

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110524. 1327. 002

经前舒颗粒对经前期综合征肝气郁证 大鼠海马和下丘脑 5-羟色胺转运体表达的影响

冯玉, 张惠云*, 耿燕楠
(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] **目的:**研究经前舒颗粒对经前期综合征(PMS)肝气郁证大鼠海马、下丘脑 5-羟色胺转运体(5-HTT)表达的影响,从分子水平探讨经前舒颗粒的作用机制。**方法:**雌性 SD 大鼠随机分为正常对照组、肝郁模型组、经前舒颗粒给药组(10 g·kg⁻¹)和氟西汀给药组(0.002 5 g·kg⁻¹),束缚造模法复制 PMS 肝气郁证大鼠模型,给药组大鼠 ig 给药 5 d 后,旷场实验、糖水偏好实验对模型进行评价,采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫印迹(Western blot)技术分别检测大鼠海马和下丘脑 5-HTT 的 mRNA 及蛋白的表达。**结果:**与肝郁模型组相比经前舒和氟西汀给药组大鼠糖水偏好指数及旷场实验得分均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);经前舒和氟西汀给药均能显著上调海马和下丘脑中 5-HTT 的 mRNA 和蛋白的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$),两给药组间无显著性差异。**结论:**经前舒颗粒的作用机制可能是通过调节海马、下丘脑中 5-HTT 的表达而发挥作用。

[关键词] 经前期综合征肝气郁证;5-羟色胺转运体;经前舒颗粒

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0132-04

Effects of Jingqianshu Granule on Expression of 5-Serotonin Transporter of Premenstrual Syndrome Model Rats with Liver-qi Stagnation

FENG Yu, ZHANG Hui-yun*, GENG Yan-nan
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To research the effects of Jingqianshu granule (JQSG) on the expression of serotonin transporter(5-HTT) of premenstrual syndrome (PMS) model rats with liver-qi stagnation in different brain regions and the mechanism at molecular level. **Method:** SPF female SD rats were randomly divided into normal control group, model group, JQSG group(10 g·kg⁻¹) and fluoxetine group (0.002 5 g·kg⁻¹). The PMS model rats with liver-qi stagnation were induced by bonding the limbs. Drugs were given for 5 days, and the effects were evaluated by open-field test and sucrose preference test. We analyzed the expression of 5-HTT in hippocampus and hypothalamus by the method of RT-PCR and Western blot. **Result:** Compared with the model group, the score of open-field and saccharine preference index of JQSG and fluoxetine group were markedly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The treatment could improve the expression of 5-HTT in hippocampus and hypothalamus ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and the two treated groups showed no significant difference. **Conclusion:** JQSG can regulate the 5-HTT

[收稿日期] 20110126(004)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)课题(2011CB505102);国家自然科学基金重点项目(30930110)

[第一作者] 冯玉,讲师,博士学位,从事调肝方药中药药理及情志病证动物模型研究, Tel:0531-89628171, E-mail:fyshangong@163.com

[通讯作者] *张惠云,教授,博士生导师,从事调肝方药中药药理及情志病证动物模型研究, Tel: 0531-89628596, E-mail:zhhuiyun@163.com

[网络出版时间] 2011-05-24 13:27

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110524.1327.002.html>

expression level in hippocampus and hypothalamus in model rats, which may be one of the mechanisms responsible for treating PMS with liver-qi stagnation.

[**Key words**] premenstrual syndrome with liver-qi stagnation; 5-serotonin transporter; Jiangqianshu granule

经前抑郁是经前期综合征(PMS)肝气郁证的主证,一般认为与脑内单胺类神经递质的功能失衡有关^[1]。研究表明中枢神经系统内5-羟色胺(5-HT)能神经功能系统发生紊乱可能导致一系列不良情绪如:焦虑、抑郁、恐惧等。5-羟色胺转运体(5-HTT)是5-HT能神经末梢的一种膜蛋白,能和突触间隙中5-HT结合,将其转运至神经元的轴突末端,因此决定了突触后受体介导信号的强度和作用持续时间,成为反映5-HT能神经元功能活动的重要指标,也是5-HT能神经末梢多寡的间接反映^[2],其表达变化直接影响5-HT参与的神经活动。经前舒颗粒是治疗PMS肝气郁证的中药制剂,临床疗效显著,为进一步研究其作用机制,本实验研究了其对PMS肝气郁证模型大鼠海马和下丘脑5-羟色胺转运体mRNA及蛋白表达的影响。

