

率为70.15 %，见表5。

表5 两面针叶不同提取部位对小鼠疼痛的影响(扭体法, $\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 5 Effect of different fraction from the leaves of *Z. nitidum* in mice acetic acid writhing test

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	15 min 扭体次数 / 次	扭体反应抑制率 /%
模型组	-	47.90 ± 3.63	
阿司匹林组	0.50	14.30 ± 1.34**	70.15
粗提取物组	1.00	15.89 ± 3.25**	66.83
	0.50	20.70 ± 1.25**	56.78
	0.25	26.70 ± 3.80**	44.26
乙酸乙酯部位组	1.00	13.20 ± 3.01**	72.44
	0.50	18.44 ± 2.93**	61.50
	0.25	25.00 ± 2.35**	47.81
正丁醇部位组	1.00	15.43 ± 2.67**	67.79
	0.50	20.06 ± 3.91**	58.12
	0.25	23.56 ± 3.17**	50.81
水部位组	1.00	31.50 ± 4.30**	34.24
	0.50	35.20 ± 5.07**	26.51
	0.25	39.00 ± 4.47*	18.58

注：与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

3 讨论

两面针药材已成为广西化工、医药等行业的重要原材料之一，随着对两面针基础研究的不断深入，用途不断拓宽，两面针药材多年前在广西已成功人工栽培，每年在采收大量的法定入药部位(根部)的同时，大量非药用部位(如叶等)被当成废弃物。在广西民间，常将两面针叶作为抗炎镇痛药使用。本研究结果表明，与模型组比较，除热板法水部位低

剂量的镇痛作用无统计学意义外，各剂量的两面针叶粗提取物和不同提取部位均有显著的抗炎和镇痛作用($P < 0.05$, $P < 0.01$)。正丁醇部位在二甲苯所致耳廓肿胀、棉球肉芽肿胀、足跖肿胀等3个抗炎实验和热板法镇痛实验中均显示最强的药理活性，而乙酸乙酯部位在扭体法镇痛试验中活性最强。在小鼠耳廓肿胀试验中，两面针叶正丁醇部位肿胀抑制率高达73.14 %，接近阳性药阿司匹林组的肿胀抑制率(74.36 %)。可见，两面针叶具有良好的抗炎镇痛作用，其中正丁醇和乙酸乙酯提取部位是主要的有效部位。本研究为两面针植物的综合开发利用，扩大药源提供科学的实验依据。

参考文献：

[1] 冯洁, 周劲帆, 覃富景, 等. 两面针根和茎抗炎镇痛不同部位活性比较研究[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(6): 60-63.

[2] 周劲帆, 覃富景, 冯洁, 等. 两面针根挥发油的抗炎镇痛作用研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(1): 19-20.

[3] 陈奇. 中药药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 70.

[4] 孙春龙, 郑庆霞, 李洪庆, 等. 苗蓊冷水花提取物抗炎镇痛活性的研究[J]. 贵州大学学报(自然科学版), 2009, 26(6): 67-69.

[5] 赵平, 叶志文, 凌玉云, 等. 珍黄丸抗炎镇痛作用的药理学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(9): 86-88.

[6] 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 882.

(编辑：梁进权)

经前期综合征肝气郁证大鼠下丘脑 ERβ 的表达及配体受体结合活性的研究

宋春红¹, 高杰¹, 陈志恒², 张惠云¹ (1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355; 2. 潍坊市食品药品检验所, 山东 潍坊 261041)

摘要：目的 探讨经前期综合征(PMS)肝气郁证发病的微观分子机理和中药经前舒颗粒对 PMS 肝气郁证的干预机制。方法 雌性 SD 大鼠随机分为 3 组：正常对照组、模型组和经前舒组。慢性束缚应激法复制 PMS 肝气郁证大鼠模型，以经前舒颗粒进行药物干预。放射性配体受体结合技术测定下丘脑中雌激素受体 β 亚型(ERβ)的结合活性变化；Western blot 技术检测下丘脑中 ERβ 蛋白的表达。结果 与正常对照组比较，PMS 肝

收稿日期：2012-06-13
作者简介：宋春红，女，博士研究生，讲师，研究方向：调肝方药中药药理及情志病的动物模型研究。Email: sch-64552@126.com。通讯作者：张惠云，教授，博士生导师。Email: zhuiyun@163.com。
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)。

