

白香丹胶囊对经前期综合征肝气逆证模型大鼠 下丘脑类固醇激素受体表达的影响

刘向红¹ 张惠云² 赵启韬² 郑春梅²

(1. 山东大学齐鲁医院, 山东省济南市文化西路107号, 250012; 2. 山东中医药大学)

[摘要] **目的** 观察白香丹胶囊对模型大鼠下丘脑类固醇激素受体表达的影响, 探讨该药治疗经前期综合征(PMS)肝气逆证的中枢作用靶点。**方法** 以情志刺激多因素法复制PMS肝气逆证大鼠模型, 经中药白香丹胶囊干预, 采用免疫荧光标记结合激光流式细胞仪、激光共聚焦显微镜检测下丘脑中主要的类固醇激素受体(雌激素受体 α 孕酮受体)的蛋白水平表达量及定位分布模式。**结果** 白香丹胶囊能够显著上调PMS肝气逆证模型大鼠下丘脑中类固醇激素受体(雌激素受体 α 孕酮受体)的蛋白表达水平。**结论** 下丘脑中雌激素受体 α 孕酮受体是白香丹胶囊的两个重要作用靶位, 该药可能通过上调上述两种受体的蛋白表达水平发挥其疗效。

[关键词] 经前期综合征; 肝气逆证; 白香丹胶囊; 下丘脑; 雌激素受体- α 孕酮受体

Effect of Baixiangdan Capsule on Expression of Steroid Hormone Receptors in Hypothalamus of Premenstrual Syndrome Model Rats with Liver-qi Invasion

LIU Xiang-hong¹, ZHANG Hui-yun², ZHAO Qi-tao², et al.

(1. Qilu Hospital of Shandong Province, Jinan 250001; 2. Shandong University of Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To study the effect of Baixiangdan Capsule on the expression of steroid hormone receptors in hypothalamus of model rats to approach its action target of PMS with liver-qi invasion. **Methods** PMS model rats with liver-qi invasion was made by multiple-factor emotional stimulation. Immunofluorescence cytochemistry technique coupled with flow cytometry and laser scanning confocal microscope was used to detect the expression levels and distribution mode of main steroid hormone receptors (estrogen receptor- α and progesterone receptor) in hypothalamus. **Results** Baixiangdan Capsule could markedly up-regulate expression levels of steroid hormone receptors in hypothalamus of model rat. **Conclusion** estrogen receptor- α and progesterone receptor were two important components targets. Baixiangdan might partially play its role in ameliorating PMS by up-regulating the expression of neurosteroid receptors.

Key words Premenstrual syndrome; Baixiangdan Capsule; Hypothalamus; Estrogen receptor- α Progesterone receptor

经前期综合征(PMS)是以排卵后期出现躯体、情感、认识和习惯上的紊乱并在月经来潮后症状自然消失为特征的一组异常情况^[1], 属于情志病证的范畴。肝气逆证是PMS的主要亚型, 其症状伴随月经周期发作, 严重影响患者的正常生活^[2]。既往动物实验表明, 白香丹胶囊能明显改善和调整PMS肝气逆证模型大鼠、猕猴行为变化及外周血中雌二醇(E₂)、孕酮(P)水平的波动^[3]。为进一步探讨白香丹胶囊中枢作用靶点, 我们采用免疫荧光技术结合流式细胞仪、激光共聚焦显微镜来研究其对PMS肝气逆证模型大鼠下丘脑中雌激素受体(ER- α 、孕酮受体(PR))表达水平、组织内定位分布模式的影响。

1 材料

1.1 实验动物

雌性成年未孕SD大鼠30只, 体重(200 $\pm$ 20)g, 由中国科学院上海实验动物中心提供, 许可证号: SCXK

(沪)2003-0003, SPF级。

1.2 药品与仪器

白香丹胶囊由白芍、香附、牡丹皮三味中药组成(山东中医药大学生产, 批号: 040201), 免疫荧光试剂盒(一抗: 兔抗鼠ER多克隆抗体, 二抗: 山羊抗兔IgG-FITC, 正常山羊封闭血清, Santa Cruz公司), L-多聚赖氨酸(北京中山公司)。激光流式细胞仪(FCM, BD FACSCalibur 420), 激光共聚焦显微镜(LSCM, Zeiss LSM 510), ST-A型数字脉冲生物刺激仪, 转轮式切片机(LEICA RM 2015)。

