

· 博士之窗 ·

逍遥散调节慢性束缚应激大鼠代谢组学的实验研究

罗和古¹ 陈家旭¹ 岳广欣¹ 丁 杰¹ 颜贤忠²

摘要 目的 通过检测慢性束缚应激大鼠血浆和逍遥散干预引起的大鼠内源性代谢物的变化,确定与之相关的“代谢组学特征”的小分子标志化合物,探讨慢性束缚应激大鼠代谢网路改变和逍遥散作用机制。
方法 选用雄性 SD 大鼠 36 只,随机分为 3 组。即:正常对照组、模型组及逍遥散治疗组,其中每组又分为 7、21 天组,每组 6 只。以慢性束缚方法制作应激大鼠模型,每天束缚 3 h。自建模第 1 天开始,逍遥散治疗组每日在束缚前 1 h 灌服逍遥散,给药量为 3.854 g/kg,灌胃容积为 1 mL/100 g 体重。正常对照组、模型组灌服等体积的蒸馏水。分别于第 8、22 天采集血浆后取上清 300 μ L,在 27 $^{\circ}$ C 的条件下,在 Varian UNITYINO-VA 600MHz 超导傅立叶变换核磁共振波谱仪上分别调用弛豫编辑脉冲序列 (CPMG)、扩散编辑脉冲序列 (LED),采用预饱和方式抑制水峰,自由感应衰减 (FID) 信号经过 32k 点傅立叶变换得到一维 NMR 谱图。以 TSP 为化学位移参考峰的位置,调用 VNMR 软件中的程序将 ^1H 谱中从 4.5 ~ 0.5 ppm (CPMG) 以及 6.0 ~ 0 ppm (LED) 范围内的谱峰,按每段为 0.04 ppm,进行分段积分。将积分数据归一化之后,将积分值进行中心化和定标,用 SIMCA-P 10.0 软件包进行主成分分析 (PCA),必要时进行判别分析 (PLS-DA)。结果 (1) 正常组与模型组之间代谢产物有明显的不同,两组比较,存在代谢网路的改变。模型组与治疗组各对照组间基本能分开,不同组别之间代谢产物存在差异、代谢网路有所不同,给予逍遥散后可以干预代谢物或代谢途径而致代谢终产物的改变。(2) 慢性束缚应激大鼠血清中代谢产物乳酸 (1.4、4.16)、胆碱 (3.24)、N-乙酰半乳糖胺 (NAC)、饱和脂肪酸 (1-3) 升高,而不饱和脂肪酸 (1.99、4-5)、血糖 (3-4)、HDL (0.83) 等化合物含量降低。逍遥散可使乳酸、胆碱、NAC、饱和脂肪酸下降,血糖、不饱和脂肪酸、HDL、3.44 ppm 等化合物含量升高,有明显的代谢终产物的调节效应。**结论** 慢性束缚应激大鼠代谢表型为乳酸、胆碱、NAC、饱和脂肪酸含量上升,血糖、不饱和脂肪酸、HDL、3.44 ppm 等化合物含量降低。其代谢产物标志物可能是乳酸、胆碱、NAC、饱和脂肪酸、血糖、不饱和脂肪酸、HDL、3.44 ppm 等化合物。慢性束缚应激发生的代谢终产物的改变以脂类物质更明显。逍遥散对代谢终产物有明显的调节效应,但主要干扰何种代谢物或代谢途径而改变代谢终产物还需进一步研究确认。

关键词 逍遥散;慢性束缚应激;代谢组学

Metabonomic Study on the Regulatory Effect of Xiaoyao Powder on Chronic Immobilization Stressed Rats

LUO He-gu, CHEN Jia-xu, YUE Guang-xin, et al Department of Chinese Medicinal Diagnosis, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029)

Abstract Objective To provide a scientific basis for systematic research on the mechanism of chronic immobilization stress (CIS) induced metabolic network change in rats, through detecting the changes of endogenous metabolites in rats with CIS, treated or un-treated with Xiaoyao Powder (XYP), for determining the small molecule marker compound that closely associated with the metabonomical specificity of CIS and acting mechanism of XYP. **Methods** Thirty-six experimental male SD rats were divided into 3 groups, the normal control group, the model group and the XYP group. And all the three groups were subdivided into two subgroups respectively on day 7 and day 21 of the experiment. The stress rat model of CIS was made by chronic restraining method for 3 h every day. Starting from the first day of modeling, XYP 3.854 g/kg in volume of 1 mL/100 g body weight was administered 1 h before restraining via gastrogavage to rats in the XYP group, while equal volume of distilled water was given to rats

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (No. 30672578); 国家杰出青年科学基金项目 (No. 30825046)

作者单位:1. 北京中医药大学中医诊断系 (北京 10029); 2. 国家生物医学分析中心

通讯作者:陈家旭, Tel: 010-64287074, E-mail: chenjx@bucm.edu.cn

in the other two groups instead. Blood samples were collected on the 8 th day and 22 th day for detection in the following procedure: at 27 °C, 300 μ L supernate of blood plasma was taken, calling the Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) and longitudinal eddy-delay (LED) sequence respectively on a Fourier variable nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometer, pre-saturated inhibition of the water peak was performed; free induction decay (FID) signals were transferred via 32 k Fourier transformation to gain one-dimensional NMR spectrogram; by taking TSP as the chemical migration reference peak, the segmental integral calculus (0.04 ppm per segment) was performed from 4.5 – 0.5 ppm (CPMG) and 6.0 – 0 ppm (LED) within the peak ranges in ^1H spectra using the VNMR software; after normalization, centering and scaling were conducted on data, then used for pattern recognition of principal component analysis (PCA) using the SIMCA-P 10.0 software, or if necessary, the partial least squares discriminate analysis (PLS-DA) was performed. **Results** (1) The metabolites in the model group were significantly different from those in the control group, suggesting that the animal model was successfully established with the metabolic network different to that of control. The model group and the XYP group could be differentiated from the control group by the differences of metabolites and metabolic networks between groups; XYP could intervene the metabolites or the metabolic path to cause changes in final metabolites. (2) The serum contents of lactic acid (1.4, 4.16), choline (3.24), N-acetylgalactosamine (NAC) and saturated fatty acids (1-3) increased, but unsaturated fatty acids (1.99, 4-5), blood sugar (3-4), HDL (0.83), etc. reduced in the CIS rats. XYP showed obvious regulatory effects on final metabolites, causing decrease of lactic acid, choline, NAC, saturated fatty acids and blood sugar, and increase of unsaturated fatty acids, blood sugar, HDL, 3.44 ppm compound, etc. **Conclusions** The metabolic phenotype in CIS rats includes the increase of lactic acid, choline, NAC, saturated fatty acid, and the decrease of blood sugar contents, unsaturated fatty acid, HDL, 3.44 ppm compound, etc., these may be the markers of the metabolites. The final metabolites changes induced by CIS are primarily the lipid substances. XYP markedly regulates the contents of final metabolites, showing the regulatory effects on final metabolites, but what is the metabolite or metabolic pathways it interferes to alter the final metabolites should be confirmed by further studies.