气郁证模型组大鼠下丘脑中 ER β 的配体受体结合活性、蛋白表达显著升高($P < 0.05$), 而经前舒组可纠正其异常升高。**结论** 下丘脑中 ER β 表达量、配体受体结合活性的升高可能是导致 PMS 肝气郁证的重要病因; 经前舒颗粒对下丘脑中 ER β 表达、配体受体结合活性的异常变化有纠正作用。

关键词: 经前期综合征; 肝气郁证; 下丘脑; 雌激素受体 β ; 配体受体结合活性; 经前舒颗粒

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)02-0125-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.02.005

Study on Hypothalamic Estrogen Receptor Beta Expression and Ligand-receptor Binding Activity in Pre-menstrual Syndrome Model Rats with Liver-*Qi* Stagnation

SONG Chunhong¹, GAO Jie¹, CHEN Zhiheng², ZHANG Huiyun¹ (1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355 Shandong, China; 2. Weifang Institute for Food and Drug Control, Weifang 261041 Shandong, China)

Abstract: Objective To investigate the molecular pathogenesis of premenstrual syndrome (PMS) with liver-*Qi* stagnation, and to explore the therapeutic mechanism of *Jingqianshu* Granule for PMS with liver-*Qi* stagnation. **Methods** Female SD rats were randomly divided into three groups, i.e., the normal group, the model group and the medication group. The PMS model rats with liver-*Qi* stagnation were induced by bondage stimulation. *Jingqianshu* Granule at the dose of 10 g·kg⁻¹ was given to the rats in the medication group by intragastric administration during the modeling. Equal volume of sterilized water was given to the rats in the model group and the normal group, once daily. The ligand binding activity of estrogen receptor β (ER β) was detected by radio ligand-receptor binding techniques, and Western blot method was used to detect protein expression level of ER β in rat hypothalamus. **Results** The protein level and estrogen-binding capacity of ER β in the hypothalamus were increased more obviously in the model group than those in the normal group ($P < 0.05$), and the abnormal increase was corrected in the medication group. **Conclusion** The increase of hypothalamic ER β expression and its estrogen-binding capacity contributes to the development of PMS with liver-*Qi* stagnation, and *Jingqianshu* Granule has down-regulation of the hypothalamic ER β expression and its estrogen-binding capacity.

Keywords: Premenstrual syndrome; Liver-*Qi* stagnation; Hypothalamus; Estrogen receptor β ; Ligand-receptor binding activity; *Jingqianshu* Granule

肝气郁证是经前期综合征(PMS)的主要中医证型, 主要表现为抑郁寡欢, 胸闷叹息^[1]。有研究认为雌激素缺乏与机体的焦虑和抑郁等情绪有关^[2]。绝经后妇女的焦虑和抑郁可用雌激素替代疗法改善^[3]。基因敲除实验证实雌激素的情绪调节作用离不开雌激素受体 β (ER β)^[4]。张惠云等^[5]研究显示, 下丘脑中 ER β mRNA表达量升高与PMS肝气郁证有关, 然而下丘脑中ER β 蛋白表达及配体受体结合活性与PMS肝气郁证的关系目前尚未见文献报道。因此, 本文就这一问题展开研究, 从而探索PMS肝气郁证的发病机理, 揭示经前舒颗粒的干预机制。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂 17 β -雌二醇(美国Sigma公司, 批号: E8875); (6, 7)³H-雌二醇(放射比活性 44.8 Ci/mmol, 美国PerkinElmer life science, 批号: NET

01300); PPO(瑞士Fluka公司, 批号: 43140); POPOP(美国Sigrna公司, 批号: P3754); 葡聚糖T500(中国Solarbio Pharmacial公司, 批号: 7-0320-01)。ER β 多克隆一抗(美国Abcam公司, 批号: ab3576); β -actin(美国Stanta Cruz公司, 批号sc-47778), 碱性磷酸酶标记羊抗鼠Ig G(美国Santa Cruz公司, 批号: sc-2005); 经前舒颗粒(秦皇岛市山海关制药厂, 批号: 220083087)。

1.2 仪器 SN-6930液体闪烁计数器(上海核所日环光电仪器有限公司); Allegra 64R高速冷冻离心机(美国Beckman公司); 721分光光度计(上海精密仪器仪表有限公司); Olympus显微镜(日本Olympus公司)。

