

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.19.015

逍遥散对慢性应激模型大鼠下丘脑外侧区瘦素受体、食欲素 A 和食欲素受体 1 表达的影响

王杰鹏, 王少贤*, 方朝义, 旷湘楠, 王一旭, 赵丹

(河北中医学院基础医学院, 河北省石家庄市鹿泉区杏苑路 3 号, 050200)

摘要 目的 探讨逍遥散抗应激的可能作用机制。方法 72 只 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型组和逍遥散组各 24 只。除空白对照组外, 其余两组以每天 3 h 束缚制动方式连续 21 天建立慢性应激动物模型。在造模第 1 天, 逍遥散组灌服逍遥散混悬液 3.85 g/(kg·d), 其余两组灌服生理盐水 1 ml/100 g。记录实验第 0、7、21 天时大鼠体重、摄食量以及旷场实验行为学变化; 实验第 22 天测定血清 D-木糖及下丘脑外侧区中食欲素 A (OXA)、瘦素含量, 免疫荧光染色观察下丘脑外侧区中瘦素受体 (ob-R)、OXA 与食欲素受体 1 (OX1R) 蛋白表达, 实时荧光定量 PCR 检测 ob-R、前食欲素原与 OX1R mRNA 表达。结果 与空白对照组比较, 模型组大鼠体重、摄食量以及在旷场实验 5 min 移动总距离和中央区总穿格数明显减少, 血清 D-木糖含量下降, 下丘脑外侧区中 OXA、OX1R 蛋白表达降低, ob-R 蛋白及 mRNA 表达、瘦素含量升高, 前食欲素原、OX1R mRNA 表达下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。逍遥散组上述各指标均较模型组改善 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 逍遥散调节食欲抗应激的中枢机制可能与下丘脑外侧区中 Leptin-ob-R-OXA/OX1R 摄食通路有关。

关键词 慢性束缚应激; 逍遥散; 下丘脑外侧区; 食欲素 A; 食欲素受体 1; 瘦素; 前食欲素原

随着社会生活节奏的加快, 应激所引发的生理和心理障碍已经严重威胁到人类健康。适当应激有利于机体适应外界环境, 但慢性或过度应激会导致机体出现焦虑、抑郁、恐惧等情绪异常和食欲减退、体重下降等躯体变化。传统中药复方逍遥散 (《太平惠民和剂局方》) 具有疏肝解郁健脾之功效, 是目前中医抗应激的首选中药复方^[1]。目前有关逍遥散的实验研究多集中于其改善慢性应激所致焦虑、抑郁等情绪障碍的机制研究^[2-4]。本研究通过制备慢性应激大鼠模型, 以逍遥散为干预用药, 观察其对大鼠摄食量和行为学变化, 以及下丘脑外侧区食欲素 A (OXA)、食欲素受体 1 (OX1R)、瘦素受体 (ob-R) 与瘦素表达的影响, 探讨逍遥散调节食欲抗应激的可能中枢机制, 为其临床用药提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 健康雄性大鼠 72 只, 4~6 周龄, 体重 (180±20) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物合格证编号: SCXK (京) 2012-0001。

1.2 药物与试剂

逍遥散 (《太平惠民和剂局方》) 组成: 北柴胡 30 g, 白芍 30 g, 当归 30 g, 白术 30 g, 茯苓 30 g, 炙甘草 15 g, 薄荷 10 g, 煨生姜 10 g, 饮片购自北京同仁堂药店, 以沸水萃 3 次, 真空 (70℃) 脱水, 磨粉备用, 干粉提取率为 18.8%。2% 戊巴比妥钠 (北京化学试剂公司, 批号: 020402); TritonX-100 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号: 0153B32); 驴血清 (德国 Millipore 公司, 货号: 3059603); Alexa Fluor® 594 驴抗兔 IgG 二抗 (红色荧光标记, 美国 Invitrogen 公司, 货号: A21207); Alexa Fluor® 488 驴抗兔 IgG 二抗 (绿色荧光标记, 美国 Invitrogen 公司, 货号: A11055); OXA 兔源性多克隆一抗 (美国 Phoenix

