

· 药物研究 ·

白芍总苷对应激大鼠的行为和下丘脑神经内分泌的影响^{*}

丛茜玉, 王晓敏, 周志愉, 温晓梨, 刘志勇

(江西中医药大学基础医学院病理学科组, 南昌 330004)

摘要 **目的** 观察白芍总苷对应激大鼠行为和神经内分泌的影响, 探讨其部分作用机制。**方法** 雄性 SD 大鼠取 10 只作为正常对照组, 其余 40 只采用不可预见性中等刺激建立应激大鼠模型, 随机分为模型对照组、氟西汀 ($5.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组和白芍总苷大、小剂量 ($66, 33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组, 每组 10 只。连续给药 3 周后, 使用自主活动仪测定大鼠水平和垂直活动变化; 采用悬尾实验观察大鼠情绪变化; 采用苏木精-伊红染色观察肾上腺形态学变化, 放射免疫法测定皮质酮和促肾上腺皮质激素 (ACTH) 的含量, 实时-聚合酶链反应 (RT-PCR) 法检测下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) mRNA 的表达。**结果** 与模型对照组比较, 白芍总苷大剂量组水平和垂直活动增加 ($P < 0.05$); 不动时间减少 ($P < 0.05$), 肾上腺指数下降, 血清皮质酮和 ACTH 下降 ($P < 0.05$); 下丘脑 CRH mRNA 的表达下降 ($P < 0.05$)。**结论** 白芍总苷能纠正应激大鼠行为和内分泌紊乱, 可能是通过降低皮质酮水平和下丘脑 CRH mRNA 的表达, 调整紊乱的下丘脑-垂体-肾上腺轴活动实现。

关键词 白芍总苷; 下丘脑-垂体-肾上腺轴; 活动水平; 大鼠, 应激

中图分类号 R282.71; R965

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2018)01-0016-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2018.01.004

Effect of Total Glucosides of White Paeony Capsules on Psychological Ethology and Hypothalamic Neuroendocrine System of Stress Rats

CONG Qianyu, WANG Xiaomin, ZHOU Zhiyu, WEN Xiaoli, LIU Zhiyong (Pathology Department, Basic Medical College, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT **Objective** To observe the effects of total glucosides of white paeony (GWP) on psychological ethology and neuroendocrine system of stress rats. **Methods** Ten male Sprague-Dawley rats were treated as normal control group, the others ($n = 40$) were constructed by isolated custody and chronic unpredictable stimuli to build the model of stress rats. Stress rats were randomly divided into 4 groups: model control group, GWP high dose group and low dose ($66, 33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, fluoxetine ($5.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, each group had 10 rats. The changes of rat behavior were monitored by locomotor activity system. The change of emotion was observed by tail suspension test. The pathology change of adrenal was observed by HE staining. The levels of CorT and ACTH in serum were measured by radioimmunoassay. The expression of CRH mRNA of hypothalamic were detected by RT-PCR. **Results** The activity of the level scoring and vertical scoring of GWP high dose group was obviously improved as compared to that in model control group, while static time was significantly shortened. Adrenal index of GWP groups were increased significantly ($P < 0.05$), thymus index of the treatment group was declined ($P < 0.05$), CorT and ACTH content were decreased ($P < 0.05$) and hypothalamus CRH mRNA of GWP group was decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** The improvement of activity and related hormone anomalous changes were observed in rats treated with GWP. The mechanism of its actions might be involved adjusting the endocrine function, decreasing CorT and ACTH content and the expression of hypothalamic CRH mRNA of stress rats.

KEY WORDS Total glucosides of white paeony; Hypothalamic-pituitary-adrenal; Activity; Rats, stress

研究表明, 白芍可以疏肝理气, 柔肝养血, 具有抗

氧化、减少纤维蛋白原生成的作用, 可提高免疫力, 对风湿免疫病和肝纤维化具有良好疗效^[1]。白芍总苷是白芍主要有效成分, 具有明显的镇痛和调节情绪作用, 但其具体机制尚不清楚^[2]。本实验以采用不可预见性中等刺激建立应激大鼠模型, 观察白芍总苷对应激大鼠的行为和内分泌激素及下丘脑的影响, 以探讨白芍总苷调节应激的作用机制, 为其临床应用提供理论依据。

收稿日期 2016-11-15 修回日期 2017-03-13

基金项目 * 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ09275)

