

• 论 著 •

逍遥丸对“怒”应激大鼠海马差异表达基因的影响及机制探讨*

陈思洁¹, 肖 亮², 王 莹², 李玮婷², 付 勇³, 杨军平^{2△}

1. 江西中医药大学研究生院, 江西南昌 330004; 2. 江西中医药大学附属医院检验科, 江西南昌 330006;

3. 江西中医药大学附属医院针灸科, 江西南昌 330006

摘 要:目的 运用转录组学技术探究“怒”应激大鼠海马中差异表达基因及逍遥丸干预后差异表达基因的变化。方法 将 72 只 Wistar 大鼠随机分成正常组, “怒”应激模型对照组, 中药低、中、高剂量组和氟西汀组, 除正常组外, 其他组采用“足底电击+社会隔离法”制备“怒”应激大鼠模型。采用行为学试验评价大鼠行为变化; 酶联免疫吸附试验检测海马中 5-羟色胺(5-HT)、血清中皮质醇(CORT)水平; 提取海马总 RNA 进行转录组测序和分析, 并用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)对目的基因的表达量加以验证。结果 相较于正常组, “怒”应激模型对照组可见明显动物行为学改变, 海马 5-HT、血清 CORT 水平均升高($P<0.01$); 相较于“怒”应激模型对照组, 中药高剂量组逆转了大鼠行为学改变, 海马 5-HT、血清 CORT 水平降低($P<0.01$)。转录组测序结果表明, 逍遥丸主要通过调控细胞代谢、血清素水平、损伤与炎症、凝血功能、免疫功能、氧化应激等生物学过程干预“怒”情绪应激。相较于正常组, “怒”应激模型对照组海马 Rtkn、Pf4、Hbb-b1、Hbb mRNA 表达均上调, Slc25a22 mRNA 表达下调($P<0.05$); 相较于“怒”应激模型对照组, 中药组大鼠海马 Rtkn、Pf4、Hbb-b1、Hbb mRNA 表达均下调, Slc25a22 mRNA 表达上调($P<0.05$)。结论 “怒”应激能促使大鼠产生行为学改变, 可引起海马中基因表达和信号通路的改变, 逍遥丸可能通过调节 Rtkn、Pf4、Hbb-b1、Hbb、Slc25a22 这些基因表达水平回调这种改变, 起到抗“怒”应激的作用。

关键词: 转录组测序; 逍遥丸; “怒”应激; 大鼠; 海马组织

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.17.003

中图法分类号: R28

文章编号: 1673-4130(2023)17-2057-08

文献标志码: A

Effect and mechanism of Xiaoyao Pill on hippocampal differentially expression genes in rats under "anger" stress*

CHEN Sijie¹, XIAO Liang², WANG Ying², LI Weiting², FU Yong³, YANG Junping^{2△}

1. Graduate School, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang, Jiangxi 330004, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 3. Department of Acupuncture and Moxibustion, Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang, Jiangxi 330006, China

Abstract: Objective To investigate the differentially expression genes in hippocampus of rats under "anger" stress and the changes of differentially expression genes after Xiaoyao Pill intervention by using transcriptomics techniques. **Methods** Totally 72 Wistar rats were randomly divided into normal group, "anger" stress model control group, Chinese medicine low-dose, medium-dose and high-dose groups and fluoxetine group. Except the normal group, the other groups were treated with "foot shock + social isolation" to prepare the rat model of "anger" stress. Behavioral test was used to evaluate the behavioral changes of rats. The levels of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in hippocampus and serum cortisol (CORT) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Total RNA was extracted from hippocampus for transcriptome sequencing and analysis, and the expression level of target gene was verified by quantitative real-time PCR (RT-qPCR). **Results** Compared with the normal group, the "anger" stress model control group showed significant changes in animal behavior, the hippocampal 5-HT and serum CORT levels were increased ($P<0.01$). Compared with the "anger" stress model control group, the high-dose Chinese medicine group reversed the behavioral changes of rats, and decreased the levels of 5-HT and serum CORT in the hippocampus ($P<0.01$). Transcriptome sequencing results showed that Xiaoyao Pill mainly interferes with anger emotional stress by regulating cell me-

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81860806); 江西中医药大学校级科技创新团队发展计划(CXTD22012)。

作者简介: 陈思洁, 女, 硕士研究生在读, 主要从事中西医结合免疫学方向的研究。△ 通信作者, E-mail: yyfyjp0507@126.com。

tabolism, serotonin level, injury and inflammation, coagulation function, immune function, oxidative stress and other biological processes. Compared with normal group, the mRNA expressions of Rtn, Pf4, Hbb-b1 and Hbb in hippocampus of the "anger" stress model control group were up-regulated, while the mRNA expression of Slc25a22 was down-regulated ($P<0.05$). Compared with "anger" stress model control group, mRNA expressions of Rtn, Pf4, Hbb-b1 and Hbb in hippocampus of rats in Chinese medicine group were down-regulated, while mRNA expression of Slc25a22 was up-regulated ($P<0.05$). **Conclusion** "Anger" stress could promote behavioral changes in rats, and could cause changes in gene expression and signaling pathway in hippocampus. Xiaoxiao Pill may play a role in anti-anger stress by regulating the change of gene expression level of Rtn, Pf4, Hbb-b1, Hbb and Slc25a22.

