

论著·基础研究

柴胡疏肝散调节“怒伤肝”大鼠信号传导通路机制^{*}杨军平,王莹,肖亮[△]

(江西中医药大学附属医院检验科,江西南昌 330006)

摘要:目的 观察柴胡疏肝散对“怒伤肝”大鼠神经内分泌免疫变化及对下丘脑-垂体-肾上腺轴、蓝斑-交感-肾上腺髓质介导的介质反应的调控作用。方法 将120只Wistar大鼠随机分成正常对照组、模型组、中药高剂量组、中药中剂量组、中药低剂量组,后4组以通电30 s破坏双侧膈区建立“怒伤肝”应激动物模型,中药低、中、高剂量组分别灌胃给予0.3、0.6、1.2 g/(kg·d)柴胡疏肝散。结果 与模型组比,中药中剂量组大鼠海马 γ -氨基丁酸A型受体(GABAA)- $\alpha 2$ mRNA表达增多,大脑皮层中孕酮水平升高($P<0.05$),大鼠海马去甲肾上腺素(NE)、5-羟色胺(5-HT)、3,4-二羟基苯乙酸(DOPAC)水平降低($P<0.05$),脑干组织中NE、5-HT、多巴胺、DOPAC水平降低($P<0.05$)。结论 柴胡疏肝散可通过多个作用靶点,对“怒伤肝”大鼠多个生理反应环节进行调节。

关键词:柴胡疏肝散; 怒伤肝; 信号传导通路; 大鼠

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.24.004

文章编号:1673-4130(2018)24-3002-04

中图法分类号:R256.4;R446.6

文献标识码:A

The mechanism of Chaihu Shugan powder regulating the signal transduction pathway in rats with "angry injury live" *

YANG Junping, WANG Ying, XIAO Liang[△]

(Department of Clinical Laboratory, The Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: Objective To observe the effect of Chaihu Shugan powder on neuroendocrine immunity and mediator response mediated by hypothalamus-pituitary-adrenal axis, locus coeruleus-sympathetic-adrenal medulla in rats with "angry liver injury". **Methods** 120 Wistar rats were randomly divided into normal control group, model group, traditional Chinese medicine(TCM) high-dose group, TCM medium-dose group, and TCM low-dose group. After 30 seconds of electrification, the bilateral diaphragm was destroyed the "angry injury liver" stress model was established. In the stress animal model, the TCM low, medium and high-dose group were given 0.3, 0.6, 1.2 g/(kg·d), respectively. **Results** Compared with the model group, the expression of Gamma-aminobutyric acid type A receptor(GABAA) $\alpha 2$ mRNA in the hippocampus and the progesterone content in the cerebral cortex increased($P<0.05$), and the contents of Norepinephrine(NE), 5-hydroxytryptamine(5-HT) and dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC) in the hippocampus of rats decreased ($P<0.05$). The contents of NE, 5-HT, dopamine and DOPAC in brainstem tissues decreased($P<0.05$). **Conclusion** Through multiple targets, Chaihu Shugan powder can regulate many physiological reactions related to "anger liver" rats.

Key words: Chaihu Shugan powder; anger liver; signal transduction pathway; rats

怒为情绪应激的一种方式,在“怒”的刺激下,常表现出交感神经亢奋现象,引起心跳加快、血压上升、汗腺分泌增多、胃肠道运动被抑制、呼吸加深加快等^[1-3]。心身医学研究已经证实,情绪应激的作用可引起神经、内分泌、免疫系统活动的变化,从而对全身多个系统和器官产生影响^[4-6]。现代医学认为,情绪的形成和调节是通过大脑边缘系统以海马、下丘脑、