Key words Xiaoyao Powder; chronic immobilization stress; metabolomics

代谢组学是继基因组学、转录组学和蛋白质组学之后新近发展起来的一门学科,是系统生物学的重要组成部分。它通过对生物体液和组织中随时间改变的代谢物进行检测、确定、定量和分类,将这些代谢信息与病理生理过程中生物学事件关联起来,以监测活细胞中化学变化。因此 Billy David 认为,基因组学和蛋白质组学能够说明可能发生的事件,而代谢组学则反映确实已经发生了的事情^[1]。利用代谢组学方法,通过研究代谢物图谱随时间的变化,就能够提供有关生物体病理生理作用过程中整体机能的完整信息^[2]。代谢组学方法的主要检测手段是核磁共振(NMR)。H-NMR 的谱峰与样品中各化合物的氢原子是一一对应的,所测样品中的每一个氢原子在图谱中都有其相关的谱峰,图谱中信号的相对强弱反映了样品中各组分的相对含量。因此,NMR 方法很适合研究代谢产物中的成分,从一维 H 图谱上可以看出很“精细”的代谢物成分图谱即代谢指纹图谱,通过模式识别(pattern recognition, PR)方法,得出相应的、有价值的生物学信

息。通过对这些生物信息的统计分析和研究,了解机体生命活动的代谢过程^[3]。

本课题组在前期工作^[4]的基础上,试图通过慢性束缚应激大鼠血浆和逍遥散干预引起的大鼠内源性代谢物的变化,获得束缚应激大鼠模型和逍遥散给药前后的“代谢物指纹图谱”;分析血清“代谢物指纹图谱”的变化,确定与慢性束缚应激大鼠和逍遥散作用机理密切相关的“代谢组学特征”的小分子标志化合物,阐明药物作用靶点及作用机制。

材料与方法

1 动物与分组 实验用二级雄性 SD 大鼠 36 只,体重(200 \pm 20) g,购自北京维通利华实验动物研究中心(合格证号码:SCXK-京 2002-0003)。适应性饲养 3 天后随机分为 3 组。即:正常对照组、模型组及逍遥散治疗组,其中每组又分为 7、21 天组,每组 6 只。动物每笼 6 只群养于普通级动物房,室内温度保持为(22 \pm 2) °C,相对湿度保持为 30% ~ 40%,各组大鼠喂

常规饲料,自由进食饮水。

2 中药及制备 实验所用的中药复方选用《太平惠民和剂局方》中的逍遥散(北柴胡 30 g 当归 30 g 白芍 30 g 白术 30 g 茯苓 30 g 炙甘草 15 g 生姜 10 g 薄荷 10 g),中药饮片均购自北京同仁堂药店,由中日友好医院制剂室煎煮、浓缩制成药粉备用,用时根据需要用蒸馏水配制成一定的浓度。

3 试剂与仪器 重水(deuteriumoxide, D_2O),北京京巨化工科技有限责任公司产品;TSP,美国 Cambridge Isotop Laboratories, Inc.; Varian UNITYINOVA 600 MHz 型超导傅立叶变换 NMR 仪,美国 Varian Ltd.; 5245 型离心机,德国 Eppendorf AG。

4 模型制备及药物干预 以慢性束缚方法^[5]制作应激大鼠模型。将大鼠束缚于特制的束缚架上(T 型束缚台:底座宽 10 cm、长 20 cm、厚 2.8 cm,上端束缚台长 22 cm,最宽处 6.6 cm,前端有固定头部的小架和适合四肢放置的凹槽,上端束缚台有 3 条可调的软带,两宽一窄,分别在头颈部、胸腰、腰背固定),并放入饲养箱中,每日 3 h,随机选取束缚时间点。整个束缚过程中动物在同一环境中,不予以进水、食物,分别连续 7 或 21 天。正常对照组均散养于各自的饲养箱中 3 h。自造模第 1 天开始,按人体用药量换算成大鼠等效剂量作为大鼠用药量,逍遥散治疗组在束缚前 1 h 分别灌服逍遥散,给药量为 3.854 g/kg,灌胃容积为 1 mL/100 g 体重。正常对照组及模型组灌服等体积的蒸馏水。

5 取材 分别于实验第 8、22 天清晨 8:00,用 2% 戊巴比妥钠腹腔注射进行深度麻醉(40 mg/kg),手术剪剖开胸腔,经左心室用注射器穿刺左心室取血浆,采集血浆后肝素钠抗凝,于 $-20^{\circ}C$ 冰箱中保存备用。

6 NMR 数据采集与分析 根据文献[6,7]方法,取出血浆,常温解冻,离心(14 000 r/min, 10 min),取上清 300 μ L,添加 0.1% TSP 100 μ L、 D_2O 200 μ L 于 5 mm 样品管中,混匀,4 $^{\circ}C$ 冰箱保存。在军事医学科学院国家生物医学分析中心核磁共振实验室进行检测,27 $^{\circ}C$ 的条件下,在 Varian UNITYINOVA 600 MHz 超导傅立叶变换 NMR 上分别调用弛豫编辑脉冲序列(carr-purcell-meiboom-gill, CPMG)、扩散编辑脉冲序列(longitudinal eddy-delay, LED)进行实验,采用预饱和方式抑制水峰,饱和时间为 2 s,谱宽 8 000 Hz,采样点数 32 k,累加次数 64 次,预饱和频率和中心频率都在水峰位置。自由感应衰减(free induction decay, FID)信号经过 32 k 点傅立叶变换得到一维 NMR 谱图。以 TSP 为

化学位移参考峰的位置,设为 0 ppm。调用 VNMR 软件中的程序将 1H 谱中从 4.5 ~ 0.5 ppm (CPMG) 以及 6.0 ~ 0 ppm (LED) 范围内的谱峰,按每段为 0.04 ppm,进行分段积分。将积分数据归一化之后,以文本文件或 Excel 文件贮存,用于模式识别。将积分值进行中心化 and 定标,用 SIMCA-P 10.0 软件包(瑞典, Umetrics AB, Umea)进行主成分分析(PCA),必要时进行判别分析(PLS-DA)。

结 果

1 各组大鼠血清的典型 1H NMR 图谱 采用 CPMG 脉冲序列结果:CPMG 脉冲序列可以压制脂类等大分子的信号,从而得到血清中氨基酸等小分子代谢物发生变化的信息(图 1)。采用 LED 脉冲序列结果:LED 脉冲序列可以屏蔽氨基酸等小分子的信号,从而得到血清中脂类等大分子代谢物发生变化的信息(图 2)。其每一个峰代表一个或几个化合物,峰的高低表示着含量的大小。

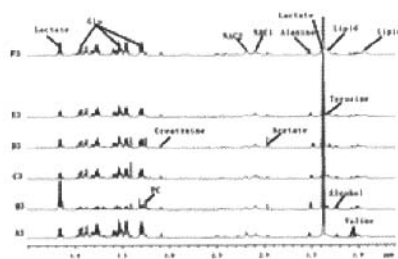


图 1 各组大鼠血清的 1H NMR 图谱(CPMG)

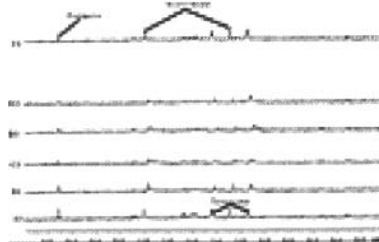


图 2 各组大鼠血清的 1H NMR 图谱(LED)

2 正常组和模型组 PCA 分析或结合 PLS-DA 分析比较结果 乳酸(1.36、1.38、1.4、4.16、4.12)、丙氨酸(1.44)、脂类化合物(0.92、1.36)、血糖(3.4)以及谷氨酸(2.4)、VLDL 和 LDL(0.87、0.91、0.95、0.99)、HDL(0.83)、胆碱(3.23、3.27)、NAC-1(2.07)、NAC-1(2.08)、小分子化合物(1.12)、3.44 ppm 未知化合物、长链脂肪酸(1.31、1.23、1.27、1.36、1.39)、NAC-2(2.15)以及 1.59 ppm 处未知化合物可能是 7 天期正

常组和模型组的组间代谢生物标志物。

LDL(0.87、0.91、1.27)、不饱和脂肪酸(4-5)、饱和脂肪酸(4-5)、NAC-1(2.07)、NAC-2(2.16)、饱和脂肪酸(1-3)等代谢产物可能是 21 天期正常对照组和模型组的组间代谢生物标志物。

正常组 7 天时样本中乳酸(1.36)、苏氨酸(1.32)、脂类化合物(0.92、0.96)、丙氨酸(1.52)、NAC-1(2.08)、3-羟基丁酯(1.28)以及 2-3 之间的小分子化合物、VLDL 和 LDL(0.87、0.91、1.27、1.31、1.35)、胆碱(3.23、3.27)以及不饱和脂肪酸(1.99、5.31、5.35)等化合物含量较高;而 21 天时样本中血糖(3-4)、谷氨酸(2.44)、乙酸(1.96)、丙氨酸(1.48)、化学位移在 3-4 之间的含氧脂肪酸含量较高。上述发生改变的代谢产物可能是 7 天与 21 天不同时间点的正常组组间的代谢标志物。

