

经前舒颗粒对大鼠海马 5-HT 含量及其 5-HT_{3B} 受体表达的影响^{*}

□李红华 薛 玲^{**}

(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)

摘 要:目的:观察经前舒颗粒对郁怒模型大鼠海马 5-HT_{3B} 受体蛋白表达和 mRNA 水平以及 5-HT 含量的影响,研究郁怒情绪的中枢机制,探讨经前舒颗粒的中枢作用机制。方法:以居住入侵方法制备大鼠郁怒情绪模型,给药组给予调肝方药经前舒颗粒,模型组给予灭菌饮用水,并设不造模正常组,用蛋白质印迹技术(WB)检测各组大鼠海马 5-HT_{3B} 受体蛋白水平表达量,半定量 RT-PCR 技术检测各组大鼠海马 5-HT_{3B} 受体 mRNA 的表达。高效液相色谱-荧光检测器检测海马中 5-HT 的含量。结果:与正常组比较,模型组大鼠海马 5-HT_{3B} 受体 mRNA 水平和蛋白表达水平都极显著升高($P < 0.01$),5-HT 含量显著下降($P < 0.05$);与模型组比较,经前舒颗粒组大鼠海马蛋白表达和 mRNA 水平都极显著降低($P < 0.01$),5-HT 含量显著升高。结论:郁怒刺激能显著升高大鼠海马 5-HT_{3B} 受体蛋白表达和 mRNA 表达水平并显著降低 5-HT 的含量,调肝方药经前舒颗粒可能通过下调海马过高的 5-HT_{3B} 受体蛋白表达和 mRNA 水平以及上调 5-HT 含量达到调肝解郁治疗疾病的目的。

关键词:郁怒模型 5-HT_{3B} 受体 RT-PCR Western blot

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2011.02.017

20 世纪末,世界卫生组织(WHO)将人的健康标准界定为身体和心理两个方面,人们普遍认识到情绪心理因素能导致疾病并影响疾病的转归与治

疗,负面情绪对人类健康的威胁尤其重大。因此,对情绪致病的研究日益受到研究者重视。NE、DA、5-HT 及其受体的功能与情绪反应密切相关,实验室的前期研究发现经前舒颗粒可以通过调节 5-HT_{1A} R、ER α 、Er β 的蛋白和基因的异常表达^[1-3],达到

收稿日期:2010-11-30

修回日期:2010-12-27

^{*} 国家重点基础研究发展计划(“973 计划”)资助课题(2011CB505102):从肝论治抑郁症、经前期综合征探讨肝主疏泄调畅情志的作用机制,负责人:张惠云;国家自然科学基金重点项目(30930110):肝疏泄失常与调肝方药对不同脑区功能的影响及其机制研究,负责人:乔明琦;国家自然科学基金面上项目(30973688):诱发愤怒、郁怒大鼠模型脑中枢关键指标筛选及其评价,负责人:张惠云。

^{**} 通讯作者:薛玲,教授,硕士生导师,主要研究方向:中药调肝方药药理研究,Tel:0531-89628596,E-mail:xxueling@163.com。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>
(World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica) 298

调肝解郁治疗疾病的目的。现代文献报道^[4], 5-HT₃受体与情绪反应密切相关。本实验通过大鼠海马5-HT含量以及5-HT_{3B}受体蛋白表达和mRNA水平的变化, 进一步探讨郁怒情绪的中枢机制, 并进一步探讨经前舒颗粒的中枢作用机制。

一、材料

1. 动物

雄性Wistar大鼠50只, 200g左右。其中10只作为正常对照组, 另外40只作为造模组。另准备120~150g Wistar大鼠30只作为入侵鼠。自由饮水进食。饲养室温度 $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 $(50 \pm 10)\%$, 12h/12h明暗周期, 昼夜颠倒(21:00开灯)。