杏仁体为中心,得以维持内环境的自身稳定状态,它主要是通过下丘脑-垂体-神经系统起调控作用,由神经末梢释放神经递质,跨过突触间隙,作用于细胞上的受体,引起功能效应^[7-9]。《素问·阴阳应象大论》指出:“怒伤肝”,中医观点认为,肝主升、主动,在志为怒,故而怒与肝联系紧密。怒病的脏腑治法以清肝泻火、疏肝理气,方以柴胡疏肝散:柴胡10 g,枳壳10 g,

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81860806);江西省卫计委中医药科技项目(2016A135)。

作者简介:杨军平,男,副主任技师,主要从事细胞生物学等基础研究。 △ 通信作者,E-mail:31411431@qq.com。

本文引用格式:杨军平,王莹,肖亮.柴胡疏肝散调节“怒伤肝”大鼠信号传导通路机制[J].国际检验医学杂志,2018,39(24):3002-3005.

香附 10 g 川芎 10 g, 郁金 10 g, 延胡索 10 g, 炙甘草 3 g, 本课题根据中医“怒伤肝”理论, 从情绪应激角度, 探讨其与中医的“肝在志为怒”理论的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料 健康清洁级雄性 Wistar 大鼠 100 只, 体质量(180±10)g[许可证号:(赣)2016A023], 由江西省实验动物中心提供, 研究方案经本单位实验动物伦理委员会批准。所有动物提前一周购入, 在实验室 22~25 ℃适应性饲养。随机分成 5 组: 正常对照组、模型组、中药低剂量组、中药中剂量组、中药高剂量组, 每组 20 只。柴胡疏肝散由柴胡 10 g, 枳壳 10 g, 香附 10 g 川芎 10 g, 郁金 10 g, 延胡索 10 g, 炙甘草 3 g 等中药组成。常规水煎, 分别浓缩成含生药量 0.3、0.6、1.2 g/mL 三种剂量, 4 ℃冰箱保存备用。

1.2 仪器与试剂 PTC-100TMPCR 仪(MJ Research 公司); 凝胶成像分析系统(Ampharmacia 公司); DL-822 色谱系统(中国科学院大连化学物理研究所); γ 放射免疫计数器(中国科大中佳公司); AMV 反转录酶(上海 Promega 公司); Tap DNA 聚合酶(上海 Promega 公司); PCR Mix(上海 Promega 公司); DNA ladder(Ivitrogen 公司); 孕酮放免试剂盒(北京美迪科生物技术有限公司); 去甲肾上腺素(NE, 德国 Serva 公司), 多巴胺(美国 Fluka 公司); 肾上腺素 E、5-羟色胺(5-HT)、5-羟吲哚乙酸(5-HIAA)、高香草酸(HVA)、3,4-二羟基苯乙酸(DOPAC)、3,4-二羟苯胺(DHBA, 美国 Sigma 公司)。

1.3 方法

1.3.1 建立“怒伤肝”大鼠模型 雄性 Wistar 大鼠, 室温、通风良好, 立体定位器 AP-1, RL±1(矢状面左侧和右侧各 1 cm)H6 处用直流电压 10 V, 通电 30 s 破坏双侧膈区。术后缝皮, 常规消毒, 全部动物术后 24~48 h 出现显著的怒行为反应, 包括对峙、撕咬、鸣叫、直立, 对外界的响声或震动反应强烈, 肌张力加大, 两眼直视对方、瞳孔扩大, 有时恐惧、不安, 学习、记忆行为减退, 这些结果表明“怒伤肝”大鼠模型成功^[10]。