2 实验方法

2.1 造模、分组及给药方法

依阴道涂片法确定大鼠动情周期, 将处于动情后期大鼠30只随机分为正常对照组、模型组、白香丹组, 每组10只。除正常对照组外其它两组参照文献方法^[4]造模。白香丹组灌胃给白香丹1ml/100g体重(浓度1桑

1, 即1ml药液含原生药9g, 相当于人临床8倍剂量); 模型组给予等体积生理盐水, 连续给药5天。

2.2 激光流式细胞仪检测

末次给药后,大鼠迅速断头,取下丘脑冰上迅速研磨。冷生理盐水悬浮,1200转/分钟离心洗涤8分钟,弃上清,过300目筛。沉淀加入0.25%多聚甲醛溶液室温固定1小时;0.01M PBS 离心清洗,弃上清。沉淀加入70%甲醇溶液4℃固定1小时。离心,弃上清。PBS 悬浮离心清洗1次。上述细胞悬液加一抗(1 μ g¹⁰⁰)及0.1% Triton X-100 4℃过夜;PBS 悬浮离心清洗2次。二抗室温孵育30分钟,PBS 洗涤3次。冷生理盐水定容,过300目筛。流式细胞仪检测。Cellquest 软件处理数据和图像。

2.3 激光共聚焦显微镜测定

大鼠迅速断头,剥离出下丘脑,生理盐水冲洗,Bouins 液固定24小时。PBS 洗涤,浸泡过夜。上行酒精脱水,二甲苯透明,制作石蜡切片。二甲苯脱蜡,下行酒精脱水,柠檬酸盐缓冲液微波抗原修复。正常山羊血清封闭,加一抗4℃过夜。PBS 清洗,加二抗37℃孵育30分钟。PBS 清洗,缓冲甘油封片。共聚焦显微镜检测 Ex/Em:488nm/530~550nm;每个样品随机选择10个视野,记录图像及相对荧光强度。Zeiss LSM 510 Image Examiner 软件分析相对荧光强度。样品受体表达量以相对荧光强度平均值表示。

3 结果

3.1 白香丹对大鼠下丘脑 ER- α 蛋白表达量的影响

3.1.1 流式细胞仪检测结果 表1示,PMS 肝气逆证模型大鼠下丘脑 ER- α 蛋白与正常对照组相比显著降低($P<0.01$),经白香丹治疗大鼠下丘脑 ER- α 蛋白表达量显著高于模型组大鼠($P<0.01$),而与正常大鼠比较差异无显著性意义。

表1 3组大鼠下丘脑 ER- α 蛋白表达量检测结果比较($\bar{x} \pm s$)		
组别	鼠数	ER- α 表达量
正常对照组	8	11.37 $\pm$ 4.08
模型组	8	4.11 $\pm$ 1.79*
白香丹组	8	10.75 $\pm$ 5.40 Δ

与正常对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.01$

3.1.2 激光共聚焦显微镜检测结果 图1示,PMS 肝气逆证模型大鼠下丘脑神经元表达 ER- α 蛋白的阳性细胞数显著少于正常大鼠,阳性细胞内荧光减弱。与模型组比较,白香丹组大鼠相同脑组织中 ER- α 阳性细胞数增加明显,阳性神经元中荧光强度也明显回升。荧光强度定量分析证实中药白香丹可显著上调模型大鼠下丘脑神经细胞中 ER- α 蛋白水平表达量($P<0.01$)。