模型组 7 天时样本中脂类化合物(0.96、0.89、0.92、1.32、1.36)、血糖(3-4)、NAC-1(2.08)、NAC-2(2.15)、血脂(0.87、0.91、1.27、1.31、1.35)、胆碱(3.23、3.27)等化合物含量较高;21 天时样本中乳酸(1.4、4.16)、乙酸(1.96)、胆碱(3.24)、丙氨酸(1.48)、化学位移在 3-4 之间含氧脂肪酸含量较高, NAC 含量相对稍高一些。上述发生改变的代谢产物可能是 7 天与 21 天不同时间点的模型组组间的代谢标志物。

其中脂类化合物(0.92、0.96)、NAC-1(2.08)、血脂(0.87、0.91、1.27、1.31、1.35)、胆碱(3.23、3.27)、乙酸(1.96)、化学位移在 3-4 之间(可能为含氧脂肪酸)、丙氨酸(1.48)等化合物随时间的变化而变化,这些物质是否为束缚应激模型的生物标志物还需进一步研究。

乳酸(1.4、4.16)、不饱和脂肪酸(1.99)、血糖(3-4)、胆碱(3.24)、NAC 等化合物不随时间的变化而变化,上述物质和不饱和脂肪酸(4-5)、饱和脂肪酸(4-5)、NAC-1(2.07)、NAC-2(2.16)、饱和脂肪酸(1-3)、HDL(0.83)等可能为慢性束缚应激大鼠血浆的标志化合物。表现为慢性束缚应激大鼠血清中代谢产物乳酸(1.4、4.16)、胆碱(3.24)、NAC、饱和脂肪酸(1-3)升高,而不饱和脂肪酸(1.99、4-5)、血糖(3-4)、HDL(0.83)等化合物含量降低。

3 3 组 7 天时样本的模式识别 CPMG 实验表明:PCA 分析 3 组样本间无法分开,且点 c5 与其他样本间有显著不同。排除点 c5 后进行 PLS-DA 分析,3 组样本仍分不开,说明 3 组样本间差异较小。LED 实验表明:PCA 分析 3 组样品间差异较小,分组情况不

理想,进一步进行 PLS-DA 分析后,可以看出一定的分组趋势,但是模型拟合较差(图 3)。从因子载荷图(图 4)及结合原始谱图数据分析,正常组的不饱和脂肪酸(5.35)、胆碱(3.27)含量相对较高,而模型组及逍遥散治疗组样本中这两种物质含量相对低一些;正常组个别样本 NAC(2.08、2.15)含量较高,但从整体平均水平上看,模型组样本的 NAC 含量较其他两组为高。3 组样本 VLDL 和 LDL 水平都较高,但两两比较,正常组更高。

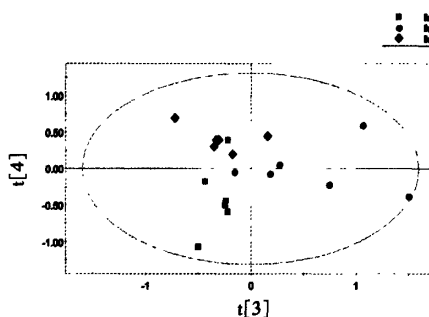
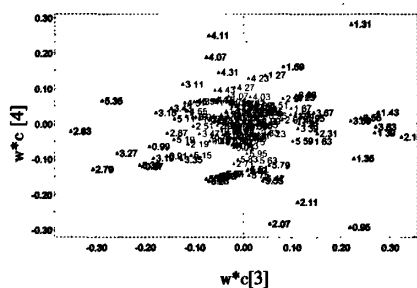


图 3 3 组大鼠 LED 实验血清 ^1H NMR 谱 PLS-DA 分析得分图($t[3]$ 和 $t[4]$)



义,其结果较 PCA 分析更好。

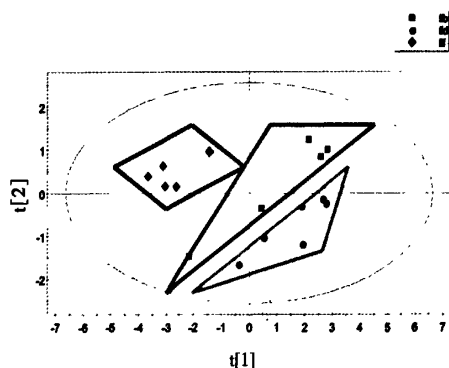


图 5 3 组大鼠 LED 实验血清 ^1H NMR 谱 PLS-DA 分析得分图($t[1]$ 和 $t[2]$)

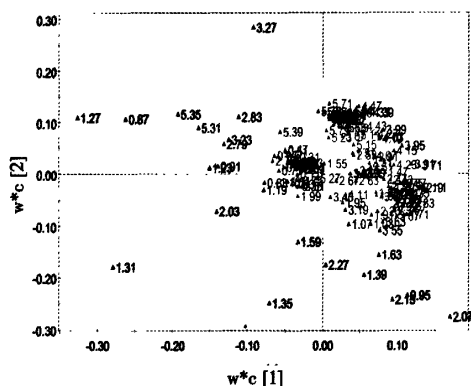


图 6 3 组大鼠 LED 实验血清 ^1H NMR 谱 PLS-DA 分析载荷图($w^*c[1]$ 和 $w^*c[2]$)

LED 实验表明:3 组样本未能分开,且点 b1 落于置信区间外。排除点 b1 后进行 PLS-DA 分析,3 组样本间可见明显的分组趋势(图 5)。结合原始图谱,从因子载荷图(图 6)上看,逍遥散治疗组样本中胆碱(3.27)、不饱和脂肪酸(5.31)含量较高,3-4 之间的化合物含量相对较低;模型组样本中 NAC-1(2.08)、NAC-2(2.15)以及 VLDL 和 LDL(0.95、1.31、1.35)含量要高一些,其他化合物含量相对低一些,而正常对照组则介于逍遥散治疗组与模型组之间。

7 天时模型组样本中磷脂酰胆碱(3.28)、脂类化合物(0.92、0.96、1.32)、NAC-2(2.15)、NAC-1(2.08、2.11)、小分子氨基酸(1)、VLDL(0.95、1.35、1.39、1.43)、甘油三酯(3.55、3.59)以及 1.63 ppm、3.2 和 3.16 ppm、3.44 ppm 等未知化合物含量较高;而逍遥散治疗组中乳酸(1.4、4.16、4.2)、谷氨酸(2.44)、丙氨酸(1.52)、缬氨酸(1.08)、HDL(0.87、1.21)、不饱和脂肪酸(5.31、5.35)及小分子化合物(1-2)含量较

高。与同时点的正常对照组比较,其乳酸(1.4、4.16、4.2)、谷氨酸(2.44)、丙氨酸(1.52)、HDL(0.87、1.21)有所恢复,并有不饱和脂肪酸(5.31、5.35)及小分子化合物(1-2)含量的提升。

21 天时模型组样本中乙酸(1.96)、乳酸(4.2、1.4、4.16)、缬氨酸(1.04)、NAC-1(2.08)、NAC-2(2.15)以及小分子化合物(1-2)、化合物(3-4)含量较高;逍遥散治疗组样本中苏氨酸(0.92、0.96、1.32、1.36)、丙氨酸(1.48)、谷氨酸(2.44)以及 3.44 ppm、VLDL 和 LDL(0.87、0.91、1.27、1.31、1.35)、胆碱(3.27)以及不饱和脂肪酸(5.31、5.35)等化合物含量较高。与同时点的正常对照组比较,其 VLDL 和 LDL(0.87、0.91、1.27、1.31、1.35)及不饱和脂肪酸(5.31、5.35)等化合物有所恢复,并有苏氨酸(0.92、0.96、1.32、1.36)、丙氨酸(1.48)、谷氨酸(2.44)、胆碱(3.27)等化合物含量的增加。并随给药时间的延长,其逍遥散治疗组样本中 3.4 ppm、3.8 ppm、2.44 ppm 未知化合物、磷酸酐胆碱(3.28)、胆碱(3.27)以及 LDL 或 HDL(0.87、0.91)含量更高,与正常对照组比较,逍遥散治疗组有明显的代谢网络修复趋势。逍遥散可使乳酸、胆碱、NAC、饱和脂肪酸下降,血糖、不饱和脂肪酸、HDL、3.44 ppm 等化合物含量升高,表现为明显的代谢终产物的调节效应。

