

· 论著 ·

# 激动肝郁脾虚证大鼠海马CA1区AMPA受体对杏仁核区AMPA受体亚基基因表达的影响及逍遥散的调节作用

岳利峰<sup>1</sup>, 王玲<sup>2</sup>, 王福<sup>1</sup>, 奚胜艳<sup>3</sup>, 陈昌乐<sup>1</sup>, 赵健<sup>1</sup>( <sup>1</sup>北京中医药大学, 北京 100029; <sup>2</sup>北京航空航天大学, 北京 100191; <sup>3</sup>厦门大学, 厦门 361005 )

**摘要:**目的: 探讨逍遥散治疗肝郁脾虚证的基因调节机制。方法: 25只SD雄性大鼠随机等分为5组, 正常组、模型组、假手术组、-氨基羟甲基恶唑丙酸 (AMPA) 组和逍遥散组。以21d慢性束缚应激方法造肝郁脾虚证模型组。假手术组、AMPA组和逍遥散组均采用21d慢性束缚联合脑部埋管微量注射方法造模, AMPA组在双侧海马CA1区埋管微量注射AMPA, 逍遥散组灌服逍遥散溶液。运用RT-PCR一步法检测海马CA1区和杏仁核区AMPA受体的重要亚基GluR1 mRNA和GluR2 mRNA的表达变化。结果: 在杏仁核区, 与AMPA组比较, 逍遥散组GluR1 mRNA和GluR2 mRNA表达差异无统计学意义; 在海马CA1区, 与正常组比较, AMPA组GluR1 mRNA和GluR2 mRNA表达差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ); 与AMPA组比较, 逍遥散组GluR1 mRNA和GluR2 mRNA表达差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。结论: 结合前期实验, 从基因表达角度, 进一步推断逍遥散通过纠正杏仁核和海马AMPA受体的“兴奋-抑制”失衡, 重建稳态, 来治疗肝郁脾虚证。

**关键词:** 逍遥散; 肝郁脾虚证; 基因表达; 调节机制; -氨基羟甲基恶唑丙酸; -氨基羟甲基恶唑丙酸受体

基金资助: 国家自然科学基金青年基金 (No.61101008), 北京中医药大学自主选题项目 (No.2009JYBZZ-JS006)

## Influence of Xiaoyao Powder on gene expression of GluR1 mRNA, GluR2 mRNA in amygdala and hippocampus in rat model of liver-stagnation and spleen-deficiency syndrome

YUE Li-feng<sup>1</sup>, WANG Ling<sup>2</sup>, WANG Fu<sup>1</sup>, XI Sheng-yan<sup>3</sup>, CHEN Chang-le<sup>1</sup>, ZHAO Jian<sup>1</sup>( <sup>1</sup>Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; <sup>2</sup>Beihang University, Beijing 100191, China;<sup>3</sup>Xiamen University, Xiamen 361005, China )

**Abstract:** Objective: To further investigate the mechanism of gene regulation of Xiaoyao Powder in the treatment of liver-stagnation and spleen-deficiency syndrome. Methods: All SD rats ( $n=25$ ) were randomly divided into 5 equal groups, including the normal group, model group, sham-operation group, AMPA group and Xiaoyao Powder group. The model was established by chronic restraint for 21 days. The last 3 groups were modeled by chronic restraint for 21 days in combination with micro-injection by cerebral stereotaxis instrument. AMPA group was micro-injection with AMPA. Xiaoyao Powder group was fed with solution of Xiaoyao Powder. Results: In amygdala, compared with AMPA group, the expressions of GluR1 mRNA and GluR2 mRNA had no statistical significance in Xiaoyao Powder group. In CA1 region, compared with normal group, the expressions of GluR1 mRNA and GluR2 mRNA had no statistical significance in Xiaoyao Powder group, while had statistical significance ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ) in AMPA group; compared with AMPA group, the expressions of GluR1 mRNA and GluR2 mRNA had statistical significance ( $P < 0.01$ ) in Xiaoyao Powder group. Conclusion: The regulating mechanism of Xiaoyao Powder to the expressions of subunits of hippocampus and amygdala AMPA receptor may be coincidence with that of AMPA in rat model of liver-stagnation and spleen-deficiency syndrome. It is deduced that Xiaoyao Powder cures liver-stagnation and spleen-deficiency syndrome through correcting the disorder of 'excitation-inhibition' of hippocampus and amygdala and reconstructing the homeostasis.