作者简介 丛茜玉 (1991-), 女, 山东威海人, 硕士, 研究方向: 中西医结合基础。电话: 0791-87118926, E-mail: 840513096@qq.com。

通信作者 刘志勇 (1977-), 男, 江西东乡人, 副教授, 硕士, 研究方向: 中药药理。电话: 0791-87118926, E-mail: 469241547@qq.com。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康成年 8 周 SD 大鼠,雄性,体质量(200±20) g,由湖南斯莱克斯实验动物有限公司提供,动物生产许可证号:SCXK(湘)2013-0004,动物合格证号:00027305。饲养于江西中医药大学基础医学院实验动物中心。室温(20±25)℃,相对湿度(45±65)%,12 h 光照,12 h 黑暗,动物自由摄食、饮水。

1.2 药材与试剂 白芍总苷购自宁波立华制药有限公司(批号:H2005058)。肾上腺皮质激素和皮质酮购自北京华英生物技术研究(批号:bs004p,bs0382p),Trizol、RNA 反转录试剂盒和实时荧光定量试剂盒购自 TaKaRa 公司(批号:DRR021A,DRR037A);实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)引物购自上海生物工程有限公司(批号:DRR081A)。

1.3 仪器 紫外分光光度计(UV-2102 尤尼柯),r-911 全自动放免计数仪(中国科技大学实业总公司),自主活动仪(Wertical activitysensor UGO Basile,Italy),酶标仪(Multiskan MK3,USA),RT-PCR 仪(GeneAmp PCR System2400)。

1.4 方法

1.4.1 动物模型的建立与给药 SD 大鼠适应性喂养 3 d,取 10 只作为正常对照组,其余大鼠造模:给予慢性孤养加不可预见性中等刺激 3 周^[3](应激源包括有夹尾 1 min、36 V 安全电电击 30 s、束缚 2 h、45°斜笼 8 h,每天随机给予 1 种刺激源)。取造模成功^[3]的应激大鼠 40 只,随机分为模型对照组、氟西汀组和白芍总苷大、小剂量组,每组 10 只。正常对照组和模型对照组每日灌胃饮用水 2 mL;白芍总苷大、小剂量组分别灌胃给予白芍总苷 66,33 mg·kg⁻¹;氟西汀组灌胃给予氟西汀 5.0 mg·kg⁻¹,共 3 周。

1.4.2 观察自主活动 将大鼠放入自主活动仪中适应 2 min 后,分组前和处死前各记录 10 min 水平和垂直活动次数。

1.4.3 悬尾实验 悬尾箱自制。将大鼠距尾尖 5 cm 处固定于悬尾实验箱上,使其呈倒悬状态,头部距实验台面约 15 cm,两侧用纸板隔开动物的视线。动物开始为了克服不正常的体位而挣扎,但经过一段时间以后会出现间断性的“不动”,显示出“失望”状态。记录 5 min 内的大鼠不动次数和上翻的次数^[4]。

1.4.4 肾上腺指数及形态 禁食 12 h 后称质量,股动脉取血后处死,取肾上腺称质量。计算肾上腺指数(脏器质量/体质量),肾上腺用 10%甲醛固定包埋,采用苏木精-伊红(HE)染色观察形态学变化。

1.4.5 激素测定 放射免疫法测定血清促肾上腺皮

质激素(adrenocorticotropic hormone, ACTH)、皮质醇(cortisol, CorT)水平。

1.4.6 下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone, CRH) mRNA 表达 大鼠处死后冰上迅速摘取下丘脑(40~60 mg),Trizol 提取总 RNA,蛋白核酸分析仪测定 RNA 浓度后;M-MuLV 逆转录酶合成 cDNA;用 Primer 5 软件设计引物(CRH, F: 5' GAAAGGGGAAAAGGCAAAG, R: CAGCGGGACTTC-TGTTGA);β-actin, F: 5' CCCATCTATGAGGGTTACGC, R: TTTAATGTCACGCACGATTTC)。

1.4.7 统计学方法 数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS17.0 版统计软件处理,组间比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐时 LSD 检验,方差不齐时用 Dunnett's T3 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对应激大鼠活动度的影响 与正常对照组比较,模型对照组大鼠的水平与垂直活动均减少($P<0.05$)。与模型对照组比较,白芍总苷组和氟西汀组大鼠水平活动与垂直活动均增加($P<0.05$)。见表 1。

