

[文章编号] 1000-4718(2009)03-0591-04

三种复方对慢性应激模型大鼠海马 *CREB*、*BDNF* 基因表达的影响*

于琦[#], 金光亮[△]

(北京中医药大学中医基础理论系, 北京 100029)

[摘要] 目的: 探讨慢性应激肝郁模型大鼠海马 *CREB*、*BDNF* 基因表达及疏肝、疏肝健脾与健脾 3 种方剂的效应。方法: SD 雄性大鼠 40 只, 用随机区组设计的方法分为对照组、模型组、四逆散组、逍遥散组和四君子汤组, 多种应激处理共 21 d 后, 测定 1% 蔗糖水摄取率和强迫游泳中累计不动时间, 用 RT-PCR 的方法检测海马 *CREB* 和 *BDNF* mRNA 表达。结果: 与对照组比较, 模型组大鼠 1% 蔗糖水摄取率明显降低, 强迫游泳中累计不动时间明显延长, 海马 *CREB*、*BDNF* mRNA 表达明显降低; 与模型组比较, 四逆散组、逍遥散组的 1% 蔗糖水摄取率明显升高, 强迫游泳中累计不动时间明显缩短, *CREB*、*BDNF* mRNA 表达均明显升高; 四君子汤组各行为学指标及 *BDNF* 表达与模型组相比没有差异, 仅 *CREB* 表达升高。结论: 慢性应激肝郁模型大鼠海马 *CREB*、*BDNF* 的 mRNA 表达降低, 具有疏肝作用的方剂四逆散和逍遥散可以对抗这种降低, 而健脾方剂四君子汤无明显效应。

[关键词] 应激; 中草药; cAMP 反应元件结合蛋白质; 脑源性神经营养因子

[KEY WORDS] Stress; Drugs, Chinese herbal; cAMP response element binding protein; Brain-derived neurotrophic factor

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A

肝郁证是临床常见的基础证候, 情志刺激是其主要病因, 多见于与慢性应激密切相关的疾病。为了深入研究肝郁证的发生发展机制, 我们建立了慢性应激肝郁证大鼠模型^[1]。在本研究中, 我们根据国际上有关慢性应激影响海马神经元再生机制的新认识, 研究了慢性应激肝郁模型大鼠海马内与神经元再生相关的蛋白: 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, *CREB*)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, *BDNF*)的基因表达变化, 并观察了四逆散、逍遥散、四君子汤 3 个不同治法代表方剂的干预作用。

材 料 和 方 法

1 药物

根据《方剂学》^[3]确定方剂的组成, 其中逍遥散(《太平惠民和剂局方》): 柴胡 9 g, 当归 9 g, 芍药 9 g, 茯苓 9 g, 白术 9 g, 薄荷 3 g, 炙甘草 4.5 g, 生姜 6 g; 四逆散(《伤寒论》): 柴胡 6 g, 枳实 6 g, 生白芍 6 g, 炙甘草 6 g; 四君子汤(《太平惠民和剂局方》): 人参 9 g, 白术 9 g, 茯苓 9 g, 炙甘草 6 g。上述各方用饮用水将中药免煎颗粒(江明天江药业有限公司), 以成人(按 60 kg 计)1 d 用量的 14 倍配制悬浊液, 其中逍遥散浓度为 1.365 kg/L, 四逆散浓度为 0.56 kg/L, 四君子汤浓度为 0.77 kg/L。