1 材料

1.1 药物 经前舒颗粒:秦皇岛市山海关制药厂生产,批号Z20083087。盐酸氟西汀胶囊;礼来苏州制药有限公司生产,批号J20080016。

1.2 动物 SPF级健康SD雌性大鼠,体重180~220 g。由山东中医药大学实验动物中心提供,生产许可证号SCXK(鲁)20050015。

1.3 试剂 5-HTT一抗(Millipore, AB1594P);驴抗兔二抗(abcam, ab16284);预染蛋白标准(Thermo Fisher Scientific);蛋白酶抑制剂(Sigma, P8340);超敏化学发光试剂盒(碧云天生物技术研究);硝酸纤维素膜(美国PALL公司);RT-PCR所需引物由济南博亚生物工程技术有限公司合成,总RNA提取试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司);RT反转录试剂盒(济南朋远生物工程技术有限公司)。

1.4 仪器 电泳仪、转印仪(美国伯乐公司);台式高速冷冻离心机(上海生美生化仪器设备工程有限公司);FR-980凝胶成像分析仪(上海复日科技有限公司);PCR扩增仪(TAKARA);电泳仪:DYY-III 2稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 造模与给药 大鼠按阴道涂片镜检法观察大

鼠各期细胞形态及数量,确定动情周期,选取处于动情后期的大鼠纳入实验,随机分为正常对照组、肝郁模型组、经前舒给药组、氟西汀给药组各16只。参照文献方法束缚造模^[3],将拟造模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,同时造模笼中放入自由活动大鼠以增强致郁效应。经前舒组大鼠造模同时每日ig经前舒颗粒($10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,相当于人临床8倍剂量),氟西汀组大鼠给药剂量为 $0.0025\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,给药体积均为 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,1次/d,连续给药5 d,其他各组大鼠给予相同体积的灭菌饮用水。造模后采用旷场实验方法^[4]、糖水偏好实验^[5]对各组大鼠进行行为学评价,其后将各组大鼠称重,断头取脑,于冰上迅速剥离海马和下丘脑,分别放入1.5 mL离心管,置于液氮中迅速冷冻后保存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

2.2 旷场实验 旷场实验箱 $100\text{ cm}\times 100\text{ cm}\times 50\text{ cm}$,周壁底面为黑色,底面用白线划分为面积相等的25块方格。操作者握住大鼠尾根部1/3处,小心放入旷场正中格,用摄像系统记录动物3 min的行为变化。①水平得分:动物穿越底面方块数为水平活动得分(四爪均进入的方格方可计数,为水平运动得分);②垂直得分:直立次数为垂直活动得分(两前爪腾空或攀附墙壁,为垂直运动得分)。旷场实验总分=①+②。每只动物造模结束后进行1次测定,3 min/次,比较各组得分差异。行为评定采用盲法,3位观察者观看录像评分,3人一致性很高(Kappa值 >0.95)。

2.3 糖水偏好实验 糖水偏好实验前训练大鼠适应含糖饮水,每笼均同时放置2个水瓶,2瓶均为0.8%的蔗糖水。实验时每笼1只大鼠,放置2个瓶子,1个瓶装0.8%蔗糖水,1个瓶装纯水,大鼠可在2瓶之间自由选择,为避免大鼠喜好饮一侧水,实验期间12 h变换1次2水瓶的位置进行平衡,通过测量瓶子质量测得大鼠24 h纯水和糖水消耗,糖水偏好指数=糖水摄入量/总液体消耗量 $\times 100\%$ 。

2.4 RT-PCR分析5-HTT mRNA的表达 5-HTT引物序列:5'-TTA GCA TCT GGA AAG GCG TCA -3', 5'-CTT GTC ATG CAG TTC ACC AC -3',产物长度

313 bp;用 β -actin 作为内参(序列:F 5'-AGG GAA ATC GTG CGT GAC -3',R 5'-CAA AGA AAG GGT GTA AAA CG-3'),产物长度 552 bp。取出海马下丘脑组织,冰浴下操作,采用 Trizol 法抽提总 RNA,紫外分光光度法检测 RNA 浓度,将 mRNA 反转录成 cDNA。所得样品进行 PCR 扩增。5-HTT PCR 扩增条件为:95 °C,3 min,预变性;94 °C,30 s,变性;57.8 °C,45 s,退火;72 °C,1 min,延伸;72 °C,7 min,再延伸;最佳循环数为 35。取 PCR 扩增产物于 100 V 下在 2% 琼脂糖凝胶上电泳,应用 Smartview 生物电泳图像分析系统进行吸光度扫描,检测指标的相对含量(吸光度比值) = 目的基因的吸光度/ β -actin 的吸光度,计算出 5-HTT mRNA 的相对含量值。

