

经前平颗粒对经前期综合征肝气逆证大鼠下丘脑和海马 μ 阿片受体表达的影响

王芙蓉 薛 玲 张惠云*

山东中医药大学中医药经典理论教育部重点实验室, 济南市长清大学科技园, 250355)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30973688); 山东省自然科学基金项目(2007ZRB14568)

* 通讯作者: 张惠云, zhuiyun@163.com, (0531)89628063

[摘要] 目的 探讨经前期综合征(PMS)肝气逆证的发病机制及经前平颗粒的干预机制。方法 将 30 只处于非接受期的 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、给药组, 每组 10 只。除正常组外, 其余大鼠采用数字脉冲电刺激噪音干扰仪刺激 5 天, 制备 PMS 肝气逆证模型。同时, 正常组和模型组灌胃生理盐水 1ml/100g 体重, 给药组予经前平颗粒(0.16g/100g 体重)。每天 1 次, 连续 5 天。检测各组大鼠下丘脑和海马 μ 阿片受体 mRNA 和蛋白表达。结果 PMS 肝气逆证大鼠下丘脑和海马 μ 阿片受体 mRNA 和蛋白表达均显著升高, 经前平颗粒可使恢复至近似正常水平。结论 下丘脑和海马 μ 阿片受体表达升高是经前期综合征的发病机制之一, 经前平颗粒可通过抑制该受体表达而发挥疗效。

[关键词] 经前期综合征肝气逆证; μ 阿片受体; 下丘脑; 海马

Influence of Jingqianping Granule on Expression of μ Opium Receptor in the Hypothalamus and Hippocampus of Premenstrual Syndrome Rats with Liver Qi Reversion WANG Furong, XUE Ling, ZHANG Huiyun

(Department of Traditional Chinese Medicine Classical Theories, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355)

ABSTRACT **Objective** To explore the pathogenesis of liver qi reversion in premenstrual syndrome (PMS) and the intervention mechanism of Jingqianping Granule (Granule for premenstrual disorders). **Methods** Thirty non-estrus SD rats were randomized into normal control group, model group, and Jingqianping Granule group, with 10 in each. Except the normal control group, other two groups were made PMS liver qi reversion models with the stimulation from the digital impulse electrical stimulation noise interference apparatus for 5 days. The normal control group and model group were treated with intragastric feeding with normal saline 1ml/100mg body weight, and the Jingqianping Granule group was administered Jingqianping Granule (0.16g/100g body weight), once a day, 5 days in succession. The expression of μ opium receptor mRNA and protein in the hypothalamus and hippocampus of all groups was determined. **Results** The expression of μ opium receptor mRNA and protein in the hypothalamus and hippocampus of PMS rats with liver qi reversion was all increased significantly, Jingqianping Granule could make it restored to nearly normal level. **Conclusion** Increase of μ opium receptor in the hypothalamus and hippocampus is one of pathogenic mechanisms of PMS and Jingqianping Granule functions to exert its influence through inhibiting the increase of this receptor.

Key Words liver qi reversion in premenstrual syndrome (PMS); μ opium receptor; hypothalamus; hippocampus

经前期综合征(PMS)是影响女性身心健康的常见病、多发病, 中医证候分为肝气逆证和肝气郁证, 经前烦躁易怒是肝气逆证的主症。PMS 肝气逆证的发生机制复杂, 与内源性阿片肽系统有关^[1-3]。既往研究表明, PMS 肝气逆证大鼠血清中内啡肽含量显著升高^[4], 但 μ 阿片受体(μ opioid receptor, MOR)与 PMS 肝气逆证关系仍不明确。本研究采用 PMS 肝气逆证模型大鼠, 观察受体在下丘脑和海马中的表达, 从而探讨 PMS 肝气逆证的发病机制以及经前平颗粒的干预机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康未孕 SD 雌性大鼠 30 只, SPF 级, 体重(200±20)g, 购自山东中医药大学实验动物中心, 实验动物许可证号: SCXK(鲁)20050015。