表 1 5 组大鼠垂直与水平运动的变化
Tab.1 Changes of vertical and horizontal movement in five groups of rats

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	次, $\bar{x}\pm s, n=10$	
		10 min 内水平运动	10 min 内垂直运动
正常对照组	-	1291.73±236.76	559.02±147.46
模型对照组	-	948.00±121.45 ^{*1}	395.00±161.39 ^{*1}
氟西汀组	5.0	1 107.83±149.49 ^{*2}	412.75±149.49
白芍总苷			
小剂量组	33	1 361.14±228.97 ^{*2}	505.30±148.12
大剂量组	66	1 287.63±271.91 ^{*2}	565.56±234.63 ^{*3}
F		3.500	3.645
P		0.029	0.022

与正常对照组比较, ^{*1} $P<0.01$;与模型对照组比较, ^{*2} $P<0.01$, ^{*3} $P<0.05$

Compared with normal control group, ^{*1} $P<0.01$; Compared with model control group, ^{*2} $P<0.01$, ^{*3} $P<0.05$

2.2 悬尾实验 与正常对照组比较,模型对照组大鼠的静止时间明显延长,上翻的次数明显减少($P<0.05$);与模型对照组比较,白芍总苷大剂量组的静止时间明显减少($P<0.05$);给药组上翻的次数显著增多($P<0.05$)。见表 2。

2.3 肾上腺指数的变化 正常对照组、模型对照组、氟西汀组和白芍总苷大、小剂量组肾上腺指数分别为

(20.60±4.26), (27.90±5.53), (25.72±5.53), (23.01±3.27), (23.64±1.89) mg · (100 g)⁻¹, 与正常对照组比较, 模型对照组大鼠的肾上腺组织体积增大, 质量增加, 肾上腺指数显著增大 ($P<0.05$); 各给药组的肾上腺指数均低于模型对照组, 但是比正常对照组有所增高 ($F=2.823, P=0.047$)。

表 2 5 组大鼠悬尾实验结果

Tab.2 Results of tail suspension test in five groups of rats

$\bar{x}\pm s, n=10$			
组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	静止不动 时间/s	5 min 内上翻的 次数
正常对照组	-	109.40±17.09	63.30±13.65
模型对照组	-	139.12±12.28 ^{*1}	35.63±7.70 ^{*2}
氟西汀组	5.0	110.00±10.88	57.13±16.04 ^{*3}
白芍总苷			
小剂量组	33	100.88±14.66	64.75±11.36 ^{*3}
大剂量组	66	99.87±8.42 ^{*3}	56.75±9.48 ^{*3}
<i>F</i>		5.458	3.462
<i>P</i>		0.007	0.024

与正常对照组比较, ^{*1} $P<0.01$, ^{*2} $P<0.01$; 与模型对照组比较, ^{*3} $P<0.05$

Compared with normal control group, ^{*1} $P<0.01$, ^{*2} $P<0.01$; Compared with model control group, ^{*3} $P<0.05$

2.4 血清 CorT、ACTH 含量的变化 与正常对照组比较, 模型对照组的 CorT 含量明显增高 ($P<0.01$); 与模型对照组比较, 各给药组的 CorT 含量均有所降低, 白芍总苷组和氟西汀组差异有统计学意义 ($P<0.05$)。各给药组 ACTH 含量与正常对照组均差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 3。

2.5 肾上腺形态学变化 正常对照组大鼠肾上腺球状带和束状带分界清晰, 束状带细胞排列成束, 细胞结构完整。模型对照组大鼠肾上腺球状带和束状带分界

模糊, 束状带细胞数量增多, 且排列紊乱, 细胞体积增大, 细胞质空泡增多, 提示肾上腺分泌处于亢进状态。给予白芍总苷后大鼠肾上腺球状带和束状带分界清晰, 分泌糖皮质激素的束状带细胞排列成束, 稍紊乱, 细胞体积增大, 但细胞质空泡有所减少, 血管扩张较模型对照组明显改善。见图 1。