2.5 Western blot 分析 5-HTT 蛋白的表达 取出海马、下丘脑组织,冰浴中操作,按 1:5 的比例加入提前预冷的 Rippa 裂解液,匀浆器匀浆 30 min,4 °C 下 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清,采用考马斯亮蓝法测定蛋白含量,其他加入 5 × SDS 上样缓冲液至终浓度为 1 ×,置于沸水中煮 5 min 使蛋白变性。以 50 μg/泳道上样,经 SDS-PAGE 电泳分离后,湿法转移至 NC 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液室温封闭 1 h,分别与 5-HTT(anti-5-HTT 1:200,5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液稀释)和 β -actin(1:2 000)的抗体室温摇床孵育 2 h,再与辣根氧化酶标记的相应二抗室温孵育 1 h,ECL 化学发光试剂检测杂交信号,显影于 X 光片上,用凝胶成像分析仪在可见光透射下对 X 光片进行扫描和图像分析,吸光度比值分析与 5-HTT mRNA 方法相同。

2.6 数据统计处理 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析及 LSD 法检验以统计数据, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 旷场得分和糖水偏好指数 与正常对照组大鼠相比,肝郁模型组大鼠造模后旷场实验得分、糖水偏好指数均显著减少 ($P < 0.01$, $P < 0.05$);与肝郁模型组相比,两给药组大鼠旷场实验各得分、糖水偏好指数均明显提高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),见表 1,2。

3.2 RT-PCR 检测 结果表明肝郁模型组海马和下丘脑中 5-HTT mRNA 表达较相应的正常对照组显著降低 ($P < 0.05$);两给药组较模型组表达明显升高 ($P < 0.05$),两给药组间无显著性差异(表 3)。

3.3 Western blot 检测 结果表明 PMS 肝气郁证大

表 1 各组大鼠旷场实验得分比较 ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	水平得分	垂直得分	旷场实验得分
正常对照	-	79.65 ± 10.12 ²⁾	27.68 ± 6.32 ²⁾	107.23 ± 14.61 ²⁾
肝郁模型	-	29.57 ± 9.32	9.99 ± 3.88	39.53 ± 9.71
经前舒	10	59.61 ± 7.34 ²⁾	16.67 ± 4.31 ¹⁾	76.28 ± 11.02 ²⁾
氟西汀	0.002 5	59.43 ± 10.81 ²⁾	15.86 ± 2.96 ¹⁾	75.86 ± 12.71 ²⁾

注:与肝郁模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

表 2 各组大鼠糖水偏好指数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	造模前	造模后
正常对照	-	0.943 ± 0.044 7	0.973 ± 0.015 1 ¹⁾
肝郁模型	-	0.971 ± 0.002	0.863 ± 0.029 2
经前舒	10	0.926 ± 0.158 1	0.931 ± 0.048 7 ¹⁾
氟西汀	0.002 5	0.935 ± 0.052 4	0.942 ± 0.025 1 ¹⁾

表 3 海马和下丘脑中 5-HTT PCR 扩增产物的
相对光密度 ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	剂量/ g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	5-HTT/ β -actin	
		海马	下丘脑
正常对照	-	0.268 ± 0.033 ¹⁾	0.222 ± 0.010 ¹⁾
肝郁模型	-	0.230 ± 0.032	0.195 ± 0.011
经前舒	10	0.265 ± 0.034 ¹⁾	0.207 ± 0.009 ¹⁾
氟西汀	0.0025	0.266 ± 0.032 ¹⁾	0.213 ± 0.010 ¹⁾

鼠海马和下丘脑中 5-HTT 均有表达。与正常对照组大鼠相比,模型组大鼠海马和下丘脑中 5-HTT 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$),两给药组海马和下丘脑脑区中 5-HTT 蛋白表达水平均显著高于肝郁模型组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)(表 4)。

表 4 海马和下丘脑中 5-HTT 蛋白的表达 (A) ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	5-HTT/ β -actin	
		海马	下丘脑
正常对照	-	0.458 ± 0.017 4 ²⁾	0.343 ± 0.019 3 ²⁾
肝郁模型	-	0.424 ± 0.016 9	0.310 ± 0.014 6
经前舒	10	0.447 ± 0.013 8 ²⁾	0.332 ± 0.022 0 ¹⁾
氟西汀	0.002 5	0.453 ± 0.015 3 ²⁾	0.342 ± 0.016 2 ²⁾

4 讨论

5-羟色胺转运体在神经心理正常功能维持及疾病的发生和发展中起重要作用,有研究表明,5-HTT 基因敲除小鼠的 5-HT 再摄取减少,而且对抗精神药物不敏感^[6];在强迫症、抑郁症等病人脑内均发现 5-HTT 结合位点的减少^[7];5-HTT 是许多抗抑郁

