

愤怒情绪模型大鼠不同脑区 γ 氨基丁酸 B₂ 受体表达的变化

崔维刚, 薛玲

(山东中医药大学, 济南 250355)

【摘要】 目的 通过检测愤怒情绪模型大鼠顶区皮质和海马 γ 氨基丁酸 B₂ 受体 (GABA_BR2) 表达的变化, 探索愤怒情绪与 GABA_BR2 的关系, 以及中药经前平颗粒的干预机制。方法 采用居住入侵的方法复制愤怒情绪模型大鼠, 然后用 RT-PCR 和 Western Blot 的方法检测 GABA_BR2 mRNA 和蛋白的表达差异。结果 与正常组相比, 模型组大鼠 GABA_BR2 mRNA 和蛋白的表达都明显降低; 与模型组相比, 经前平给药组大鼠 GABA_BR2 mRNA 和蛋白的表达都显著升高。结论 大鼠顶区皮质和海马 GABA_BR2 表达降低可能是影响大鼠愤怒情绪的重要机制之一; 中药经前平颗粒可对 GABA_BR2 表达异常变化起到调节作用。

【关键词】 愤怒情绪模型大鼠; 顶区皮质; 海马; 经前平颗粒; γ 氨基丁酸 B₂ 受体

【中图分类号】 R285.5 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)03-0022-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.03.006

Changes of γ -Aminobutyric Acid B₂ Receptor in Different Brain Regions of Rats with Anger Emotion

CUI Wei-gang, XUE Ling

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

【Abstract】 Objective To research the relationship of anger model and γ -aminobutyric acid B₂ receptor (GABA_BR2) and the intervention mechanism of jingqianping granule by observing the differential expression of GABA_BR2 in anger emotional model rats of cerebral cortex regions and hippocampus. **Methods** The anger model was induced in rats by resident-intruder. We analyzed the expression of GABA_BR2 in cerebral cortex and hippocampus by Western Blot and RT-PCR. **Results** The expression of GABA_BR2 in cerebral cortex and hippocampus of model rats decreased obviously compared with the normal control group. Compared with the model group, the expression of GABA_BR2 increased after treated with Jingqianping granule. **Conclusion** The Jingqianping granule can up-regulate the GABA_BR2 expression level of the model rats in cerebral cortex and hippocampus, which may be one of the mechanisms impacting rats with anger emotion. The expression changes of GABA_BR2 are tight related to rats with anger emotion.

【Key words】 Anger emotional rat model; Cerebral cortex regions; Hippocampus; Jingqianping granule; γ -aminobutyric acid B₂ receptor

情志内伤是临床诸多心身疾病发生、发展和转归的重要因素。怒为七情五志之一, 是引发相应心

身疾病的关键^[1]。目前国内外对 GABA_BR2 调节情绪的研究多针对在焦虑和抑郁上, 与愤怒情绪的关

【基金项目】 国家自然科学基金重点项目 (30930110); 国家自然科学基金面上项目 (30973688); 山东省科技发展计划项目 (2006GGB02001)。

【作者简介】 崔维刚 (1986 -), 男, 硕士生, 研究方向: 中药调肝方药药理研究。E-mail: sdws2004@163.com。

【通讯作者】 薛玲 (1964 -), 女, 教授, 研究方向: 中药调肝方药药理研究。E-mail: xxueling@163.com。

系罕有报道。本实验通过复制愤怒情绪动物模型,经前平颗粒给药后,采用 RT-PCR 和 Western Blot 实验技术研究了愤怒情绪模型大鼠顶区皮层和海马 mRNA 及蛋白的表达,以及中药经前平颗粒对模型大鼠的干预作用。

1 材料和方法

1.1 实验药物

经前平颗粒:秦皇岛市山海关制药厂生产,批号:07102501。

1.2 动物

SPF 级健康 SD 雌性大鼠,体重 180~220 g。由山东中医药大学实验动物中心提供 [SCXK(鲁)20050015]。

1.3 试剂

GABA_BR2 抗体(Santa Cruz 公司);预染蛋白 marker(Thermo Fisher Scientific 公司);BeyoECL Plus(碧云天生物技术研究);硝酸纤维素膜(美国 PALL 公司);RT-PCR 所需引物由济南博亚生物工程技术服务有限公司合成,Trizol 总 RNA 提取试剂盒(上海生工生物工程技术服务有限公司);RT 反转录试剂盒(济南朋远生物工程技术服务有限公司);日本 TaKaRa 的 rTaq(不含 dNTP Mixture)(济南赛恩斯生物工程技术服务有限公司)。