Key words: transcriptome sequencing; Xiaoyao pill; "anger" stress; rat; hippocampus

应激是外部压力作用于机体,导致的一系列网络调节和生理反应。短期应激能够增强机体对外部环境的适应能力,反复或长期应激则会破坏机体的调节系统,出现一系列神经内分泌、免疫和代谢等的异常和紊乱,导致机体出现情绪和行为异常^[1]。近些年来,情绪心理应激作为心血管疾病、结直肠癌、不孕症等多种疾病的致病因素而成为研究热点^[2]。

源自中医理论体系的七情致病论强调情志活动与疾病的关系,“怒”情志首伤肝,《医编》曰:“百病皆生于郁...皆肝木之病矣”,“肝主疏泄”与情志疾病的发生发展有着密不可分的联系^[3]。研究表明,“肝主疏泄”这一功能与神经-内分泌-免疫(NEI)网络息息相关,通过中枢多种神经递质及其神经肽、激素等的表达变化来调节相关脏腑的功能,与情绪心理应激的免疫功能调控密切相关^[4]。逍遥丸作为抗“怒”应激的首选方药,其被广泛应用于现代心身医学划分的情绪心理应激相关疾病中^[5-6],对机体内稳态的破坏具有较好的治疗作用,但目前有关逍遥丸与情绪心理应激在基因水平方面的研究鲜见相关报道。

转录组测序技术(RNA-Seq)是一种从生物体水平进行基因转录组分析的技术手段,能够从分子层面揭示疾病的发生发展过程及多靶点药物的作用机制,被广泛应用于各个领域,对研究情志致病起着重要的作用。海马体是应激性刺激中受损最严重的大脑区域之一,与情绪和行为有着密切的联系^[7-9]。因此,本研究通过 RNA-Seq 分析正常、“怒”应激及逍遥丸干预后大鼠海马的差异表达基因(DEG),并对测序结果进行生物信息学分析及验证,以期从基因组学层面探究“怒”情绪应激的生物学机制及逍遥丸抗“怒”应激的作用机制,为进一步筛选“怒”应激相关基因和中药逍遥丸的药效靶基因等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料来源 选用 Wistar 大鼠(SPF 级)72 只,SD 大鼠(SPF 级)12 只,均为雄性,8 周龄,体质量(200±20)g;两种品系的大鼠均由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供。动物合格证号:SCXK(京)2019-0010。将大鼠随机分笼适应性喂养 1 周,不限饮食,室温 20~25 ℃,早上 7 点开灯,晚上 7 点熄灯^[10]。实

验方案已通过江西中医药大学动物实验伦理委员会批准,审核批号:JZLLSC20220814。

1.2 仪器与试剂 DK-8D 型电热恒温水槽(上海森信实验仪器有限公司),VII A 7 Real-time PCR System(美国 Applied Biosystems 公司),Nanodrop™ One 超微量紫外分光光度计(美国 Thermo 公司),NanoDrop ND-1000(美国 NanoDrop 公司),Gene Amp PCR System 9700(美国 Applied Biosystems 公司),Agilent 2100 Bioanalyzer(美国 Agilent 公司),Illumina HiSeq2000/2500/3000/4000(美国 Illumina 公司)。逍遥丸(仲景宛西制药股份有限公司,国药准字:Z41021831),氟西汀胶囊(苏州中化药品工业有限公司,批号:J20200039),5-HT、CORT 酶联免疫吸附试验(ELISA)测定试剂盒(江西博茵达生物科技有限公司,批号分别为 MM-0442R1、GT10870)、TRIZOL 试剂(美国 Invitrogen 公司,批号 10296-028),异丙醇、氯仿(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为 40064391、10006818),RNA 酶抑制剂、RiboZero Magnetic Gold Kit (Human/Mouse/Rat)、KAPA Stranded RNA-Seq Library Prep Kit(Illumina,批号 KK8401)。

1.3 方法

1.3.1 造模 参照文献[10-11]方法,采用“足底电击+社会隔离法”对孤养的 Wistar 大鼠制备“怒”应激模型。为孤养大鼠制造早晚颠倒的生活环境,晚上 7 点开灯,早上 7 点熄灯;每天不定时进行侵犯鼠干扰(随机选取 1 只 SD 大鼠放入模型鼠的单笼,持续 15 min),进行无法逃避的足底电击(电击棒 3 000 V,持续 15 min),不限饮食,持续 21 d(正常组大鼠与侵犯鼠隔离声音饲养且光线正常)。

1.3.2 分组与给药 Wistar 大鼠随机分成正常组(12 只)和“怒”应激模型组(60 只),正常组每 6 只 1 笼,“怒”应激模型组单笼(37 cm×27 cm×17 cm)孤养,并按上述方法复制“怒”应激模型,正常组大鼠不做处理。SD 大鼠作为侵犯鼠,实验结束后废弃处理。造模 1 周后,60 只“怒”应激模型组大鼠随机分出 48 只进入中药低、中、高剂量组和氟西汀组,每组 12 只,并于每日应激造模后分别给予含生药量为 0.45

g/kg·d、0.90 g/kg·d、1.80 g/kg·d 的逍遥丸混悬液^[12]及 10 mg/kg·d 的氟西汀^[13]灌胃治疗 2 周,中药低、中、高剂量组统称中药组,余下 12 只作为“怒”应激模型对照组,正常组与“怒”应激模型对照组灌服生理盐水,灌胃容积为 1 mL/100 g 体质量。实验第 21 天晚上 8 点大鼠禁食,翌日上午 8 点开始麻醉,采用眼静脉取血方式收集血液,静置后离心(3 000 r/min,15 min),分离血清待测;用颈椎脱臼法处死大鼠,于冰盒上摘取海马组织,放入-80℃冰箱。

