

·基础研究·

# 中药新制剂(YN-3)干预慢性应激模型大鼠 海马 NR2A、NR2B mRNA 表达的研究\*

史榕苻<sup>1</sup> 图 娅<sup>1,2</sup>

**摘要 目的:**探讨中药新制剂(YN-3)对慢性应激模型大鼠海马 NR2A、NR2BmRNA 含量的调节作用。**方法:**将 32 只 SD 雄性大鼠随机分为空白组、模型组、中药组(YN-3)、氟西汀组,每组 8 只。采用放射免疫法检测海马皮质醇(CORT),比色法测定海马内 Glu 含量,PCR 法测定海马内 NR2A、NR2BmRNA 含量。**结果:**与空白组相比,模型组海马内 CORT、Glu、NR2AmRNA、NR2BmRNA 含量明显升高,YN-3 组和氟西汀组有效抑制海马内 CORT、Glu、NR2A mRNA、NR2BmRNA 的过量表达。**结论:**慢性应激引起大鼠海马内 NR2A、NR2BmRNA 含量增加,YN-3 可能通过调整 NR2A、NR2B mRNA 含量对抗海马内神经毒性作用。

**关键词** 慢性应激;中药;NR2AmRNA;NR2BmRNA;谷氨酸

**中图分类号:**R749.4,R49 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2008)-01-0030-04

**Effects of YN-3 on NR2A, NR2B mRNA expressions in hippocampal tissue in chronic stress model rats/SHI Rongxing, TU Ya// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(1): 30—33**

**Abstract Objective:**To investigate the effects of YN-3 on changes of NR2A NR2B mRNA in hippocampal tissue in chronic stress rats. **Method:**Thirty-two male SD rats were evenly randomized into control, stress-model, and YN-3 group and Prozac220 group. Chronic stress model was established by using mixed stimulation. The contents of corticosterone (CORT) and Glutamic acid (Glu) in hippocampal tissue were detected with radioimmunoassay techniques and electro-chemical detection technique. NR2A, NR2BmRNA expressions in hippocampal tissue by Quantitative Real Time PCR.**Result:**Compared with control group, the rats' hippocampal NR2A and NR2BmRNA contents increased remarkably in model group ( $P < 0.01$ ). In comparison with control group, the rats' NR2A, NR2BmRNA contents lowered significantly in YN-3 group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:**Chronic stress may cause high level NR2A and NR2BmRNA in hippocampal, whereas YN-3 can adjust the expression of NR2A and NR2BmRNA in hippocampal tissue.

**Author's address** College of Acu-moxibustion, Beijing University of TCM, Beijing, 100029

**Key words** chronic stress; traditional Chinese medicine; NR2A;NR2B; Glutamic acid

抑郁症(depression)是一种主要表现为显著而持久的心境低落的神经精神疾患,发病率呈上升趋势,其病因至今尚不清楚。YN-3 是治疗抑郁症的经验方研制成的中药新制剂,实验证明,YN-3 具有明显的抗抑郁作用。本研究采用慢性应激大鼠模型,通过测定海马内皮质醇(corticosterone,CORT)、谷氨酸(Glutamic acid,Glu)水平及 NR2A、NR2BmRNA 含量,研究 YN-3 是否通过对海马内 N-甲基-D-天门冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor,NMDAR 或 NR)的影响起到抗抑郁作用。

近年来研究表明,NMDAR 调控药物具有潜在抗抑郁效应,是兴奋性氨基酸——Glu 受体的重要亚型,属配基门控的离子通道,NMDAR 介导的 Glu 神经兴奋毒性作用在脑损伤的众多环节中起着关键作用<sup>[1]</sup>。NMDAR 在中枢神经系统中广泛参与学习、记忆、突触可塑性、神经发育、缺血性脑损伤、神经退行

性变、癫痫、肿瘤等许多重要的生理病理过程<sup>[2]</sup>。

现已发现 NMDAR 至少存在 7 个亚单位,即 NR1 亚单位、4 种 NR2 亚单位(分为 NR2A、NR2B、NR2C 和 NR2D)以及 2 种 NR3 亚单位(包括 NR3A 和 NR3B)<sup>[3]</sup>。构成 NMDAR 的亚单位常以受体复合物的形式存在<sup>[4]</sup>,其中 NR1 是受体复合物的功能亚单位,NR2 是调节亚单位,不同 NR2 的参与可赋予通道复合物以不同的电生理学和药理学特性,其基因表达的紊乱将导致受体复合物功能活性的改变<sup>[5]</sup>。本研究采用荧光定量 PCR 技术对慢性应激模型大鼠海马 NR2A、NR2BmRNA 表达进行检测并观