基金项目: 国家自然科学基金 (81673881, 81202644); 河北省自然科学基金 (H2016423049)

* 通讯作者: muhudie@163.com, 15131100301

公司, 货号: MB-003-30); ob-R 兔源性多克隆一抗 (美国 Santa 公司, 货号: sc-8391); OX1R 兔源性多克隆一抗 (北京博奥森生物技术有限公司, 货号: bs-18029R); OXA ELISA 试剂盒 (美国 Phoenix 公司, 货号: EK-003-30); 瘦素 ELISA 试剂盒 (美国 Phoenix 公司, 货号: EK-003-17); 防荧光淬灭封片剂 (美国 Vector 公司, 货号: H-1000); Trizol (美国 Invitrogen 公司, 货号: 10296028); M-MLV 反转录试剂盒 (美国 Promega 公司, 货号: A6010); SYBR Green I 荧光定量 PCR 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司, 货号: 11746100); D-木糖试剂盒 (天津市光复精细化工研究所, 批号: 58-86-6)。

1.3 仪器

恒温冷冻切片机 (德国 Leica 公司, 型号: CM1950); 低温离心机 (德国贺利氏公司, 型号: RS-28); 恒流泵 (保定兰格恒流泵有限公司, 型号: ZT-600a); 酶标仪 (美国雷博公司, 型号: Wellscan Mk3); 激光扫描共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司, 型号: SP8); 紫外分光光度计 (美国 Thermo 公司, 型号: ND2000); 荧光定量 PCR 系统 (美国 ABI 公司, 型号: 7300)。

1.4 动物分组、造模及给药

72 只大鼠适应性喂养 1 周, 按照随机数字表法根据体重随机分为空白对照组、模型组、逍遥散组各 24 只。模型组和逍遥散组依据文献 [5] 制备慢性应激大鼠模型: 大鼠束缚于木质束缚架上, 每天 3 h, 连续 21 天。空白对照组常规饲养。逍遥散组大鼠每日束缚前 30 min 灌服逍遥散 3.85 g/(kg·d) (按人体用药量换算成大鼠等效剂量); 空白对照组与模型组大鼠每日灌服生理盐水 1 ml/100 g, 共 21 天。

1.5 观察指标及方法

于实验第 22 天, 大鼠以 2% 戊巴比妥钠 (4 mg/100 g) 腹腔注射麻醉后取材, 采用随机数字表法选取 6 只行左心室升主动脉灌注固定, 断头取脑, 置 4% 多聚甲醛 4℃ 储存, 以 20%、30% 蔗糖溶液梯度脱水, 恒温冷冻切片机切片, 片厚 25 μm, 进行免疫荧光染色; 另取 6 只大鼠麻醉后直接断头取血 (2 ml)、取脑。脑组织液氮速冻, 用大鼠脑切片模具, 干冰环境下切取大鼠下丘脑外侧区组织, 放入 1.5 ml EP 管, 备测 OXA、OX1R、ob-R mRNA 含量; 血标本室温静置 30 min 后离心 (3500 r/min、4℃ 离心 20 min) 分离提取血清, 均

置于 -80℃ 储存备检。

1.5.1 体重、摄食量 束缚应激开始前 1 天 (作为第 0 天数据) 和应激开始后第 7、14、21 天记录各组大鼠体重和摄食量。

1.5.2 旷场实验 根据文献 [5], 于实验第 0、7、21 天相同时间段进行旷场实验。旷场箱为自制 1 m × 1 m × 40 cm 木箱, 底面由 25 块 20 cm × 20 cm 的正方形小格组成, 中间 8 个小格为中央区。测试时将大鼠放置中央区固定位置, 采用行为学软件 2.0 (上海欣软信息科技有限公司) 同步记录分析 5 min 内大鼠在旷场箱的总移动距离和中央区的穿梭数。测试完成后以蘸有 75% 酒精毛巾擦拭箱底, 待其自然晾干后再进行下一只大鼠观测。