1.3.3 动物行为学试验 (1)旷场试验^[14-15]。于实验前及实验第 3 周末进行。试验全程保持安静,准备旷场箱大小为 1.0 m×1.0 m×0.5 m,底面分为 25 个等方格,靠内壁一圈为周围格,其余为中央格。启动摄像仪器,提起大鼠尾巴中后段将其放置于旷场箱中央,记录大鼠 3 min 运动轨迹。采用软件分析以下各项得分,①水平得分:大鼠经过格子数;②垂直得分:大鼠直立次数。(2)攻击行为试验^[16]。于实验前及实验第 3 周末进行。将单只大鼠放入待测笼,启动摄像仪器,随机选取 1 只 SD 侵犯鼠放入大鼠笼中,记录 15 min 内大鼠的行为变化,计算以下得分,①攻击次数;②攻击累积时间。

1.3.4 海马 5-HT、血清 CORT 水平测量 严格按照 ELISA 试剂盒说明书检测海马中 5-HT、血清中 CORT 水平。

1.3.5 海马组织收集与 RNA-Seq 分别从正常组、“怒”应激模型对照组、中药高剂量组中随机选择 5 只大鼠的海马组织作为样本进行测序分析。提取各组海马的总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳检测和紫外分光光度计定量检验后,去除 rRNA,富集 mRNA 并构建

cDNA 文库,用 qPCR 方法进行文库的最终定量,对合格 cDNA 文库进行测序。

1.3.6 转录数据与基因差异表达分析 原始测序数据经过严格的测序质量控制,在测序完成后,需要对 Illumina 测序仪产生 FASTQ 格式的原始序列进行质检以评估能否进行后续分析,通过统计 Q30 来判断测序质量,一般 Q30≥80%表示测序质量极高。本研究 Q30(评估测序质量的参数)均超过 90%,说明样本测序质量极高。对转录组测序的原始数据进行过滤后通过 Ensembl 数据库与参考基因组进行比对,计算基因的 FPKM 值,设定阈值为显著性水平 $P\leq 0.05$ 且组内 FPKM 均值≥0.5,差异倍数≥1.5 或≤0.667 来筛选差异表达基因。

1.3.7 基因本体(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 对筛选获得的差异表达基因,进行 GO 与 KEGG 通路富集分析。其中 GO 分析包括以下 3 个子条目:分子功能(MF)、细胞组成(CC)、参与的生物学过程(BP)^[17]。

1.3.8 逍遥丸回调差异表达基因分析^[18] 使用 Venny2.1.0 工具将正常组 vs.“怒”应激模型对照组 vs. 中药组的差异表达基因取交集,进一步筛选逍遥丸在回调“怒”应激致病网络中的重要基因。

1.3.9 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)验证 用 TRIZO 提取海马总 RNA 并检测浓度,采用逆转录+扩增对转录组测序的交集差异表达基因进行 RT-qPCR 验证。引物由英骏生物技术有限公司合成。使用基因 β -actin 作为内参,目的基因扩增后的结果经过内参校正,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各基因的相对表达量,各引物序列见表 1。

表 1 待测基因引物序列

基因名	双向引物序列	退火温度(℃)	产物长度(bp)
β -actin	F:5'CGAGTACAACCTTCTTGCAGC3'	60	202
	R:5'ACCCATACCCACCATCACAC3'		
Hbb	F:5'TGATGATGTTGGTGCGCAG3'	60	100
	R:5'AGCAGAGGCAGAGGACAGG3'		
Hbb-b1	F:5'CTTTGGCAGCCTCAGTGAAC3'	60	99
	R:5'TGGTGGCCCATCATAATCAC3'		
Pf4	F:5'TTCTTCTGGGTCTGCTGTTGC3'	60	163
	R:5'CAGTGGGGTCCTGCTTTGAT3'		
Rtkn	F:5'GTGCAATAGCCGATTCTCA3'	60	171
	R:5'TCCTTCCACATGAGTGGGAT3'		
Slc25a22	F:5'CTAAGACACGGCTGCAGAAC3'	60	174
	R:5'AGAAGTCATTAGCAGCCAGC3'		

1.4 统计学处理 统计学分析采用 SPSS26.0 软件,符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 “怒”应激大鼠旷场试验结果 实验期间“怒”应激模型对照组大鼠在造模过程中死亡 1 只,剩余 11 只大鼠纳入最终实验。实验前 1 天,各组水平得分、垂直得分差异均无统计学意义($P>0.05$)。实验第

21 天,相较于正常组,“怒”应激模型对照组水平得分、垂直得分下降($P<0.01$);相较于“怒”应激模型对照组,中药中剂量组、中药高剂量组和氟西汀组水平得分、垂直得分上升($P<0.01$),但中药高剂量组和氟西汀组组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

2.2 “怒”应激大鼠攻击行为试验结果 实验前 1 天,各组大鼠攻击次数和攻击累积时间差异均无统计

学意义($P>0.05$)。实验第 21 天,相较于正常组,“怒”应激模型对照组攻击次数、攻击累积时间增加($P<0.01$);相较于“怒”应激模型对照组,中药中剂量组、中药高剂量组和氟西汀组攻击累积时间减少($P<0.01$),中药高剂量组和氟西汀组攻击次数减少($P<0.01$),但中药高剂量组和氟西汀组组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 2 各组大鼠旷场试验结果($\bar{x}\pm s$,分)

组别	<i>n</i>	水平得分		垂直得分	
		实验前 1 天	实验第 21 天	实验前 1 天	实验第 21 天
正常组	12	79.75±16.44	76.33±12.38	12.08±2.75	10.67±2.19
“怒”应激模型对照组	11	84.09±18.50	38.64±20.89 [*]	12.18±4.09	4.64±2.11 [*]
中药低剂量组	12	88.58±20.65	45.67±18.40	13.92±5.23	5.92±1.68
中药中剂量组	12	92.33±20.83	59.50±13.15 [#]	13.08±4.25	7.50±1.93 [#]
中药高剂量组	12	82.58±29.86	74.67±13.18 [#]	13.67±2.35	9.83±2.33 [#]
氟西汀组	12	86.50±21.20	74.42±12.35 [#]	13.58±3.09	10.17±1.99 [#]
<i>F</i>		0.518	13.219	0.516	17.153
<i>P</i>		>0.05	<0.001	>0.05	<0.001