\* 基金项目:国家自然科学基金资助(30472181)

1 北京中医药大学针灸推拿学院,100029

2 通讯作者:图娅(北京中医药大学针灸推拿学院,tuyab@263.net)

作者简介:史榕苻,女,博士研究生

收稿日期:2007-03-05

察 YN-3 的干预作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

Trizol RNA 提取试剂盒(美国 Gibco 公司);逆转录-聚合酶链反应试剂盒、TaqDNA 聚合酶、dNTP、Access(大连);SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒(美国应用生物公司);琼脂糖(西班牙 Biowest 公司);其他试剂均为国产分析纯。

5415R 型高速离心机(德国 Eppendorf 公司);Gene II 型 DNA/RNA 测定仪(瑞典 Pharmacia biosystem 公司);GeneAmp 9600 型普通 PCR 仪及 PRISM 7000 型荧光定量 PCR 仪(美国应用生物公司);DYCP-31D 型琼脂糖水平电泳槽(北京);Image master VDS 扫描仪(瑞典)。

CORT 放免试剂盒,由北京华英生物技术有限公司提供。Glu 生化试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

### 1.2 动物分组及造模方法

雄性 SD 大鼠 32 只,体重 170±10g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。通过开野实验将水平运动次数加垂直运动次数不足 30 次或超过 120 次的大鼠剔除,然后按体重随机分组,分为空白组、模型组、中药组、西药组,每组 8 只。实验前各组大鼠在 25℃安静环境内饲养 1 周,自然光照,通风良好,自由进食水。

### 1.3 各组的处理方法

①空白组:每笼 5 只饲养,正常饮食饮水。②模型组:采用慢性应激模型<sup>[9]</sup>结合孤养方式造模。每笼 1 只饲养,慢性多种应激程序每日随机安排以下一种:禁水(24h)、禁食(24h)、昼夜颠倒(24h)、夹尾(180s)、束缚(3h)、冷水游泳(14℃,5min)、电击足底(电压为 30V,电击 5s,间歇 5s,共进行 120s),平均每种

刺激 3 次,共计 21d,造成大鼠慢性应激抑郁模型,每日按 1ml/kg 灌服生理盐水 1 次。③中药组:造模同时,于每日应激刺激前 1h 灌胃给予 YN-3,大鼠按 1.2mg/kg 体重,浓度 1.00g/ml,共 21d。④西药组(氟西汀, fluoxetine, 商品名:百优解,美国产,批号 104041):造模同时,于每日应激刺激前 1h 灌胃给药,大鼠按 0.18mg/kg BW,浓度为 0.018mg/ml,共 21d。

### 1.4 药物

YN-3 由中国中医科学院药物研究所药物研究室鉴定,使用前按照灌胃剂量煎药浓缩,浓度 1.00g/ml,贮存于 4℃冰箱中备用,用前加温。

### 1.5 RNA 提取

RNA 提取按 Trizol 提取试剂盒操作说明书进行。每个海马组织样本加入 1ml Trizol 后吹打,15—30℃孵育 5min;加入氯仿,盖紧盖子,用力摇动 15s,15—30℃孵育 2—3min,4℃ 12000g 离心 15min,取上清液至新 EP 管内,加入异丙醇(0.5ml 异丙醇/1ml Trizol),15—30℃孵育样品 10min,4℃ 12000g 离心 10min,弃上清液;75%冷乙醇洗涤沉淀一次,4℃ 7500r/min 离心 5min,弃乙醇,空气或真空干燥 5—10min;加 DEPC 处理水溶解 RNA,提取的 RNA 质量由 A260/A280 比值和 1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

### 1.6 cDNA 制备

取 1μg RNA,以 Oligo dT 为引物进行 RT 反转录。20μl 体系中含有 5×M-MLV 缓冲液 4μl,dNTP 10mmol, Rnasein 20U,M-MLV 100U,Oligo dT 20pmol,RNA 1μg。逆转录反应条件为:20℃ 5min,42℃ 60min,70℃ 5min,冰浴冷却后置-20℃保存。