1.5.3 血清 D-木糖与下丘脑外侧区中瘦素、OXA 含量 血清 D-木糖含量采用间苯三酚法检测, 实验第 22 天早上 8:00 每组依据随机数字表抽取 12 只大鼠, 灌胃 5% D-木糖溶液, 1 h 后麻醉, 断头取血 2 ml, 4℃ 离心, 分离血清, -80℃ 保存, 待测 D-木糖含量, 严格按照试剂盒说明操作。脑组织以液氮速冻, 干冰环境下取下丘脑外侧区部位, 将冻存的大鼠脑组织进行组织匀浆, 提取上清液。根据 ELISA 试剂盒操作说明检测 OXA、瘦素含量。

1.5.4 下丘脑外侧区中 OXA、OX1R、ob-R 蛋白表达 采用免疫荧光法检测, 主要步骤: 1) 0.01 mol/L PBS 漂洗, 以含 0.5% TritonX-100 的 0.01 mol/L PBS 温箱孵育 1 h (37℃); 2) 0.01 mol/L PBS 漂洗, 驴血清封闭, 加一抗, 4℃ 冰箱孵育, 过夜; 3) 漂洗后, 加荧光二抗孵育, 避光, 室温孵育 4 h; 4) 0.01 mol/L PBS 漂洗, 防荧光淬灭封片剂封片, 4℃ 储存备检。每组 10 张切片, 激光扫描共聚焦显微镜扫描成像, Image-Pro Plus 6.0 进行图像分析, OXA、ob-R 测量在下丘脑外侧区中选取 500 μm × 500 μm 面积, OX1R 的选取测量面积为 200 μm × 200 μm, 统计阳性细胞数、阳性表达面积和积分光密度 (IOD)。

1.5.5 下丘脑外侧区中前食欲素原、OX1R 与 ob-R mRNA 表达 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测, 主要步骤: 1) 取约 50 μg 下丘脑外侧区组织, Trizol 法提取总 RNA。2) 根据 M-MLV 反转录试剂盒说明操作将 RNA (1 μg/样本) 逆转录为 cDNA: 建立 20 μl 反转录体系, 反转录条件为 42℃ 50 min, 95℃ 5 min。3) 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 建立 50 μl PCR 反应体系, 于每个循环的第 3 个步骤, 即 72℃ 30 s 收集荧光信号。以 β-

actin 为内参照基因, 根据公式 $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各目的基因表达的相对定量值 (RQ 值)。引物序列: 前食欲素原: 上游 TACAAAGGTTCCCTGGGC, 下游 AACAGTTCGTAGAGACGGCA, 扩增片段 141bp; OX1R: 上游 GGAGGAAGACTGCCAAGATG, 下游 AAGGACATTGAGGACACTGATG, 扩增片段 83bp; ob-R: 上游 GCCAAAGTCAACTACGCTCTT, 下游 CTTCCATACGCCAAACCCA, 扩增片段 133 bp; β -actin: 上游 GGTTCATCACCATTGGCAA, 下游 GAGTTGAAGGTAGTTTCGTGGA, 扩增片段 105 bp。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件, 计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 组间比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间体重和摄食量比较