注:与同时段正常组比较,^{*} $P<0.05$;与同时段“怒”应激模型对照组比较,[#] $P<0.05$ 。

表 3 各组大鼠攻击行为试验结果($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	攻击次数		攻击累积时间(s)	
		实验前 1 天	实验第 21 天	实验前 1 天	实验第 21 天
正常组	12	2.17±1.47	2.58±1.51	5.83±3.54	5.92±2.31
“怒”应激模型对照组	11	2.55±1.75	9.91±5.01 [*]	4.45±3.45	49.00±22.47 [*]
中药低剂量组	12	2.75±1.48	8.33±3.80	5.42±3.00	38.17±17.61
中药中剂量组	12	2.58±2.07	7.50±3.15	4.83±3.81	21.25±6.82 [#]
中药高剂量组	12	2.75±1.96	3.25±1.22 [#]	6.67±5.12	8.25±3.98 [#]
氟西汀组	12	3.00±1.60	2.50±1.45 [#]	7.42±1.53	6.58±4.62 [#]
<i>F</i>		0.310	14.009	0.855	26.620
<i>P</i>		>0.05	<0.001	>0.05	<0.001

注:与同时段正常组比较,^{*} $P<0.05$;与同时段“怒”应激模型对照组比较,[#] $P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠海马 5-HT、血清 CORT 水平比较 相较于正常组,“怒”应激模型对照组 5-HT、CORT 水平升高($P<0.01$);相较于“怒”应激模型对照组,中药低剂量组、中药中剂量组、中药高剂量组和氟西汀组大鼠 5-HT、CORT 水平均降低($P<0.01$),但中药高剂量组和氟西汀组组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

2.4 RNA-Seq 结果分析

2.4.1 差异表达基因分析 使用 Ballgown 进行样本表达水平的定量,分析不同组间基因的差异表达,筛选出差异有统计学意义的基因($P\leq 0.05$,差异倍数 ≥ 1.5 或 ≤ 0.667 且组内 FPKM 均值 ≥ 0.5)。相较于正常组,“怒”应激模型对照组有 43 个差异表达基因,其中上调基因 28 个,下调基因 15 个;相较于“怒”应激模型对照组,中药组差异表达基因共有 42 个,其

中上调基因 22 个,下调基因 20 个。见图 1。

表 4 各组大鼠海马 5-HT、血清 CORT 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	5-HT(ng/L)	CORT(μ g/L)
正常组	12	416.86±24.65	163.39±9.40
“怒”应激模型对照组	11	559.83±24.65 [*]	218.51±6.14 [*]
中药低剂量组	12	519.79±23.14 [#]	200.93±7.56 [#]
中药中剂量组	12	479.95±16.01 [#]	185.60±9.15 [#]
中药高剂量组	12	448.27±20.31 [#]	177.60±7.76 [#]
氟西汀组	12	449.29±19.62 [#]	178.64±6.98 [#]
<i>F</i>		57.370	69.031
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与正常组比较,^{*} $P<0.05$;与“怒”应激模型对照组比较,[#] $P<0.05$ 。

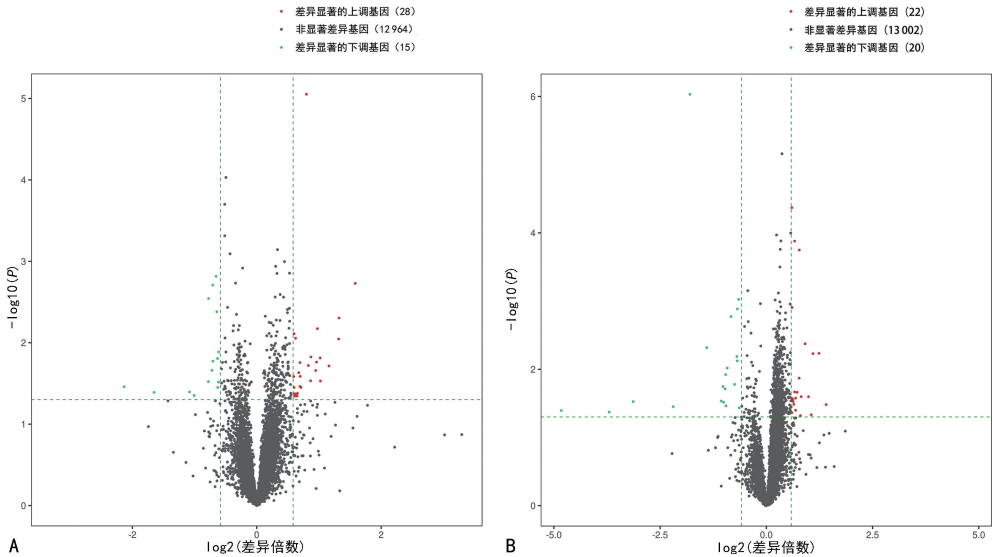
2.4.2 差异表达基因 GO 富集分析结果 相较于正常组,“怒”应激模型对照组差异表达基因富集到 BP 条目 34 条,上调差异表达基因主要涉及细胞氧化解