2 试剂与仪器

BDNF 引物序列为, *BDNF* - 1 GGGGTTAGGAGAAGT-CAAGC, *BDNF* - 2 CAGTGGGACTCCAGAAGACA, 扩增片段 288 bp; β -actin 引物序列为, 上游引物 ATCATGTTTTCAGAC-CTCAACA, 下游引物 CATCTCTTGCTCGAAGTCCA, 扩增片段 318 bp; 均用 Primer 5 软件自行设计, 由北京奥科生物公司合成。*CREB* 引物序列为, *CREB* - 1 TCAGCCGGTACTACCAT-TC, *CREB* - 2 TCTCTTGCTGCTTCCCTGTT, 扩增片段 252 bp^[4]; 北京赛百盛生物公司合成。RNA 酶抑制剂、M-MLV 逆转录酶、M-MLV RT-5 × reaction buffer (Promega); dNTPs (10 mmol/L, pH 7.5), Genview; 2 × taqPCRmix (欣源佳和公司); 无水乙醇(北京化学试剂公司); 异丙醇、三氯甲烷(北京化学试剂公司); Trizol Reagent (Gibco); 琼脂糖 (Biowest)。HY-2 调速多用振荡器, 江苏金坛金城国胜实验仪器厂; 电热鼓风干燥箱, 天津市泰斯特仪器有限公司; 台式高速冷冻离心机 (Centrifuge 541R)、PCR 仪 (Eppendorf); Alpha Imager TM 图像分析系统 (Alpha); 电泳仪 (JUNYI); 皮质酮酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定试剂盒 (批号 24110603) (R&D)。

3 动物分组及处理

雄性 SD 大鼠 40 只 [SPF 级, 北京维通利华实验动物公司; 许可证编号: SCXK (京) 2002-0003], 体重 190-210 g。正常光照条件、自由摄取食水驯养 1 周, 并进行 1% 蔗糖水摄

[收稿日期] 2008-01-11 [修回日期] 2008-07-11

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30171129); 北京中医药大学“211 工程”建设子项目资助 (No. 2001-02)

Δ 通讯作者 Tel: 010-64287011; E-mail: gljin@sina.com

现在中国中医科学院做博士后

取训练。禁水 24 h 后,于上午 8-9 时测定 1 h 的 1% 蔗糖水摄取量,计算摄取率,按 1% 蔗糖水摄取率划分区组,再按随机数字表法分为 5 组,每组 8 只。正常对照组(control)群养,每日灌胃饮用水 10 mL/kg BW;慢性应激模型组(model)、慢性应激加四逆散组(sinisan)、慢性应激加逍遥散组(siaoyaosan)、慢性应激加四君子汤组(sijunzitang)均为孤养,按程序施加造模刺激,每天按 10 mL/kg BW 分别用饮用水、四逆散悬浊液 0.56(kg/L)、逍遥散悬浊液 1.365(kg/L)和四君子汤悬浊液 0.77(kg/L)灌胃 1 次。普通饲料与饮用水在允许时可自由摄取。各组处理均为 21 d,每 3 d 测定 1 次大鼠体重,以调整灌胃剂量。末次刺激后第 2 d 断头,冰上快速取脑、分离海马,迅速投入液氮中,后转入 -70 °C 冰箱备用。

4 造模方法

按照我们以前方法^[1]进行。孤养并施加下列刺激:夹尾 1 min,160 times/min 振荡 30 min,4 °C 冰水游泳 5 min,禁水 24 h,禁食 24 h,昼夜颠倒 24 h,45 °C 热环境 5 min。上述各刺激每天 1 种,每种刺激各 3 次,随机安排,使动物不能预知第 2 d 的刺激。

5 1% 蔗糖水摄取率测定

根据文献^[5]方法进行。在正式实验前,先对大鼠进行 1% 蔗糖水摄取训练,即 1% 蔗糖水和饮用水同时供给 48 h,然后断水 24 h,于第 2 d 清晨 8-9 时再次同时供给大鼠 1% 蔗糖水和饮用水 1 h,每笼 1 只大鼠,记录摄取量,根据下列公式计算蔗糖水摄取率。

$$1\% \text{ 蔗糖水摄取率} = \frac{1\% \text{ 蔗糖水摄取量}}{1\% \text{ 蔗糖水摄取量} + \text{饮用水摄取量}} \times 100\%$$