表 1 示, 各组大鼠体重和摄食量在第 0 天比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与空白对照组同时时间比较, 模型组大鼠体重在第 7、14、21 天下降, 摄食量在第 14、21 天下降 ($P < 0.01$); 与模型组同时时间比较, 逍遥散组在第 7、14、21 天体重显著增加, 摄食量在第 14、21 天明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠不同时间体重和摄食量比较 ($g, \bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	体重	摄食量
空白对照组	第 0 天	24	268.23 $\pm$ 10.54	27.80 $\pm$ 2.46
	第 7 天	24	325.35 $\pm$ 13.24	27.86 $\pm$ 3.23
	第 14 天	24	365.85 $\pm$ 17.07	26.75 $\pm$ 2.16
	第 21 天	24	406.24 $\pm$ 9.96	28.18 $\pm$ 2.56
模型组	第 0 天	24	268.18 $\pm$ 15.11	28.23 $\pm$ 2.98
	第 7 天	24	284.13 $\pm$ 10.96*	25.58 $\pm$ 2.74
	第 14 天	24	311.15 $\pm$ 4.24*	23.35 $\pm$ 2.22*
	第 21 天	24	338.59 $\pm$ 6.38*	23.10 $\pm$ 1.93*
逍遥散组	第 0 天	24	267.39 $\pm$ 9.90	28.37 $\pm$ 2.66
	第 7 天	24	303.61 $\pm$ 19.58 $\Delta\Delta$	26.18 $\pm$ 2.60
	第 14 天	24	329.46 $\pm$ 22.16 $\Delta\Delta$	25.50 $\pm$ 1.70 Δ
	第 21 天	24	365.53 $\pm$ 5.23 $\Delta\Delta$	25.80 $\pm$ 1.64 $\Delta\Delta$

注: 与空白对照组同时时间比较, * $P < 0.01$; 与模型组同时时间比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 4 各组大鼠下丘脑外侧区中 OXA 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	阳性表达细胞数 (个)	阳性表达面积 (μm^2)	IOD 值
空白对照组	6	24.50 $\pm$ 7.98	4628.21 $\pm$ 2319.70	599.95 $\pm$ 316.58
模型组	6	12.28 $\pm$ 8.13*	2242.58 $\pm$ 1400.53*	284.65 $\pm$ 179.72*
逍遥散组	6	18.73 $\pm$ 5.42 Δ	3692.09 $\pm$ 1252.31 Δ	469.46 $\pm$ 154.13 Δ

注: OXA, 食欲素 A; 与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2.2 各组大鼠不同时间旷场实验行为学结果比较

表 2 示, 与空白对照组同时时间比较, 模型组大鼠在第 21 天的 5 min 移动总距离减少, 第 7、21 天 5 min 中央区总穿格数明显减少 ($P < 0.01$); 与模型组同时时间比较, 逍遥散组大鼠第 21 天 5 min 移动总距离及中央区的总穿格数均增加 ($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠不同时间旷场实验行为学结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	5 min 移动总距离 (m)	5 min 中央区总穿格数 (次)
空白对照组	第 0 天	24	39.59 $\pm$ 9.51	6.13 $\pm$ 2.21
	第 7 天	24	23.72 $\pm$ 7.39	3.49 $\pm$ 0.60
	第 21 天	24	24.68 $\pm$ 2.99	4.04 $\pm$ 1.03
模型组	第 0 天	24	40.15 $\pm$ 6.79	6.10 $\pm$ 1.49
	第 7 天	24	18.83 $\pm$ 5.76	1.98 $\pm$ 0.65*
	第 21 天	24	13.45 $\pm$ 2.47*	1.65 $\pm$ 0.46*
逍遥散组	第 0 天	24	41.69 $\pm$ 8.53	5.90 $\pm$ 1.66
	第 7 天	24	20.87 $\pm$ 3.25	2.20 $\pm$ 0.43
	第 21 天	24	18.68 $\pm$ 6.18 Δ	2.33 $\pm$ 0.28 Δ

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

2.3 各组大鼠下丘脑外侧区中 OXA、瘦素及血清 D-木糖含量比较

表 3 示, 与空白对照组比较, 模型组大鼠下丘脑外侧区中 OXA 和血清 D-木糖含量下降, 而瘦素含量上调 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 逍遥散组大鼠下丘脑外侧区中 OXA 和血清 D-木糖含量上调, 瘦素含量下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 3 各组大鼠下丘脑外侧区中 OXA、瘦素及血清 D-木糖含量比较 ($ng/ml, \bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	OXA	瘦素	D-木糖
空白对照组	12	9.76 $\pm$ 1.14	3.76 $\pm$ 1.80	1.17 $\pm$ 0.20
模型组	12	5.61 $\pm$ 1.08*	5.86 $\pm$ 1.65*	0.52 $\pm$ 0.09*
逍遥散组	12	8.54 $\pm$ 1.07 $\Delta\Delta$	4.27 $\pm$ 1.22 Δ	0.82 $\pm$ 0.21 $\Delta\Delta$