讨 论

各组间进行的 PCA 分析结果显示,各样本基本集中分布于得分图的椭圆形(95% 置信区内)的 4 个区域,虽各组动物组内样品存在一定的差异,表现为有些样品相对离散,但各对照组间基本仍能分开,说明不同组别之间存在代谢产物的差异。

大鼠应激反应过程应表现血浆中血糖、乳酸、游离脂肪酸和甘油三酯增加。而我们的研究发现,7 天时正常对照组的血糖和乳酸相对较高,这可能是与实验室条件限制,在制作束缚应激组动物模型时,正常对照组动物易受到模型组动物易急怒行为的影响而常产生急性心因性应激;或适应性喂养时间短,动物因环境改变而产生的代谢改变没有得到调整;或动物样本量不够大;而且产生血糖和乳酸升高的代谢因素很多,肝、脑、肌肉、肾、红细胞等器官组织都参与其中,代谢物丰富、代谢途径多样有关。从总体来看,慢性束缚应激过程中,模型组血糖水平相对较高。脂肪酸含量的增加是应激时脂肪分解增强,而 HDL 含量的降低提示肝与肠道合成功能的减弱有关。NAC 是一种 N-乙酰基糖蛋白,可能包含多种糖蛋白如 GalNAc、GlcNAc、NeuAc

等 N-连接糖蛋白,糖蛋白包含多种生理功能,具体是何种还需进一步研究。3.44 ppm 未知化合物在 7 天时就明显升高,它为何种化合物及其生成机理尚需研究。

21 天时脂类代谢明显紊乱,不饱和脂肪酸大多是必需脂肪酸,不能从人体合成,需从食物中摄取。不饱和脂肪酸(4-5)的减低提示模型组进食减少。逍遥散干预后血中苏氨酸、甲硫氨酸等必需氨基酸含量升高也可证明模型组进食减少这一结论,这与我们前期研究的结果相同^[5,8]。

研究发现 7 天时正常对照组及模型组能大致分开而模型拟合较差,说明 7 天期模型代谢有变化,但变化不大。从结果来看,予以逍遥散 7 天期治疗效果没有 21 天疗程的效果明显。21 天期正常对照组及模型组 CMPG 实验虽不能完全分开,但两组还是存在一定的分组趋势。

逍遥散治疗组图中主成分积分值基本集中分布于椭圆形散点图(95% 置信区内)的 4 个区域,结合原始图谱,对不同时点的治疗组间的进一步分析发现,7 天和 21 天之间代谢产物有明显改变,基本能分开。7 天样本中 NAC-1 (2.08)、NAC-2 (2.15) 乳酸 (1.36、1.38、1.4、4.16、4.12)、缬氨酸 (1.02、1.09) 较高,而 21 天样本中磷脂酰胆碱 (3.27)、LDL 和 HDL (0.87、0.91) 含量较高。结合原始图谱,对相同时点的正常组、模型组与逍遥散治疗组进一步分析发现:7 天时各组间差异较小,21 天时各组间差异较大,有比较明显的分组趋势。21 天逍遥散治疗组其代谢物的含量有趋于正常对照组的改变趋势。与正常对照组比较,显示出随治疗时间的延长而更有代谢网络的修复趋势。

从代谢组学角度来看,慢性束缚应激大鼠的代谢

影响了机体糖类、蛋白质和脂类等物质代谢改变,尤其是脂类的改变明显。逍遥散能调节慢性束缚应激大鼠的脂类代谢,使之恢复到正常水平,但其调节机理还需进一步研究确立。

参 考 文 献

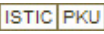
- 1 German JB, Bauman DE, Burrin DG, et al. Metabolomics in the opening decade of the 21st century: building the roads to individualized health. *J Nutr* 2004;134(10):2729—2732.
- 2 Gavaghan CL, Holmes E, Lenz E, et al. An NMR-based metabolomic approach to investigate the biochemical consequences of genetic strain differences; application to the C57BL10J and Alpk: ApfCD mouse. *FEBS Lett* 2000;484(3):169—174.
- 3 赵剑宇, 颜贤忠. 基于核磁共振的代谢组学研究进展. *国外医学药学分册* 2004;31(5):308—312.
- 4 罗和占, 丁杰, 岳广欣, 等. 大鼠肝郁脾虚证的代谢组学研究. *中西医结合学报* 2007;5(3):307—313.
- 5 陈家旭, 杨建新, 赵歆, 等. 慢性束缚应激大鼠下丘脑 β -内啡肽变化及中药复方对其的影响. *中国医药学报* 2004;19(2):83—85.
- 6 Waters NJ, Waterfield CJ, Farrant RD, et al. Metabonomic deconvolution of embedded toxicity: application to thioacetamide hepato- and nephrotoxicity. *Chem Res Toxicol* 2005;18(4):639—654.
- 7 Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, et al. Metabonomics: Metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids. *Concepts Magn Reson* 2000;12:289—320.
- 8 陈家旭, 李伟, 赵歆, 等. 三种中药复方对慢性束缚应激大鼠行为及皮层和海马 NT3 的影响. *北京中医药大学学报* 2004;27(2):19—23.

(收稿:2008-02-27 修回:2008-10-07)

· 书 讯 ·

《胸痹心痛与冠心病介入》由广州中医药大学第二附属医院(广东省中医院)心脏中心张敏州教授主编,科学出版社于 2007 年 7 月出版。本书为我国第一本冠心病介入领域的中西医结合专著,涵盖了中、西医学治疗冠心病的理论和实践。全书共分三篇,第一篇从辨证治疗和名家经验等方面详细论述胸痹心痛的证治;第二篇从急性冠脉综合征和复杂病变的介入治疗等方面系统介绍了冠心病介入治疗的研究进展;第三篇从冠心病的中西医结合诊疗思路和临床研究等方面论述了介入治疗领域的中西医结合研究进展。本书可作为心血管临床医师和研究生的参考用书。

本书由中国科学院陈可冀院士和全国名老中医邓铁涛教授分别作序,图文并茂,五十多万字,具理论可读性、临床实用性、科研参考性。每册 60 元(包括邮费),欲购者请与广东省中医院 ICU 杨广医师联系,邮编 510120,电话:020-81887233 转 32802,手机:13580421600。

作者: 罗和古, 陈家旭, 岳广欣, 丁杰, 颜贤忠
作者单位: 罗和古, 陈家旭, 岳广欣, 丁杰 (北京中医药大学中医诊断系, 北京10029), 颜贤忠 (国家生物医学分析中心)
刊名: 中国中西医结合杂志 
英文刊名: CHINESE JOURNAL OF INTEGRATED TRADITIONAL AND WESTERN MEDICINE
年, 卷(期): 2008, 28(12)
被引用次数: 1次

参考文献(8条)

1. German JB, Bauman DE, Burrin DG Metabolomics in the opening decade of the 21st century: building the roads to individualized health 2004(10)
2. Gavaghan CL, Holmes E, Lenz E An NMR-based metabonomic approach to investigate the biochemical consequences of genetic strain differences: application to the C57BL10J and Alpk:ApfCD mouse 2000(03)
3. 赵剑宇, 颜贤忠 基于核磁共振的代谢组学研究进展[期刊论文]-国外医学(药学分册) 2004(05)
4. 罗和占, 丁杰, 岳广欣 大鼠肝郁脾虚证的代谢组学研究[期刊论文]-中西医结合学报 2007(03)
5. 陈家旭, 杨建新, 赵歆 慢性束缚应激大鼠下丘脑 β -内啡肽变化及中药复方对其的影响[期刊论文]-中国医药学报 2004(02)
6. Waters NJ, Waterfield CJ, Farr'ant RD Metabonomic deconvolution of embedded toxicity: application to thioacetamide hepato-and nephrotoxicity 2005(04)
7. Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E Metabonomics: Metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids 2000
8. 陈家旭, 李伟, 赵歆 三种中药复方对慢性束缚应激大鼠行为及皮层和海马NT3的影响[期刊论文]-北京中医药大学学报 2004(02)