2. 试剂与药物

5-HT_{3B}受体抗体(Santa Cruz公司), 预染蛋白marker(Thermo Fisher Scientific公司), BeyoECL Plus(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服务有限公司合成, Trizol总RNA提取试剂盒(上海生工生物工程技术服务有限公司), RT反转录试剂盒(济南朋远生物工程技术服务有限公司), 日本TaKaRa的rTaq(不含dNTP Mixture)(济南赛恩斯生物工程技术服务有限公司), 5-羟色胺(Sigma公司), 柠檬酸三钠、高氯酸、盐酸均为国产分析纯, 甲醇为色谱纯, 水为高纯水。

经前舒颗粒(秦皇岛市山海关制药厂生产, 批号: Z20053087), 主要含白芍、当归、柴胡、白术、丹皮、香附、甘草、郁金等中药。灌胃给药, 给药量为 $4.8\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (相当于人临床8倍剂量^[5])。

3. 仪器

Bio-Rad电泳仪、转印仪(美国伯乐公司); TP600 PCR扩增仪(TaKaRa); 复日FR-980凝胶成像分析仪(上海复日科技有限公司); Tecan Sunrise酶标仪(上海麦莎生物科技有限公司); Agilent 1100高效液相色谱仪(二元泵、自动进样器、柱温箱、FLD检测器); LGR16—w高速冷冻离心机(北京医用离心机厂)。

二、方法

1. 取材

依据文献^[6]造模, 造模5d后将模型组分为继续造模组和造模给药组, 继续造模组在造模的同时

灌胃给予灭菌饮用水, 造模给药组在造模的同时灌胃给予经前舒颗粒。继续实验10d后对大鼠进行旷场试验和糖水偏好实验, 实验后断头取脑, 于冰上迅速剥离出海马, 放入1.5mL离心管, 置于液氮中迅速冷冻后保存于 -70°C 冰箱备用。

2. 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)

根据RNAisoTMPlus总RNA提取试剂盒说明提取总RNA。紫外分光光度仪检测纯度, $A_{260}/A_{280} \approx 1.8$, 反转录采用Promega的RT反转录试剂盒, 经总mRNA反转录成cDNA。PCR引物序列: 5-HT_{3B}受体上游引物序列5'-GCA GAC ATA CGC TTT CCC -3', 下游引物序列5'-ATA GCC CAC CAG CAC ATT -3'; β -actin上游引物序列5'-TGG TGG GTA TGG GTC AGA AGG ACT C-3', 下游引物序列5'-CAT GGC TGG GGT GTT GAA GGT CTC A -3'。PCR条件在25 μL 体系中, Cdna2 μL 加入23 μL PCR混合物, 即TaKaRa Taq™ Hot Start Version试剂盒。反应在PCR仪中进行: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2.5min 预变性; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30s 变性; 5-HT_{3B}受体51.1 $^{\circ}\text{C}$, 内参59 $^{\circ}\text{C}$ 40S, 退火; 72 $^{\circ}\text{C}$, 1min 延伸; 再72 $^{\circ}\text{C}$ 7min 延伸。循环参数: 5-HT_{3B}受体为35, 内参为28。PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳, 采用Smartview生物电泳图像分析系统对条带拍照并进行光密度值扫描, 以目的条带/ β -actin的光密度值比值表示各样本表达强度。

3. 免疫印迹(Western blot, WB)

取出组织, 冰浴中操作, 按1:5的比例($\text{mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)加入提前预冷的Ripa裂解液, 匀浆器匀浆30min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下12000rpm离心5min, 取上清, 采用Bradford法测定蛋白含量, 其它加入5 $\times$ SDS上样缓冲液至终浓度为1 $\times$, 置于沸水中煮5min使蛋白变性。以30 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1h, 分别与5-HT_{3B}R(1:200, 5%脱脂奶粉的TBST溶液稀释)和 β -actin(1:1500)的抗体室温摇床孵育2h, 再与辣根氧化酶标记的相应二抗室温孵育1h, 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。