### 1.7 荧光定量 PCR

根据 NCBI 数据库中的 NR2A、NR2B 及 β-actin 基因序列,以 Premier 5.0 软件设计引物,由北京赛百盛基因技术有限公司合成(序列见表 1)。在 ABI

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

| Oligo          | 引物序列                            | Predicted size(bp) | Genebank Accession |
|----------------|---------------------------------|--------------------|--------------------|
| <b>NR2A</b>    |                                 | 169                | NM_012573          |
| Forward Primer | 5'-GTGATGCCTGTCTGCGGATGG-3'     |                    |                    |
| Reverse Primer | 5'-TAGGAGTGCTGTCGGTTA-3'        |                    |                    |
| <b>NR2B</b>    |                                 | 240                | NM_012574          |
| Forward Primer | 5'-TGGAATGGCATGATCGGTGAG-3'     |                    |                    |
| Reverse Primer | 5'-AGCCACCGCAGAAACAAT-3'        |                    |                    |
| <b>β-actin</b> |                                 | 138                | BC063166           |
| Forward Primer | 5'-ACCACCACAGCTGAGAGGGAAATCG-3' |                    |                    |
| Reverse Primer | 5'-CTGACCGTCAGGCAGCTCATAGCTC-3' |                    |                    |

的 PRISM 7700 型荧光定量 PCR 仪进行实时定量 PCR, 按以下反应体系进行: 20 $\mu$ l PCR 体系中含 2 $\times$  SYBR Green PCR Master Mix 10 $\mu$ l, cDNA 2 $\mu$ l, 上游引物 1 $\mu$ l, 下游引物 1 $\mu$ l。扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 5min 变性, 94 $^{\circ}$ C 30s, 51 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 共 42 个循环, 最后是 72 $^{\circ}$ C 7min 延伸。

运用 PE7700 全自动荧光定量 PCR 仪, 待反应结束后, 由电脑自动分析并计算结果, 反应完毕后对扩增产物作熔解曲线。

结果以 Ct 值表示, 以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法比较各组之间 NR2A 和 NR2B 基因表达差异, 公式如下:

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{target}} - \Delta Ct_{\beta\text{-actin}})_{\text{X}} - (\Delta Ct_{\text{target}} - \Delta Ct_{\beta\text{-actin}})_{\text{Control}}$$

X 表示任意组, Control 为空白组, 计算各样本的  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

### 1.8 海马 CORT、Glu 含量测定

海马 CORT 含量测定: 将海马称重后加入到含 10% EDTA·Na<sub>2</sub> 30 $\mu$ l 的试管中, 匀浆, 混匀。4 $^{\circ}$ C, 3000r/min 离心 10min。取上清测定, 按试剂盒说明书操作。

海马 Glu 含量测定: 将海马称重后置于煮沸的生理盐水 1ml 中煮沸 3min, 再加 1N 冰醋酸 0.5ml 于匀浆器中匀浆, 再用 1N NaOH 0.5ml 中和, 混匀。4 $^{\circ}$ C, 3000 r/min 离心 10min。取上清液测定, 按谷氨酸生化试剂盒说明书操作。

### 1.9 统计学分析

实验结果以均数 $\pm$ 标准差表示, 用统计学软件对原始数据进行单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  作为差异显著性水平。

## 2 结果

YN-3 对慢性应激模型大鼠海马内 CORT、Glu 含量的影响, 见表 2。YN-3 对慢性应激模型大鼠海马 NR2A、NR2BmRNA 表达的影响, 见表 3。由表 2 可见, 慢性应激刺激后大鼠海马中 CORT ( $P < 0.01$ )、Glu ( $P < 0.05$ ) 含量的明显升高。YN-3 和氟西汀治疗后可明显改善海马中 CORT、Glu 含量 ( $P < 0.05$ )。