6 强迫游泳中不动时间测定

根据文献^[6]的方法进行。于末次应激 24 h 后,先进行适应性强迫游泳 15 min,即将大鼠放入内径 20 cm、高 60 cm 的圆形透明玻璃缸中,缸中加(25 ± 1) °C 的温水,深约 25 cm,使大鼠在水中不能以后爪支撑身体、前爪攀附于缸壁,取出后用毛巾擦干放回笼中。每缸水仅使用 1 只大鼠。24 h 后再同样将大鼠放入水中 5 min,累计记录 5 min 内大鼠在水中停止挣扎、呈漂浮不动状态的总时间。每只大鼠仅进行 1 次实验,由两人同时观察记录,取平均值作为各大鼠强迫游泳中不动时间的数据。

7 血清皮质酮测定

于末次刺激后第 2 d,快速断头取血,4 °C 放置 3 h 后,4 °C 离心 15 min(4 000 × g),分离血清,-40 °C 保存备测。采用酶联免疫吸附试验的方法,检测按试剂盒说明书操作。

8 海马 BDNF、CREB mRNA 表达的 RT-PCR 测定

每组取 6 只进行测定。海马总 RNA 采用 Trizol 一次性抽提法。取大鼠左侧海马(约 80-120 mg)置入 1 mL Trizol 中,冰上匀浆,加入 0.2 mL 氯仿,剧烈振荡后离心,取上清加等体积异丙醇,冷冻静置后离心,沉淀用 75% 乙醇洗,自然晾干,加 20 μL DEPC 水溶解。经 MOPS 变性凝胶电泳鉴定,两条 rRNA(18 S、28 S)条带清晰,紫外分光光度计测 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值于 1.8-2.0 之间,用于以下实验。样品 RNA 浓度计算方法:RNA 浓度(g/L) = A₂₆₀ × 40 × 稀释倍数 × 1%。

8.1 逆转录反应体系及条件 RNA 样品 4 μg, oligo dT 1 μL, 5 × M-MLV 逆转录酶缓冲液 4 μL, RNA 酶抑制剂 1 μL, dNTPs 1 μL, M-MLV 酶 1 μL, DEPC 水补充至 20 μL, 42 °C 1 h, 95 °C, 5 min。

8.2 BDNF 基因 PCR 反应体系及条件 RT 产物 2 μL, 2 × Taq PCR Mix 12.5 μL, BDNF 上下游引物混合 0.5 μL, 内参引物混合 0.5 μL, 补充 DEPC 水至 25 μL。预变性 94 °C 2 min 后, 94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环, 72 °C 5 min。

8.3 CREB 基因 PCR 反应体系及条件 RT 产物 2 μL, 2 × Taq PCR Mix 12.5 μL, CREB 上下游引物混合 2 μL, 补充 DEPC 水至 25 μL。预变性 94 °C 2 min 后, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 60 s, 30 个循环, 72 °C 10 min。

上述各 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳,其中内参 β-actin 引物与 BDNF 引物混合,与 CREB 在同 1 张胶上电泳。利用 Alpha Imager TM 图像分析系统对 DNA 条带进行吸光度扫描, Phoretix 1D 凝胶分析软件进行灰度分析,以目的基因与内参基因的灰度比值来表示目的基因 mRNA 表达的相对含量。

9 统计学处理

数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,利用 SPSS13.0 统计软件包进行 One-way ANOVA 检验,组间两两比较的 SNK-q 检验,方差不齐则采用 Dunnett's T3 检验。

结 果

1 1% 蔗糖水摄取率与强迫游泳中不动时间变化

在处理 21 d 后,模型组大鼠与对照组比较,1% 蔗糖水摄取率明显降低,强迫游泳不动时间明显延长($P < 0.01$);与模型组比较,四逆散组、逍遥散组 1% 蔗糖水摄取率明显升高($P < 0.01$),强迫游泳不动时间明显缩短($P < 0.05$),达到与对照组相同的水平($P > 0.05$),而四君子汤组的 1% 蔗糖水摄取率、强迫游泳不动时间均与模型组没有显著差异($P > 0.05$),见表 1。