1.3.2 一般情况观察 观察大鼠的精神状况、饮水、摄食、毛发及活动情况等。

1.3.3 对 γ -氨基(GABA)能神经通路的影响 (1) 检测“怒伤肝”大鼠脑组织 γ -氨基丁酸 A 型受体(GABA A)mRNA 的表达: 实验结束后, 立即处死, 迅速取出大脑于冰面上快速分离出海马, 立即置液氮中, 于-80 ℃低温冰箱中冻存待用。采用反转录 PCR(RT-PCR)反应扩增产物进行相对定量分析, 引物 GABA A - α 2 受体上游引物序列为第 879~899 bp (5'-CAT GGA CTG GTT TAT CGC TGT-3') GABA A - α 2 受体下游引物序列为第 1 121~1 141 bp (5'-GCT TCT TGT TTG GTT CTG GAG-3'), 采用异硫氰酸胍一步法提取总 RNA, mRNA 反转录为

cDNA, PCR 扩增反应后将样品扩增产物的 A 值与 marker 中 0.5 bp 条带的 A 值的比值作为 mRNA 表达水平的参数, 对所有样品的 GABA A - α 2 mRNA 表达进行半定量分析。(2)检测“怒伤肝”大鼠血清和脑组织孕酮水平: 实验结束后, 立即股动脉取血, 4 ℃, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 并迅速取出大脑在冰面上快速分离出大脑皮层、海马, 立即置液氮中, 置于-80 ℃冷冻冰箱中保存待用。皮层组织, 按 5 mL/g 组织加入 0.1 mol/L pH 7.4 的 HCl-Tris 缓冲液, 置玻璃匀浆器内匀浆, 匀浆液 3 000 r/min 离心 20 min 后取上清液测定。按孕酮放免测定盒说明, 采用放射免疫法分别检测血清及大脑皮层孕酮的水平。

1.3.4 单胺递质及其代谢产物进行水平测定 实验结束后, 立即处死, 迅速取出大脑在冰面上快速分离出大脑皮层、海马及脑干, 立即置液氮中, 随后于-80 ℃冷冻冰箱中保存待用。依据脑组织的质量, 加入冷却的 0.1 mol/L 过氯酸(内含 0.3 mmol 的 EDTA-Na₂ 和 0.5 mmol 的亚硫酸钠), 2 μ g/mL DHBA, 组织匀浆, 11 000 r/min 离心 10 min, 组织上清液用于神经递质的测定。单胺递质的测定采用高效液相色谱-电化学检测器系统(HPLC-ECD)进行, 色谱条件参照文献方法^[11]。样品中的主要组分用内标法进行定量。单胺递质水平计算: 以 ng/g 组织湿重表示, 样品中各物质实际水平的计算公式如下(标准品进样量为 10 μ L)。

$$W_i = \frac{A_i(\text{样品}) \times F_{gi}(\text{标准}) \times W_s(\text{样品内标})}{A_s(\text{样品内标})} \times$$

$$\frac{\text{处理液总量} \times \text{脑组织质量}}{\text{进样量}}$$

1.4 统计学处理 运用软件 SPSS20.0 进行处理。各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验结果两组比较采用双侧 *t* 检验, 多组间比较等先用单因素方差分析, 差异有显著性时再用 Dunnett' *t* 检验进行统计分析。以 *P* < 0.05 作为差异有统计学意义的标准。

2 结 果

2.1 一般情况观察 除正常对照组外, 各组大鼠均出现神态嗜睡倦怠, 扎堆拥挤懒散, 毛色无光泽, 对食物的辨别反应减弱, 饮水次数减少, 伴有大便稀溏等现象, 有个别大鼠出现轻微的口鼻出血现象。

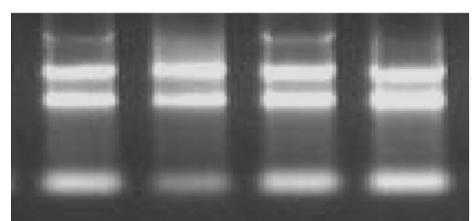


图 1 总 RNA 的电泳条带

2.2 总 RNA 鉴定 经过提取的总 RNA, 在琼脂糖凝胶电泳, 显示出 28S、18S 两条 RNA 电泳带, 见图 1。紫外分光光度计测定结果, 所有 RNA 样品在