4. 高效液相色谱-荧光检测法检测海马5-HT含量

样品处理: 取海马, 精确称重, 加入1mL高氯酸

(0.4mol) 水溶液,置入 1mL 组织匀浆器中,冰浴下匀浆 4℃ 冷冻离心 10000 rpm,10min,取上清液置入 -20℃ 保存。测样时,室温下解冻,0.22 微孔滤膜过滤,进样 20μL。

5-HT 含量的测定依据文献^[7],色谱条件为: Shim-pack C₁₈柱(150mm×4.6mm 5μm),流动相为 20mm 柠檬酸三钠(Ph4.5/HCl):甲醇=95:5,柱温 35℃,流速 1.0mL·min⁻¹,激发波长 280nm。发射波长 315nm。进样量 20μL。相对标准偏差(RSD)为

1.4%。在 2~300pmol 范围内线性关系良好($r=0.999$)

5. 统计方法

利用 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,所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著性水平为 $P<0.05$ 。

三、结果

1. 旷场实验及糖水偏好实验

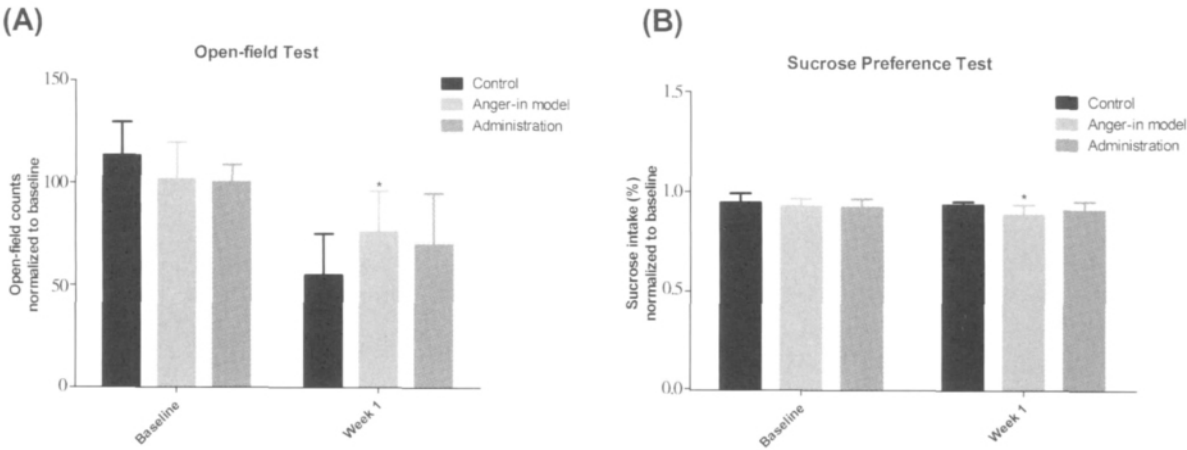


图1 各组大鼠旷场实验及糖水偏好结果比较

注: A: 各组大鼠旷场实验得分比较, B: 各组大鼠糖水消耗系数比较; * 与对照组相比 $P<0.05$, $\bar{x} \pm s$, $n=10$ 。

由图 1 可知,造模刺激 1w 后郁怒大鼠模型旷场实验得分显著上升 ($P<0.05$),而糖水偏好系数则显著下降 ($P<0.05$); 药物干预后上述指标均得到一定程度恢复,但与模型组比较未见显著性差异 ($P>0.05$)。

2. RT-PCR 和 Western-blot 结果

如图 2 和表 1 所示,与正常对照 组大鼠相比,郁怒模型组大鼠海马中 5-HT_{3B} 受体 mRNA 表达和蛋白表达都显著升高,这说明郁怒情绪障碍与海马中 5-HT_{3B} 受体表达异常升高相关。与造模组比较,经前舒给药组大鼠海马中 5-HT_{3B} 受体 mRNA 表达和蛋白表达显著降低,调肝方药经前舒颗粒干预能改变 5-HT_{3B} 受体 mRNA 表达和蛋白表达水平异常升高的状态。