1.4 仪器

电泳仪、转印仪(美国 Bio-Rad 公司);CT15RT 台式高速冷冻离心机(上海生美生化仪器设备工程有限公司);FR-980 凝胶成像分析仪(上海复日科技有限公司);PCR 扩增仪(TAKARA);电泳仪:DYY-III2 稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂)。

1.5 方法

SD 大鼠 27 只,进入正式实验前,称量大鼠体重,进行旷场行为学实验,采集其基线水平数据。大鼠随机分为 3 组,每组 9 只,造模组大鼠居住入侵造模^[2]刺激 10 d,正常对照组大鼠平行对照,造模给药组大鼠造模同时给予经前平 10 g/kg 灌胃,造模组及正常组大鼠 10 mL/kg 常水灌胃。造模完成后立即称量 3 组大鼠体重并进行旷场行为学测定,然后断头取脑,于冰上迅速剥离出顶区皮质、海马,分别放入 1.5 mL 离心管,置于液氮中迅速冷冻后保存于 -70℃ 冰箱备用。

1.5.1 Western Blot^[3]分析 GABA_BR2 的表达:取出海马组织,冰浴中操作,按 1:5 的比例(mg/μL)加入

提前预冷的 Ripa 裂解液,匀浆器匀浆 30 min,4℃ 下 12 000 r/min 离心 5 min,取上清,采用 Bradford 法测定蛋白含量,其它加入 5×SDS 上样缓冲液至终浓度为 1×SDS,置于沸水中煮 5 min 使蛋白变性。以 30 μg/泳道上样,经 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 1 h,分别与 GABA_BR2(1:200,5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液稀释)和 β-actin(1:1500)的抗体室温摇床孵育 2 h,再与相应二抗室温孵育 1 h,ECL 化学发光试剂检测杂交信号,显影于 X 光片上,用凝胶成像分析仪在可见光透射下对 X 光片进行扫描和图像分析。

1.5.2 RT-PCR^[3]法分析 GABA_BR2 mRNA 的表达:GABA_BR2 引物序列:5'-CTG TGC TCT CTG TGA AGT TGC-3',5'-CCA TCT GGC TTG GCA TTG TC-3',产物长度 582 bp;用 β-actin 作为内参照(引物序列:5'-TGG TGG GTA TGG GTC AGA AGG ACT C-3',5'-CAT GGC TGG GGT GTT GAA GGT CTC A-3'),产物长度 265 bp。取出顶区皮质组织,冰浴下操作,采用 Trizol 法抽提总 RNA,紫外分光光度法检测 RNA 浓度,将 mRNA 反转录成 cDNA,所得样品进行 PCR 扩增。GABA_BR2 扩增条件为:预变性 94℃ 2.5 min,变性 94℃ 1 min,退火 57℃ 40 s,延伸 72℃ 1 min,30 个循环,再 72℃ 延伸 7 min;β-actin 扩增条件为:预变性 94℃ 2.5 min,变性 94℃ 1 min,退火 59℃ 1 min,延伸 72℃ 1 min,28 个循环,再 72℃ 延伸 7 min;取 PCR 扩增产物于 100 V 下在 2% 琼脂糖凝胶上电泳,应用 Smartview 生物电泳图像分析系统进行光密度扫描,分析内参及 GABA_BR2 mRNA 表达。

1.5.3 数据统计处理:所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析及 LSD 法检验以统计数据。

2 结果

2.1 各组大鼠取材前旷场实验得分

与正常对照组大鼠相比,造模组大鼠造模后旷场实验的得分显著增加;与造模组相比,经前平给药组大鼠旷场实验得分显著减少(图 1)。

2.2 Western Blot 结果

Western Blot 结果表明,愤怒情绪大鼠海马及顶区皮质中 GABA_BR2 均有表达。与正常对照组大鼠相比,愤怒情绪组大鼠海马和顶区皮层的 GABA_BR2 蛋白表达显著降低,这说明愤怒情绪的发生可能与

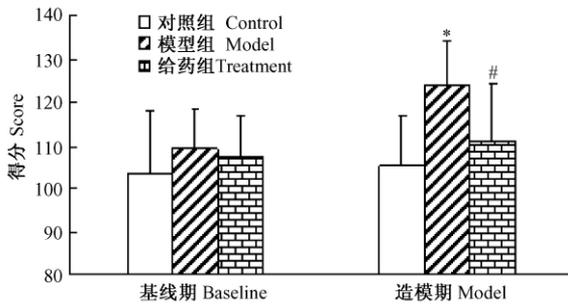


图 1 各组大鼠旷场得分比较 (n = 9)