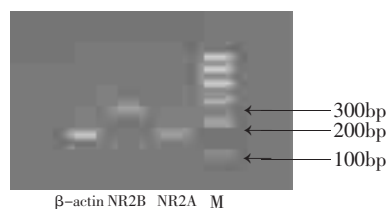


图 1 NR2A、NR2B 及  $\beta$ -actin RT-PCR 扩增产物电泳图

## 3 讨论

本研究采用慢性轻度不可预见应激刺激模型,

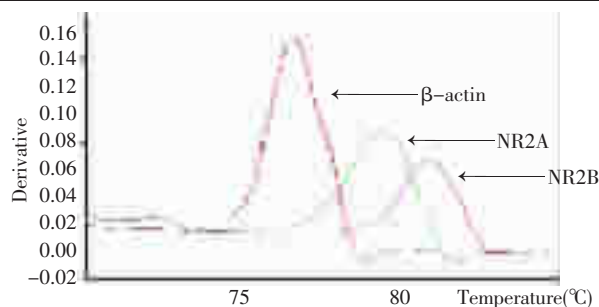


图 2 NR2A、NR2B 及  $\beta$ -actin 扩增产物溶解曲线图

表 2 YN-3 对慢性应激模型大鼠  
海马 CORT、Glu 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 鼠数 | CORT (ng/ml)                   | Glu (mmol/L)                 |
|-----|----|--------------------------------|------------------------------|
| 空白组 | 8  | 57.44 $\pm$ 2.38               | 0.83 $\pm$ 0.24              |
| 模型组 | 8  | 124.14 $\pm$ 7.15 <sup>②</sup> | 4.07 $\pm$ 0.36 <sup>①</sup> |
| 中药组 | 8  | 77.59 $\pm$ 3.78 <sup>③</sup>  | 1.74 $\pm$ 0.26 <sup>③</sup> |
| 西药组 | 8  | 86.63 $\pm$ 4.82 <sup>③</sup>  | 1.42 $\pm$ 0.99 <sup>③</sup> |

与空白组相比: ① $P < 0.05$ , ② $P < 0.01$ ; 与模型组相比: ③ $P < 0.05$

表 3 YN-3 对慢性应激模型大鼠海马  
NR2A、NR2BmRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 鼠数 | NR2AmRNA                     | NR2BmRNA                      |
|-----|----|------------------------------|-------------------------------|
| 空白组 | 8  | 1.01 $\pm$ 0.21              | 1.03 $\pm$ 0.37               |
| 模型组 | 8  | 8.11 $\pm$ 0.16 <sup>①</sup> | 11.51 $\pm$ 6.50 <sup>①</sup> |
| 中药组 | 8  | 3.95 $\pm$ 0.31 <sup>②</sup> | 5.82 $\pm$ 4.05 <sup>②</sup>  |
| 西药组 | 8  | 1.73 $\pm$ 0.07 <sup>③</sup> | 1.92 $\pm$ 0.84 <sup>③</sup>  |

与空白组相比: ① $P < 0.01$ , 与模型组相比: ② $P < 0.05$ , ③ $P < 0.01$

与人类常见的慢性、持续、低水平的应激源刺激促进抑郁症的发生及发展的环境接近, 当机体感受某种应激原时, 下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA 轴) 兴奋性提高, 若 HPA 轴功能持续亢进, 机体长期处于应激状态, 高水平的 GC, 会导致耗能增加、免疫受抑、神经营养因子表达降低, 对机体十分不利, 甚至威胁生命。应激和 GCS 增加海马内谷氨酸含量, 与海马的损伤有关。

Glu 是中枢内一种重要的神经递质。海马内无论是传入、传出或是中间神经元, 绝大多数都属于 Glu 能神经元, 对突触的可塑性、学习和记忆均有重要的作用。Glu 为 HPA 轴重要的兴奋物质, 它们互为因果, 互相放大。一方面, 应激时 HPA 轴激活, 引起 Glu 的堆积, 造成海马的毒性; 另一方面, 细胞外高水平的 Glu 又使 HPA 轴功能亢进, 使 GC 水平更高。过多的 Glu 释放及其受体激活, 引起神经元持续去极化, 导致离子渗透压力和电化学改变, 细胞外谷氨酸的堆积增加, 使兴奋性氨基酸 NMDAR 结合蛋白水平及受体通道结合位点数目增加, 离子通道开放, 引起 K<sup>+</sup>大量外流, Ca<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>、H<sub>2</sub>O 内流, 造成细胞内钙离子超载。钙超载是神经元损伤的决定性因素, 除造成细胞损害外, 还可激活胞内一系列继发性损伤。

本研究观察长期慢性应激刺激增加大鼠海马内

CORT、Glu 含量,YN-3 可以明显降低大鼠海马内 CORT 的含量,有效纠正海马所处的应激状态,降低由 HPA 轴亢进而导致的海马内 Glu 含量的增加,从而对海马负反馈机制起到良性调整作用。