注: OXA, 食欲素 A; 与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.4 各组大鼠下丘脑外侧区中 OXA、OX1R 与 ob-R 蛋白表达比较

表 4、5、6 示, 与空白对照组比较, 模型组大鼠下丘脑外侧区中 OXA 与 OX1R 的阳性细胞数、阳性表达面积及 IOD 值表达下降, ob-R 的阳性细胞

表 5 各组大鼠下丘脑外侧区中 OX1R 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	阳性表达细胞数 (个)	阳性表达面积 (μm^2)	IOD 值
空白对照组	6	46.85 $\pm$ 3.56	8707.24 $\pm$ 252.46	345.50 $\pm$ 44.10
模型组	6	30.75 $\pm$ 2.79*	5576.89 $\pm$ 247.11*	246.70 $\pm$ 28.86*
逍遥散组	6	37.15 $\pm$ 1.87 $^{\Delta}$	6355.19 $\pm$ 243.77 $^{\Delta}$	292.68 $\pm$ 10.85 $^{\Delta}$

注: OX1R, 食欲素受体 1; 与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

表 6 各组大鼠下丘脑外侧区中 ob-R 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	阳性表达细胞数 (个)	阳性表达面积 (μm^2)	IOD 值
空白对照组	6	24.76 $\pm$ 2.91	264.15 $\pm$ 21.98	78.72 $\pm$ 2.20
模型组	6	75.94 $\pm$ 14.68*	739.21 $\pm$ 116.62*	225.38 $\pm$ 5.52*
逍遥散组	6	47.83 $\pm$ 6.34 $^{\Delta}$	447.73 $\pm$ 28.53 $^{\Delta}$	132.98 $\pm$ 12.39 $^{\Delta}$

注: ob-R, 瘦素受体; 与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

胞数、阳性表达面积、IOD 值表达上调 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 逍遥散组大鼠下丘脑外侧区中 OXA 与 OX1R 的阳性细胞数、阳性表达面积、IOD 值升高, ob-R 的阳性细胞数、阳性表达面积、IOD 值下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.5 各组大鼠下丘脑外侧区中前食欲素原、OX1R 与 ob-R mRNA 表达比较

表 7 示, 与空白对照组比较, 模型组大鼠下丘脑外侧区中前食欲素原、OX1R mRNA 表达均下降, ob-R mRNA 表达升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 逍遥散组大鼠前食欲素原与 OX1R mRNA 表达则上调, ob-R mRNA 表达下调 ($P < 0.01$)。

表 7 各组大鼠下丘脑外侧区中前食欲素原、OX1R 与 ob-R mRNA 表达比较 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	前食欲素原	OX1R	ob-R
空白对照组	6	1.00 $\pm$ 0.08	1.03 $\pm$ 0.19	1.10 $\pm$ 0.29
模型组	6	0.46 $\pm$ 0.16*	0.44 $\pm$ 0.07*	2.74 $\pm$ 0.34*
逍遥散组	6	0.76 $\pm$ 0.04 $^{\Delta}$	0.70 $\pm$ 0.11 $^{\Delta}$	1.81 $\pm$ 0.16 $^{\Delta}$

注: OX1R, 食欲素受体 1; ob-R, 瘦素受体; 与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

3 讨论

束缚应激是目前较为常用的模仿人体“压抑”和“郁怒”不得宣泄状态的动物模型制备方法, 能够较好地模仿人体在慢性心理应激状态下出现的诸如焦虑、抑郁情绪和行为, 以及食欲减退和体重增长减缓等能量代谢异常等表现^[6-7]。从致病因素和临床表现而言, 束缚应激模式与中医情志致病过程相似。中医学认为, “肝主疏泄”, 调畅情志, 肝与情志关系密切。有研究认为, 肝的生理功能在慢性应激过程中起主导作用^[8]。一旦肝失疏泄, 气机郁滞, 犯客脾胃, 可出现脾胃运化失常表现。