毒,红细胞、骨髓细胞生长,血小板激活,对有毒物质的反应等;下调差异表达基因主要涉及细胞蛋白质复杂装配、组成。富集到 MF 条目 10 条,上调差异表达基因主要涉及氧化还原酶活性、抗氧化活性、有机酸结合、血红素结合、结合珠蛋白结合、四吡咯结合;下调差异表达基因主要涉及蛋白质结构域。富集到 CC 条目 10 条,上调差异表达基因主要涉及结合珠蛋白-血红蛋白复合;下调差异表达基因主要涉及线粒体膜、细胞及细胞器内膜。

相较于“怒”应激模型对照组,中药组差异表达基因富集到 BP 条目 50 条,上调差异表达基因主要涉及蛋白质折叠、基因转译、RNA 生物合成、细胞元调控;下调差异表达基因主要涉及血小板激活、血液凝固与止血、细胞氧化解毒、分解代谢。富集到 MF 条目 16 条,上调差异表达基因主要涉及 RNA 聚合酶 II、DNA 结合转录、蛋白质二聚活动;下调差异表达基因

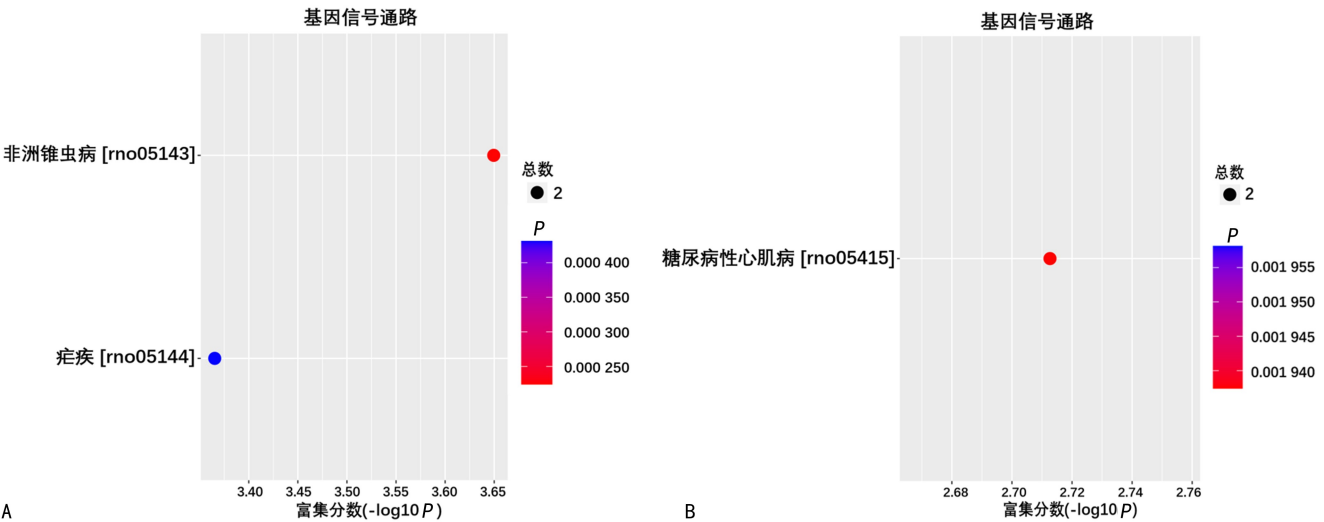
主要涉及氧化还原酶活性、抗氧化活性、有机酸结合、血红素结合、结合珠蛋白结合、四吡咯结合。富集到 CC 条目 13 条,上调差异表达基因主要涉及细胞内体,线粒体被膜、膜间隙,核小点;下调差异表达基因主要涉及细胞外空隙、结合珠蛋白-血红蛋白复合、血红蛋白复合体、分泌泡、分泌泡囊、细胞质。

2.4.3 差异表达基因 KEGG 通路富集分析结果
“怒”应激模型对照组与正常组差异表达基因比较,共富集到 3 条通路,其中上调差异表达基因富集到 2 条,涉及非洲锥虫病、疟疾;下调差异基因富集到 1 条,涉及糖尿病性心肌病。中药组与“怒”应激模型对照组差异表达基因比较,共富集到 3 条通路,其中上调差异表达基因富集到 1 条,涉及单纯疱疹病毒 1 型;下调差异表达基因富集到 2 条,涉及非洲锥虫病、疟疾。见图 2、3。



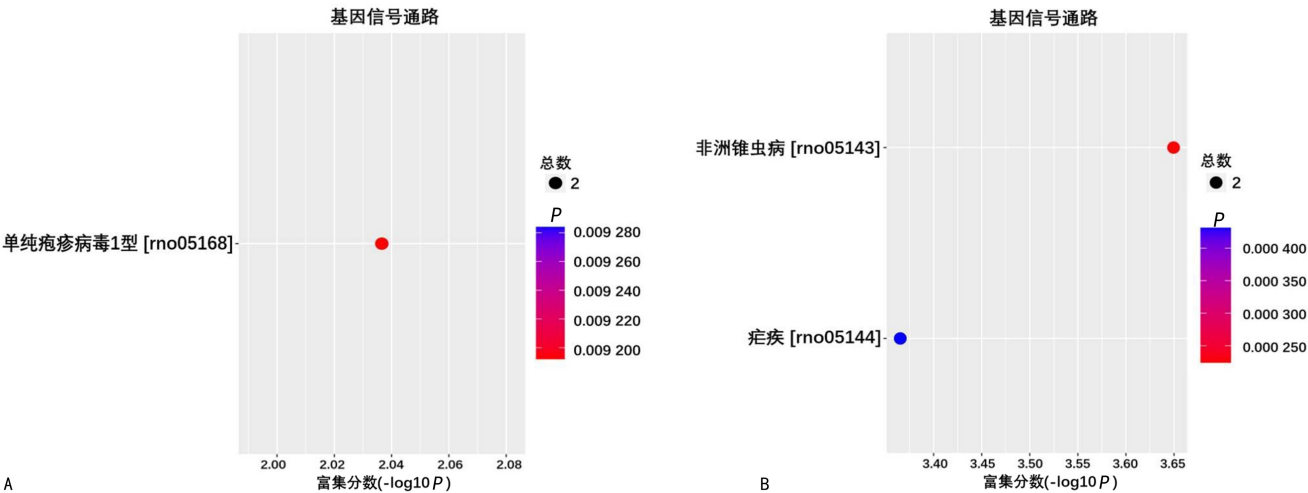
注:A 为“怒”应激模型对照组 *vs.* 正常组;B 为中药组 *vs.* “怒”应激模型对照组;左右两条纵向的绿线分别为上调和下调,绿色横线为 *P* 阈值。