现已发现 NR2A 和 NR2B 主要分布在包括海马在内的前脑,本研究采用荧光定量 PCR 技术观察 NR2A 和 NR2B mRNA 在慢性应激模型大鼠海马含量的变化,发现在海马表达含量明显升高,这一结果与以往研究相符。YN-3 可降低海马 NR2A、NR2B mRNA 表达,从而抑制 NMDA 受体门控通道的过度开放,减少钙离子内流,减轻长期慢性应激刺激产生的细胞内毒性作用。

有研究分别针对 NR1、NR2A 和 NR2B 的特异性抗体观察<sup>[6]</sup>,比较三者在海马结构的详细分布,结果 NR1 的免疫细胞化学表达最强,NR2B 居中,NR2A 最弱,提示海马 NMDA 受体复合物的组合形式,很可能以 NR1/NR2A/NR2B 和 NR1/NR2B 占多数。我们的研究发现,慢性应激模型大鼠海马内 NR2BmRNA 表达变化比 NR2A 更为显著,这大概反映了与 NMDA 受体复合物在特定条件下的组合形式。

中医学将抑郁症归入“郁证”范畴,认为其病因多由情志不遂、肝气郁结所致<sup>[3]</sup>。YN-3 是在以往研究组方基础上的优化,采用疏肝解郁,宁心化痰之

法,以调畅肝气,气机通畅,心神得养,郁证自除。中药治疗抑郁等精神疾患具有疗效好、副作用小、不易产生耐药性等优点,在中医理论的指导下,运用现代医药研究方法开发研制安全有效的中药抗抑郁制剂,是需要不断探索的课题。

#### 参考文献

- [1] Murua VS, Gomez RA, Andrea ME, et al. Shuttle2 box deficits induced by chronic variable stress: Reversal by imipramine administration [J]. Pharmacol Biochem & Behav, 1991,38:125.
- [2] 张均田. 新药发现的药理学基础 [M].北京:化学工业出版社, 2002.33—34.
- [3] 张建军,王景霞,高学敏,等.贯郁胶囊对嗅球损毁大鼠血浆促肾上腺皮质激素和皮质醇的影响 [J].北京中医药大学学报, 2005,28(3):52.
- [4] 耿战辉,程义勇,马秀玲,等.应激对大鼠海马 Glu-NMDA 受体通路的影响及锌的保护机制 [J].中国应用生理学杂志,2003,19(2):161.
- [5] Katz R, Roth K, Carroll B. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: Implications for a model of depression[J]. Neurosci Biobehav Rev,1981,5:247.
- [6] 徐铁军,樊红彬,张凤真,等.NMDA 受体亚单位 NR1、NR2A 和 NR2B 在大鼠海马的免疫组织化学表达 [J].解剖学杂志, 2002,25(2):128—132.
- [7] 龚绍麟.抑郁症[M].北京:人民卫生出版社,2003.2.
- [8] 钱之玉.现代文明病及其药物治疗与进展[M].北京:化学工业出版社,2004.8.

## 国家“863 计划”“脑血管病康复治疗新技术开发应用研究” 启动会议在复旦大学附属华山医院召开

2008 年 1 月 13 日,国家高技术研究发展计划“863 计划”“脑血管病康复治疗新技术开发应用研究”启动会议在复旦大学附属华山医院隆重召开。来自北京大学、四川大学、暨南大学、复旦大学、上海理工大学等大学的专家教授,以及康复医学科主任胡永善教授、副主任朱玉连副教授、李放副教授和康复医学科的同仁参加了会议。

该项目是由复旦大学附属华山医院康复医学科副主任吴毅教授牵头,联合北京大学第一医院、四川大学华西医院、暨南大学附属第一医院,以及上海理工大学医疗器械学院等相关科室开展合作。本次申报的国家“863 计划”项目,旨在对脑血管病患者出现的功能障碍,研发新的康复治疗技术和新的康复治疗仪器,从而为脑血管病患者提供更便捷、更全面的康复治疗服务,以改善脑血管病患者的功能障碍,提高其生活质量。

这次项目的申报成功是国内康复医学界第一次牵头承担国家“863 计划”项目,这也是由复旦大学附属华山医院康复医学科主任胡永善教授牵头完成国家“十五”攻关课题后,华山医院康复医学科再次牵头承担的国家级重大课题,这预示着我国的康复医学事业在不断壮大和发展,科研能力在不断提高,已能够相继承担国家级重大科研项目。我们相信通过本项目的实施可进一步促使我国在脑血管病康复治疗新技术、新仪器的研发,推动我国康复医学事业全面发展。