本实验通过慢性束缚方法复制大鼠肝郁脾虚证模型, 模拟了郁怒日久、木郁乘土、肝郁脾虚的病理演变过程。

旷场实验是目前常用的慢性应激动物模型行为学评价方法, 其原理是基于动物对空旷环境的畏惧性和对陌生环境的探究心理进行分析, 多用于评价动物的自发活动和焦虑抑郁状态^[9]; D-木糖可经小肠直接吸收, 不经消化酶参与, 可反映小肠的吸收功能^[10]。本研究结果显示, 模型组大鼠在旷场试验中 5min 移动总路程和中央区总穿格数减少, 说明大鼠的自主探究和自发活动减少, 表现出对空旷环境的畏惧和忧郁情绪的存在; 同时, 大鼠出现食欲减退、体重增长减缓以及血清 D-木糖含量下降的表现, 提示大鼠胃肠消化、吸收功能存在异常。

下丘脑被认为是调节能量代谢的关键中枢部位, 尤其是下丘脑外侧区被认为是调控食欲的摄食中枢。下丘脑外侧区分泌的食欲素是具有强烈刺激摄食效应的神经肽, 包括 OXA 和食欲素 B (OXB) 两种神经元, 二者均来源于前食欲素原^[11]。食欲素有两个与 G-蛋白偶联的内源性配体 OX1R、OX2R, 其中 OX1R 对 OXA 具有选择性^[12]。瘦素是一种由脂肪组织分泌、具有抑制摄食作用的内分泌因子, 研究证实, 在下丘脑外侧区中的 ob-R 神经元可投射至食欲素神经元, 瘦素可通过作用于 ob-R 调节食欲素的功能^[13-14]。本研究结果提示, 慢性应激状态下外周分泌增多的瘦素, 通过血脑屏障与脑组织中的 ob-R 蛋白结合, 从而抑制前食欲素原 mRNA 的分泌, 从而使 OXA 的含量减少; 此外, 应激也抑制了 OX1R 的表达。由此可知, 束缚应激所致摄食障碍和消化功能减退可能与下丘脑外侧区瘦素 (Leptin) -ob-R-OXA/OX1R 摄食通路的抑制有关。

逍遥散功善疏肝解郁、健脾养血，其方中柴胡、当归、白芍补肝体而助肝用，顺肝体阴而用阳之性，疏解肝郁而养肝，共为方中主药；辅以白术、茯苓健脾和胃，强壮中焦制肝气戕伐；佐薄荷、生姜之辛散，以条达肝郁；使以炙甘草调和诸药。诸药合用，以条达肝气，健脾养血和胃。临床研究证实，逍遥散在临床各科中有着广泛的应用，其主治证候以肝郁脾虚证为主^[3]。现代药理学研究发现，逍遥散抗抑郁作用机制可能是通过调节单胺类神经递质、神经突触可塑性、神经内分泌系统和免疫功能实现^[4]。课题组前期研究结果表明，逍遥散可改善应激反应出现脾胃功能失常，其机制与调节下丘脑弓状核中 ob-R、神经肽 Y 及其受体 1、可卡因安非他明调节转录因子 (CART)、 α 促黑素细胞激素 (α -MSH)^[7-18]。本研究结果显示，大鼠灌胃逍遥散后其血清瘦素水平和下丘脑外侧区中 ob-R 表达下降，而下丘脑外侧区中 OXA 蛋白与 OX1R 蛋白及 mRNA 表达上调，说明逍遥散抗应激的中枢机制可能是通过调节下丘脑外侧区中 Lep-tin-ob-R-OXA/OX1R 实现。