相似文献(10条)

1. 期刊论文 徐洪雁, 赵歆, 陈家旭, 马梦茵, 王竹风, 岳广欣 慢性束缚应激大鼠海马CA1区L-ENK的变化及逍遥散的调节作用 -世界科学技术-中医药现代化2005, 7(5)

目的: 研究慢性束缚应激时大鼠海马CA1区L-ENK的变化以及逍遥散的调节作用。方法: 用特制束缚架连续束缚7d与21d, 每天3h的方法制作大鼠束缚应激模型, 用免疫组织化学方法结合图像分析检测中枢(海马CA1区、齿状回、大脑皮层)L-ENK的变化。结果: 大鼠海马CA1区L-ENK免疫反应阳性细胞的平均光密度、积分光密度、平均总面积、面密度和数密度等在造模7d时都有不同程度的增强, 到造模21d时大鼠海马CA1区L-ENK有极显著性增强; 7d与21d两模型组、四君子汤组及金匮肾气丸组大鼠CA1区L-ENK免疫反应积分光密度与逍遥散组比较显著增强, 而逍遥散组和正常对照组相比则没有明显差异; 可见逍遥散组对大鼠海马CA1区L-ENK的积分光密度有显著的影响。结论: 逍遥散、四君子汤和金匮肾气丸对慢性束缚应激时海马CA1区有不同程度的调节作用, 而以逍遥散作用为优。

2. 学位论文 王竹风 慢性束缚应激对脑区NMDA受体及生长相关蛋白的影响和逍遥散的调节作用 2006

引言: 慢性应激影响人们的日常生活, 但却无法避免, 是生命为生存和发展所必须存在的。对慢性应激致病机理的深刻认识, 有助于相关防治措施的研究, 以保护人们的身心健康。随着现代社会竞争的日趋激烈, 人们因抑郁引起的疾病日渐增多, 大都与慢性应激有密切的关系。慢性应激能引起神经-内分泌-免疫等系统广泛的变化, 其中, 中枢神经可塑性的变化是导致应激反应各种变化的原因之一。海马是慢性应激反应的主要调节中枢和受影响中枢, 海马和杏仁核在学习和情绪等方面又有密切的联系。因此, 研究慢性应激抑郁动物模型和调节慢性应激药物之间的关系, 对于临床实践具有重要的指导意义。

目的: 本课题通过理论研究和实验研究两大部分, 探讨慢性束缚应激引起中枢神经系统突触可塑性结构和功能在海马和杏仁核中变化的机理。本课题主要研究慢性束缚应激时兴奋性谷氨酸受体NMDAR[N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartic acid receptor), NMDAR], 主要是NMDAR2A(NR2A)和NMDAR2B(NR2B)亚基, 突触生长相关蛋白GAP-43, Nogo-A变化的规律, 同时运用逍遥散对其进行干预, 观察中药对它们的调节作用, 以期揭示慢性应激影响突触可塑性的内在机理, 以及中药复方逍遥散对肝郁证的分子水平调节机制。

方法:

1 理论研究主要探讨了以下几个方面的内容: ①应激的概念及分期; ②应激反应对机体的影响; ③应激反应对神经系统的影响; ④应激反应的调节与控制; ⑤中医肝脏的现代研究进展; ⑥中医对应激的认识研究。

2 实验研究

2.1 第一部分: 探讨慢性束缚应激大鼠的饮食和体重的变化及逍遥散的影响。本实验目的在于: 探讨慢性束缚应激状态下大鼠行为学变化以及慢性束缚应激时大鼠进食量和体重的变化, 同时对其一般情况进行评价。将雄性SD大鼠72只, 随机分为7天正常对照组(A组)、21天正常对照组(B组)、7天模型组(C组)、21天模型组(D组)、7天逍遥散组(E组)、21天逍遥散组(F组)共6组, 每组各12只。实验所用的中药复方选用《太平惠民和剂局方》中的逍遥散[北柴胡30g、当归30g、白芍30g、白术30g、茯苓30g、炙甘草15g、生姜10g、薄荷10g], 将以上药物按一定的工艺制成药粉备用。以慢性束缚方法制作应激大鼠模型, 将大鼠束缚于特制的束缚架上, 每日3小时, 连续21天(A、C、E组为7天)。自造模第一日始, 各用药组(E和F)每日在束缚前1小时分别灌服逍遥散5.82g/kg, 灌胃容积为10ml/kg, 其它各组则灌服等体积的蒸馏水。一周后, A、C、E组取材, 其余3周后取材。每日称量大鼠体重, 计算进食量

，观察其一般状况。

2.2第二部分：免疫组织化学(漂浮染色，SP法)方法检测海马和杏仁核(基底外侧杏仁核)中NR2A，NR2B，GAP-43和Nogo-A的变化以及逍遥散的调节作用。大鼠分组和造模方法同第一部分。实验结束时，大鼠常规用3.0%戊巴比妥钠(40mg/kg)麻醉，以4%多聚甲醛溶液心脏灌注固定后取脑，将脑组织置于4%多聚甲醛溶液中后固定。然后将其移至20%的蔗糖溶液中，待组织下沉后，预冷，于恒冷低温切片机中制备30um的冰冻切片，用免疫组织化学结合图像分析的方法检测海马和杏仁核NR2A，NR2B，GAP-43和Nogo-A的变化。

2.3第三部分：Westernblot方法直接评价海马和杏仁核中NR2A、NR2B、GAP-43和Nogo-A的靶蛋白表达的变化以及逍遥散的调节作用。造模方法同第一部分。造模结束后，立即将大鼠断头处死。在冰盘上迅速剥离脑组织，取双侧海马和杏仁核，提取蛋白后进行Westernblot系列反应。用凝胶图像分析系统进行扫描并分析目的蛋白的光密度，再进行半定量分析。

2.4第四部分：RT-PCR的方法检测海马和杏仁核中NR2A、NR2B、GAP-43和Nogo-AmRNA的变化以及逍遥散的调节作用。造模方法同第一部分。造模结束后，立即将大鼠断头处死。在冰盘上迅速剥离脑组织，取双侧海马和杏仁核，称重后用TRIzol法提取总RNA，进行RT-PCR反应，扩增上述四个指标的基因，同时以β-actin作为内参照。用凝胶图像分析系统进行扫描并分析，把目的基因光密度与内参照条带的光密度比较后进行半定量分析。

2.5动物实验主要结果：

①慢性束缚应激时模型组大鼠体重增长缓慢，进食量在第一周和第三周明显减少。

②NR2A和NR2B蛋白的表达情况基本一致：在CA3和DG区，与7天和21天正常对照组相比，7天和21天模型组的表达降低显著(P<0.05或P<0.01)，逍遥散组的表达升高(P<0.05或P<0.01)，以CA3区模型组降低明显。说明慢性束缚应激对NR2A和NR2B蛋白表达的影响有明显的调节作用，在海马CA3和DG区最明显，有同一趋势。NR2A和NR2B蛋白的表达在BLA(基底外侧核)和海马的趋势大致相同。逍遥散对NR2A和NR2B有明显的调节作用，在海马的CA3和DG区最明显，对7天和21天的应激模型都有不同程度的调节作用。综上所述：逍遥散对NR2A和NR2B应激模型有不同程度的调节作用，以尽力维持机体原来的平衡状态，充分说明逍遥散对神经突触的病理性质改变有抑制作用。

③在海马各区，与21天正常对照组相比，21天模型组的GAP-43表达量下调显著(p<0.01或p<0.05)，而在CA3区，7天模型组的GAP-43表达量下调显著(p<0.05)。而GAP-43在杏仁核区21天模型组上调明显(p<0.01)。在海马各区，与21天正常对照组相比，21天模型组的Nogo-A表达量上调显著(p<0.01或p<0.05)，以CA3和DG区明显，然而在杏仁核区21天模型组下调明显(p<0.01)。逍遥散对GAP-43和Nogo-A蛋白表达的调节作用具有双向性，逍遥散能调节慢性束缚应激引起GAP-43和Nogo-A变化所致突触可塑性变化，但有一定的选择性，在7天应激模型中，效果并不明显，对21天应激模型有明显的调节作用，以CA3区的作用较好，使它们趋于恢复原来的水平状态，以保持组织正常的生理功能。这充分说明逍遥散能调节神经系统的突触可塑性的结构变化，以起到抗抑郁的作用。