药物的作用靶点,如氟西汀、帕罗西汀等均结合到5-HTT上,通过抑制5-HT的再摄取过程来发挥其药理作用^[8]。如上所述,5-HTT基因与抑郁等情感障碍密切相关,PMS肝气郁证情志主证为情绪抑郁,因此推断PMS肝气郁证可能与5-HTT功能异常有关。

本实验通过束缚造模法复制PMS肝气郁证动物模型,通过旷场实验、糖水偏好实验评价的结果,可初步判断此模型的制备是成功的;RT-PCR,Western blot结果显示,PMS肝气郁证模型组大鼠海马和下丘脑脑区5-HTT mRNA和蛋白表达均显著降低,这与目前大多数关于抑郁症的研究结果相一致,鉴于抑郁症与PMS肝气郁证均以抑郁为情志主证,两者可能具有类似的中枢微观机制。经前舒颗粒由白芍(炒),当归,柴胡,白术(炒),丹皮,香附等配伍而成,本处方的组成与目前中药药理学的最新研究成果是一致的,目前研究表明白芍有抗炎、免疫调节等作用^[9];当归有较强的镇静作用^[10];柴胡主要活性成分柴胡皂苷,具有镇静、抗炎、提高中枢神经兴奋性作用^[11]。白术有免疫调节作用,对植物神经系统有双向调节作用^[12]。丹皮主要成分是丹皮酚,具有明显的抗焦虑作用^[13]。香附主要药效成分为萜类挥发油,具有类似雌激素的作用^[14]。结合本实验结果,经前舒颗粒能显著提高PMS肝气郁证大鼠的行为学得分、糖水消耗量,表明该药能改善大鼠因束缚刺激造成的行为学改变,具有良好的抗抑郁样作用,疗效与氟西汀相当;经前舒颗粒能显著缓解束缚刺激导致的正常大鼠海马与下丘脑5-HTT mRNA和蛋白表达水平的下降,据此可以初步推测经前舒颗粒中的某些有效成分或其代谢成分可能透过血脑屏障进入脑脊液,通过调节5-HTT的表达,从而发挥其抗抑郁作用,但具体的信号通路还需要后期工作进一步证实。

[参考文献]

[1] 张惠云,乔明琦,孙丽. 肝气郁证模型大鼠下丘脑单胺

类神经递质分析[J]. 中医杂志,2008,49(2):150.

- [2] Nielsen K, Brask D, Knudsen G M, et al. Immunodetection of the serotonin transporter protein is more valid marker for serotonergic fibers than serotonin [J]. Synapse,2006,59(5):270.
- [3] 乔明琦,张惠云,陈雨振,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.
- [4] 刘晓伟,张红梅,曲宏达,等.“怒伤气”大鼠行为观察与检测[J]. 江苏中医药,2005,26(3):53.
- [5] Rafal Rygula, Nashat Abumaria, Gabriele Flügge, et al. Anhedonia and motivational deficits in rats; impact of chronic social stress [J]. Behav Brain Res, 2005, (162):127.
- [6] Anne Ravary, Aude Muzerelle, Michele Darmon, et al. Abnormal trafficking and subcellular localization of an N-terminally truncated serotonin transporter protein [J]. Eur J Neurosci, 2001,13(7), 1349.
- [7] Stengler-Wenzke K, Müller U, Angermeyer M C, et al. Reduced serotonin transporter-availability in obsessive-compulsive disorder (OCD) [J]. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci,2004,254(4):252.
- [8] Owens M J, Nemeroff C B. Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter [J]. Clin Chem,1994,40(2):288.
- [9] 邓兆智,钟秋生. 白芍总苷的药理与临床研究考释 [J]. 实用中医内科杂志,2004,18(3):181.
- [10] 夏泉,张平,李绍平,等. 当归的药理作用研究进展 [J]. 时珍国医国药,2004,15(3):164.
- [11] 牛向荣. 柴胡药理作用研究概述 [J]. 中国药师,2009,12(9):1310.
- [12] 杜培凤,聂进红. 白术研究综述 [J]. 齐鲁药事,2004,23(9):41.
- [13] Xiao Juan Mi, Si Wei Chen, Wen Juan Wang, et al. Anxiolytic-like effect of paeonol in mice [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2005, 81(3): 683.
- [14] 黄险峰,彭国平. 香附的化学成分及药理研究进展 [J]. 中药材,2003,26(1):65.

[责任编辑 聂淑琴]