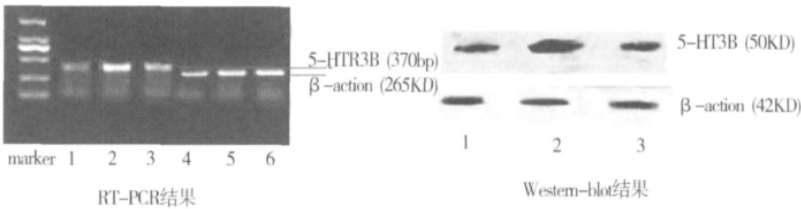


图2 3 组大鼠海马 5-HT_{3B} RmRNA 电泳及 western-blot 蛋白表达结果

注: 1、4 正常组; 2、5 郁怒模型组; 3、6 郁怒给药组。

表 1 大鼠海马 5-HT_{3B} 受体 mRNA 及其目标蛋白与内参相对光密度 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	目标基因相对光密度值	目标蛋白相对光密度值
正常组	0.464 ± 0.013	0.453 ± 0.012
郁怒模型组	0.872 ± 0.004**	0.922 ± 0.036**
郁怒给药组	0.524 ± 0.061	0.474 ± 0.037

注: 与正常组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, $P<0.01$ 。

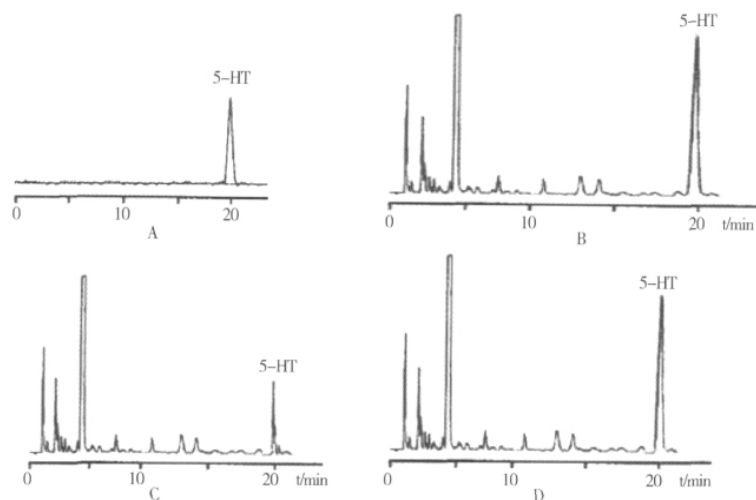


图3 各组大鼠海马组织色谱图

注: A. 5-HT 标准品 B. 空白对照组 C. 抑郁模型组 D. 给药组。

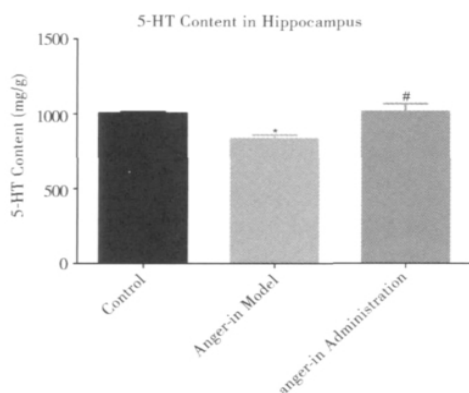


图4 各组大鼠海马 5-HT 含量结果比较

注: * 表示与对照组相比 $P < 0.05$,

表示与模型组相比 $P < 0.05$ 。

3. 高效液相色谱-荧光检测法检测结果

由图3~4可知,抑郁模型大鼠海马 5-HT 含量较对照组显著下降 ($P < 0.05$),而给予药物干预后海马 5-HT 恢复至正常水平(与模型组比较 $P < 0.05$ 与对照组比较 $P > 0.05$)。

四、讨论

中医学认为:肝主疏泄,调畅气机。肝气郁结与中枢神经对精神情绪调节功能的异常密切相关^[8-9]。对中医肝脏象及证候的有关研究所得出的主要一致性结论是:肝的实证和虚证都表现出不同程度的神经内分泌功能紊乱,这主要是因为肝主疏