**Key words:** Xiaoyao Powder; Liver-stagnation and spleen-deficiency syndrome; Gene expression; Regulating mechanism; AMPA; AMPA receptor

通讯作者: 王玲, 北京市海淀区学院路37号北京航空航天大学, 邮编: 100191, 电话: 010-82335865, E-mail: lingwang@buaa.edu.cn

**Fund assistance:** Youth Project of National Natural Science Foundation of China(No.61101008), Independent Research Project of Beijing University of Chinese Medicine (No.2009JYBZZ-JS006)

大鼠慢性束缚应激21d总体导致杏仁核兴奋,海马CA1区抑制<sup>[1]</sup>。-氨基羟甲基恶唑丙酸(-amino-hydroxy-methyl-isoxazolepropionic acid, AMPA)通过激动双侧海马CA1区AMPA受体,缓解其抑制状态,来达到抑制杏仁核过度兴奋的目的,理论上可以起到干预治疗作用。本研究以21d慢性束缚应激方法造肝郁脾虚证模型组<sup>[2]</sup>,同时设立正常组、假手术组、AMPA组和逍遥散组,逍遥散组造模方法和AMPA组尽可能相似,突出逍遥散和AMPA二者干预的可比性,观察在逍遥散组和AMPA组GluR1 mRNA和GluR2 mRNA的表达变化趋势是否分别相似。

#### 材料

1. 动物 健康雄性SD大鼠25只,鼠龄20d,体质量(230±10)g,清洁级,动物许可证号:SCXK(京)2002-0003,批号:20100316,由北京维通利华实验动物中心提供。所有动物适应性饲养3d。

2. 中药 中药复方选用《太平惠民和剂局方》中的逍遥散(北柴胡30g,当归30g,白芍30g,白术30g,茯苓15g,炙甘草15g,生姜10g,薄荷10g),由北京同仁堂(亳州)饮片有限责任公司提供,批号:20091018,经北京中医药大学国医堂药房鉴定为纯正药材。按原书配伍比例由中日友好医院中药制剂室煎煮、浓缩制成药粉备用,用时根据需要用蒸馏水配制成一定的浓度,1g药粉含生药量4.6g。

3. 试剂 AMPA由Sigma公司提供(5mg/瓶),批号:20100214,5mg AMPA溶入2 500 μL DMSO和2 500 μL 0.9%氯化钠溶液中,即1 μL AMPA溶液含1 μg AMPA<sup>[3]</sup>。

TRZOL试剂,美国Invitrogen,批号:20100512;The AccessQuick RT-PCR System一步法试剂盒,美国Promega公司,批号:20100520。

4. 仪器 Angel-one数控式脑立体定位仪,美国Benchmark公司;MiniCycler PTC-150型PCR仪,美国MJ Research公司。

#### 方法

1. 分组 大鼠适应性饲养3d后进行初步筛选,将过于活跃和过于安静的大鼠排除,25只大鼠按体质量利用随机区组方法等分为5组。正常组(A组)、模型组(B组)、假手术组(C组)、AMPA组(D组)、逍遥散组(E组),群养,5只/笼。

#### 2. 造模

2.1 埋管微量注射手术 适应性喂养第4天开

始,对假手术组、AMPA组和逍遥散组大鼠进行脑部埋管手术(正常组和模型组不进行手术,继续适应性喂养)。埋管微量注射方法详见参考文献[4],注射位点为双侧海马CA1区<sup>[5]</sup>(200-270g SD雄性大鼠:AP=-3.6mm, L=±2.3mm, DV=-4.1mm)。术后连续3d腹腔注射16万单位青霉素,大鼠休息1周后开始脑内微量注射。于第1、4、7、10、13、16、19、21天,在AMPA组大鼠双侧海马CA1区分别微量注射AMPA溶液1 μL(1g/L),假手术组和逍遥散组大鼠双侧海马CA1区分别微量注射0.9%氯化钠溶液1 μL。

2.2 慢性束缚方法造模 从微量注射的第1天开始,将模型组、假手术组、AMPA组和逍遥散组大鼠分别束缚于特制的大鼠束缚架上,每日3h,束缚时间点随机,连续束缚21d。正常组在同一时间段不做束缚但禁止饮食。每组在束缚前1h灌胃,灌胃后动物休息0.5h后束缚。逍遥散组每日灌服逍遥散溶液,其他4组灌服等体积0.9%氯化钠溶液。按人体用药标准换算,大鼠逍遥散给药量为5.32g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,灌胃容积为10mL/kg体质量。