Fig. 1 Effects of baseline and the model time of social stress on locomotor activity (n = 9)

注: 造模期大鼠与对照组相比, *P < 0.05; 与造模组相比, #P < 0.05

Note: *P < 0.05, compared with control group in model time; #P < 0.05, compared with model group in model time

大鼠海马顶区皮质 GABA_BR2 表达异常降低相关。与愤怒情绪组比较, 经前平给药组大鼠两脑区的 GABA_BR2 蛋白表达显著升高, 说明调肝方药经前平颗粒能改变 GABA_BR2 蛋白表达水平异常降低的状态 (图 2, 表 1)。

表 1 三组大鼠顶区皮质和海马 GABA_BR2 蛋白的相对表达量 (n = 9)

Tab. 1 GABA_BR2 protein relative levels in rat cerebral cortex regions and hippocampus of three groups (n = 9)

相对光密度 Relative optical density	正常对照组 Control Group	愤怒造模组 Model Group	经前平给药组 Treatment Group
顶区皮质 cerebral cortex regions	0.732 ± 0.032	0.625 ± 0.037**	0.718 ± 0.019#
海马 hippocampus	0.609 ± 0.063	0.451 ± 0.079**	0.558 ± 0.011#

注: 与正常对照组相比, **P < 0.01; 与造模组相比, #P < 0.05.
Note: **P < 0.01, compared with control group; #P < 0.05, compared with model group

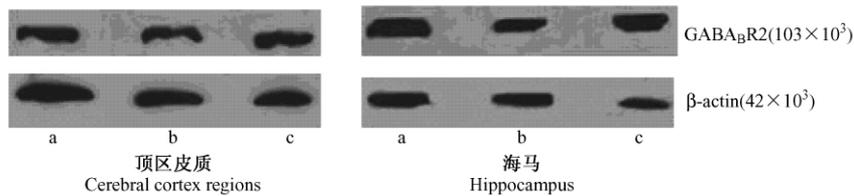


图 2 三组大鼠顶区皮质、海马 GABA_BR2 蛋白的 Western Blot 结果

Fig. 2 Western Blot results of GABABR2 protein in cerebral cortex regions and hippocampus of three rat groups

注: a 正常对照组; b 造模组; c 给药组

Note: a control; b model; c treatment

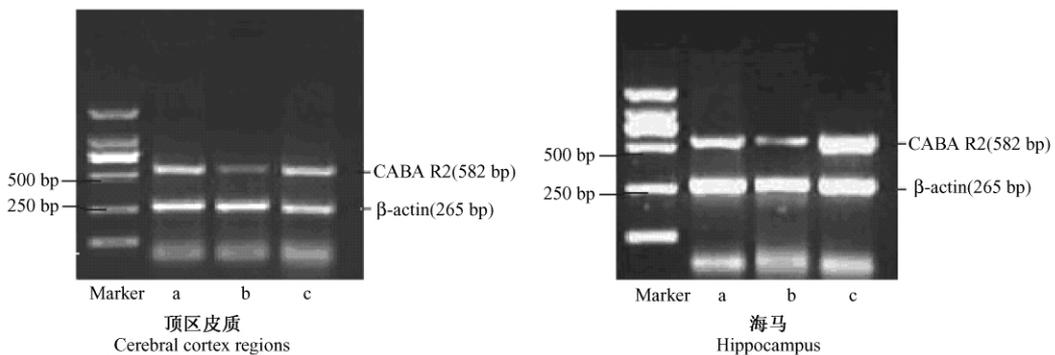


图 3 三组大鼠顶区皮质和海马 GABA_BR2 mRNA 表达

Fig. 3 GABA_BR2 mRNA expression from three groups rats of cerebral cortex regions and hippocampus

注: a 正常对照组; b 造模组; c 给药组

Note: a control; b model; c treatment

2.3 RT-PCR 结果

RT-PCR 结果表明, 愤怒造模组大鼠顶区皮质和海马 GABA_BR2 的 mRNA 表达均明显低于正常对照组; 与愤怒情绪组比较经前平颗粒给药后两脑区 GABA_BR2 的 mRNA 表达均显著上升 (图 3, 表 2)。