④NR2AmRNA在CA3，DG和杏仁核区，与7天和21天正常对照组相比，7天和21天模型组的表达均下调(P<0.05或P<0.01)，在CA1区不明显。NR2BmRNA在CA1，CA3，DG和杏仁核区，与21天正常对照组相比，21天模型组表达均上调(P<0.05或P<0.01)，在CA1和杏仁核区7天模型组表达没有统计学意义。逍遥散对CA3和DG区的NR2AmRNA和NR2BmRNA有明显的调节作用，在CA3和DG区7天和21天的表达均有效(P<0.05和P<0.01)。而在CA1区对NR2AmRNA和NR2BmRNA没有调节作用。其中以CA3区和DG区的调节作用最明显，这里可能是逍遥散的调节靶点。21天逍遥散组与之相比都有不同程度的改变，说明慢性束缚应激明显的影响了大鼠海马和杏仁核中NR2AmRNA和NR2BmRNA基因的转录情况，可能引起突触的功能改变而影响突触可塑性。

⑤GAP-43mRNA在海马各区的21天模型组中都下调(p<0.01或p<0.05)，在CA3和DG区的影响较大(7天和21天模型组都下调)，而在杏仁核中上调显著(p<0.01或p<0.05)。Nogo-AmRNA在海马各区的21天模型组中都上调(p<0.01或p<0.05)，以CA3的影响明显，而在杏仁核中下调显著(p<0.01)。大鼠束缚时间越长，对它们的影响愈大。逍遥散对慢性束缚应激引起的GAP-43和Nogo-AmRNA基因转录有明显的调节作用，但有选择性。总的来说对CA3和DG区的作用明显，对CA1区的7天模型组没有作用。

结论：慢性束缚应激影响了NR2A、NR2B、GAP-43和Nogo-A在海马和杏仁核中的表达，其中变化最显著的区域是CA3和DG区。逍遥散可双向的调节上述指标的蛋白和基因水平，以保持神经系统正常的生理功能。这充分说明逍遥散能调节神经系统的突触可塑性结构和功能，以起到抗抑郁的作用。逍遥散作用的最敏感靶区可能是CA3和DG区，以21天的模型组明显，这与慢性束缚应激的影响区域相似。综上所述，慢性束缚应激时机体功能的变化与中医学的肝郁脾虚证非常接近。海马是逍遥散调节慢性束缚应激的重要作用部位，杏仁核也起一定的作用。众多的蛋白质和基因等参与了逍遥散对慢性应激的调节过程，其具体的作用机理还需要深入研究。

创新点：①首次从神经系统突触可塑性的角度出发，通过建立不同时间点(7天和21天)的慢性束缚应激模型，系统研究了慢性束缚应激过程中大鼠海马和杏仁核中突触可塑性结构和功能的变化，阐述可能的机理，从方法学上进行探索，为今后研究类似问题提供借鉴。②首次研究逍遥散干预时，慢性应激状态下，GAP-43和Nogo-A蛋白的变化情况。③首次研究慢性应激状态中，海马和杏仁核的相互联系和影响。综上所述，本课题通过探求中药逍遥散对慢性束缚应激突触可塑性调节的机理，进一步揭示了肝郁证的本质，为今后中医药防治应激性疾病提供了理论依据。

3. 会议论文 [丁杰. 陈家旭. 饶红梅. 梁媛. 刘晓明. 霍素坤 慢性束缚应激大鼠Y迷宫实验变化及逍遥散对其的调节](#)

2008

目的:探讨慢性束缚应激大鼠Y迷宫(Y-maze)实验的变化及逍遥散对其的调节作用。

方法:将大鼠随机分为正常对照组、模型组和治疗组。以慢性束缚方法制作大鼠应激模型,同时灌服逍遥散有效组份悬液。在造模第21d结束后的第2天进行Y迷宫实验,观察并记录达标所需的训练次数(N)、错误反应次数(EN)、总反应时间(TRT)、主动回避率、正确反应率。

结果:造模结束时,组间比较无显著性差异(P>0.05);正常组大鼠的EN多于其余两个组,组间比较有显著差异(P<0.05),TRT多于其余两个组,组间比较有极显著差异(P<0.01);大鼠的主动回避率组间两两比较无显著性差异(P>0.05);大鼠的正确反应率正常组低于模型组和治疗组,组间比较有显著差异(P<0.05)。

结论:应用21d慢性束缚应激方法能够复制与中医肝郁脾虚证相似的动物模型,逍遥散能够有效改善慢性束缚应激大鼠的认知、学习记忆能力。

4. 会议论文 [丁杰. 陈家旭. 赵歆. 岳广欣. 饶红梅. 李爱君. 张巧丽. 梁媛 逍遥散对慢性束缚应激大鼠高架十字迷宫实验的影响](#)

2008

目的:探讨慢性束缚应激大鼠高架十字迷宫实验(EPM)变化及逍遥散对其调节作用。

方法:将大鼠随机分为正常对照组、模型组和治疗组。以慢性束缚方法制作大鼠应激模型,同时灌服逍遥散有效组份悬液;于第1、7、14、21天行EPM,观察进入开放臂次数(OE)、开放臂停留时间(OT)、进入封闭臂次数(CE)、封闭臂停留时间(CT)、向下探究次数(HD)、封闭臂后腿直立次数(R)。计算进入开放臂和封闭臂的总次数(OE+CE)、进入开放臂次数比例(OE%)及开放臂停留时间比例(OT%)。

结果:造模开始后,三组OE均有减少趋势,模型组尤为明显;造模结束时,组间比较无显著性差异;三组CE、OE+CE、OT%、OT和HD均呈起初减少,后来增多趋势;三组CT呈先增多后减少的趋势;随着造模时间的延长,模型组OE%呈现明显的先降低后升高的趋势;三组R都呈现第1天较高,进而降低后又有所增高或持平的趋势。

结论:应用21天慢性束缚应激方法能够复制与中医肝郁脾虚证相似的动物模型,逍遥散能够有效改善慢性束缚应激大鼠的情绪。

5. 学位论文 [丁杰 慢性束缚应激对大鼠行为和中枢AMPA受体的影响及逍遥散的调节作用](#) 2007

应激是机体在受到各种应激原刺激时，体内出现的以交感神经兴奋和垂体—肾上腺皮质分泌增多为主的一系列神经内分泌反应，它对个体的存活具有十分重要的意义。对于适度的应激，哺乳动物可以通过行为及内分泌方面的改变以维持内环境稳态，其中，下丘脑—垂体—肾上腺(HPA)轴起着至关重要的作用。但过度的尤其是慢性应激会导致不同程度的生理、心理障碍，甚至引起躯体疾病，可视为是一种由机体对倾向于干扰内环境稳态的外部力量和异常条件的反应引起的病理过程。由于慢性应激涉及人体多个系统，在不同应激原、不同个体、不同环境下，可能导致的结果也不同，给预防和治疗慢性应激性疾病造成了困难，而中医药的整体观念、辨证论治、个体化诊疗等理念在这方面显示出更大的优越性。本课题为国家自然科学基金(NO. 30672578)资助课题，从慢性应激反应的中枢机制与逍遥散对其的作用机制两个方面进行了实验研究。

实验研究：

哺乳动物脑中大部分兴奋性信号都发生在以谷氨酸为神经递质的突触。谷氨酸是中枢神经系统(CNS)中的主要兴奋性神经递质，有两种受体，代谢型谷氨酸受体和离子型谷氨酸受体。离子型谷氨酸受体根据药理学、分子和电生理学特性又被分成三种：α-氨基羟甲基基性丙酸(AMPA)受体、红藻氨酸(KA)受体和N-甲基-D-天(门)冬氨酸(NMDA)受体。AMPA受体是参与中枢神经系统中快速兴奋性突触传递的主要分子单位。谷氨酸与突触后的AMPA型谷氨酸受体结合后诱发放电，导致神经元兴奋。这一AMPA受体介导的神经传递促成大脑的瞬时至瞬时活性，包括认知反应和动作。而且，突触上AMPA受体功

