对表达。

2.5 统计学处理 实验结果均采用 $\bar{x} \pm s$, 用 SPSS 10.0 软件进行统计分析。所有数据分析使用单因素方差分析, 两组间比较采用 Unpaired 检验, 3 组间比较使用 Fisher 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 条件性恐惧实验 与正常组比较, 实验模型组的僵直百分比升高, 有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。TJ-12 各组 1, 0.5, 0.1 g·kg⁻¹ 剂量均能明显降低小鼠的僵直比, 与实验模型组比较差异显著 ($P <$

0.01)。见表1。

表1 柴胡加龙骨牡蛎汤对小鼠条件性恐惧实验僵直时间比的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	僵直时间比/%
正常对照	-	8.13 ± 2.42
模型	-	23.86 ± 4.82 ¹⁾
柴胡加龙骨牡蛎汤	1.0	8.29 ± 2.94 ²⁾
	0.5	8.47 ± 2.67 ²⁾
	0.1	9.50 ± 3.02 ²⁾

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 实时荧光 RT-PCR 测量海马 GR 与 BDNF 的相对基因表达 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为参照基因,用实时荧光 RT-PCR 测量了海马 GR 与 BDNF 的相对表达水平。与对照组比较,模型组的 GR 与 BDNF 基因表达增加,有显著性差异($P < 0.01$),治疗4周后,与模型组比较,TJ-12 各组 1, 0.5, 0.1 $g \cdot kg^{-1}$ 剂量 BDNF 基因表达明显降低,有显著性差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),而 GR 表达无统计学差异。见表2。

表2 柴胡加龙骨牡蛎汤对小鼠海马基因 GR 与 BDNF 相对表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	基因相对表达 $2^{-\Delta\Delta Ct}$	
		GR	BDNF
正常对照	-	0.83 ± 0.15	0.94 ± 0.11
模型	-	1.21 ± 0.12 ¹⁾	1.52 ± 0.30 ¹⁾
柴胡加龙骨牡蛎汤	1.0	1.14 ± 0.29	1.15 ± 0.12 ²⁾
	0.5	1.15 ± 0.26	1.17 ± 0.09 ²⁾
	0.1	1.17 ± 0.22	1.19 ± 0.11 ³⁾

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

本研究以社会失败应激建立小鼠 PTSD 模型,观察了柴胡加龙骨牡蛎汤的疗效及作用机制,证实 TJ-12 不同剂量 1, 0.5, 0.1 $g \cdot kg^{-1}$ 不仅可以降低条件性恐惧测试的“僵直”时间百分比,且能降低海马中基因 BDNF 的表达。显示其抗 PTSD 作用。

本研究根据 EL 小鼠好斗的特性,与实验对象 ICR 小鼠放在同一小鼠笼打斗 1 h,因 ICR 小鼠总是失败于 EL 小鼠,形成肉体痛苦记忆,然后鼠笼中间放置透明玻璃板隔开,其余 23 h 隔板相望,继续形成 EL 小鼠对 ICR 小鼠的精神上恐吓。这样连续 4 周持续社会失败应激建立了创伤后应激模型,预实验研究显示该模型 ICR 小鼠僵直时间百分比升高具有可重复性,认为是研究创伤后应激障碍较理想的模型。僵直时间百分比升高可能是恐惧反应过度亢进引起。而海马是参与环境调控条件性恐惧的重

要脑区^[10]。海马的 GR 参与下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA-axis)的负反馈调节^[11]。本研究海马的 GR 基因表达增加说明社会失败应激引起 HPA 轴的过度抑制引起。总之,本研究社会失败应激模型组僵直时间百分比上升和海马 GR 基因表达增加与现存的 PTSD 模型的特征一致^[12-13],说明本研究的社会失败应激小鼠是出现类似创伤后应激障碍疾患的典型特征。

脑源性神经营养因子(BDNF)是调控海马突触可塑性和记忆所必不可少的。已建立条件性恐惧的大鼠海马区注射 BDNF 反义寡核苷酸阻断 BDNF 表达后,其对条件性恐惧反应减弱,说明 BDNF 是影响恐惧记忆的一个关键因子^[14]。而本研究社会失败应激组 BDNF 基因表达却增加,可能与小鼠对条件性恐惧应激反应亢进有关,BDNF 升高的具体机制有待进一步解明。由此可见,BDNF 的异常表达影响了脑对恐惧记忆的反应。

针对 PTSD 的药物治疗,常用抗抑郁症药物,如临床常用阻断脑内去甲肾上腺素(SNRI,如文拉法辛胶囊)及 5-羟色胺再摄取(SSRI,如马来酸氟伏沙明片)等,药效不能持续保持,只有通过不断的服药才能控制症状,且价格贵、存在胃肠道及代谢不良反应等,不符合我国国情。经方柴胡加龙骨牡蛎汤出自《伤寒论》,本研究以条件性恐惧实验发现含有镇静安神的“龙骨”“牡蛎”两药的 TJ-12 各剂量组可有效降低小鼠条件性恐惧水平,其机制可能通过改善海马 BDNF 基因表达相关,本研究为柴胡加龙骨牡蛎汤临床治疗 PTSD 提供实验证据,其抗 PTSD 的具体机制有待更深入研究。