1.3 动物 SPF级健康未孕SD雌性大鼠, 45只, 体重180~220 g, 山东中医药大学实验动物中心, 动物许可证号: SCXK(鲁)20050015。大鼠均饲养于昼夜颠倒环境, 每天于21:00开灯, 9:00关灯。除实验

期外自由进食饮水。各组大鼠每天均由实验操作者抓握移动,熟悉环境,消除人为操作影响。

1.4 PMS肝气郁证大鼠模型制备 采用慢性束缚应激法^[6]复制大鼠模型,阴道涂片、镜检结合行为学观察方法确定大鼠动情周期。选择动情行为规则出现且活跃处于动情周期非接受期的大鼠进入旷场试验^[7-8],旷场实验水平得分反映动物的兴奋性,垂直得分主要反映动物对周围环境的不确定性和探究性趋势,旷场试验总分是动物探索行为及兴奋性的总体反应,最后选择旷场试验得分相近的大鼠进入正式实验。经前舒组大鼠在造模同时灌胃给药,给药剂量为10 g·kg⁻¹(相当于人临床8倍剂量),正常对照组和模型组同时灌胃等容积生理盐水,1次/d,共5 d。

1.5 取材 给药完成后旷场实验对大鼠宏观表现予以量化评价,并称体质量。将大鼠断头处死,迅速剥离脑组织,弃除在脑组织表面的血液和脑膜,在冰盒上取出下丘脑装入1.5 mL EP管中,立即放入液氮罐中速冻,-70 ℃储存备用。

1.6 大鼠脑组织总蛋白提取 将剪碎的脑组织移入电动匀浆器,冰浴中操作,按1:5 (m:V)比例加入提前预冷的Rippa裂解液(含0.01 mol·L⁻¹的PMSF和cock-tail),匀浆30 min,4 ℃下12000 r·min⁻¹离心5 min,取上清,采用Bradford法测定蛋白含量,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,12000 r·min⁻¹离心5 min,取上清,分装备用,-20 ℃保存。

1.7 Western blot检测ERβ蛋白的表达 以每泳道50 μg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ERβ一抗(1:400)、β-Actin一抗(1:4000)室温摇床孵育2 h(抗体均用含5%脱脂奶粉的TBST溶液稀释),TBST洗膜3次(每次10 min),再与碱性磷酸酶标记的相应二抗(1:4000)室温孵育1 h,TBST洗膜3次(每次10 min),DAB法显色。用凝胶成像分析仪在可见光透射下对显色膜进行扫描和图像分析,计算目的条带的平均光密度值。

1.8 胞浆受体液的制备 从-70 ℃冰箱中取出脑组织,迅速称重,放在冰冷的TED缓冲液中(2个下丘脑/mL),用玻璃匀浆器(冰浴)匀浆,匀浆液转移到EP管中,3000 r·min⁻¹低温离心20 min,取上清液后15000 r·min⁻¹低温离心20 min,其上清即为胞浆受体液。制备蛋白标准曲线,采用考马斯亮蓝法测定胞浆受体液的蛋白浓度。

1.9 受体配体结合活性测定 采用葡聚糖-活性炭单点测定法,分总结合管(TB)和非特异性结合管(NSB)进行,按表1进行加样,使³H-雌二醇和17-β雌二醇的终浓度分别为8.3×10⁻² mol·L⁻¹和4.2×10⁻² mol·L⁻¹,4 ℃孵育18 h,冰浴5 min终止反应,加葡聚糖-活性炭悬液200 μL,4 ℃放置15 min(每5 min将EP管在旋涡器上混合1次),3000 r·min⁻¹离心20 min。取上清液200 μL投入含5 mL甲苯闪烁液的计数瓶内,放置过夜,于闪烁计数仪上测定放射性(cpm值)。按照下列公式计算所测样本的受体配体结合率:特异性受体配体结合活性=[(样品总cpm-非特异性cpm)/样品总cpm]×[³H-雌二醇量(fmol)/受体液蛋白量(mg)]。

表1 雌激素受体配体结合活性实验加样量(μL)