#### 3. GluR1 mRNA和GluR2 mRNA表达实验

3.1 取材 第21天,用2%戊巴比妥钠腹腔注射进行深度麻醉(40mg/kg),迅速断头,在超净台内冰上取脑,分别剥离出右侧海马和杏仁核,再根据文献[4],将海马分离出CA1区。分别放入1.5mL灭菌的离心管中,埋入干冰粉末中迅速冷冻,-70℃冰箱保存备用。

3.2 大鼠海马和杏仁核总RNA的提取和含量测定 参照文献[7]的方法,根据A260/A280比值,保留1.8-2.0,弃去比值低于1.5者。

3.3 PCR引物设计 由赛百盛基因技术有限公司合成-actin mRNA, GluR1 mRNA, GluR2 mRNA的引物,以-actin作为半定量PCR的内参照。

3.4 RT-PCR 一步法反应<sup>[6]</sup> 按Promega A1701一步法试剂盒说明书严格操作。该系统是优化的单一缓冲液系统,敏感性极强,步骤简化,减少样品污染机会。

3.5 PCR产物半定量 对经过电泳之后的2.5%琼脂糖凝胶用Image Master VDS 凝胶图像分析系统进行数码图像摄取,以在组织中表达稳定的-actin条带作为内参照,用目的基因的光密度与内参照条带的光密度的比值作为半定量分析数据。

4. 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。运用SPSS 13.0软件,采用单因素方差分析进行统计处理,组间比较采用SNK检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

结果

1.GluR1 mRNA 表达变化 从图1、图2和表1可以看出:在海马CA1区,与正常组比较,模型组、假手术组和AMPA组GluR1 mRNA表达明显增高( $P<0.01$ );与模型组比较,假手术组表达差异无统计学意义;与AMPA组比较,逍遥散组表达差异有统计学意义( $P<0.01$ )。在杏仁核区,与正常组比较,模型组和假手术组GluR1 mRNA表达明显降低( $P<0.05$ ),AMPA组和逍遥散组表达差异均无统计学意义;与模型组比较,假手术组表达差异无统计学意义;与模型组和假手术组比较,AMPA组和逍遥散组表达明显增高( $P<0.05$ );与AMPA组比较,逍遥散组表达差异无统计学意义。

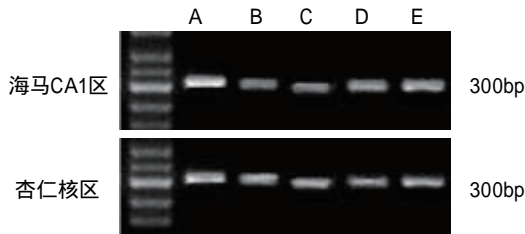


图1 -actin mRNA在各区表达图

注:A.正常组;B.模型组;C.假手术组;D.AMPA组;E.逍遥散组。下图同。

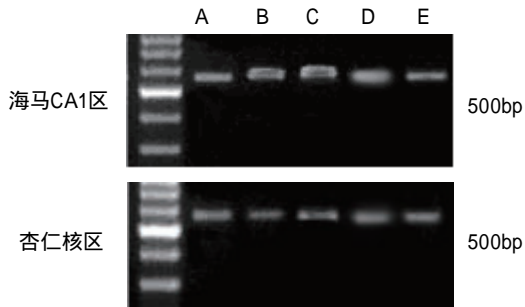


图2 GluR1 mRNA在各区表达图

表1 GluR1 mRNA 表达的变化( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	海马CA1区	杏仁核区
正常组	0.49±0.08	0.47±0.09
模型组	0.72±0.09**	0.41±0.08 <sup>^</sup>
假手术组	0.81±0.11**	0.40±0.07 <sup>^</sup>
AMPA组	0.83±0.08**	0.46±0.06
逍遥散组	0.47±0.06	0.45±0.07

注:与正常组比较, $^{\wedge}P<0.05$ , $^{**}P<0.01$ ;与模型组比较, $P<0.05$ , $^{\wedge}P<0.01$ ;与假手术组比较, $P<0.05$ , $^{\wedge}P<0.01$ ;与AMPA组比较, $^{\wedge}P<0.01$ 。下表同。

2.GluR2 mRNA表达变化 从图1、图3和表2可以看出:在海马CA1区,与正常组比较,模型组、假手术组和AMPA组GluR2 mRNA表达差异均有统计学意义( $P<0.01$ , $P<0.05$ ),且模型组、假手术组均较正常组GluR2 mRNA表达降低而AMPA组表达升高;与