参考文献

- [1] 姜幼明, 蒙缜之, 刘玥芸, 等. 逍遥散干预慢性应激焦虑状态概述 [J]. 中医杂志, 2015, 56(3): 259-261.
- [2] 桂丹, 富文俊, 魏周科. 焦虑症海马神经元损伤分子生物学机制及丹栀逍遥散干预的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(9): 218-222.
- [3] LI P, TANG XD, CAI ZX, et al. CNP signal pathway up-regulated in rectum of depressed rats and the interventional effect of Xiaoyaosan [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(5): 1518-1530.
- [4] LI XJ, MA QY, JIANG YM, et al. Xiaoyaosan exerts anxiolytic-like effects by down-regulating the TNF- α /JAK2-STAT3 pathway in the rat hippocampus [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 353. doi: 10.1038/s41598-017-00496-y.
- [5] 岳利峰, 丁杰, 陈家旭, 等. 肝郁脾虚证大鼠模型的建立与评价 [J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(6): 396-400.
- [6] 旷湘楠, 王少贤, 方朝义, 等. 逍遥散调节慢性应激肝郁脾虚模型大鼠下丘脑弓状核 ob-R、 α -MSH 变化机制 [J]. 世界中医药, 2017, 12(3): 488-493.
- [7] JIANG YM, LI XJ, MENG ZZ, et al. Effects of Xiaoyaosan on Stress-Induced Anxiety-Like Behavior in Rats: Involvement of CRF1 Receptor [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016: 1238426. doi: 10.1155/2016/1238426.
- [8] 严灿, 吴朋朋, 徐志伟. 应用心理应激理论和方法开展中医药实验研究的思路 [J]. 广州中医药大学学报, 2004, 21(4): 325-328.
- [9] 王维刚, 刘震泽, 吴文婷, 等. 旷场实验在小鼠行为分析中的应用 [J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(11): 1191-1196.
- [10] 樊新荣, 朱文锋, 伍参荣, 等. 太阳与阳明病症实验大鼠小肠 D-木糖的吸收功能及肝脏 ATP 酶活性研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2007, 21(4): 47-49.
- [11] DE LECEA L, KILDUFF TS, PEYRON C, et al. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(1): 322-327.
- [12] SAKURAI T, AMEMIYA A, ISHII M, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuro peptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior [J]. Cell, 1998, 92(5): 573-585.
- [13] PLAZA-ZABALA A, FLORES A, MALDONADO R, et al. Hypocretin/orexin signaling in the hypothalamic paraventricular nucleus is essential for the expression of nicotine withdrawal [J]. Biol Psychiatry, 2012, 71(3): 214-223.
- [14] BUTLER RK, FINN DP. Stress-induced analgesia [J]. Prog Neurobiol, 2009, 88(3): 184-202.
- [15] 刘燕, 陈家旭, 邹小娟, 等. 逍遥散方证研究概况 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(3): 1008-1010.
- [16] 江东, 郭维, 孙琪, 等. 逍遥散抗抑郁作用机制研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(1): 214-217.
- [17] 王霞, 马金生, 吴佳欣, 等. 逍遥散对慢性束缚应激模型大鼠行为学和下丘脑弓状核 NPY 及受体 Y1 表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(4): 453-458.
- [18] 旷湘楠. 慢性应激肝郁脾虚模型大鼠下丘脑弓状核 ob-R、CART、 α -MSH 变化及逍遥散调节作用 [J]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.