1.2 药品与试剂

经前平颗粒(江苏扬子江药业集团公司, 批号: 05111501), 颗粒规格: 1.1g, 即 1ml 药液含原生药 1g。rTaq 酶、dNTPs、RNase Inhibitor、DNA marker DL2000(大连宝生物公司); M-MLV 反转录

酶(Promega 公司);Trizol(Sigma 公司);MOR-1 一抗(羊抗大鼠多克隆抗体)、二抗(驴抗羊多克隆抗体,Santa Cruz 公司,批号分别为 sc-7488、sc-2020);预染蛋白 marker(Thermo Fisher Scientific 公司);RIPA 裂解液、BeyoECL Plus(碧云天生物技术研究所);NC 膜(美国 PALL 公司)。

1.3 模型制备及给药

参照课题组前期工作制备 PMS 肝气逆证大鼠模型^[8]。大鼠称重,依阴道涂片法确定大鼠动情周期的接受期(动情前期、动情期)与非接受期(动情后期、动情间期),非接受期即相当于人经前期。按随机数字表法将 30 只处于非接受期的大鼠分为正常组、模型组、给药组,每组 10 只。模型组和给药组采用 ST-A 型数字脉冲电刺激噪音干扰仪(由济南空军后勤装备总厂、山东中医药大学联合研制)给予刺激,共 5 天,制备 PMS 肝气逆证大鼠模型。在刺激造模的同时,给药组大鼠每天灌胃给予经前平颗粒(给药量相当于人临床 8 倍剂量即 0.16g/100g 体重),正常组和模型组大鼠灌胃等体积(1ml/100g 体重)生理盐水,每天 1 次,连续 5 天。

1.4 样本制备

造模给药 5 天后,根据阴道涂片,记录大鼠各自的动情周期,将处于非接受期的大鼠正常组 8 只、模型组 7 只、给药组 9 只断头处死。快速剥离出脑组织,在冰盒上分离下丘脑、海马,迅速放入液氮中储存备用。

1.5 RT-PCR 法检测下丘脑和海马 MOR-1 mRNA 表达

采用 Premier5 软件设计引物,MOR-1 上游引物 5'-acatccctccacggctaatac-3',下游引物 5'-ctctacagaaggtgactgggtc-3';内参 β -actin 上游引物 5'-tggtgggtatgggtcagaaggactc-3',下游引物 5'-catggctggggtgttggaaggtctca-3',片段长度分别为 525bp、265bp。引物均由上海生工生物公司合成。

采用 Trizol 法提取脑组织总 RNA,按照 M-MLV 反转录酶说明书进行反转录合成 cDNA。PCR 扩增体系 25 μ l,94 $^{\circ}$ C 预变性 5min,94 $^{\circ}$ C 变性 30s,57.5 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30s,共 34 个反应循环,72 $^{\circ}$ C 最后延伸 10min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后,采用 SmartView 生物电泳图像分析系统测定电泳条带的光密度值。计算目的基因与内参基因的光密度值比值,以此作为目的基因的相对表达量。

1.6 下丘脑和海马 MOR-1 蛋白表达的检测

取出研磨好的大鼠脑组织,冰浴中操作,加入适量 RIPA 裂解液提取总蛋白,采用 Bradford 法测定蛋白含量。以每孔 50 μ g 总蛋白上样,经 8% SDS-PAGE 电泳分离后,湿法转移至 NC 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液室温封闭 1h,与 MOR-1 一抗(1:100)室温摇床孵育 2h(抗体均用 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液稀释),TBST 洗膜 3 次,10min/次,再与辣根过氧化酶标记的二抗(1:2000)室温孵育 1h,TBST 洗膜 3 次,10min/次,ECL 化学发光试剂检测杂交信号,显影于 X 线片上,用凝胶成像分析仪在可见光透射下对 X 线片进行扫描和图像分析。以各条带的灰度值代表其蛋白的表达量,用内参 β -actin 条带的灰度值进行校正,得出各条带的相对灰度值,即蛋白的相对表达量。

