

心理应激对大鼠下丘脑、胃粘膜 CRF 基因表达的影响及中药干预的实验研究

李杰¹ 刘长江¹ 李庆和¹ 韩娟¹ 李慧吉¹ 武成²

摘要 目的:从分子水平阐明情志致病的机制及药物干预作用。方法:采用逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)的分子生物学技术,观察大鼠束缚浸水后下丘脑及胃粘膜中促肾上腺皮质激素释放因子信使核糖核酸(CRFmRNA)表达,及具有理气降逆散结作用的中药复方心身 1 号干预作用的分子生物机制。结果:与正常组比较,模型组大鼠呈现气机紊乱证表现,胃内可见广泛性浅表性溃疡,下丘脑及胃粘膜出现 CRFmRNA 表达,而服心身 1 号的中药组大鼠胃内溃疡显著减少,CRFmRNA 表达量明显降低。结论:证实气机紊乱证与 CRF 基因表达相关,心身 1 号具有改善上述指标的作用。

关键词 应激;心理学;下丘脑;遗传学;基因表达

本研究以束缚水浸作心理应激源,模拟中医七情不遂的病因,建立应激性溃疡大鼠病证结合模型。观察大鼠下丘脑及胃粘膜中 CRFmRNA 表达及中药复方心身 1 号的干预作用。初步阐明情志致病的分子机制及中药干预的分子机理。

1 材料与方法

1.1 药物制备:心身 1 号片主要由陈皮 6g,赭石 6g,旋覆花 6g,丹参 15g,清半夏 6g,赤芍 15g 组成,每片含生药 1g。由天津中医药研究院附属医院生产。批准文号:(96)津卫药制剂(65)第 4-6-16-1 号。研细,以蒸馏水配制成混悬液(1g/ml),冷藏备用。

1.2 动物分组及造模:健康 Wistar 大鼠 36 只,雌雄各半,体重 150~170g(由天津市劳研所提供)。实验动物常规饲养 1 周,自由饮水摄食。1 周后随机分为 3 组,即正常组、造模组和中药组。正常组和造模组大鼠每日用生理盐水灌胃,每次 0.5ml,每日 2 次,中药组给予心身 1 号混悬液每次 0.5ml,每日 2 次(用药量为成人用药量的 20 倍),共计 7 天。造模前 1 天,各组动物均禁食 12 小时,自由饮水。造模方法:将各组大鼠四肢绑扎,固定于鼠板,浸入 20℃ 左右水槽中,水面深至剑突部位。持续浸泡 7 小时后,将大鼠取出,立即断头处死,选取下丘脑、胃粘膜进行指标测定。

1.3 观察指标

1.3.1 动物一般状况:观察动物束缚后的反应情况、

精神状态、对外界刺激的反应性。

1.3.2 分子生物学指标测定:检测大鼠下丘脑及胃粘膜出现 CRFmRNA 表达的情况。

1.4 指标检测方法及主要试剂仪器

1.4.1 引物合成:根据文献报道^[1],合成引物的 DNA 序列如下:

CRF 上游 5'-CCAGCAACCTCAGCCGATTC-3'

CRF 下游 5'-AAAAAGTTAGCCGCAGCCTG-3'

β -actin 上游 5'-GAGACCTTCAACACCCAGCC-3'

β -actin 下游 5'-AATGTCACGCACGATTTCCC-3'

扩增长度 CRF162bp β -actin265 bp 由中国协和医科大学血液病研究所设计,上海生工生物公司合成。

1.4.2 组织处理:将新鲜下丘脑、胃粘膜组织分别放入匀浆器中,加入 1ml 4M 裂解液(GTC)溶液,迅速匀浆,取匀浆液置于冷冻管中,-70℃ 冰箱保存。

1.4.3 总 RNA 提取:采用异硫氰酸胍法提取下丘脑、胃粘膜中总 RNA。试剂由上海生工生物公司提供。

1.4.4 逆转录过程:取 12 μ l RNA 样品,加入 6 μ l Buffer、2 μ l DTT、4 μ l dNTP、1 μ l BSA、1 μ l RNasin、1.5 μ l MMLV、3 μ l Oligo-dT、于 37℃ 水浴 1 小时后,95℃ 水浴 5 分钟。试剂由华美生物工程公司提供。