泄与情志关系密切,情志变化引起大脑皮层功能改变所致^[10]。单胺类神经递质作为一种重要的神经内分泌物质,对于情志的调节具有重要的作用。

5-HT 作为一种神经递质和血管活性物质,广泛存在于中枢神经系统和周围组织中,与焦虑、惊恐、酗酒、强迫症、过度饮食和精神分裂症等有关。5-HT 受体分型复杂,5-HT 通过激动不同的受体亚型产生不同的药理作用。研究发现 5-HT_{3B}R 的表达参与了心理情绪的调节。5-HT_{3B}R 是 5-HT₃R 的一个重要的亚型结构,主要存在于人类大脑的海马区,以及啮齿类动物的中枢神经系统^[11,12]。海马是调节情绪的重要脑区,也是应激损伤的主要易感部位,慢性应激可损害海马,引起其结构和功能的变化^[13]。因此,海马是调节情绪的重要脑区,也是应激损伤的易感部位。

经前舒颗粒由白芍、当归、柴胡、白术、丹皮、香附、甘草、郁金等中药组成,以当归、白芍养血柔肝,柴胡疏肝解郁,白术健脾气以滋化源,丹皮性味辛凉,善清血分郁热,郁金疏肝解郁可除烦热,香附微苦微辛,功擅行气疏肝,与郁金、丹皮相伍,消胀止痛。上药相合,养肝血以助肝用,助肝气以解肝郁,理气以消除胀,共奏养肝解郁,理气消胀之功效。实验室的前期研究发现经前舒颗粒通过调节大鼠海马和额区皮质 5-HT_{1A}R、ER α 、ER β 的结合活性来调肝解郁,达到治疗疾病的目的。本实验采用居住入侵法制备抑郁情绪大鼠模型,通过旷场试验得分和糖水偏好实验初步检测造模是成功的,利用蛋白质印迹技术(WB)和半定量的 RT-PCR 技术对大鼠海马 5-HT_{3B} 受体蛋白和 mRNA 表达进行测定,利用高效液相色谱-荧光检测法检测大鼠海马中 5-HT 含量的变化,从而发现抑郁情绪反应的中枢作用机制并研究经前舒颗粒对中枢的作用机制。结果显示,抑郁模型大鼠海马与正常组比较 5-HT_{3B}R 蛋白表达和 mRNA 水平较正常组都极显著的升高 ($P < 0.01$),5-HT 含量显著性的降 ($P < 0.05$),说明抑郁情绪与大鼠脑区 5-HT_{3B}R 的表达以及 5-HT 含量的变化密切相关。而与模型组相比,调肝方药经前舒颗粒干预能显著降低 5-HT_{3B}R 蛋白和 mRNA 表达水平异

常升高的状态以及使 5-HT 的含量恢复正常水平。提示调肝方药经前舒的中枢作用机制与调节海马 5-HT_{3B}R 表达水平以及 5-HT 含量密切相关,虽然目前其具体作用机制尚不清楚,需要进一步研究,但这为研究郁怒情绪的相关中枢机制并为调肝方药调肝解郁治疗疾病的作用机制提供了新的研究思路。

本文所选用干预药物经前舒颗粒临床已生产上市,其适应症是经前期综合征肝气郁证。依中医辨证,郁怒情绪反应表现类似肝气郁证,因此我们选用上方对不良情绪反应进行干预。但不良情绪反应毕竟未到疾病阶段,其表现与临床经前期综合征病证表现亦有不一致处,因而造成药物干预后尽管出现纠正趋势,但未见明显治疗效应。另外,本文所使用药物是中剂量,可能加大药物剂量可能产生更为明显治疗效应,尚待今后工作中开展相关探索。

参考文献

- 1 孙世光,张惠云. 经前舒颗粒对 PMS 肝气郁证大鼠额叶皮层和海马 5-HT_{1A} 受体结合活性的影响. 中国中药杂志, 2009, 34 (5): 635 ~ 637.
- 2 赵斌. 经前舒颗粒对 PMS 肝气郁证模型大鼠不同脑区雌激素受体表达的影响. 山东: 山东中医药大学, 1995: 1 ~ 77.
- 3 马晶. 经前期综合征肝气郁证模型大鼠中枢不同脑区 ER α 和