表 3 5 组大鼠血清 CorT、ACTH 含量变化

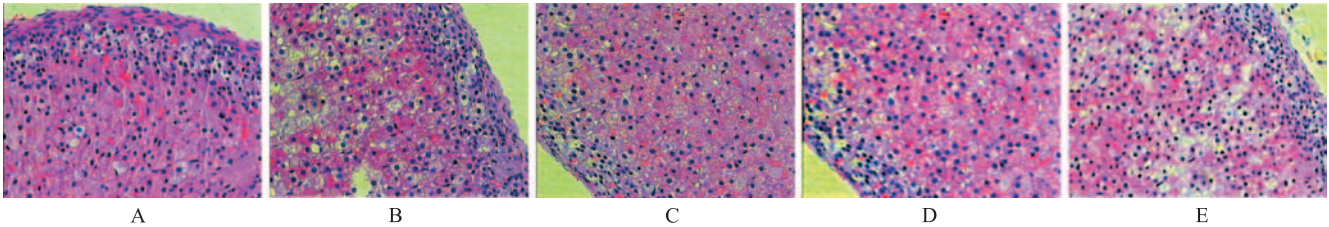
Tab.3 Changes of the serum content of CorT and ACTH in five groups of rats

$\bar{x}\pm s, n=10$			
组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	CorT/ (ng · mL ⁻¹)	ACTH/ (pg · mL ⁻¹)
正常对照组	-	306.57±20.21	18.64±2.31
模型对照组	-	432.02±20.11 ^{*1}	20.23±2.78
氟西汀组	5.0	378.80±21.10 ^{*2}	19.45±2.34
白芍总苷			
小剂量组	33	346.14±18.16 ^{*2*3}	18.18±2.20
大剂量组	66	327.17±23.06 ^{*2*3}	18.67±1.79
<i>F</i>		10.505	0.694
<i>P</i>		0.000	0.606

与正常对照组比较, ^{*1} $P<0.01$; 与模型对照组比较, ^{*2} $P<0.05$; 与氟西汀组比较, ^{*3} $P<0.05$

Compared with normal control group, ^{*1} $P<0.01$; Compared with model control group, ^{*2} $P<0.05$; Compared with fluoxetine group, ^{*3} $P<0.05$

2.6 下丘脑 CRH mRNA 变化 正常对照组、模型对照组、氟西汀组和白芍总苷大、小剂量组 CRH mRNA 相对表达分别为 0.96±0.22, 1.20±0.17, 1.05±0.09, 1.13±0.12, 1.18±0.18。与正常对照组比较, 模型对照组大鼠下丘脑 CRH mRNA 含量上升 ($P<0.01$)。与模型对照组比较, 白芍总苷大剂量组大鼠 CRH mRNA 含量下降 ($P<0.01$); 白芍总苷小剂量组大鼠 CRH mRNA 含量下降不明显 ($P>0.05$)。



A.正常对照组 ;B.模型对照组;C.氟西汀组;D.白芍总苷组大剂量组;E.白芍总苷组小剂量组

图 1 5 组大鼠肾上腺病理图(HE 染色, ×20)

A.normal control group;B.model control group;C.fluoxetine group ;D.high-dose total glucosides of white paeony (GWP)group ;E.low-dose GWP group

Fig.1 Pathological images of five groups of rats (HE staining, ×20)

3 讨论

《素问·举痛论》称“百病生于气也”；《素问·阴阳应象大论》称“怒伤肝，恐伤肾”。因肝主疏泄，喜条达，恶抑郁，故情志所伤大多与肝有着密切的联系^[5-6]。依中医“形神若一”和情志致病理论，认为肝气郁结是应激中重要的精神刺激因素之一^[7]。且临床上采用疏肝理气等中药治疗应激所致疾病已取得较好疗效^[8-9]。应激状态下机体的焦虑、抑郁等情绪反应和行为均会发生显著变化。中医学认为，“有诸内者，必形之于外”，即机体外部的表现在一定程度上反映了机体内部的情况。本实验通过经典的动物行为实验——旷场实验和悬尾实验来反映应激大鼠行为和情绪的变化。在旷场实验中白芍总苷组的水平活动和垂直活动均增加。悬尾实验中大鼠始终处于一种被动的倒挂状态，大鼠为克服不正常体位而进行挣扎。若大鼠感到改变现状的希望小，欲放弃努力，即会减少或停止挣扎，表现为不动状态。本实验中给予白芍总苷后悬尾不动时间明显较短而上翻次数增多，表明其有提高应激大鼠活动，改善应激大鼠的不良情绪作用，提示白芍总苷具有调畅情志的药效作用。王景霞等^[10]实验结果显示白芍提取物可显著缩短抑郁症小鼠强迫游泳及悬尾不动时间，与本研究的结论基本一致。