3 讨论

中国传统医学认为怒为七情五志之一, 是宣达人体气机的一种方式, 适度的怒不会危害人体健康。然而怒太过, 则会导致脏气损伤, 产生病变。

表 2 三组大鼠顶区皮质、海马 GABABR2 mRNA 的相对表达量 (n = 9)

Tab. 2 GABABR2 mRNA relative levels in rat cerebral cortex regions and hippocampus of three group (n = 9)

相对光密度 Relative optical density	正常对照组 Control Group	愤怒造模组 Model Group	经前平给药组 Treatment Group
顶区皮质 cerebral cortex regions	0.762 ± 0.036	0.507 ± 0.049**	0.772 ± 0.033##
海马 hippocampus	0.559 ± 0.114	0.296 ± 0.058*	0.584 ± 0.143#

注:与正常对照组相比, **P < 0.01;与造模组相比, #P < 0.05。
Note: **P < 0.01, compared with control group; #P < 0.05, compared with model group

《素问·举痛论》说“怒则气上”。《素问·本病论》说“人或恚怒,气逆上而不下,即伤肝也”。怒伤肝,肝气上逆是怒致病的基本病机^[4]。肝主疏泄,既藏有形之血,又疏无形之气,调畅全身气机,肝主疏泄是维持机体健康状态极为重要的一环^[5]。杨世忠等^[6]将亚健康状态责之于肝失疏泄,提出肝失疏泄可以引起精神情志改变、脏腑功能改变以及对气血津液的影响等三方面的病理变化。中医“肝主疏泄”理论认为愤怒、抑郁是肝疏泄失常的典型表现且二者联系密切^[7]。由于肝功能异常则易怒,怒又伤肝。因此对怒之为病,重在治肝。

现代医学认为怒主要是通过引起神经-内分泌-免疫网络系统的失调而致病的。愤怒情绪发生时,激活交感神经系统,引起交感肾上腺髓质系统兴奋;内分泌系统被激活,血中肾上腺皮质激素、肾素血管紧张素、甲状腺素、胰高血糖素、垂体后叶激素分泌增加,这些激素对肝脏和其它一些器官都有影响,从而引发了一系列的病症^[8]。而神经递质亦与怒密切相关,作为调节焦虑和应激行为的主要神经递质,γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid, GABA)是调节焦虑和应激行为的主要神经递质,是中枢神经系统和外周神经系统中重要的抑制性神经递质,存在于整个大脑的多种中间神经元和投射神经元,是一种潜在的神经营养因子,在大脑皮质、丘脑、海马等多个部位发挥多种调节作用,对神经元的迁移、增殖、分化、其自身受体的基因表达以及神经相关的蛋白质合成均有一定的调节作用^[9]。GABA 系统功能失调可导致中枢神经系统功能的异常和焦虑管理失调^[10]。其中 GABA 受体在中枢神经系统内主要介导慢性抑制效应,改变其亚基的功能易引起烦躁易怒和焦虑抑郁情绪。

经前平颗粒主要由白芍、香附、川楝子、柴胡、川穹、枳壳、半夏、豆蔻、木香、甘草等中药组成。现代药理研究发现方中白芍有明显的镇静作用。白

芍中的芍药甙(TGP)1 mg 静脉注射给予大鼠,可见到轻度的镇静作用,白芍总甙分别加强吗啡、可乐定抑制小鼠扭体反应,提示 TGP 有镇痛作用^[11]。柴胡中的柴胡皂苷和柴胡挥发油均有抗惊厥作用^[12]。香附中所含的三萜类化合物镇痛效果与乙酰水杨酸相当。香附酮为较强的前列腺素生物合成抑制剂,故也是镇痛作用的有效成分之一。香附的醇提取物有镇静作用,使小鼠自发活动减少、迟缓,并可消除大鼠的条件性回避反射^[13]。通过现代药理表明,经前平颗粒组方中的多种成分具有镇静、镇痛、抗惊厥等作用,提示这些成分可能是经前平颗粒对愤怒情绪发挥调节作用的物质基础。

本研究发现,与对照组相比愤怒情绪模型大鼠的旷场试验得分显著升高,模型大鼠顶区皮质和海马 GABA_BR2 蛋白和 mRNA 表达水平显著降低,提示大鼠顶区皮质和海马 GABA_BR2 蛋白和 mRNA 的低表达水平与愤怒情绪密切相关,经前平颗粒能显著改善模型大鼠的旷场试验得分,提高大鼠顶区皮质和海马 GABA_BR2 蛋白和 mRNA 表达水平,表明该药通过提高大鼠顶区皮质和海马中 GABA 受体表达水平而发挥疗效。这无疑为经前平颗粒的临床应用提供了一定的理论基础和依据,同时也为研究愤怒情绪的病因提供了新的实验依据。