能的变化也促成了作为学习和记忆的基础的可塑性。GRIP与非磷酸化的PDZ基序结合可能将含有GluR2的受体锚定在突触上，Stargazin在AMPA受体膜表面靶向性调控中起作用，其PDZ结合基序磷酸化是突触AMPA受体浓度和突触强度的调控器，c—fos等即刻早期基因(IEG)成员被认为是神经细胞功能状态的示踪标志。因此本课题选择了AMPA受体的两个亚基GluR1、GluR2，两个相关蛋白GRIP1、Stargazin，IEG成员c—fos作为研究对象，通过对慢性束缚应激大鼠行为、应激相关激素、AMPA受体的调节作用，探讨慢性应激反应和慢性应激损害的中枢机制及逍遥散对其的调节功能。主要结果如下：

1. 动物行为的变化：束缚21天后，动物出现类似肝郁脾虚的不良表现，逍遥散对其有改善作用。慢性束缚应激状态下模型组大鼠在三周实验过程中体重增长量明显减少。在旷场实验第1天模型组大鼠的正中格停留时间、总穿梭数明显增多；第21天模型组大鼠的正中格停留时间明显增多、总穿梭数、站立次数和修饰次数明显减少。在高架十字迷宫实验第14天模型组大鼠进入开放臂的次数和比例、进入开放臂的时间和比例、进入开放和封闭臂总次数以及向下探究次数均明显降低。在第21天Y迷宫实验模型组大鼠的错误反应次数、全天总反应时间减少，正确反应率增加。逍遥散对体重、旷场和高架十字迷宫各项指标的改善作用明显，而对Y迷宫实验未表现出明显的调节作用。

2. ELISA检测结果：21天束缚应激状态下，大鼠血浆ACTF1和血清CORI、均升高，但CORT 升高有统计学意义，而逍遥散对其有明显的向正常水平的调节作用。

3. 免疫组织化学结果：21天束缚应激使模型组CA1、DG、BLA区的c—fos阳性细胞数增多；而模型组的GluR1在CA1和DG区表达增多；GluR2在CA1、CA3和DG区表达下降；GluR1和GluR2在BLA区均无明显变化。逍遥散可下调c—fos阳性细胞数，下调GluR1阳性细胞及免疫阳性物表达，上调GluR2阳性细胞数及免疫阳性物表达。

4. RT—PCR结果：21天束缚应激状态下，模型组GRIP1和Stargazin mRNA在CA1区表达下降；但在CA3、DG区和杏仁核的变化无统计学意义。逍遥散可上调GRIP1和Stargazin mRNA的表达。

以上结果提示：(1)在相同慢性应激刺激下，大鼠不同的行为学检测方法可能结果不同；(2)慢性束缚应激状态下，AMPA受体亚基GluR1和GluR2在海马的表达趋势不同；(3)海马和杏仁核在慢性束缚应激反应中的作用不一致；(4)海马CA1区可能是慢性束缚应激影响突触可塑性的最敏感部位；(5)逍遥散的调节呈现出区域选择性、时相性和双向调节作用。

6. 期刊论文 [李伟. 陈家旭. LI Wei. CHEN Jia-xu 慢性束缚应激大鼠海马BDNF TrkB NT3的变化及逍遥散对其影响 - 中医药学刊2005, 23\(7\)](#)

目的:观察慢性束缚应激时大鼠海马BDNF、TrkB、NT3的变化及逍遥散对其影响.方法:用束缚的方法建立了应激模型,用心脏灌注的方法固定海马,切片后用免疫组织化学结合图像分析的方法观察了海马CA1区BDNF、TrkB、NT3变化情况.结果:发现海马中BDNF和NT3的阳性细胞数和积分光密度下降,TrkB阳性细胞数和积分光密度明显上升.逍遥散能不同程度的抑制海马中BDNF和NT3阳性细胞数和积分光密度的下降以及TrkB阳性细胞数和积分光密度的上升.结论:BDNF、TrkB、NT3在慢性应激中发挥了重要作用.逍遥散可能正是通过它们的变化,作用于HPA轴引起机体免疫功能变化的.

7. 会议论文 [陈家旭. 洪梅. 李伟. 赵歆. 杨建新. 陈青红. 马梦茵. 李柳骥. 汪南明. 薛飞飞 慢性束缚应激大鼠海马基因的差异表达及逍遥散的作用 2003](#)

目的：研究慢性束缚应激时大鼠海马基因差异变化以及逍遥散的影响。
方法：用特制束缚架连续束缚7 d与21 d，每天3 h的方法制作大鼠束缚应激模型，用荧光差异显示技术检测海马差异基因。
结果：海马内有许多基因产生了明显的变化。7天模型组大鼠3号和7号基因表达减弱；8号、18号(Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA6720467C03 gene)、28号(Mus mus-culus similar to ATP-binding cassette, sub-family A(ABC1), member 3(LOC328776))、41号基因表达增强；11号、23号(Rattus norvegicus completemitochondrial genome)、26号基因没有表达。

21天模型组大鼠7号、41号、11号、18号基因表达明显增强；28号基因和23号基因、8号基因表达明显减弱。
结论：逍遥散能够降低海马内7号、11号、26号、41号基因的表达；增强8号、28号基因的表达；可以使12号基因表达。

8. 学位论文 [霍素坤 逍遥散对肝郁脾虚证大鼠海马和杏仁核BDNF的调节作用 2009](#)

本课题利用慢性束缚的方法，模拟肝郁日久，木郁乘土，肝郁脾虚的病理演变过程，成功复制出大鼠肝郁脾虚证模型。慢性束缚应激模拟了肝失疏泄的病理过程，而逍遥散的治疗促进了肝主疏泄功能恢复。由于慢性应激涉及到人体多个系统，在不同应激源、不同个体、不同环境下，可能导致的结果也不相同，给预防和治疗慢性应激所致疾病造成了困难，而中医药的整体观念、辨证论治、个体化诊疗等理念在这方面显示出了更大的优越性。逍遥散是治疗肝郁脾虚证的名方，本实验从逍遥散入手，探讨逍遥散的调节作用。本课题为国家自然科学基金(No. 30672578)资助课题。

主要选择大脑中相互关联的两个区域——海马与杏仁核。从现代应激理论入手，结合中医学有关应激理论的研究成果，通过探讨慢性束缚应激时BDNF分布与表达，对大脑突触可塑性的观察，以及逍遥散对BDNF的调节作用，进一步探索慢性应激时所造成的机体损伤及疾病的内在机制，以及肝主疏泄是慢性应激调节的核心及逍遥散在消除或减轻慢性应激时所产生的部分作用机理，这也是肝主疏泄功能的体现。这些研究不仅有利于中医基础理论和中医临床的研究发展，而且对于许多应激性疾病的预防和治理具有重要的意义。

当前认为AMPA的受体拮抗剂CNQX比NMDA的受体拮抗剂MK—801更能有效的阻止CA3锥体神经元受损。本实验拟拮抗双侧杏仁核AMPA受体，抑制杏仁核尤其抑制BLA的兴奋，通过行为学观察以及免疫组化和RT—PCR技术检测各组大鼠海马CA1、CA3、DG和杏仁核BLA区BDNF的变化，以探索逍遥散对其调节作用。

2、实验研究
本实验由四部分组成。实验一，肝郁脾虚证大鼠模型的建立与评价。从动物行为学着手、观察宏观表征和检测反应小肠吸收功能的尿D—木糖排泄率确认慢性束缚应激方法造成的大鼠肝郁脾虚证模型；实验二、三和四通过行为学、免疫组化和RT—PCR检测海马各区和杏仁核的BDNF的表达情况，探讨逍遥散的重要调节作用，共分五组，正常组、模型组、假手术组、CNQX组和逍遥散组，每组15只，5只/笼群养。后四组束缚捆绑21d后，第22d开始做手术。假手术组和逍遥散组分别在双侧杏仁核用脑立体定位仪微量注射生理盐水0.5 μl，CNQX组双侧杏仁核微量注射CNQX溶液0.5 μl。除逍遥散组灌服逍遥散溶液外，其它组均灌相同体积的生理盐水。模型组只束缚不手术。第25d进行行为学观察。第26d分别灌注固定取材留做免疫组化和剥离取大鼠海马和杏仁核组织留做RT—PCR。