表 1 3 种复方对大鼠 1% 蔗糖水摄取率、强迫游泳中不动时间的影响

Tab 1 The effect of three kinds of prescriptions on sucrose preference and motionless time in forced swimming test of rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Group	Sucrose preference(%)	Motionless time in FST(s)
Control	60 ± 30	53 ± 25
Model	30 ± 21 ^{##}	150 ± 63 ^{##}
Sinisan	63 ± 20 ^{**}	97 ± 32 [*]
Xiaoyaosan	64 ± 19 ^{**}	81 ± 35 [*]
Sijunzitang	40 ± 15	150 ± 54

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

2 血清皮质酮含量变化

处理 21 d 后,模型组大鼠血清皮质酮含量明显高于对照组,差异显著($P < 0.01$);四逆散组、逍遥散组均低于模型组,差异显著($P < 0.05$);四君子汤组与模型组相比较,无显著差

异($P > 0.05$);四逆散、逍遥散组之间及其与对照组比较均无显著差异,见表2。

表2 3种复方对大鼠血清皮质酮含量的影响

Tab 2 The effect of three kinds of prescriptions on cortisone of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Group	Cortisone (nmol/L)
Control	62 ± 19
Model	94 ± 20 ^{##}
Sinisan	67 ± 17 [*]
Xiaoyaosan	65 ± 23 [*]
Sijunzhitang	79 ± 29

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group.

3 海马 CREB、BDNF 基因表达变化

在处理21 d后,模型组大鼠与对照组比较,CREB、BDNF的mRNA表达明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,四逆散组、逍遥散组的CREB、BDNF的mRNA表达均明显升高($P < 0.05$),达到与对照组相同的水平($P > 0.05$),而四君子汤组仅CREB表达明显升高($P < 0.01$),与对照组没有明显差异($P > 0.05$),见表3、图1所示。

表3 3种复方对大鼠海马 CREB、BDNF mRNA 表达的影响

Tab 3 The effect of three kinds of prescriptions on expression of CREB and BDNF mRNA of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	CREB	BDNF
Control	1.22 ± 0.28	0.80 ± 0.07
Model	0.76 ± 0.10 [#]	0.67 ± 0.08 [#]
Sinisan	1.20 ± 0.44 [*]	0.80 ± 0.12 [*]
Xiaoyaosan	1.29 ± 0.27 [*]	0.80 ± 0.06 [*]
Sijunzhitang	1.52 ± 0.49 ^{**}	0.75 ± 0.14

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

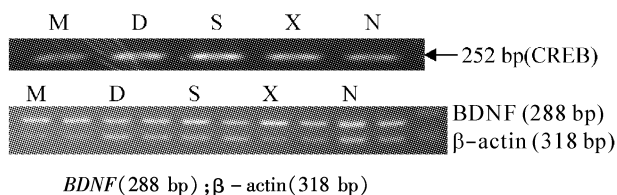


Fig 1 The effect of sinisan, xiaoyaosan and sijunzhitang on expression of CREB and BDNF mRNA in hippocampus of rats subjected to stress. M: model; D: control; X: xiaoyaosan; S: sijunzhitang; N: sinisan.