[参考文献]

- [1] Sheline Y I, Wang P W, Gado M H, et al. Hippocampal atrophy in recurrent major depression[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(9): 3908.
- [2] Avitsur R, Stark J L, Sheridan J F. Social stress induces glucocorticoid resistance in subordinate animals [J]. Horm Behav, 2001, 39(4): 247.
- [3] Merlot E, Moze E, Dantzer R, et al. Importance of fighting in the immune effects of social defeat [J]. Physiol Behav, 2003, 80(2/3): 351.
- [4] Orr S P, Metzger L J, Lasko N B, et al. Physiologic responses to sudden, loud tones in monozygotic twins discordant for combat exposure: association with posttraumatic stress disorder[J]. Arch Gen Psychiatry, 2003, 60(3): 283.

附子理中汤对脾阳虚大鼠 AQP4 的影响及其止泻机制

唐汉庆¹, 韦祎^{2*}, 李晓华¹, 劳传君¹

(1. 右江民族医学院, 广西 百色 533000; 2. 海南医学院, 海口 571199)

[摘要] 目的: 观察附子理中汤对脾阳虚大鼠水通道蛋白 4 (AQP4) 的影响, 探讨附子理中汤止泻作用的机制。方法: Wistar 大鼠 100 只随机分为对照组、模型组、附子理中汤低、中、高剂量组 5 组, 每组 20 只。在模型组基础上, 低剂量组按 10 g·kg⁻¹ ig, 中剂量组按 20 g·kg⁻¹ ig, 高剂量组按 40 g·kg⁻¹ ig, 每天 1 次, 连续 4 周。取结肠标本, 酶联免疫法 (ELISA) 法检测 AQP4 含量, RT-PCR 法检测 AQP4 mRNA 表达。结果: 和对照组比较, 模型组的 AQP4 含量 (13.25 ± 4.22) ng·L⁻¹。AQP4 mRNA 相对表达量 (0.38 ± 0.11) 均降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。和模型组比较, 附子理中汤中剂量组的 AQP4 含量 (23.84 ± 5.68) ng·L⁻¹, AQP4 mRNA 相对表达量 (0.54 ± 0.26) 均升高 ($P < 0.05$)。和模型组比较, 高剂量组的 AQP4 含量 (28.98 ± 6.12) ng·L⁻¹, AQP4 mRNA 相对表达量 (0.62 ± 0.32) 均显著升高 ($P < 0.01$)。结论: 附子理中汤能恢复脾阳虚大鼠 AQP4 含量和 AQP4 mRNA 正常表达, 以高剂量的恢复作用较明显, 附子理中汤可能通过上调 AQP4 表达, 促进胃肠道黏膜对水液的重吸收而起到止泻的作用。

[关键词] 附子理中汤; 脾阳虚证; 水通道蛋白 4

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0222-04

[doi] 10.11653/syjf2013120222

Effect of Fuzi Lizhong Decoction on AQP4 in Rats with Spleen Yang Deficiency Syndrome and its Antidiarrheal Mechanism

TANG Han-qing¹, WEI Yi^{2*}, LI Xiao-hua¹, LAO Chuan-jun¹

(1. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China;

[收稿日期] 20130113(010)

[第一作者] 唐汉庆, 从事中西医结合基础研究, E-mail: iloveyouverymuch0000@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 韦祎, 从事中西医结合临床研究, E-mail: sue0900cn@163.com

- [5] Pitman R K, Orr S P, Shalev A Y, et al. Psychophysiological alterations in post-traumatic stress disorder [J]. *Semin Clin Neuropsychiatry*, 1999, 4 (4):234.
- [6] Pitman R K, van der Kolk B A, Orr S P, et al. Naloxone-reversible analgesic response to combat-related stimuli in posttraumatic stress disorder[J]. *Apilot Study Arch Gen Psychiatry*, 1990, 47(6):541.
- [7] 胡燕, 洪敏. 柴胡类方治疗抑郁症研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(17): 247.
- [8] 原红霞, 韦彩柳, 程遥. 小柴胡汤抗抑郁作用研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(15): 190.
- [9] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta Ct} method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402.
- [10] Fanselow M S. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus [J]. *Behavioural Brain Research*, 2000, 110(1/2):73.
- [11] Feldman S, Weidenfeld J. Glucocorticoid receptor antagonists in the hippocampus modify the negative feedback following neural stimuli[J]. *Brain Res*, 1999, 821(1):33.
- [12] 貝谷久宣, 安田新, 土田英人. SSRI/SNRIにおける不安障害でのエビデンス[J]. *精神科*, 2002, 1 (2):140.
- [13] Dna B F, Matthew J F, Terence M K. PTSD 治療ガイドラインエビデンスに基づいた治療戦略[M]. 金剛出版, 2005:84.
- [14] Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, et al. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage[J]. *PNAS*, 2008, 105(7): 2711.

[责任编辑 聂淑琴]