图 1 差异表达基因的 mRNA 火山图



注:A 为上调差异表达基因,B 为下调差异表达基因;图中条目按照 *P* 从低到高排列,纵坐标表示 *P*($-\log_{10}$ 转化)。

图 2 “怒”应激模型对照组 *vs.* 正常组差异表达基因 KEGG 通路富集分析



注:A 为上调差异表达基因,B 为下调差异表达基因;图中条目按照 P 从低到高排列,纵坐标表示 $P(-\log_{10} \text{转化})$ 。

图 3 中药组 *vs.* “怒”应激模型对照组差异表达基因 KEGG 通路富集分析

2.4.4 逍遥丸回调差异表达基因分析 将正常组 *vs.* “怒”应激模型对照组 *vs.* 中药组先上调后下调的差异表达基因取交集,得到 1 个交集基因 Slc25a22;将正常组 *vs.* “怒”应激模型对照组 *vs.* 中药组先下调后上调的差异表达基因取交集,得到 4 个交集基因 Rtkn、Pf4、Hbb-b1、Hbb,表明逍遥丸可能通过调节这些基因表达水平回调“怒”应激致病。见表 5、图 4。

2.4.5 RT-qPCR 验证差异基因结果 相较于正常组,“怒”应激模型对照组 Rtkn、Pf4、Hbb-b1、Hbb mRNA 表达均上调 ($P < 0.05$),Slc25a22 mRNA 表达下调 ($P < 0.05$);相较于“怒”应激模型对照组,中药组 Rtkn、Pf4、Hbb-b1、Hbb mRNA 表达均下调 ($P < 0.05$),Slc25a22 mRNA 表达上调 ($P < 0.05$),与 RNA-Seq 结果一致。见表 6。

表 5 逍遥丸回调差异基因表

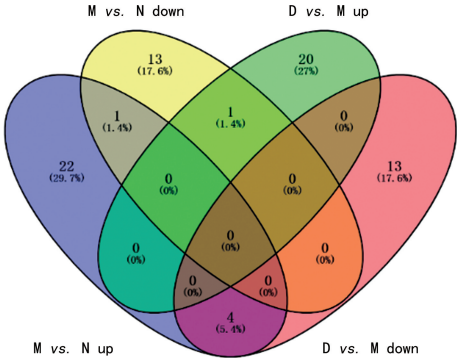
基因	正常组 FPKM 值	“怒”应激模型对照组 FPKM 值	中药组 FPKM 值	基因描述
Rtkn	0.347 551 714	1.931 809 377	0.133 394 392	rhotekin 基因
Pf4	0.535 156 126	1.858 544 922	0.852 898 253	血小板因子 4
Hbb-b1	2.659 589 586	3.683 217 765	2.726 812 490	血红蛋白,β1
Hbb	3.188 591 537	4.059 093 235	3.038 170 894	血红蛋白,β
Slc25a22	1.081 025 776	0.000 000 000	1.057 663 210	溶质载体家族 25,成员 22

注:每组 FPKM 值为组间基因对数尺度 FPKM 的平均值。

表 6 逍遥丸对“怒”模型大鼠关键基因 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	Rtkn	Pf4	Hbb-b1	Hbb	Slc25a22
正常组	0.01±0.00	0.02±0.01	0.06±0.02	0.17±0.04	0.01±0.00
“怒”应激模型对照组	0.02±0.00*	0.06±0.01*	0.16±0.02*	0.46±0.14*	0.01±0.00*
中药组	0.01±0.00 [#]	0.02±0.01 [#]	0.09±0.03 [#]	0.22±0.04 [#]	0.01±0.00 [#]

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与“怒”应激模型对照组比较,[#] $P < 0.05$ 。



注:N 为正常组;M 为“怒”应激模型对照组;D 为中药组;up 为上调;down 为下调。

图 4 逍遥丸回调大鼠海马组织差异表达基因的维恩图

3 讨论

随着社会的迅速发展与现代医学研究的进步,负性情绪致病已成为研究的一大热点。七情致病论与情绪心理应激是传统中医和现代医学关于情志致病研究的重要内容,二者在理论框架与发病原理方面存在相似性,都认为负性情绪与健康 and 疾病密切相关^[19]。七情中的“怒”情志是不良负性情绪的核心,“怒”首伤肝,导致肝失疏泄,诸病丛生。有多项研究表明,长期心理应激和情绪异常容易引起体内 NEI 网络功能失衡,伴随下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA 轴)和单胺类神经递质分泌失常,进一步诱发多系统的异常变化,主要涉及内分泌、消化、生殖和心脑血管系