参考文献:

- [1] 刘晓伟,曲宏达,张红梅,等. 怒、恐应激大鼠脑内 c2 fos 与 CRHmRNA 表达差异性分析[J]. 四川中医, 2006, 24(1): 11 - 13.
- [2] Breuer ME, McGinnis MY, Lumia AR, et al. Aggression in male rats receiving anabolic androgenic steroids: effects of social and nvironment provocation [J]. Horm Behav, 2001, 40: 409 - 418.
- [3] 赵亚力,马学斌,韩为东. 分子生物学基本实验技术[M]. 北京:清华大学出版社 2006:96 - 171.
- [4] 张峰璋,烟建华. 《内经》“怒则气上”学术解读[J]. 吉林中医药 2008, 28(8): 550 - 552.
- [5] 于春泉,张伯礼,马震. 中医对亚健康病因病机的认识[J]. 天津中医药 2005, 22(3): 198 - 199.
- [6] 杨世忠,孙龙. 亚健康状态责之于肝失疏泄[J]. 长春中医药大学学报 2003, 19(1): 34.
- [7] 乔明琦. 肝藏象现代研究总体思路、基本目标及主要进展[J]. 山东中医药大学学报 2005, 29(2): 91 - 94.
- [8] 陶海燕,乔明琦,王文燕. 怒致病与心理应激的相关性[J]. 浙江中医药大学学报 2009, 33(1): 140 - 141.
- [9] 王擒云,戴体俊,曾因明. GABAA 受体对内源性痛觉下行抑制系统的调控作用[J]. 国外医学(麻醉学与复苏分册), 2004, 25(4): 209 - 212.

- [10] Wood SJ, Toth M. Molecular pathways of anxiety revealed by knockout mice [J]. Mol Neurobiol 2001 23(2-3):101-119.
- [11] 王永祥, 陈敏珠, 徐叔云, 等. 白芍总甙的镇痛作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1988 2(1):6-10.
- [12] 刘燕, 廖卫平, 高玫梅. 柴胡萃取成分抗惊厥作用的实验研究 [J]. 新中医 2001 33(9):76-77.
- [13] 黄险峰, 彭国平. 香附的化学成分及药理研究进展 [J]. 中药材 2003 26(1):65-67.
- (修回日期) 2010-07-40

新 书 介 绍

《实验动物替代方法原理与应用》由程树军, 焦红担任主编, 由来自国内外的 30 多名专家学者共同参与编著, 该书站在全球社会进步与技术发展的角度, 全面介绍了实验动物福利与替代方法的由来、立法背景、科学发展与技术前沿。全书分上下两篇, 25 章, 110 万字, 2010 年 9 月由科学出版社发行。该书上册为原理篇, 分 6 章, 全面介绍动物福利及 3R 运动的历史与现状, 国内外实验动物及其替代方法的法规化管理, 替代方法的开发、验证与认可程序, 替代方法的教育培训、学术交流和网络资源, 体外试验系统与技术、体外替代实验室良好规范。下册为应用篇, 分 19 章, 根据安全性评价动物试验的具体内容分章详细介绍动物实验及替代技术的进展, 包括基本细胞毒性、急性毒性、皮肤刺激性、遗传毒性、光毒性、毒性动力学、致癌性、生殖和发育毒性、生态和环境毒性等。下册还就替代方法在生态环境、食品、化妆品、疫苗生物制品、医疗器械和纳米材料评价中的应用情况作了介绍。重点突出替代方法的验证认可现状和实际应用, 关注最新研究动态、技术热点和前景展望。书后附录包括 3R 与替代方法年表(大事记)、动物福利与替代方法网络资源和中英文索引方便读者检索。

购买本书可直接前往当地新华书店或联系科学出版社医学出版中心(010-64033532)。也可联系著者单位邮寄, 地址: 广州市珠江新城花城大道 66 号检验检疫大厦 B1214, 广东出入境检验检疫局(替代方法研究评价中心); 邮编: 510623; 联系人: 秦瑶, 潘芳。E-mail: vitrotox@sohu.com; 电话: 020-38290670; 传真: 020-38290350; 定价: 128 元(精装)。