1.4.5 RT-PCR 扩增:以 β -actin 作内对照,采用 α -³²P-dCTP dPTP(2uCi/ μ l)5'末端标记引物,扩增条件为 94℃ 变性 3 分钟进入循环,每个循环 94℃ 变性 50s,56℃ 退火 45s,72℃ 延伸 45s,共计 36 个循环,最后于 72℃ 中延伸 8min。

1.4.6 PCR 扩增产物的凝胶电泳:将 RT-PCR 扩增产物 20 μ l 和 5 μ l 染料加样于 12%聚丙烯酰胺凝胶板,进行电泳。

1.4.7 放射自显影:采用 Ultrascan-XL 激光光密度计扫描 X 线底片。

1.5 统计学方法:所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计软件 SPSS 8.0 单因素方差分析和 q 检验进行分析。

2 结果

2.1 动物状态变化:在束缚初期,动物表现为强烈的反抗,嘶叫,呼吸加快。约 4 小时后,仍易激惹,但反抗力明显降低,叫声减弱,呈抑郁状态,可见腹部胀大。造模过程中造模组大鼠死亡 2 只,中药组死亡 1 只。

2.2 琼脂糖电泳结果:采用 PBR/Hinf I 作为标准品

基金项目:天津市自然科学基金项目(963608211)

1 天津中医学院,天津市南开区鞍山西道玉泉路 88 号(300193)

2 天津中医药研究院

收稿日期:2001-10-11;修回日期:2002-03-20

对照,片段长度范围为 1631bp,517bp,506bp,396bp,344bp,298bp,220bp,154bp,75bp。电泳结果显示:CRF 扩增片段为 162bp, β -actin 扩增片段为 265bp。CRF 片段在标准品 150~220bp 之间, β -actin 片段在 CRF 片段之后,位于 220~298bp 之间。

2.3 CRFmRNA 下丘脑、胃粘膜表达比较:附表表示,造模组、中药组与正常组比较,下丘脑中 CRFmRNA 表达量显著上升($P<0.01$)。中药组与造模组比较,下丘脑、胃粘膜中 CRFmRNA 表达量显著降低($P<0.01$)。中药组胃粘膜中 CRFmRNA 表达量与正常组比较无统计学意义($P>0.05$)。从表中可看出,CRFmRNA 表达以下丘脑部位占优势。

附表 下丘脑、胃粘膜 CRFmRNA 表达量变化比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	下丘脑	胃粘膜
正常组	12	0.494 $\pm$ 0.344	0.334 $\pm$ 0.222
造模组	10	15.170 $\pm$ 6.509*	4.830 $\pm$ 1.942*
中药组	11	3.477 $\pm$ 3.471* Δ	0.646 $\pm$ 0.558 Δ

与正常组比较,* $P<0.01$;与造模组比较, $\Delta P<0.01$

3 讨论

中医学认为,情志致病机理包括气机失调、损伤脏腑、耗伤精血、神志异常四个方面。其中气机失调是普遍存在的,始终贯穿于其他三种病机之中,多数情况下处于主导地位,少数情况处于次要地位^[2]。经过多年理论与临床研究,课题组在继承传统认识基础上,提出气机紊乱及由此产生的病理产物瘀血、热结、寒结、寒热互结是情志致病共有的中医基本证候,我们将其称为“气机紊乱证”。这里的气机紊乱以气滞、气逆为主。因此提出研究情志致病应以基本病机气机紊乱为根本出发点,根据所患病的不同系统、患者不同的体质和临床证候可再做分型,即证候的分化^[3]。该观点体现了中医学“同病异治,异病同治”的理论,既有综合性,也为具体病的辩证论治规定准绳。

建立病证结合的情志致病动物模型:在情志致病研究中,目前动物模型制作多采用药理和病理模型,忽视了病证的结合。本实验从心身相关理论出发,结合心理生理学方法,以束缚水浸的不良刺激模拟“七情不遂”的病因,以因定证,制造了“证”(气机紊乱证)和病(应激性溃疡)相结合的动物模型,并通过中药干预反证气机紊乱的存在。这种造模方法将情志致病共同机理与具体疾病机理作为一个整体有机结合,体现中医整体观和辩证论治特点,为研究“同病异治,异病同治”的理论提供重要方法。