图1 3种复方对应激大鼠海马 CREB、BDNF mRNA 表达的影响

讨 论

近年来,慢性应激对海马神经元再生过程的影响,成为慢性应激相关疾病病理生理机制研究的热点。业已证实,慢性应激可导致成年海马神经细胞增殖迅速长远地下降,最终出现神经萎缩、死亡,海马体积变小,这也可能是应激相关

疾病(如抑郁症)发生的病理机制。相反,慢性抗抑郁药治疗可以正向调节海马神经发生,从而阻碍或逆转因应激引起的萎缩和损伤^[7]。CREB在细胞存活和神经元可塑性方面发挥重要作用。原位杂交及免疫组化分析证实:长期的抗抑郁治疗后,海马主要细胞层CA₁、CA₃、齿状回的CREB的表达增加,而长期给予无抗抑郁活性的精神类药物如吗啡等并不增加海马CREB的表达^[8],因此,抗抑郁剂增加海马CREB水平具有药理学特异性。

BDNF是一种主要的神经营养因子,在海马和皮层中高水平表达,是神经元再生的关键因素^[9,10]。实验证明,慢性应激抑郁模型动物脑内BDNF水平下降,抗抑郁剂可以增加海马CA₃区BDNF mRNA的表达水平^[11]。目前认为,抗抑郁剂通过激活cAMP依赖性蛋白激酶,增强CREB的表达水平或磷酸化水平,进一步介导BDNF的功能,cAMP-CREB通路功能及其介导的神经营养因子表达可能是调节神经元再生关键性环节之一^[12]。

情志因素(实质为慢性心理应激)是临床肝郁证的主要病因。在以往的研究中,我们使用多种不同应激条件(包括冰水游泳、热环境、断食、断水、昼夜颠倒等)组合起来的慢性应激程序,来模拟临床上情志异常引发肝郁证的过程,以强迫游泳中累计的不动时间(反映恶劣环境引发的悲观无助的情绪状态)和1%蔗糖水摄取率(提示对美好事物的兴趣状态)两种行为学指标相结合,来模拟临床肝郁证情绪抑郁、郁郁寡欢、喜叹息等主要症状,并对比了经典疏肝方剂四逆散、疏肝健脾方剂逍遥散和健脾方剂四君子汤的效应,表明该模型能较好模拟临床肝郁证^[2]。在本研究中,模型大鼠1%蔗糖水摄取率降低、强迫游泳中累计不动时间延长,血清皮质酮含量升高,具有疏肝作用的四逆散和逍遥散均可明显改善上述行为学与血清皮质酮的变化,而仅有健脾作用的四君子汤则未见有明显改善作用,与我们以往的研究结果相同^[2],表明模型复制成功,也说明该模型再现性良好。

为了更深入地研究肝郁证的发生发展机制,并探讨不同方剂效应差异的机理,本文观察了大鼠海马神经元再生相关的CREB、BDNF的基因表达情况。研究发现,肝郁模型大鼠海马CREB、BDNF基因表达量均明显降低,四逆散和逍遥散均可在对抗慢性应激引起的行为学变化的同时,使其表达恢复到正常水平,而四君子汤既未能对抗慢性应激引起的大鼠行为学改变与血清皮质酮含量升高,也未使BDNF表达降低得到恢复。

本研究结果显示,肝郁证发生发展机制可能与慢性应激引起海马CREB、BDNF基因表达降低密切相关,疏肝方剂的作用机制可能是通过促进海马CREB、BDNF的基因表达而发挥的;仅有健脾而无疏肝作用的四君子汤虽可使大鼠海马CREB基因表达升高,但由于其对大鼠行为学没有影响,因此这种升高的实际意义尚待进一步研究。其它不同类型方剂对此模型的效应有待进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] 金光亮,南 睿,郭霞珍.慢性应激肝郁证大鼠模型的建立[J].北京中医药大学学报,2003,26(2):18-21.