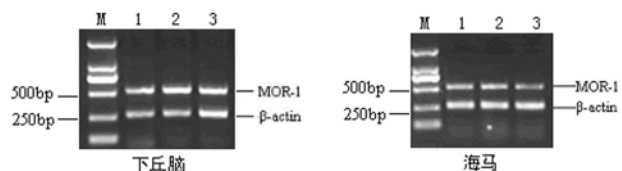
1.7 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计分析软件处理,计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠下丘脑和海马 MOR-1 mRNA 表达检测结果

图 1、图 2 示,与正常组比较,模型组大鼠下丘脑和海马中 MOR-1 的 mRNA 表达量均显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,给药组大鼠下丘脑和海马中的 MOR-1 mRNA 表达量显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。



M:DL2000 DNA Marker,1:正常组,2:模型组,3:给药组

图 1 各组大鼠下丘脑和海马脑区 MOR-1 mRNA 表达比较

2.2 各组大鼠下丘脑和海马 MOR-1 蛋白表达的比较

图 3、图 4 示,与正常组比较,模型组大鼠下丘脑和海马中 MOR-1 的蛋白表达量显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而与模型组比较,给药组大鼠下丘脑中该受体的蛋白表达量呈下降趋势,海马中该受体的蛋白表达量则显著降低($P < 0.01$)。

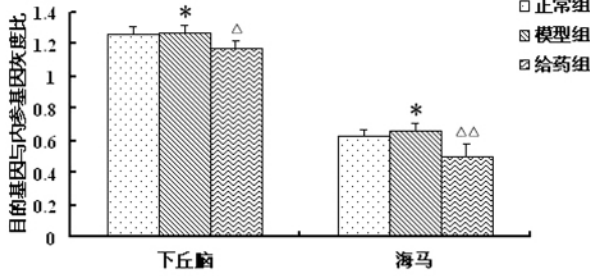


图 2 各组大鼠下丘脑和海马 MOR-1 mRNA 相对表达量比较

(注:与正常组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$)

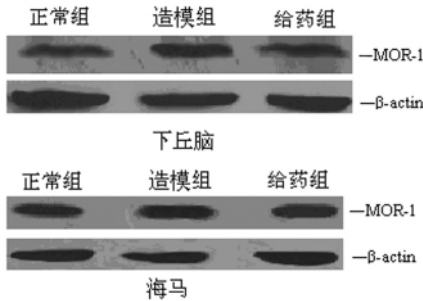


图 3 各组大鼠下丘脑和海马 MOR-1 蛋白表达比较

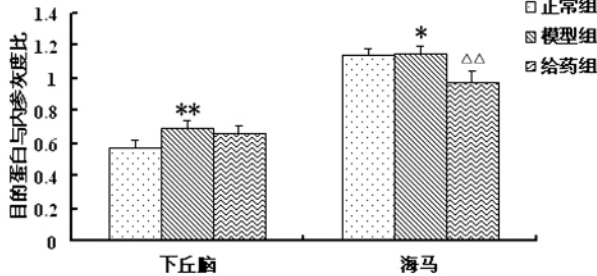


图 4 大鼠下丘脑和海马 MOR-1 蛋白的相对表达量比较

(注:与正常组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$)

3 讨论

肝气逆证占 PMS 患者的 58.9%, 以经前情志亢奋、烦躁易怒、乳房胀痛为主要特点, 属中医情志病范畴。近年越来越多的研究显示出内阿片肽系统与情绪活动及情感异常类疾病的密切相关性, 如 MOR-1 激动剂吗啡腹侧海马区及伏核给药均可产生明显抗焦虑作用^[6], 而 δ 受体拮抗剂和 κ 受体源性配体则显示诱发焦虑效应^[7], 内啡肽表现出抗抑郁作用^[8]。提示内阿片肽系统可能与情志病 PMS 的发生发展有关。进一步研究显示, PMS 患者表现为血中 β -内啡肽含量降低^[1-2], 阿片类活性下降^[3]。本课题组前期研究也证实^[4], PMS 肝气逆