正常大鼠 ER- α 的阳性细胞多分布于下丘脑边缘;而模型组和白香丹组大鼠阳性细胞多呈弥散分布。该

结果表明白香丹对模型大鼠下丘脑中 ER- α 阳性神经细胞分布模式无明显影响。

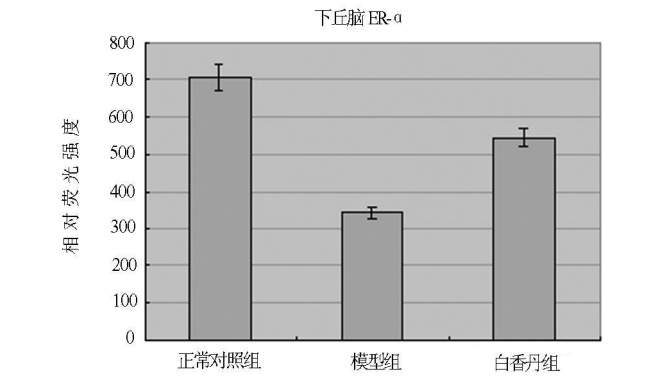


图1 3组大鼠下丘脑 ER- α 蛋白表达量激光共聚焦显微镜检测结果定量分析图

3.2 白香丹对大鼠下丘脑 PR 蛋白表达量的影响

3.2.1 流式细胞仪检测结果 表2示,PMS 肝气逆证模型大鼠下丘脑 PR 蛋白与正常组比较显著降低($P<0.01$),经白香丹治疗大鼠下丘脑 PR 蛋白表达量显著高于模型组大鼠($P<0.01$),而与正常大鼠比较差异无显著性意义。

表2 3组大鼠下丘脑 PR 表达量检测结果比较($\bar{x} \pm s$)		
组别	鼠数	PR 表达量
正常对照组	8	18.41 $\pm$ 3.73
模型组	8	10.73 $\pm$ 2.73*
白香丹组	8	18.15 $\pm$ 7.02 Δ

与正常对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.01$

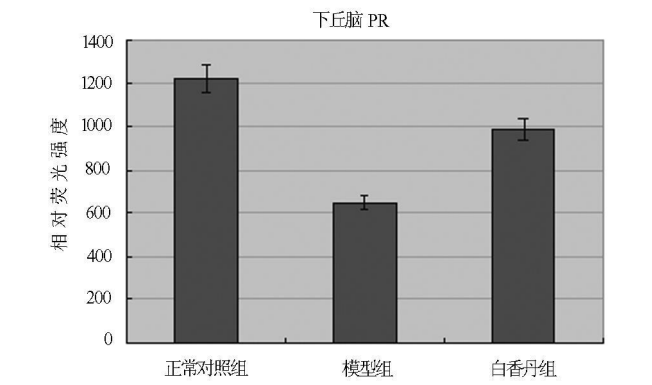


图2 3组大鼠下丘脑 PR 蛋白表达量激光共聚焦显微镜检测结果定量分析图

3.2.2 激光共聚焦显微镜检测结果 图2示,PMS 肝气逆证模型大鼠下丘脑 PR 阳性细胞数显著少于正常大鼠,阳性细胞内荧光强度也极显著低于正常大鼠。白香丹组较模型组大鼠下丘脑中阳性细胞数、PR 荧光强度均明显增加。荧光强度分析数据证实白香丹极显著上调模型大鼠下丘脑中 PR 表达量($P<0.01$)。

白香丹组和正常对照组大鼠下丘脑 PR 阳性细胞

弥散分布于下丘脑中,而模型组大鼠阳性细胞数分布于下丘脑边缘。结果表明白香丹可使模型大鼠下丘脑中PR阳性神经细胞恢复正常分布模式。

4 讨论

白香丹胶囊方中白芍性微寒,味苦酸,入肝经,生用平肝降逆力胜,切合主治病证肝气偏盛疏泄太过病机,故为君药。香附味辛、微苦,“善调理气机而行气止痛,尤适于月经不调、乳胀、腹痛等证,常配伍当归、白芍、柴胡等”^[5],辅助君药平肝理气,故为臣药。牡丹皮与上药相合共成平肝理气,除胀止痛,故能消除其经前诸症,主治PMS肝气逆证,其临床主要症状为:经前情绪激动,烦躁易怒,甚则无端发火,乳房胀痛,头痛头胀,失眠多梦,腹胀痛,或胃痛嗳气,性欲减低,工作效率下降等。