Effect of Xiaoyao Powder (逍遥散) on the Expression of Leptin Receptor, Orexin A and Orexin Receptor 1 in Lateral Hypothalamus Area of Chronic Immobilization Stress Model Rats

WANG Jiepeng, WANG Shaoxian, FANG Chaoyi, KUANG Xiangnan, WANG Yixu, ZHAO Dan

(Basic Medicine College, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang, 050200)

ABSTRACT Objective To study the possible mechanism of Xiaoyao Powder (逍遥散) on stress. **Methods** A total of 72 male SD rats were randomly divided into control group, model group and Xiaoyao Powder group, with 24

rats in each group. Except for the control group, the rats models were established by continuous immobilization stress for 21 days with 3h/day. On the 1st day of model establishment, *Xiaoyao Powder* decoction suspension (3.85 g/kg · d) was gavaged to the *Xiaoyao Powder* group, while the other 2 groups were gavaged with normal saline (1 ml/100 g). The body weight, food intake and behaviors of 3 groups were recorded on the 0, 7th, 21st day of the experiment. The content of serum D-xylose, orexin A (OXA) and leptin in lateral hypothalamus area were detected on the 22nd day of the experiment. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was conducted to determine the expression of the leptin recipient Ob-R, OXA and orexin receptor 1 (OX1R) in lateral hypothalamus area. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect ob-R mRNA, prepro-orexin mRNA and OX1R mRNA. **Results** Compared with the control group, the body weight, food intake and the total mobile distance and total cross numbers in open field test (OFT) of the model group rats were obvious decreased; Serum D-xylose content was decreased; expression of OXA, OX1R, prepro-orexin and OX1R mRNA in lateral hypothalamus area decreased; and expression of ob-R, leptin, and ob-R mRNA increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). All the indexes were improved in *Xiaoyao Powder* group compare with the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Xiaoyao Powder* can regulate the Lep-*ob-R*-OXA/OX1R signal pathway to improve appetite disorder induced by chronic stress.

Keywords chronic immobilization stress; *Xiaoyao Powder*; lateral hypothalamus area; orexin A; OX1R; Ob-R; prepro-orexin

(收稿日期: 2018-04-02; 修回日期: 2018-05-23)

编辑: 邓 媛

(上接第 1673 页)

Clinical Observation on 82 Cases of Initial Pulmonary Tuberculosis by Adjuvant Treatment of *Bufei Huoxue Capsule* (补肺活血胶囊)

HU Xu, SHANG Yaomin, XING Baochun

(Henan Chest Hospital, Zhengzhou, 450000)

ABSTRACT Objective To evaluate the efficacy and safety of *Bufei Huoxue Capsule* (补肺活血胶囊) combined with chemotherapy for new patients with initial pulmonary tuberculosis (TB). **Methods** A total of 180 new cases with pulmonary tuberculosis were randomized divided into treatment group (90 cases) and control group (90 cases). Standard chemotherapy (2HREZ/4HR) combined with *Bufei Huoxue Capsule* was used in treatment group, and standard chemotherapy (2HREZ/4HR) only was used in control group, both for continuously 6 months. Index of efficacy for symptoms improvement of both groups were calculated in the end of 3rd and 6th month after the treatment. Rates of negative conversion of bacteria, efficacy of X-rays of both groups after 6 months treatment, and the adverse reaction were recorded. **Results** A total of 82 cases in treatment group and 85 cases in control group finally completed the treatment. The therapeutic index in the treatment group was higher than those of the control group after 3 and 6 months of the treatment ($P < 0.01$). The difference of negative conversion rate of bacteria (including sputum smear and sputum culture) between both groups after 6 months of treatment has no statistical significance ($P > 0.05$). There were 7 cases of obvious absorption, 43 cases of absorption, 16 cases without obvious changes, 16 cases of deterioration and 61.0% of total absorptance in treatment group, corresponding as 6 cases, 28 cases, 30 cases, 21 cases and 40.0% in control group. The results in the treatment group were better than those of control group ($P < 0.05$). However, differences of the changes of conversion-ray closure and closure rate between 2 groups were not statistically significant ($P > 0.05$). There was no adverse reaction in both groups. **Conclusion** *Bufei Huoxue Capsule* can effectively and safely alleviate the symptoms of TB patients, and also can improve the rate of focus absorption.

Keywords pulmonary tuberculosis; *Bufei Huoxue Capsule*; X-ray; sputum culture

(收稿日期: 2018-05-11; 修回日期: 2018-06-12)

编辑: 叶 晨