模型组比较,假手术组表达差异无统计学意义;与AMPA组比较,逍遥散组表达明显降低( $P<0.01$ )。在杏仁核区,与AMPA组比较,逍遥散组表达差异无统计学意义。

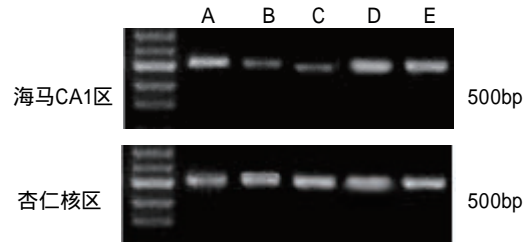


图3 GluR2 mRNA在各区表达图

表2 GluR2 mRNA表达的变化( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	海马CA1区	杏仁核区
正常组	0.51±0.07	0.48±0.11
模型组	0.34±0.09**	0.51±0.09
假手术组	0.32±0.08**	0.50±0.08
AMPA组	0.57±0.07 <sup>^</sup>	0.47±0.06
逍遥散组	0.48±0.11	0.46±0.10

讨论

海马和杏仁核是应激系统的高位调节中枢<sup>[7]</sup>。从解剖生理学角度来看,海马、杏仁核通过内侧穿通支-齿状回有神经支配关系,二者还是情绪形成中心Papez环的重要组成部分。

慢性束缚应激21d导致杏仁核区兴奋,海马抑制<sup>[1]</sup>。研究表明21d导致海马锥体神经元萎缩,胞体变小,树突轴突均变短变少;而杏仁核神经元神经元胞体变大,树突轴突均变粗变长<sup>[1]</sup>。

本实验以21d慢性束缚应激方法造肝郁脾虚证模型组。假手术组、AMPA组和逍遥散组均采用21d慢性束缚联合脑部埋管微量注射方法造模。AMPA组在双侧海马CA1区埋管微量注射AMPA受体的激动剂AMPA,假手术组和逍遥散组微量注射等体积的0.9%氯化钠溶液。逍遥散组灌服逍遥散溶液。与模型组比较,假手术组GluR1 mRNA和GluR2 mRNA无论在海马CA1区还是杏仁核区,差异均无统计学意义,从而排除了手术创伤这一干扰因素对实验的影响。逍遥散组和AMPA组造模过程相似,不同的只是分别采用逍遥散和AMPA干预,AMPA缓解海马CA1区抑制状态,达到了抑制杏仁核过度兴奋的目的。在海马CA1区,AMPA组由于注射AMPA,负反馈导致上述二指标均比正常组偏高,呈现与正常组和逍遥散组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ , $P<0.01$ );在杏仁核区,正常组、AMPA组和逍遥散组间上述二指标差异均无统计学意义,取类比象,推断逍遥散可能

和AMPA调节机制相似。

AMPA受体是非常重要且唯一调节杏仁核和海马输入信号的突触后处理场所,在突触发生、形成神经通路和突触可塑性方面起着重要的作用<sup>[6]</sup>。AMPA受体是由GluR1-4 4种亚基组成,其中GluR1和GluR2是关键亚基。

GluR1是大鼠表达长时程增强(long-term potentiation, LTP)的关键亚基, GluR1 mRNA表达与LTP强度正相关。LTP对GluR1外化起特定作用。慢性束缚应激导致海马CA1区GluR1 mRNA表达上升,直接或间接对大鼠活动下降负责,导致大鼠适应能力下降<sup>[6]</sup>。

GluR2是AMPA受体控制Ca<sup>2+</sup>通透的关键亚基<sup>[7]</sup>, 正常情况下对Ca<sup>2+</sup>不通透。研究表明慢性束缚应激导致海马CA1区GluR2 mRNA表达下降,形成Ca<sup>2+</sup>通透的AMPA受体,钙超载,继发引起“细胞死亡程序”的转录活化,同步增强兴奋性氨基酸的毒性作用,导致海马神经元退行性变<sup>[6]</sup>。