雌性哺乳动物体内的雌激素、孕酮除了控制生殖、维持能量平衡外,也强烈影响着其月经状态、情绪及行为^[6]。雌激素通过调节中枢神经递质受体系统影响情绪、精神状态^[7];孕酮通过细胞内PR的调节而发挥作用,对女性生殖活动至关重要的PR可以被雌激素诱导。ER- α PR在大脑许多区域表达,其下丘脑表达量及分布模式不仅具有性别差异,而且随月经周期变化而变化^[8]。研究结果证实,服用中药白香丹胶囊,可使模型大鼠下丘脑中过低的ER- α PR含量得到提高,用药组两种激素受体含量与模型组相比均显著升高。白香丹可显著上调PMS肝气逆证模型大鼠下丘脑ER-

α PR的蛋白表达水平,恢复其中PR阳性细胞正常分布模式,提示中药白香丹不仅通过影响外周血中的类固醇激素水平,还通过影响神经中枢相关脑区类固醇激素受体基因蛋白水平表达量、分布模式而发挥疗效。

参考文献

- [1]朱鸿秋.从肝论治经前期综合征.中华医药杂志,2004,4(3):28.
- [2]乔明琦,张珍玉,徐旭杰,等.经前期综合征证候分布规律的流行病学调查研究.中国中医基础医学杂志,1997,3(3):31~33.
- [3]张惠云,乔明琦,朱武成,等.大鼠模拟经前期综合征肝气逆证血清激素与行为变化.中成药,2002,24(2):118~119.
- [4]郑春梅,张惠云.大鼠血清中单胺类递质的高效液相色谱-荧光检测法分析.药物分析杂志,2006,26(2):215~217.
- [5]颜正华主编.中药学.北京:人民卫生出版社,1991:407.
- [6]Krezel W, Dupont S, Krust A, et al. Increased anxiety and synaptic plasticity in estrogen receptor beta-deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(21):12278~12282.
- [7]Mize AL, Alper RH. Acute and long-term effects of 17β -estradiol on G (i/o) coupled neurotransmitter receptor function in the female rat brain as assessed by agonist-stimulated [^{35} S]GTPgammaS binding. Brain Res, 2000, 859(2):326~333.
- [8]Wolfe CA, Van Doren M, Walker HJ, et al. Sex differences in the location of immunochemically defined cell populations in the mouse preoptic area/anterior hypothalamus. Brain Res Dev Brain Res, 2005, 157(1):34~41.

(收稿日期:2007-07-24;修回日期:2007-08-16)

中国中医药报 报道中医药一切时效信息

拥有信息 占得先机

- 您想在第一时间获取最新国家中医药方针政策吗?
- 您想在第一时间了解中医药最新科研成果吗?
- 您想在第一时间掌握最新中医药临床经验吗?
- 您想在第一时间知晓中医药学术思想最新动态吗?
- 您想在第一时间学习成功医院的管理模式吗?
- 您想在第一时间研究成功中医药企业文化及研发管理营销案例吗?
- 您想在第一时间搜集中医教育及人才培养资讯吗?
- 您想快速提高自己的医疗水平早日成为名医吗?

欢迎登陆本报网址: www.cntcm.com.cn
进入中国中医药报网上书店,大量医药图书供您挑选。咨询电话:010-64860746

欢迎订阅中国中医药报,全国各地邮局全年均可订阅,本报为周四刊,对开八版,邮发代号:1-140,每份定价:0.8元,全年定价:156元,半年定价:78元

如果您错过订阅时间或在订阅方面有任何问题,请直接与中国中医药报社发行部联系 电话:010-64855367、64854538 网址: www.cntcm.com.cn