统等^[20-23]。

课题组前期研究发现,采用“社会隔离+足底电击法”制备的大鼠模型出现易激惹、怒叫、呼吸急促等典型怒表现^[10,24]。本研究基于前期实验的基础上,采用孤养及昼夜颠倒改变大鼠生活环境,通过不定时的同类入侵及足底电击,从心理、社会、躯体 3 个方面制造应激源因素。在造模期间应激大鼠表现出对外界刺激高度敏感、易激易怒,对侵犯鼠出现直立对峙、追逐攀压、怒叫威胁等主动攻击行为。行为学试验提示,大鼠情绪紧张、烦躁焦虑,对外界探究的积极性降低,说明“怒”应激模型的建立是有效的。

现代医学认为,单胺类神经递质可作为情绪异常疾病的诊断标志物^[25]。研究发现,身体应激和心理应激能够引起海马内神经递质去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)水平抑制,5-HT 水平升高,促进 HPA 轴异常激活,导致其终末激素 CORT 呈高水平分泌^[26-27]。同时,NE 与 CORT 水平的改变还可引起下丘脑负反馈抑制机制受损,诱导小胶质细胞重编码,促进神经细胞凋亡,损害海马的结构和功能,导致中枢机制的失调^[1]。本研究结果显示,“怒”应激组大鼠海马 5-HT 与血清 CORT 水平均显著升高,提示大鼠 HPA 轴异常亢进并成功处于心理应激状态,逍遥丸干预后,以上指标均得到显著改善,说明逍遥丸抗“怒”情绪应激的机制涉及中枢单胺类神经递质与 HPA 轴的神经-内分泌功能调节,并与 5-HT 和 CORT 的高水平分泌有关。

相关研究结果证实,“怒”情绪应激大鼠体内存在内分泌-炎症反应网络紊乱、线粒体网络失衡、血液黏度上升及氧化应激的情况^[28-30]。本研究差异表达基因功能富集分析结果显示,“怒”应激相关基因涉及氧化应激、代谢、免疫及凝血功能、细胞因子生成和线粒体网络,且与糖尿病性心肌病有关,其功能范围与 NEI 网络密切相关。逍遥丸对“怒”应激的调节主要集中于改善氧化应激、凝血异常、代谢紊乱、免疫炎症反应及线粒体网络失常。将差异表达基因取交集得到逍遥丸干预后具有显著翻转效果的 5 个基因并进行 RT-qPCR 验证,结果与 RNA-Seq 数据相符。其中 Rtkn 是 Rho 效应因子,Rtkn 能够与 TIP-1 相互作用以促进 Rho 介导的血清应答元件的激活^[31],其表达量与多种癌症皆有密切联系^[32]。本研究“怒”应激大鼠血清应答元件 CORT 水平的升高可以为海马组织中 Rtkn 水平上调提供理解。Pf4 除了有止血功能,也含有黏附分子、促炎和免疫调节化合物。有研究表明,精神压力和高水平的循环肾上腺素生理水平可增强血小板在体内的聚集,上调髓系细胞中炎症细胞因子的表达^[33]。Hbb 和 Hbb-b1 都属于血红蛋白基因,研究发现,血红蛋白基因的表达量随着应激时间的增

加而增加,慢性应激可能参与血管系统功能、损伤和炎症的基因调控^[34-35]。Slc25a22 是一种线粒体谷氨酸转运蛋白,具有促进细胞合成天门冬氨酸,动员丝裂原激活的蛋白激酶及胞外信号调节的激酶信号,减弱氧化应激的作用^[36]。综合上述基因功能的分析,推测逍遥丸对“怒”情绪应激的治疗作用可能主要集中在维持血清素水平稳态、调节代谢、调控凝血和免疫功能、减轻损伤与炎症及抵抗氧化应激方面。

综上所述,“怒”情绪应激反应可影响中枢神经递质和 HPA 轴的正常分泌,与 NEI 网络的异常活动密切相关,逍遥丸可通过调节 Rtkn、Pf4、Hbb-b1、Hbb、Slc25a22 这些基因回调“怒”应激致病。其结果值得进一步深入研究和探讨,且有助于深化对中医药调治分子机理的认识,为基因情绪应激研究提供新的线索。然而研究存在一些不足:由于仪器与试剂缺乏,未能验证海马表型的差异及证明差异表达基因与海马表型的相关性;其次,在后续实验中计划采用基因敲除等方法验证差异表达基因的临床意义,深入开展多水平的研究,进一步佐证研究结果。

参考文献

- [1] BOTTACCIOLI A, BOTTACCIOLI F, CAROSELLA A, et al. Psychoneuroendocrinology-based meditation (PNEIMED) training reduces salivary cortisol under basal and stressful conditions in healthy university students: results of a randomized controlled study [J]. *Explore* (NY), 2019, 16(3): 189-198.
- [2] WU J X, LIN S, KONG S B. Psychological stress and functional endometrial disorders: update of mechanism insights [J]. *Front Endocrinol*, 2021, 12: 690255.
- [3] 袁培, 周昌乐, 许家伦. 中医情志疗法在抑郁症诊疗中的应用 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(8): 4853-4856.
- [4] 赵昌林. 肝主疏泄为调控免疫功能的核心 [J]. *中医杂志*, 2017, 58(7): 568-571.
- [5] 马晓雪, 裴媛. 逍遥散治疗应激性疾病研究概述 [J]. *环球中医药*, 2019, 12(7): 1129-1132.
- [6] 修春, 宓德卿, 王宁生. 逍遥散的药理研究进展 [J]. *中国药房*, 2007, 18(9): 702-703.
- [7] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(1): 57-63.
- [8] 周瑞, 项昌培, 高金环, 等. 基于转录组测序的谷红注射液抗脑缺血分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(7): 195-203.
- [9] LESCHIK J, LUTZ B, GENTILE A. Stress-related dysfunction of adult hippocampal neurogenesis-an attempt for understanding resilience? [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, (14): 7339.
- [10] 陈俊贤, 李玮婷, 杨军平, 等. 免疫调控受体 TIGIT 在