情志致病现代机理研究:现代实验研究证明,各种应激都是经过外周神经和中枢神经系统汇集到下丘

脑,引起下丘脑室旁核释放 CRF,从而增强垂体—肾上腺皮质系统的活动^[4]。不良情志刺激导致气机紊乱与下丘脑—垂体—肾上腺轴(HPA)调节紊乱相关。本实验证实不良情志刺激可导致下丘脑 CRFmRNA 表达增多,CRF 增多可破坏 HPA 轴平衡,进而影响机体正常生理活动最终导致疾病。因此,我们认为,在情志致病过程中,激活 HPA 轴是情志疾病在神经—内分泌—免疫系统功能紊乱的重要环节,而且 HPA 轴的激活是有其分子基础的,这个分子基础与 CRFmRNA 表达增多有一定联系。在本次实验中,发现胃粘膜中亦有 CRFmRNA 表达,但其表达总体趋势低于下丘脑,揭示情志致病以中枢变化占优势,至于 CRFmRNA 在外周表达是否参与溃疡出现的机理有待进一步研究。

心身 1 号具有心身双调作用,以往实验证明其可作用于中枢神经系统——下丘脑,有调节植物神经系统和内分泌系统功能、改善内环境的作用^[5,6]。本次研究结果表明,心身 1 号可抑制大鼠下丘脑 CRFmRNA 表达,调节 HPA 轴平衡,又可对躯体疾病病变部位胃粘膜起到保护作用。因此本实验初步证实了情志致病的分子生物学基础,又从分子生物学角度证实了心身 1 号对应激性溃疡的干扰作用,为研究中医药在基因治疗领域的应用提供资料。但关于中医药在基因水平的作用途径及相关机制尚待进一步研究。

参考文献

- 1 Fraser A, Charles V, Cleverger J, et al. Corticotropin-releasing factor mRNA in rat thymus and spleen. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, 90(8):7104-7108.
- 2 程锡藏,王建华. 中医基础理论研究进展. 广州:华南理工大学出版社,1990:6.
- 3 武成,李慧吉. 内科心身疾病的辨证论治. *美国中华心身医学杂志*, 1999, 5(2):196.
- 4 Ritchies JC, Nemeroff CB. Stress, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and depression. In: James A, McCubbin, Peter G, et al. *Stress, neuropeptides, and systemic disease*. San Diego: Academic Press, 1991:181.
- 5 李慧吉,武成,张世林,等. 心身 1 号抗应激性溃疡的实验研究. *中医杂志*, 1997, 38(10):623-625.
- 6 武成,李方儒,张春红,等. 消化性溃疡心身相关病证结合的临床研究. *中医杂志*, 1996, 37(8):476-478.

关于发展中华中医药学会会员的通知

为了加强学会与会员的联系,促进中医药学术交流和整体学术水平的提高,我会现在全国范围内发展会员。凡具有中级以上职称的中医药工作者,自愿填写入会申请登记表,即可入会(已在各省中医药学会入会者,不要再重复入会)。入会者需交 1 张 2 寸照片、费用 350 元(5 年会费 300 元,注册费 50 元)、职称证书复印件、1~3 篇代表性学术文章寄至北京市樱花东路甲 4 号,中华中医药学会学术部高扬收,邮政编码:100029,电话:(010)64212828。

ABSTRACTS FROM ORIGINAL ARTICLES

Clinical observation on 120 cases of rheumatic diseases treated with Huo Xue Tong Bi Ye

Xia Junjie, Feng Buzhen, Cao Zhongzhen, et al.