260、280 nm 处的吸光度比值均在 1.8~2.0 的范围内,表明 RNA 的纯度也符合要求。

2.3 RT-PCR 分析 对样品 GABA α 2 mRNA 表达进行半定量分析,见表 1、图 2。

表 1 中药对“怒伤肝”大鼠海马 GABA α 2 mRNA 表达的影响(ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	GABA α 2 mRNA
正常对照组	20	3.89 \pm 0.24 *
模型组	20	3.41 \pm 0.16
中药低剂量组	20	3.49 \pm 0.19
中药中剂量组	20	3.80 \pm 0.28 *
中药高剂量组	20	3.52 \pm 0.21

注: * $P < 0.05$, 与模型组比较

2.4 中药对“怒伤肝”大鼠血清及大脑皮层中孕酮水平的影响 见表 2。

2.5 中药对“怒伤肝”大鼠海马单胺类递质的影响

见表 3。

表 3 中药对“怒伤肝”大鼠海马单胺类递质的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NE(ng/g)	5-HT(ng/g)	5-HIAA(ng/g)	多巴胺(ng/g)	DOPAC(ng/g)
正常对照组	20	9.07 \pm 3.10 *	0.13 \pm 0.05 *	0.55 \pm 0.16	0.15 \pm 0.08	0.32 \pm 0.06 *
模型组	20	11.69 \pm 1.88	0.33 \pm 0.13	0.68 \pm 0.33	0.19 \pm 0.06	0.37 \pm 0.04
中药低剂量组	20	10.46 \pm 1.98	0.25 \pm 0.07	0.79 \pm 0.13	0.24 \pm 0.10	0.39 \pm 0.04
中药中剂量组	20	9.23 \pm 0.91 *	0.13 \pm 0.04 *	0.68 \pm 0.03	0.13 \pm 0.04	0.31 \pm 0.03 *
中药高剂量组	20	10.66 \pm 1.66	0.21 \pm 0.09	0.73 \pm 0.11	0.16 \pm 0.05	0.32 \pm 0.03 *

注: * $P < 0.05$, 与模型组比较; # $P < 0.05$, 与正常对照组比较

表 4 中药对“怒伤肝”大鼠脑干单胺类递质的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NE(ng/g)	5-HT(ng/g)	5-HIAA(ng/g)	多巴胺(ng/g)	DOPAC(ng/g)
正常对照组	20	9.54 \pm 0.63	0.40 \pm 0.12	0.73 \pm 0.23	0.08 \pm 0.03	0.18 \pm 0.02
模型组	20	10.63 \pm 1.21 #	0.57 \pm 0.10 #	0.84 \pm 0.11	0.13 \pm 0.03 #	0.23 \pm 0.02 #
中药低剂量组	20	8.89 \pm 0.94 *	0.52 \pm 0.12	0.92 \pm 0.20	0.08 \pm 0.05 *	0.20 \pm 0.03
中药中剂量组	20	9.36 \pm 0.89 *	0.50 \pm 0.16	0.93 \pm 0.30	0.09 \pm 0.05 *	0.19 \pm 0.03 *
中药高剂量组	20	10.39 \pm 0.73	0.37 \pm 0.04 *	0.79 \pm 0.22	0.08 \pm 0.02 *	0.21 \pm 0.04

注: * $P < 0.05$, 与模型组相比; # $P < 0.05$ 与正常对照组相比

3 讨 论

中医“怒伤肝”,肝主升,在志为怒,故怒与肝联系紧密。肝的现代医学指出,肝的生理功能状况及病理变化涉及人体的多个系统。有研究表明,中医的肝病证候,多出现神经、内分泌和免疫系统调节的变化^[12],肝郁时,机体的 NE、肾上腺素、5-HT 和多巴胺等中枢神经递质等免疫系统多项指标均发生改变,常伴有交感神经偏亢^[13-14]。这些信息提示,中医所说的肝的功能调节与西医的“神经-内分泌-免疫”网络密切相关。由此,肝之“主疏泄”,其中枢神经生物学的机制在整体上均可能与调节下丘脑-垂体-肾上腺轴有关。神经系统通过化学物质作为媒介进行信息传递神经递质,