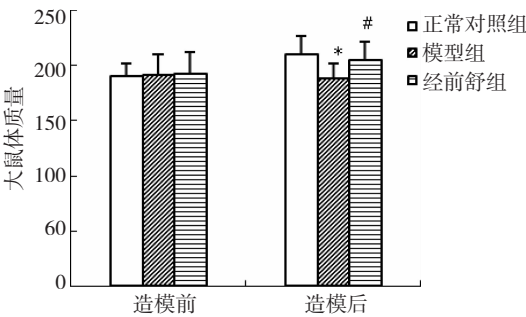
Table 1 The amount of sample added in the experiment of estrogen-binding capacities of ER

组别	胞浆受体液	TED 缓冲液	³ H-雌二醇 (10 nmol·L ⁻¹)	17-β雌二醇 (5 μmol·L ⁻¹)
TB	100	10	10	-
NSB	100	-	10	10

1.10 统计学处理方法 用SPSS 11.5统计软件进行单因素方差分析及LSD法检验。所有数据均用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,显著性水平为P<0.05。

2 结果

2.1 大鼠宏观行为学及体质量的变化 与正常对照组比较,模型组大鼠不活跃,精神萎靡,眼神呆滞,相互扎堆睡觉,对外界刺激不敏感;用电笔刺激,正常对照组大鼠一般会迅速躲开,模型组也逃避电笔刺激,但反应迟缓,速度较慢。与正常对照组比较,模型组大鼠体质量明显下降(P<0.05);与模型组比较,经前舒组大鼠体质量明显上升(P<0.05),见图1。



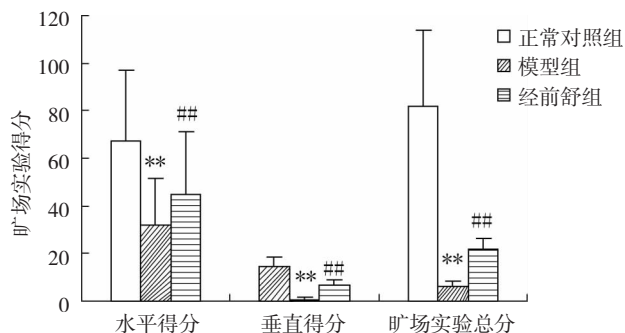
注:与正常对照组比较,*P<0.05;与模型组比较,#P<0.05。

图1 造模前后大鼠体质量比较(n=15)

Figure 1 The weight of rats before and after modeling

2.2 大鼠旷场实验得分 与正常对照组比较, 模型组大鼠在旷场实验的水平得分、垂直得分及总分均显著减少($P < 0.01$), 表明模型后大鼠的兴奋性、敏感性减弱, 探究活动减少。与造模组比较, 经前舒组大鼠在非接受期旷场水平得分、垂直得分及总分均显著增加($P < 0.01$), 表明给药后大鼠的兴奋性、敏感性增强, 探究活动增加, 也一定程度反映了经前舒颗粒对经前抑郁的治疗作用, 见图2。

旷场实验结合大鼠宏观行为学以及体质量变化表明, PMS肝气郁证大鼠模型复制成功。



注: 与正常对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

图2 旷场实验结果($n=15$)

Figure 2 The results of the open-field experiment

2.3 ER β 蛋白在下丘脑中的表达 Western blot 检测结果显示, 与正常对照组大鼠比较, 模型组大鼠下丘脑ER β 蛋白表达显著升高($P < 0.05$); 经前舒颗粒干预能抑制ER β 蛋白表达水平的异常升高, 与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图3、图4。

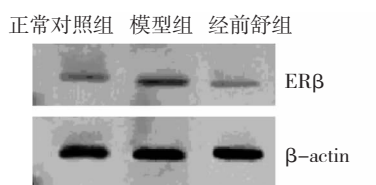
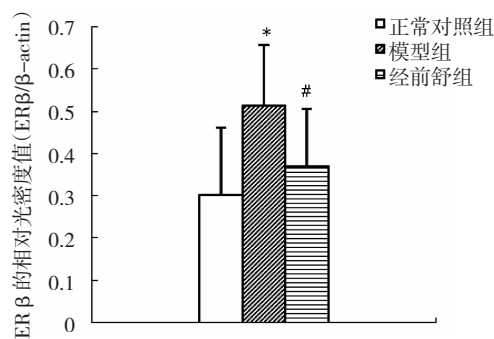