- “怒”模型大鼠胸腺及外周血单个核细胞表达的意义[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(26): 4183-4189.
- [11] 李越峰, 司昕蕾, 曹瑞, 等. 四逆散对创伤后应激障碍及睡眠障碍大鼠海马区神经元放电波幅的影响研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(10): 1203-1205.
- [12] 王春荣, 王海平, 张立娜, 等. 疏肝滋阴方配合耳穴贴压治疗肝郁阴虚型女童单纯性乳房早发育临床疗效观察[J]. 中国全科医学, 2019, 22(9): 1074-1077.
- [13] 吕霞, 黄丽, 张美琳, 等. 氟西汀调节 TLR4/NF- κ B/NLRP3 炎症体信号通路改善 CUMS 大鼠抑郁样行为[J]. 天津医药, 2023, 51(2): 160-165.
- [14] JIN S T, ZHAO Y, JIANG Y H, et al. Anxiety-like behaviour assessments of adolescent rats after repeated maternal separation during early life[J]. *Neuroreport*, 2018, 29(8): 643-649.
- [15] HU C L, LUO Y, WANG H, et al. Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress[J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0185129.
- [16] 徐铭悦, 倪红梅, 何裕民, 等. 甘麦大枣汤对“怒”模型大鼠行为学特征的影响[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(6): 2736-2739.
- [17] 姚嘉, 李冠乔, 杨时平, 等. Hsa-miR-98-5p/DKK3 信号轴对乳腺癌细胞生物学行为的影响[J]. 中国癌症杂志, 2021, 31(9): 807-816.
- [18] 刘梦柳, 高耀, 田俊生, 等. 文拉法辛对 CUMS 大鼠抗抑郁作用的转录组学机制研究[J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(15): 1220-1227.
- [19] 陈小野, 彭鑫. 情绪: 生机的度量[J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(2): 165-166.
- [20] 张懿, 苏文君, 蒋春雷. 应激生理指标皮质醇和 α -淀粉酶的研究进展[J]. 军事医学, 2017, 41(2): 146-149.
- [21] 王德杰, 刘兴国, 张东. 糖皮质激素受体的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(8): 1592-1594.
- [22] 陈全萍, 谢春毅, 张家美, 等. 逍遥散对慢性心力衰竭合并抑郁患者心功能、炎症介质和血清 5-HT、NE、CORT 的影响[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(21): 4063-4067.
- [23] 秦中朋, 赵凰宏, 詹向红. 怒伤肝理论现代研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2020, 18(7): 121-124.
- [24] 卢黄欣, 陈俊贤, 李玮婷, 等. TIGIT 及其配体 CD155 在“怒”应激大鼠胸腺细胞中的表达及其意义[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(1): 1-6.
- [25] 刘佳, 许可, 张兰. 肝郁脾虚证动物模型评价方法[J]. 中医药导报, 2019, 25(23): 120-122.
- [26] 禚璇, 戎志斌, 刘纯, 等. 柴胡疏肝散对肝郁型老年性痴呆大鼠模型行为学及海马单胺神经递质的影响[J]. 深圳中西医结合杂志, 2013, 23(3): 129-134.
- [27] 李晓红, 余彬, 吴晓君, 等. 逍遥散对慢性束缚应激肝郁脾虚证大鼠 HPA 轴及 IL-13、IL-17 的影响[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(8): 1815-1816.
- [28] 袁清洁, 郭建友, 王建伟, 等. 基于皮质酮-炎症反应-线粒体网络研究抑郁症肝郁脾虚病机及醒脾解郁方干预效应[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(5): 2241-2245.
- [29] 钱梦, 岳晨, 杨宗纯, 等. 肝藏血中肝郁血滞病机的实验探查[J]. 广州中医药大学学报, 2021, 38(7): 1472-1480.
- [30] 范明明, 张良霜, 常雨, 等. 柴术理胃饮对肝郁脾虚型 FD 大鼠胃肠运动及氧化应激指标的影响[J]. 湖北中医药大学学报, 2022, 24(5): 10-14.
- [31] QU G Q, LU Y M, LIU Y F, et al. Effect of RTKN on progression and metastasis of colon cancer in vitro[J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 74: 117-123.
- [32] YAN Y L, LIU S, HU C, et al. RTKN-1/Rhotekin shields endosome-associated F-actin from disassembly to ensure endocytic recycling[J]. *J Cell Biol*, 2021, 220(5): e202007149.
- [33] LARSSON P T, HJEMDAHL P, OLSSON G, et al. Altered platelet function during mental stress and adrenaline infusion in humans: evidence for an increased aggregability in vivo as measured by filtragometry[J]. *Clin Sci (Lond)*, 1989, 76(4): 369-376.
- [34] STANKIEWICZ A, GOSCIK J, MAJEWSKA A, et al. The effect of acute and chronic social stress on the hippocampal transcriptome in mice[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142195.
- [35] STANKIEWICZ A, GOSCIK J, SWIERGIEL A, et al. Social stress increases expression of hemoglobin genes in mouse prefrontal cortex[J]. *BMC Neurosci*, 2014, 15: 130.
- [36] WONG C C, QIAN Y, LI X N, et al. SLC25A22 promotes proliferation and survival of colorectal cancer cells with KRAS mutations and xenograft tumor progression in mice via intracellular synthesis of aspartate[J]. *Gastroenterology*, 2016, 151(5): 945-960.

(收稿日期: 2023-02-10 修回日期: 2023-05-22)