证大鼠血清中内啡肽含量显著升高。但阿片受体与 PMS 直接相关性的研究未见报道。为此, 本项目首次观察了 PMS 肝气逆证大鼠下丘脑和海马区域 MOR-1 表达, 发现上述两区域 MOR-1 mRNA 和蛋白表达均显著高于正常大鼠。我们的研究证实除阿片肽外, 阿片受体同样参与 PMS 的发生发展, 对阿片受体表达及活性改变的研究也有助于阐明 PMS 的发病机制。

内啡肽和 MOR-1 在中枢神经系统中主要分布在边缘系统(隔膜、伏核、杏仁核)、丘脑核、蓝斑以及脑干中的一些区域, 已知这些区域与情绪紊乱, 如焦虑和抑郁的发生有关。有研究表明 MOR-1 基因敲除小鼠对抗抑郁药的治疗不起反应^[9]。Zarrindast 等^[6]指出, 腹侧海马和伏核处内阿片肽系统与焦虑样行为的发生密切相关, 腹侧海马区是抗焦虑药物发挥作用的主要区域。中药穗花牡荆广泛用于 PMS 治疗^[10], 现已证实其甲醇提取物为 MOR-1 激动剂^[11]。上述研究为我们的结论提供了理论基础, 即 PMS 的发生与中枢 MOR-1 表达变化密切相关, 为进一步开发相关的治疗药物提供了新的靶点。

经前平颗粒是针对 PMS 肝气逆证具有平肝理气、除胀止痛等功效的复方, 能有效缓解经前烦躁易怒、乳房胀痛、头痛腹胀诸症。方中主要含有白芍、香附、柴胡、川芎等中药。现代药理研究表明经前平颗粒组方中的多种成分, 如芍药苷、香附酮等具有镇静、镇痛作用, 柴胡中的柴胡皂苷和柴胡挥发油均有抗惊厥作用。提示这些成分可能是经前平颗粒对经前烦躁易怒及其伴有的攻击行为发挥调节作用的物质基础。本研究发现, 经前平颗粒可显著抑制 PMS 肝气逆证大鼠下丘脑和海马区域 MOR-1 表达。由此推测, 抑制中枢 MOR-1 表达是经前平颗粒治疗 PMS 肝气逆证的分子机制之一。

内啡肽及其受体的分布区域中含有单胺类的神经递质(如 5-HT、DA、NA 等), 它们都与情感类疾病的发生密切相关。现代研究表明, PMS 的发病可能产生于卵巢甾体类激素雌二醇、孕酮及其代谢产物的周期性改变, 通过神经介质的介导(如 5-HT、GABA 等)而影响脑内某些区域功能, 形成神经内分泌障碍, 产生 PMS 症状^[12]。Fichna^[8]认为内啡肽的抗抑郁效果也可能是受到单胺类神经递质的介导。我们的前期研究也发现, PMS 肝气逆证患者血中雌二醇、孕酮卵泡期分泌峰值明显减低, 黄体期的分泌峰值未有形成^[13], 肝疏泄太过所致烦躁易怒等