图3 下丘脑ER β 和 β -actin 蛋白电泳图谱

Figure 3 The electrophoregrams β -actin and ER β protein in hypothalamus

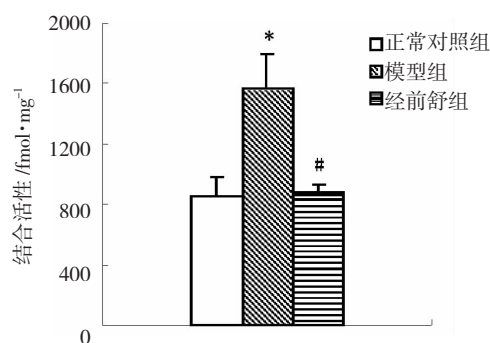
2.4 大鼠下丘脑雌激素受体(ER)与配体雌二醇(E₂)的特异性结合活性 由图5可见, 与正常对照组比较, 模型组大鼠下丘脑中ER与配体E₂的特异性结合量显著增高($P < 0.05$); 经前舒组比模型组明显降低($P < 0.05$), 并与正常组对照比较无统计学意义。结果表明, 模型组可明显升高PMS肝气郁证大鼠下丘脑ER与配体E₂特异结合活性, 而经前舒颗粒能使PMS肝气郁证大鼠下丘脑中ER和E₂的结合活性恢复到正常水平。



注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$ 。

图4 下丘脑中ER β 蛋白的相对表达量($n=15$)

Figure 4 The expression of ER β protein in hypothalamus



注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$ 。

图5 大鼠下丘脑ER与E₂的特异性结合活性($n=15$)

Figure 5 The [³H]-E₂ binding activity of ER in hypothalamus

3 讨论

ER β 属于核受体, 它与E₂结合后转移至细胞核内与雌激素应答元件结合, 调节蛋白合成。既往研究证明雌激素通过雌激素受体调节5-HT的合成、传导、转运, 从而发挥情绪调节作用^[9], 如ER β 基因敲除小鼠色胺酸羟化酶(TPH, 5-HT合成的限速酶)的表达量下降, 小鼠表现为焦虑症状^[10]。张惠云等^[9]研究结果显示PMS肝气郁证大鼠下丘脑中ER β mRNA表达升高。课题组前期实验表明PMS肝气郁证大鼠下丘脑中雌激素含量升高^[11]。本实验在前期研究的基础上进一步探讨了模型组大鼠下丘脑中ER β 受体蛋白表达量和配体受体结合活性。造模后模型组大鼠体质量明显下降, 该结果符合肝气郁结可使体质量下降的结论^[12]。经前舒颗粒对于造模所致的体质量下降有明显改善作用。Western blot 检测结果表明, PMS肝气郁证大鼠下丘脑ER β 蛋白表达量升高, 提示PMS肝气郁证大鼠下丘脑中ER β 在转录和翻译水平上均显著增高。模型组大鼠下丘脑中雌激素受体结合活性升高将近两倍水平, 这可能是下丘脑中雌激素和其受体含量均增高而引起的。雌激素核受体有两种: ER α 和ER β , 均属于类固醇激素受体基因超家族成员, 两者

均在啮齿类动物的下丘脑中分布, 国外研究证实, 17- β 雌二醇与ER α 和ER β 的结合率相等^[13]。由于实验中没有找到有效的ER α 的拮抗剂, 下丘脑所测得的结果可能含有ER α 的干扰。根据本实验研究结论, 我们推测ER β 表达量和雌激素受体配体结合活性的升高与PMS肝气郁证发病密切相关。该结果也为我们课题下一步研究ER与5-HT代谢相关基因在PMS肝气郁证中的作用奠定了基础。

经前舒颗粒是针对PMS肝气郁证所研发的中药新药, 由白芍、当归、柴胡、白术、丹皮、香附等中药配伍而成, 具有养肝解郁、理气消胀等功效, 能有效地消除PMS肝气郁证情绪低落、胸闷、乳房胀痛等症状。本实验表明经前舒颗粒可显著改善PMS肝气郁证大鼠模型的宏观表现及拮抗下丘脑中ER β 蛋白表达和配体受体结合活性升高。因此我们认为下丘脑中ER β 是该药的中枢作用靶点之一。