从而产生生理效应^[15]。本课题通过检测神经递质-受体传导通路中 GABA 能神经通路 mRNA 的表达变化以及单胺递质的水平改变,从不同作用通路,不同作用靶点,不同作用环节来探讨柴胡疏肝散的作用机制。

氨基酸类神经递质主要包括 GABA、谷氨酸、甘氨酸等。GABA 是脑内主要的抑制性神经递质,本研究采用 RT-PCR 技术研究了柴胡疏肝散对“怒伤肝”大鼠 GABA α 2 mRNA 表达的影响。结果表明,柴胡疏肝散能使 GABA α 2 mRNA 表达升高,与模型组相比,中药中剂量组差异有统计学意义($P < 0.05$),说明柴胡疏肝散可通过上调 GABA α 2 mRNA 而增

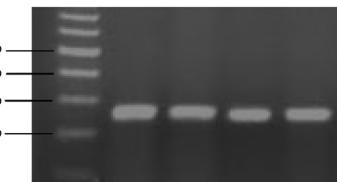


图 2 GABA α 2 的 mRNA 电泳图

表 2 中药对“怒伤肝”大鼠血清及大脑皮层中孕酮水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血清孕酮(ng/mL)	大脑皮层孕酮(ng/g)
正常对照组	20	101.62 \pm 70.13	80.59 \pm 31.98 *
模型组	20	96.41 \pm 88.33	52.82 \pm 19.43
中药低剂量组	20	98.21 \pm 68.52	51.78 \pm 18.99
中药中剂量组	20	102.57 \pm 85.02	88.76 \pm 38.47 *
中药高剂量组	20	100.72 \pm 46.74	49.73 \pm 18.42

注: * $P < 0.05$, 与模型组比较

强 GABA 的转导效应。本研究采用放射免疫技术研究柴胡疏肝散对“怒伤肝”大鼠孕酮的影响。结果显示,各组大鼠血清孕酮水平基本上无明显变化($P > 0.05$)。与模型组相比,中药中剂量组可显著升高大脑皮层的孕酮水平($P < 0.05$),说明柴胡疏肝散可能通过提高中枢系统中孕酮的水平,推动 GABA 产生,从而调节情绪应激反应。上述结果表明,柴胡疏肝散可通过增加 GABA- $\alpha 2$ mRNA 受体的表达,升高大脑皮层中孕酮的水平,多途径和多靶点地影响 GABA 神经通路,从而发挥调节作用。

本课题通过研究脑干、海马的单胺递质,检测 NE、5-HT、多巴胺及其代谢产物的水平变化,观察中药对“怒伤肝”模型单胺类递质的合成或代谢的调节变化,探讨了柴胡疏肝散调节“怒伤肝”的中枢机制。柴胡疏肝散能不同程度降低大鼠海马、大脑皮层及脑干组织中 NE、5-HT、多巴胺、DOPAC 水平,中药中剂量组与模型组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),主要是因为“怒伤肝”能引起去甲肾上腺素能神经与促肾上腺皮质激素释放激素神经元共同组成蓝斑-交感神经系统同时参与应激反应,蓝斑过度兴奋引起 NE 释放增加,而柴胡疏肝散对该应激进行了调节。另外,柴胡疏肝散降低 5-HT 的作用可能与其对“怒伤肝”应激产生 GABA 受体的拮抗作用有关,而且 5-HT 也通过改变其他神经递质系统,如去甲肾上腺素能和多巴胺能神经元的功能。“怒伤肝”应激对 5-HT 代谢产物 5-HIAA 的水平则无显著影响,推测“怒伤肝”应激对脑内 5-HT 的影响主要是抑制其在海马及脑干 5-HT 的合成而非降解过程。本研究显示,“怒伤肝”应激对大鼠海马组织中多巴胺的水平无明显影响,对脑干组织的多巴胺水平影响则较为显著,推测与多巴胺神经细胞主要集中在脑干的中脑黑质有关。中药给药组对大鼠海马及脑干组织中多巴胺的水平均无明显影响,可能是因为多巴胺对模型的敏感性不同造成的,提示应以“怒伤肝”大鼠不同的模型反复验证,由于条件所限,柴胡疏肝散对多巴胺的影响还有待于进一步研究。“怒伤肝”应激对多巴胺代谢产物 DOPAC 的水平有明显的影响,且中药可不同程度地降低 DOPAC 的水平。提示柴胡疏肝散对“怒伤肝”应激调节作用可能与其影响脑干中多巴胺的代谢有关。