- ER β mRNA 表达. 山东: 山东中医药大学, 1995: 1 ~ 39.
- 4 Drummond PD. Effect of tryptophan depletion on symptoms of motion sickness in migraineurs. *Neurology*, 2005, 65 (4): 620 ~ 622.
- 5 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 202 ~ 203.
- 6 Sheng Wei, Huiyun Zhang, Jie Gao, *et al.* Impact of social isolation and resident intruder stress on aggressive behavior in the male rat. *Neural Regen Res*, 2010; 5 (15): 1175 ~ 1179.
- 7 贺又舜, 付俊英, 袁振仪, 等. 宁神温胆汤对小鼠中枢神经递质影响的实验研究. 中国中医药信息杂志, 1999, 6 (4): 25 ~ 26.
- 8 陈泽奇, 陈国林, 石林阶, 等. 肝气郁结患者血浆 L-ENK、AVP、ANP 含量分析. 湖南中医学院学报, 1997, 17 (3): 37.
- 9 陈泽奇, 陈国林, 李学文, 等. 肝气郁结证患者血浆抗利尿激素的变化. 华人消化杂志, 1998, 6 (6): 495.
- 10 陈家旭. 中医肝本质现代研究进展. 中国中医基础医学杂志, 1998, 4 (7): 58.
- 11 Brady CA, Dover TJ, Massoura AN, *et al.* Identification of 5-HT_{3A} and 5-HT_{3B} receptor subunits in human hippocampus. *Neuropharmacology*, 2007, 52 (5): 1284 ~ 1290.
- 12 Doucet E, Latremoliere A, Darmon M, *et al.* Immunolabelling of the 5-HT_{3B} receptor subunit in the central and peripheral nervous systems in rodents. *Eur J Neurosci*, 2007, 26 (2): 355 ~ 366.
- 13 Nacher J, Pham K, Gil-fernandez V, *et al.* Chronic restraint stress and chronic C. corticosterone treatment modulate differentially the expression of molecules related to structural plasticity in the adult rat piriform cortex. *Neuro Science*, 2004, 126: 503 ~ 509.

Effects of Jingqianshu Granule on the Content of 5-HT and Expression of 5HT_{3B} Receptor in Rats' Hippocampus

Li Honghua, Xue Ling

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Classics Theory, Jinan 250355, China)

Abstract: Objective: To observe the effects of Jingqianshu granule (JQS) on the content of 5-HT and expression of 5-HT_{3B} receptor in rats' hippocampus, investigating the micro-mechanism of anger-in emotional reaction and exploring the central mechanism of the Chinese medicine formula. **Methods:** The rats were divided into three groups: control, model and administration (JQS). The anger-in rats were prepared using resident-intruder stress. And then we detected the content of 5-HT with HPLC-FLD and the expression levels of 5-HT_{3B} receptor mRNA and protein in rats' hippocampus by RT-PCR and Western blot method. **Results:** Compared with the control group, the expression levels of 5-HT_{3B} receptor mRNA and protein of model groups were significantly higher in hippocampus ($P < 0.01$), and the content of 5-HT decreased significantly. Compared with model groups, the expression levels of 5-HT_{3B} receptor mRNA and protein of administration groups reduced significantly in hippocampus ($P < 0.01$), but the content of 5-HT increased remarkably. **Conclusion:** Anger-in emotional reaction can lead to changes of the expression levels of 5-HT_{3B} receptor mRNA and protein and the content of 5-HT and the Chinese medicine formula JQS can decrease the expression levels of 5-HT_{3B} receptor mRNA and protein and increase the content of 5-HT to cure the diseases.

Keywords: Anger-in rat model, 5-HT_{3B}R, RT-PCR, western blot

(责任编辑: 李沙沙 张志华 责任译审: 魏 盛)