应激通过神经内分泌免疫网络对机体产生负性的影响，从而导致多个系统的功能改变或器质性损伤。机体的应激反应主要表现为下丘脑-垂体-肾上腺（hypothalamic-pituitary-adrenocortical, HPA）轴功能亢进，下丘脑促肾上腺激素释放激素、垂体促肾上腺激素和肾上腺糖皮质激素过度分泌^[11]。而下丘脑分泌的 CRH 作为应激中的关键调节因子，通过其受体产生一系列生物学效应，协调机体各系统以应答应激刺激^[12-13]，故 CRH 被认为是行为、神经内分泌免疫对应激广泛反应的关键递质^[14-15]。白芍总苷大剂量组大鼠下丘脑 CRH mRNA 表达明显下降，白芍总苷组血清 CorT 含量明显减少，且形态学结果也提示大鼠肾上腺球状带和束状带分界清晰，分泌糖皮质激素的束状带细胞排列成束，细胞体积增大，胞浆空泡有所减少，分泌的 CorT 明显减少，虽 ACTH 有所下降，但无统计学意义，可能是药物作用时间不够，且影响 ACTH 因素众多造成的。总之白芍总苷能使应激大鼠失调的 CorT、ACTH 得以恢复，调整了 HPA 轴功能，进而使应激大鼠的抑郁症状得到缓解。白芍总苷对应激大鼠行为学

的改变、逆转 HPA 轴高功能状态与氟西汀的疗效基本相当。但其对下丘脑、垂体和肾上腺相互之间相互影响有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 李辉.白芍总苷的抗炎活性[J].中国医院药学杂志, 2011,31(4):283-286
- [2] 崔广智,金树梅.芍药苷对利血平诱导抑郁模型的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(22):272-274.
- [3] 梁佳,卢峻,王俊仁,等.不同针刺方法对慢性应激抑郁大鼠下丘脑 CRH 基因表达及血清 ACTH、CORT 的影响[J].北京中医药大学学报,2012,35(4):265-268.
- [4] 孙世光,李子峰,刘健,等.昆明小鼠焦虑与抑郁动物模型相关性研究:明暗箱实验与悬尾实验[J].中国药理学通报,2012,28(2):289-293.
- [5] 于峥,黄晓.肝主疏泄畅情志的理论内涵及临床应用[J].中医杂志,2013,54(22):1914-1916.
- [6] 刘子旺,赵海滨,张秀静,等.电针肝俞、期门对肝气郁结模型大鼠行为学及 HPA 轴相关激素的影响[J].针灸临床杂志,2011,27(12):46-48.
- [7] 衣春光,李方莲,张茂云,等.克郁舒神颗粒对实验性恶劣心境肝气郁结证大鼠海马 BDNF 的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(5):157-160.
- [8] 徐光华.中西医结合治疗肝气郁结型 2 型糖尿病临床疗效观察[J].新中医,2014,46(7):150-151.
- [9] 阳媚.疏肝理气法在功能性消化不良中的研究运用进展[J].中医研究,2014,27(11):75-77.
- [10] 王景霞,张建军,李伟,等.白芍提取物治疗抑郁症的实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(7):183-184.
- [11] MAGUIRE J, SALPEKAR J A. Stress, seizures, and hypothalamic-pituitary-adrenal axis targets for the treatment of epilepsy[J]. Epilepsy Behav, 2013, 26(3):352-362.
- [12] HOITZMAN C W, TROTMAN H D, GOULDING S M, et al. Stress and neurodevelopmental processes in the emergence of psychosis[J]. Neuroscience, 2013, 249(26):172-191.
- [13] LOVEJOY D, CHANG B S, LOVEJOY N R, et al. Molecular evolution of GPCRs: CRH/CRH receptors [J]. Mol Endocrinol, 2014, 52(3):43-60.
- [14] KOVACS K J. CRH: the link between hormonal-metabolic and behavioral responses to stress[J]. Chem Neur, 2013, 54(7):25-33.
- [15] ALEVIZOS M, KARAGKOUNI A, PANGIOTIDOU S, et al. Stress triggers coronary mast cells leading to cardiac events [J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2014, 112(4):309-316.