- [2] 于琦,金光亮. 四逆散、逍遥散与四君子汤对慢性应激肝郁模型大鼠行为学影响的研究[J]. 天津中医药, 2007,6:509-511.
- [3] 段富津 主编. 方剂学[M]. 第1版. 上海:上海科学技术出版社,1995.58, 59, 113.
- [4] 李国海,黄明生. cAMP反应元件结合蛋白在吗啡依赖大鼠脑内相关脑区的表达和磷酸化[J]. 四川大学博士学位论文, 2001, 8-15.
- [5] Bekris S, Antoniou K, Daskas S, et al. Behavioural and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains[J]. Behav Brain Res, 2005, 161(1): 45-59.
- [6] 赵志宇,王卫星,郭洪祝,等. 甘草苷对慢性应激抑郁模型大鼠的抗抑郁作用[J]. 中国临床康复, 2006, 10(27): 69-72.
- [7] Warner-Schmidt JL, Duman RS. Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment[J]. Hippocampus, 2006, 16(3): 239-249.
- [8] Brezun JM, Daszuta A. Serotonin may stimulate granule cell proliferation in the adult hippocampus, as observed in rats grafted with foetal raphe neurons[J]. Eur J Neurosci, 2000, 12(1): 391-396.
- [9] 吴彬,胡胜娣,潘慧,等. 可卡因-苯丙胺调节转录肽激活 ERK 促进海马神经元合成 BDNF[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(7): 1289-1292.
- [10] 陈家旭,李伟,赵歆,等. 三种中药复方对慢性束缚应激大鼠皮层和海马 BDNF、TrkB 的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(7): 1296-1300.
- [11] Larsen MH, Rosenbrock H, Sams-Dodd F, et al. Expression of brain derived neurotrophic factor, activity-regulated cytoskeleton protein mRNA, and enhancement of adult hippocampal neurogenesis in rats after sub-chronic and chronic treatment with the triple monoamine re-uptake inhibitor tesofensine[J]. Eur J Pharmacol, 2007, 555(2-3): 115-121.
- [12] 张黎明,李云峰,宫泽辉. 神经元再生:抑郁症治疗的新策略[J]. 生理科学进展, 2005, 36(2): 109-112.

(上接第 590 页)

胶质细胞的增殖。但对于细胞周期的激活如何诱导神经元凋亡有待进一步的研究。

[参 考 文 献]

- [1] Fischer SJ, McDonald ES, Gross L, et al. Alterations in cell cycle regulation underlie cisplatin induced apoptosis of dorsal root ganglion neurons *in vivo* [J]. Neurobiol Dis, 2001, 8(6): 1027-1035.
- [2] Rashidian J, Iyirhiaro G, Aleyasin H, et al. Multiple cyclin-dependent kinases signals are critical mediators of ischemia/hypoxic neuronal death *in vivo* and *in vitro* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(39): 14080-14085.
- [3] Watts LT, Rathinam ML, Schenker S, et al. Astrocytes protect neurons from ethanol-induced oxidative stress and apoptotic death[J]. J Neurosci Res, 2005, 80(5): 655-666.
- [4] Nigg EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2(1): 21-32.
- [5] Galderisi U, Jori FP, Giordano A. Cell cycle regulation and neural differentiation[J]. Oncogene, 2003, 22(33): 5208-5219.
- [6] Liu DX, Greene LA. Neuronal apoptosis at the G₁/S cell cycle checkpoint[J]. Cell Tissue Res, 2001, 305(2): 217-228.
- [7] Wen Y, Yang S, Liu R, et al. Cell-cycle regulators are involved in transient cerebral ischemia induced neuronal apoptosis in female rats[J]. FEBS Lett, 2005, 579(21): 4591-4599.
- [8] Katchanov J, Harms C, Gertz K, et al. Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal cell death[J]. J Neurosci, 2001, 21(14): 5045-5053.
- [9] 王艺明,杨宗城,刘兴德. 去甲肾上腺素诱导大鼠神经胶质细胞 cAMP 生成与 VEGF mRNA 变化的相关性[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(12): 2485-2486.
- [10] Slimone DG, Vilen M, Farid A, et al. Cell cycle inhibition provides neuroprotection and reduce glial proliferation and scar formation after traumatic brain injury [J]. PNAS, 2005, 102(23): 8333-8338.