参考文献:

- [1] 乔明琦, 张珍玉, 徐旭杰, 等. 经前期综合征证候分布规律的流行病学调查研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 1997, 3(3): 31-33.
- [2] Andrade TG, Nakamuta JS, Avanzi V, et al. Anxiolytic effect of estradiol in the median raphe nucleus mediated by 5-HT_{1A} receptors[J]. Behav Brain Res, 2005, 163(1): 18-25.
- [3] Soares CN, Almeida OP, Joffe H, et al. Efficacy of estradiol for the treatment of depressive disorders in perimenopausal women: a double-blind, randomized, placebo controlled trial[J]. Arch Gen Psychiatry, 2001, 58 (6): 529-534.
- [4] Imwalle DB, Gustafsson JA, Rissman EF. Lack of functional estrogen receptor β influences anxiety behavior and serotonin content in female

- mice[J]. Physio Behav, 2005, 84: 157-163.
- [5] 张惠云, 马晶. 经前舒颗粒对经前期综合征肝气郁证大鼠下丘脑和海马雌激素受体 α , β mRNA表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2010, 34(4): 489-491.
- [6] 魏盛, 张惠云. 经前期综合征肝气逆、郁两证大鼠模型建立及宏观评价方法初探[J]. 实验动物与比较医学, 2009, 29(3): 142-146.
- [7] 屠霞芬. 大运动量游泳对小白鼠动情周期的影响[J]. 中国临床康复, 2004, 8(36): 8316-8317.
- [8] Ho HP, Olsson M, Westberg L et al. The serotonin reuptake inhibitor fluoxetine reduces sex steroid-related aggression in female rats: an animal model of premenstrual irritability [J]. Neuropsychopharmacology, 2001, 24 (5): 502-510.
- [9] Rubinow DR, Schmidt PJ, Roca CA. Estrogen-serotonin interactions: implications for affective regulation[J]. Biol Psychiatry, 1998, 44 (9): 839-850.
- [10] Nomura M, Akama KT, Alves SE, et al. Differential distribution of estrogen receptor(ER) -alpha and ER-beta in the midbrain raphe nuclei and periaqueductal gray in male mouse: predominant role of ER-beta in midbrain serotonergic systems[J]. Neuroscience, 2005, 130(2): 445-456.
- [11] Zhang HY, Wei S, Sun P, et al. Empirical study of changes of pre-menstrual syndrome model rats with liver-qi invasion and liver-qi depression in peripheral blood, sexual hormones, different encephalic regions and accommodate hormones[J]. World Sci Tech, 2010, 12 (1): 51 -56.
- [12] 许晶, 李晓秋. 慢性应激抑郁模型的建立及其评价[J]. 中国行为医学科学, 2003, 12 (1): 14-17.
- [13] Harris HA, Bapat AR, Gonder DS, et al. The ligand binding profiles of estrogen receptors alpha and beta are species dependent [J]. Steroids, 2002, 67(5): 379 -384.

(编辑: 梁进权)

香附醋制前后对大鼠脊髓 c-fos 蛋白表达的影响

李淑雯, 胡志方(江西中医药高等专科学校, 江西 抚州 334000)

摘要: 目的 通过研究香附醋制前后对大鼠脊髓 c-fos 蛋白表达的影响, 初步阐明“香附醋制止痛”机理。方法 观察大鼠在疼痛行为学方面的变化; 采用免疫组化法检测香附生品与醋制品含药血清对大鼠脊髓 c-fos 蛋白表达的影响。结果 与模型组比较, 香附生品、醋制品均可减少大鼠缩腿、舔爪累计时间, 且醋制品作用更强, 差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。痛刺激后鞘内注射香附生品及醋制品含药血清均可减少 c-fos 蛋白表达, 与生品比较, 醋制品能明显减少 c-fos 蛋白表达。结论 香附醋制后可通过减少 c-fos 蛋白表达, 阻止痛信号在脊髓内的传导, 从而增强镇痛作用。

关键词: 香附; 醋制; 脊髓 c-fos 表达

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)02-0129-03

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.02.006

收稿日期: 2012-10-07

作者简介: 李淑雯, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 从事中药复方药理研究。Email: 709339664@qq.com。

基金项目: 江西省自然科学基金(2011GQY0136)。