Objective: To increase the therapeutic effect of rheumatic diseases and probe into therapeutic action of drugs for nourishing the blood and activating blood circulation on abnormal nail fold microcirculation. **Methods:** The patients were divided into two groups, the treatment group treated with Huo Xue Tong Bi Ye which has functions of dispelling wind and dampness, and nourishing the blood and activating blood circulation, and the control group treated with Feng Shi Sheng Yao. **Results:** The therapeutic effects on both the rheumatic disease and abnormal nail fold microcirculation in the treatment group were better than those in the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** Combination of proper amount of drugs for nourishing the blood and activating blood circulation and the drugs for dispelling wind and dampness can obviously increase the therapeutic effect and improve nail fold microcirculation, with an important action on treatment and prognosis of rheumatic diseases.

Authors' address: Linyi Municipal Hospital of TCM, Linyi 276002, Shandong Province

Key words: Rheumatic fever/TCM therapy. @Huo Xue Tong Bi Ye

(Original article on page 671)

Effect of Shen Xian Kang Tang on expression of serum TGF- β_1 in the patient of mesangial proliferative glomerulonephritis

Li Xiayu, He Xuelin, Fan Yongsheng, et al.

Objective: To probe the inhibitory action of Shen Xian Kang Tang on serum transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) in the patient of mesangial proliferative glomerulonephritis (MsPGN). **Methods:** 60 cases of MsPGN were randomly divided into nephritis control group, benazepril group and Shen Xian Kang group, and the changes of serum TGF- β_1 before and after treatment were investigated. **Results:** After treatment, serum TGF- β_1 levels in the benazepril group and Shen Xian Kang group were significantly down-regulated ($P < 0.01$), with no significant difference between the two groups ($P > 0.05$), and there was significant difference as the two groups compared with the control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Shen Xian Kang Tang may have the action of anti-TGF- β_1 , being advantageous to delaying injury of the kidney.

Authors' address: The First Hospital Affiliated to Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310003.

Key words: Glomerulonephritis, membrano-proliferative, / TCM therapy. @ Shen Xian Kang Decoction

(Original article on page 673)

Clinical observation on 139 cases of recurrent genital herpes treated with Anti-Virus Capsule

Fan Ruiqiang, Chi Fenghao, Chen Yongfeng, et al.

Objective: To observe the therapeutic effect of Anti-Virus Capsule on recurrent genital herpes. **Methods:** The patients were randomly divided into two groups, the treatment group (139 cases) treated with oral administration of Anti-Virus, and the control group (46 cases) treated with oral administration of aciclovir. Serum IL-2 before and after treatment was determined in 15 cases of the treatment group. **Results:** The effective rates in the both groups were 90.51% and 91.11% respectively with no significant difference, and there was a significant difference before and after treatment in serum IL-2 in the 15 cases ($P < 0.01$). **Conclusion:** Anti-Virus Capsule is an effective preparation of Chinese drugs for genital herpes and it can increase immunologic function of the human body.

Authors' address: The Second Hospital Affiliated to Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510120.

Key words: Herpes, genital/TCM therapy

(Original article on page 679)

Experimental study of Effect of psychogenic stress on expression of CRF gene in hypothalamus and gastric mucosa of the rat and intervention of Chinese drugs

Li Jie, Liu Changjiang, Li Qinghe, et al.

Objective: To expound the mechanism of emotion inducing diseases and the intervening action of drugs from molecular level. **Methods:** RT-PCR was used to investigate expression of corticotropin releasing factor CRFmRNA in the hypothalamus and gastric mucosa, and molecular biological mechanism of the intervening action of compound Xin Shen No. 1 with action of regulating the flow of Qi, lowering the adverse flow of Qi, and dispersing accumulation of pathogen in the rat after fastening and immersing in water. **Results:** Compared with the normal group, the model group showed disturbance of functional activity of Qi in microscope, extensive and superficial ulcer in the stomach and expression of CRFmRNA in the hypothalamus and gastric mucosa, and the Xin Shen No. 1 treatment group showed a significant decrease in gastric ulcer and CRFmRNA expression. **Conclusion:** Confirm the correlation between disturbance functional activity of Qi and CRF gene expression, and Xin Shen No. 1 has action of improving the above-mentioned indexes.

Authors' address: Tianjin College of TCM, Tianjin 300193

Key words: Stress, psychology, hypothalamus/genetics, gene expression

(Original article on page 699)