3、结果和结论
3.1实验一
结果：模型组大鼠由初次束缚时反抗挣脱，逐步转变为神态倦怠、抗争不积极、烦躁、毛发枯黄散乱无光泽、蜷伏静卧、大便稀薄等；模型组大鼠体重增长缓慢，尿D—木糖排泄率逐渐降低；旷场实验中第7d开始穿梭数、站立次数、修饰次数均有下降趋势，第21d达到最低点。而逍遥散对模型组大鼠有显著的调节作用，从体重增长、穿梭数、站立次数和修饰次数相较于模型组有明显改善。

结论：利用慢性束缚的方法造模，模拟肝郁日久，木郁乘土，肝郁脾虚的病理演变过程，成功复制出大鼠肝郁脾虚证模型。

3.2实验二
结果：束缚21d后，模型组大鼠出现类似肝郁脾虚的不良表现，在三周实验过程中体重增长量明显减少，在旷场实验中模型组大鼠的总穿梭数、站立次数和修饰次数明显减少；假手术组大鼠呈现焦躁状态；CNQX组起到治疗作用，大鼠焦躁状态得到抑制；逍遥散组大鼠表现与正常组相近，说明逍遥散起到很好的调节作用。

结论：①大鼠双侧杏仁核微量注射CNQX后，抑制杏仁核尤其BLA兴奋性，可以缓解焦躁状态，起到治疗的作用；②逍遥散对肝郁脾虚证起到良好的调节作用。

3.3实验三
结果：①BDNF阳性面积、MOD和IOD趋势与阳性细胞数变化趋势大致相似。②慢性应激致海马CA3区神经元较CA1区神经元受损严重，CA1区和BLA区变化趋势大致相似。DG区损伤程度较CA3区和CA1区轻，这可能因为DG区有显著的再生功能。③阳性细胞数变化趋势：在海马CA1区，与正常组比较，假手术组和CNQX组有统计学意义，且阳性细胞数减少；与假手术组比较，逍遥散组有统计学意义，且较假手术组阳性细胞数减少；CNQX组和逍遥散组间有统计学意义。在海马CA3区，与正常组比较，模型组、假手术组和逍遥散组均有统计学意义，且均较正常组BDNF阳性细胞数减少；CNQX组和逍遥散组间有统计学意义。在海马DG区，与正常组比较，模型组、假手术组和逍遥散组均有统计学意义；与模型组比较，假手术组、CNQX组和逍遥散组均无明显差异，假手术组和CNQX组较模型组减少，逍遥散组较模型组阳性细胞数增多；与假手术组比较，模型组、CNQX组和逍遥散组间无明显差异，但逍遥散组较假手术

组增多。在杏仁核BLA区,与正常组比较,模型组和假手术组均有统计学意义,且均较正常组BDNF阳性细胞数减少;与模型组比较,CNQX组有统计学意义,且CNQX组较模型组增加;与假手术组比较,CNQX组有统计学意义,且CNQX组较假手术组增加。

结论:①模型组和假手术组间无统计学意义,提示手术创伤对BDNF的表达影响不大。②分别以假手术组或模型组为参照,逍遥散组和CNQX组免疫组化结果提示,分别在海马和杏仁核,二组变化趋势均相似,且二组间无统计学意义,说明逍遥散有效缓解束缚和手术创伤刺激,调节杏仁核和海马的平衡,起到很好的调节作用。亦说明CNQX通过拮抗杏仁核AMPA受体,抑制其兴奋,起到减轻海马各区受刺激强度,缓解海马受损程度。③本实验中,慢性束缚应激时,海马各区BDNF的表达均下降,尤其在BLA区下降明显,因慢性应激时BLA区兴奋,受损严重,微量注射CNQX后,抑制过度兴奋的杏仁核,故杏仁核区BDNF的表达下降趋势不明显,反而有上升的趋势,说明CNQX起到治疗作用。

3.4实验四

结果:变化趋势和实验三变化趋势基本吻合,逍遥散组和CNQX组BDNF mRNA的基因表达趋势一致,验证实验三结论。

综上,慢性束缚应激影响了BDNF在海马和杏仁核中的表达,模型组和假手术组在海马其含量总体呈下降趋势,在使用逍遥散后BDNF的含量上升,微量注射CNQX后变化趋势与逍遥散相似。而在杏仁核区,慢性应激时BLA区兴奋,BDNF的表达下降,微量注射AMPA受体的拮抗剂CNQX后,抑制过度兴奋的杏仁核,使BLA区的BDNF的表达上升,其趋势和CA1区相似,说明CNQX通过减轻慢性束缚应激对海马的损伤,起到治疗作用。本实验提示抑制杏仁核尤其抑制BLA兴奋,可以缓解海马各区受损程度。应激后BDNF对神经系统的保护作用减弱,同时也提示应激时失去BDNF的保护可能是中枢神经系统受损的重要机理之一。逍遥散对肝郁脾虚证有明显的调节作用,调节杏仁核和海马的平衡可能是逍遥散治疗肝郁脾虚证的一条重要作用通路。

9. 期刊论文 [焦格.元海军.陈向伟.Jiao Ge.Yuan Haijun.Chen Xiangwei 加味逍遥散对慢性束缚应激BALB/C小鼠行为学变化的调节研究 -山西中医学院学报2007,8\(5\)](#)

目的:研究加味逍遥散对慢性束缚应激BALB/C小鼠行为学变化的影响.方法:将50只8 w~10 w龄的BALB/C小鼠随机分为正常对照组、模型组、逍遥散组、加味逍遥散低剂量组、加味逍遥散高剂量组5组,每组10只.用特制束缚筒束缚14 d,每天6 h的方法制备小鼠慢性束缚模型.应激期外小鼠自由饮水和摄食,正常对照组和模型组给予生理盐水1 mL/100 g,2次/d;逍遥散组、加味逍遥散低剂量组、加味逍遥散高剂量组按1 mL/100 g体重分别给予0.3 g/mL、0.38g/mL、0.76 g/mL的中药水煎液,2次/d.给药结束后,采用旷场实验和鼠尾悬挂实验观察小鼠行为学变化.结果:与正常对照组比较,模型组正中中央格停留时间延长($P<0.05$),6 min内不动时间延长($P<0.01$),穿格次数减少($P<0.01$),修饰次数有所减少,但无显著性差异;与模型组比较,逍遥散组及加味逍遥散低、高剂量组正中中央格停留时间缩短($P<0.01$),穿格次数增加($P<0.01$),6 min内不动时间缩短($P<0.01$),修饰次数增加,但无显著性差异;加味逍遥散高剂量组与逍遥散组比较,穿格次数增加($P<0.05$).结论:加味逍遥散与逍遥散对慢性束缚应激小鼠行为学均有所改善,但加味逍遥散的调节作用更佳.

10. 期刊论文 [陈家旭.唐已婷 逍遥散对慢性束缚应激模型大鼠相关脑区CRF基因表达的影响 -中国应用生理学杂志2004,20\(1\)](#)

目的:观察慢性束缚应激大鼠相关脑区CRF mRNA(下丘脑、垂体、海马、皮层)含量变化以及逍遥散对其影响.方法:用RT-PCR和图像分析方法测定相关脑区CRF mRNA含量变化.结果:应激组较正常对照组在下丘脑CRF-1基因表达下调($P<0.01$).在下丘脑逍遥散组较应激组CRF-1基因表达显著下调($P<0.01$),CRF-2基因表达显著上调($P<0.01$);在海马区逍遥散组CRF-2基因表达较模型组上调($P<0.05$);在皮层逍遥散组CRF-1基因表达较应激组则显著上调($P<0.01$).结论:逍遥散组对慢性束缚应激中枢神经肽CRF的调节位点在下丘脑、垂体、海马和皮层,充分证实逍遥散的调节靶点与下丘脑、边缘系统及皮层中枢有关.

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zxyjh200812019.aspx
授权使用: 曹周华(caozh), 授权号: fa85f5cb-6cc5-442f-a054-9e520089ac92

下载时间: 2010年12月20日