4 结 论

“怒伤肝”应激对大鼠海马组织中多巴胺的水平无明显影响,对脑干组织的多巴胺水平影响则较为显

著,而柴胡疏肝散能不同程度地降低大鼠海马、大脑皮层及脑干组织中 NE、5-HT、多巴胺、DOPAC 水平。柴胡疏肝散可通过不同作用靶点,不同作用环节对“怒伤肝”大鼠进行调节。

参 考 文 献

- [1] 周少林.“七情致病”说[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(10): 71-72.
- [2] 贾敏, 褚静, 周玲玲. 肝郁气滞证乳腺增生大鼠血中激素水平的变化[J]. 甘肃中医, 2010, 23(4): 22-24.
- [3] 肖蕊, 周国华. 应激状态下促性腺激素释放激素及生长抑素变化的研究进展[J]. 蛇志, 2014, 26(1): 69-71.
- [4] 李宁, 高杰. 怒与怒伤肝的调控机制研究进展[J]. 山东中医药大学学报, 2013, 37(4): 347-349.
- [5] 孙烨, 齐向华. 七情过度伤五脏之气与寒热理论[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(1): 55-57.
- [6] 王一丹. 中医怒伤肝理论在临床中的应用[J]. 中国现代医生, 2017, 55(10): 131-133.
- [7] 彭云丽. 慢性应激诱发抑郁行为的炎性机制研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2013.
- [8] 张海林. 解郁清心安神汤抗抑郁作用及机制研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2013.
- [9] 宋洪涛. 慢性应激对大鼠肾素-血管紧张素系统和血管内皮的影响及电针的干预作用[D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [10] 乔明琦, 魏盛. 肝主疏泄机制研究的进展、主要问题及其展望[J]. 陕西中医药大学学报, 2014, 37(3): 4-8.
- [11] 王伟, 张艺馨, 谭龙, 等. 碘过量对大鼠脑组织和血清中单胺类神经递质浓度影响的研究[J]. 营养学报, 2017, 39(2): 200-202.
- [12] 许丽, 刘晓伟, 董秋安, 等. 天麻钩藤饮对愤怒应激大鼠下丘脑内单胺递质及其代谢产物含量的影响[J]. 四川中医, 2006, 24(6): 10-12.
- [13] ABERCROMBIE E D, JR R W K, ZIGMOND M J. Characterization of hippocampal norepinephrine release as measured by microdialysis perfusion: pharmacological and behavioral studies[J]. Neuroscience, 1988, 27(3): 897-904.
- [14] ROSSETTI Z L, PORTAS C, PANI L, et al. Stress increases noradrenaline release in the rat frontal cortex: prevention by diazepam[J]. Eur J Pharmacol, 1990, 176(2): 229-231.
- [15] GREENBERG P E, SISITSKY T, KESSLER R C, et al. The economic burden of anxiety disorders in the 1990s [J]. J Clin Psychiatry, 1999, 60(7): 427-435.

(收稿日期: 2018-05-15 修回日期: 2018-08-18)