逍遥散是疏肝解郁的名方,适用于肝郁脾虚血弱证。束缚21d,肝郁日久,木郁乘土,肝郁脾虚,机体气血紊乱,由气及血、由实转虚而出现的病理变化,符合机体功能紊乱而未出现器质性病变的治疗。边缘系统是肝主疏泄的调控中枢<sup>[7]</sup>。海马和杏仁核作为边缘系统的两个重要部位,对应激调节起着中心调节作用。海马和杏仁核的平衡协调是情绪得以正常表达,生理功能得以正常执行的关键。在应激状态下,束缚使大鼠失去行动自由,身体不适,郁怒产生厌恶情绪,杏仁核强烈激活,各种刺激大量涌入海马,出现兴奋性氨基酸毒性损害,使海马兴奋性降低<sup>[8]</sup>。杏仁核过于亢奋,而海马过于抑制,失去平衡则疾病生。

综上所述,结合本课题组前期实验<sup>[6,8-9]</sup>,从基因表达角度验证“逍遥散通过纠正杏仁核和海马AMPA受体的“兴奋-抑制”失衡,重建稳态,来治疗肝郁脾虚证”这一假说的合理性,这也与中医复方治疗疾病的整体观、双向调节观相吻合。

#### 参 考 文 献

- [1] Vyas A. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *Neurosci*, 2002,22(12):6810-6818
- [2] 岳利峰,丁杰,陈家旭,等.肝郁脾虚证大鼠模型的建立与评价. *北京中医药大学学报*,2008,31(6):394-399  
YUE Li-feng,DING Jie,CHEN Jia-xu,et al. Establishment and review of rat model of syndrome of liver depression with spleen insufficiency. *Journal of Beijing University of TCM*,2008,31(6):394-399
- [3] Estrela H F G,Bergamaschi C T,Campos R R. Differential sympathetic activation and baroreceptor reflex sensitivity induced by hepatic cirrhosis in rats. *Clin Auton Res*,2011,21(10):218-220
- [4] 岳利峰,王玲,奚胜艳,等.基于海马CA1区微量注射AMPA对肝郁脾虚证模型大鼠杏仁核BLA区阳性细胞的影响对比探讨逍遥散的调节机制. *北京中医药大学学报*,2012,11(35):784-785  
YUE Li-feng,WANG Ling,XI Sheng-yan,et al. Influences of Xiaoyao San on positive cell changes in amygdaloid nucleus BLA zone in rat model with syndrome of liver depression and spleen deficiency compare with injection AMPA in hippocampal CA1 zone. *Journal of Beijing university of TCM*,2012,11(35):784-785
- [5] George Paxinos,Charles Watson.大鼠脑立体定位图谱.3版.北京:人民卫生出版社,2005:23  
George Paxinos,Charles Watson. *Stereotactic atlas of the rat brain*. 3rd edition. Beijing: People's Medical Publishing House,2005:23
- [6] 岳利峰,陈家旭,王大伟,等.逍遥散对肝郁脾虚证模型大鼠海马和杏仁核AMPA受体亚基基因表达的调节机制. *北京中医药大学学报*,2009,32(8):513-517  
YUE Li-feng,CHEN Jia-xu,WANG Da-wei,et al. Influence of Xiaoyao Powder on subunit gene expression of AMPA receptor in amygdale and hippocampus in rat model of liver-stagnation and spleen-deficiency syndrome. *Journal of Beijing University of TCM*, 2009,32(8):513-517
- [7] 岳广欣,陈家旭.肝主疏泄生理学基础探讨. *北京中医药大学学报*,2005,2(1):22-24  
YUE Guang-xin,CHEN Jia-xu. Study on physiological basis of liver governing conveyance and dispersion. *Journal of Beijing University of TCM*,2005,2(1):22-24
- [8] 岳利峰,陈家旭,霍素坤,等.逍遥散对肝郁脾虚证模型大鼠海马CA1区和杏仁核BLA区GluR2阳性细胞数变化的影响. *中华中医药杂志*,2010,25(8):842-845  
YUE Li-feng,CHEN Jia-xu,HUO Su-kun,et al. Possible regulation channel of Xiaoyao San in treating rats of syndrome of liver invading the spleen by immunohistochemistry. *China Journal of TCM and Pharmacy*,2010,25(8):842-845
- [9] 岳利峰,陈家旭,霍素坤,等.肝郁脾虚证大鼠双侧杏仁核注射CNQX后行为变化及逍遥散的调节作用. *中华中医药杂志*,2011,26(10):2272-2275  
YUE Li-feng,CHEN Jia-xu,HUO Su-kun,et al. Behavior study and regulation of Xiaoyao Powder on the syndrome of liver invading the spleen 'rats injected CNQX in Bilateral amygdala. *China Journal of TCM and Pharmacy*,2011,26(10):2272-2275

(收稿日期:2011年12月4日)