表现可能与边缘叶 DA 水平上升,下丘脑 DA、边缘叶 5-HT 水平下降密切相关^[14]。因此我们推测内源性阿片肽系统可能通过神经递质改变及随后的单胺类神经递质变化而参与 PMS 肝气逆证的发生发展。对内源性阿片系统在 PMS 肝气逆发生中的具体机制尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Taskin O, Gokdeniz R, Yalcinoglu A, et al. Placebo-controlled cross-over study of effects of tibolone on premenstrual symptoms and peripheral beta-endorphin concentrations in premenstrual syndrome[J]. Hum Reprod, 1998, 13(9):2402-2405.
- [2] Klatzkin RR, Lindgren ME, Forneris CA, et al. Histories of major depression and premenstrual dysphoric disorder: Evidence for phenotypic differences[J]. Biol Psychol, 2010, 84(2): 235-247.
- [3] Rapkin AJ, Shoupe D, Reading A, et al. Decreased central opioid activity in premenstrual syndrome: luteinizing hormone response to naloxone[J]. J Soc Gynecol Investig, 1996, 3(2):93-98.
- [4] 马晶,张惠云. 经前期综合征模型大鼠下丘脑和外周血内啡肽含量变化的实验研究[J]. 药学与临床研究, 2008, 16(5):343-346.
- [5] 魏盛. 经前期综合征肝气逆、肝气郁证动物模型改进及肝失疏泄微观机制研究[J]. 山东中医药大学学报, 2007, 31(5):404-408.
- [6] Zarrindast MR, Babapoor-Farrokhran S, Babapoor-Farrokhran S, et al. Involvement of opioidergic system of the ventral hippocampus, the nucleus accumbens or the central amygdala in anxiety-related behavior[J]. Life

- Sci, 2008, 82(23-24):1175-1181.
- [7] Narita M, Kaneko C, Miyoshi K, et al. Chronic pain induces anxiety with concomitant changes in opioidergic function in the amygdala[J]. Neuropsychopharmacology, 2006, 31(4): 739-750.
- [8] Fichna J, Janecka A, Piestrzeniewicz M, et al. Antidepressant-like effect of endomorphin-1 and endomorphin-2 in mice[J]. Neuropsychopharmacology, 2007, 32(4): 813-821.
- [9] Ide S, Fujiwara S, Fujiwara M, et al. Antidepressant-like effect of venlafaxine is abolished in μ -opioid receptor-knockout mice[J]. J Pharmacol Sci, 2010, 114(1): 107-110.
- [10] He Z, Chen R, Zhou Y, et al. Treatment for premenstrual syndrome with Vitex agnus castus: A prospective, randomized, multi-center placebo controlled study in China[J]. Maturitas, 2009, 63(1): 99-103.
- [11] Webster DE, He Y, Chen SN, et al. Opioidergic mechanisms underlying the actions of Vitex agnus-castus L [J]. Biochem Pharmacol, 2011, 81(1): 170-177.
- [12] 乔明琦,张惠云. 中医情志学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2009: 328.
- [13] Qiao MQ, Zhang HY, Yu YH, et al. Dynamic Changes in Serum Estradiol and Progesterone levels in Patients of Premenstrual Syndrome with Adverse Flow of Liver-qi[J]. J Tradit Chin Med, 2008, 28(2): 106-109.
- [14] 巢玉彬,魏盛,乔明琦,等. 经前期综合征肝气逆、郁两证大鼠模型血清及不同脑区单胺类神经递质含量分析[J]. 医学研究杂志, 2010, 39(4):19-22.

(收稿日期:2010-11-26;修回日期:2011-02-01)

[编辑:行 之]

旨可平®降脂通络软胶囊有奖征文通知

神威药业旨可平®降脂通络软胶囊是 SFDA 批准用于治疗高脂血症的国家级新药,也是目前临床上确证具有肝脏保护作用的调脂药。自 2004 年上市以来,其确切的疗效及良好的安全性,获得了临床医生和患者的一致认可。

为了促进临床用药经验交流,神威药业于 2011 年 7—12 月面向全国临床医生征集旨可平®临床研究和临床观察的论文,篇幅 2000 字以上。获奖者名单将刊登于 2012 年第一期《中华心血管病杂志》。奖项设定如下:

一等奖:1 名,奖金 5000 元;二等奖:2 名,奖金 3000 元;三等奖:5 名,奖金 2000 元;优秀奖:50 名,价值 500 元礼品一份;参与奖:名额不限,价值 150 元礼品一份(凡投寄论文者均可获此奖)

请将论文电子版发至:zhikeping@126.com

有奖征文热线:010-85860066 转 6230

欢迎广大医生积极参与,踊跃投稿!