

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)。

Effects of Vinegar Processed Rhizoma Cyperi on Rat Spinal c-fos Protein Expression

LI Shuwen, HU Zhifang(Jiangzi Higher Training School of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 344000 Jiangxi, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of vinegar processed Rhizoma Cyperi on rat spinal c-fos protein expression, for the exploration the theoretical mechanism of vinegar processed Rhizoma Cyperi having analgesic activity in traditional Chinese medicine. **Methods** The changes of rat pain behavior were observed. The expression of c-fos protein in rat spinal dorsal horn was detected with immunohistochemistry for the evaluation of effects of serum containing crude and vinegar processed Rhizoma Cyperi. **Results** Serum containing crude Rhizoma Cyperi and serum containing vinegar processing Cyperus could remarkably shorten the time for rats licking paws and lifting the limbs, and serum containing vinegar processing Rhizoma Cyperi had stronger effect ($P < 0.01$). After injection of serum containing crude Rhizoma Cyperi and serum containing vinegar processing Rhizoma Cyperi into the spinal dorsal horn of rats receiving pain stimulation, spinal c-fos protein expression was obviously decreased, and the serum containing vinegar processing Rhizoma Cyperi had the stronger effect. **Conclusion** Rhizoma Cyperi after vinegar processing can decrease spinal c-fos protein expression, thus to block the transduction of pain signal in spinal cord, and then enhancing the analgesic effect.

Keywords: Rhizoma Cyperi; Vinegar processing; Spinal c-fos protein expression

香附为莎草科植物(*Cyperus rotundus* L.)的干燥根茎,始载于《名医别录》。香附本为行气药,但经过辅料加工炮制后,又能入血分,前人称其为“血中气药”,为妇科调经止痛的要药,有“气病之总司,女科之主帅”之美称,临床应用需炮制入药。醋制是香附的主要制法之一,自宋代以来记载有醋汤煎、醋盐煮、酒醋炒、醋炒、醋煮等方法。醋制法是一种以醋为辅料的传统中药炮制技术。香附醋制能增强疏肝理气止痛作用^[1]。研究表明,原癌基因核蛋白中的c-fos成员在中枢神经系统内的表达与痛觉调制有关,c-fos对外界刺激非常敏感,在中枢某些部位的表达可作为伤害性刺激所引起的疼痛在分子水平上的标志物。本研究通过对福尔马林致痛大鼠蛛网膜下腔给予香附醋制品与生品含药血清,观察大鼠伤害性行为学反应、脊髓背角c-fos蛋白表达的改变,以期初步阐明“香附醋制止痛”理论的作用机制,为中药炮制增效机理的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物 SD大鼠,SPF级,由江西省医学实验动物中心提供,合格证号:SCXXK(赣)2010-0003。

1.2 药物及试剂 香附,来源于江西省药材公司,经鉴定为莎草科植物莎草*Cyperus rotundus* L.的干燥根茎。醋制香附:取净香附400 g,加20%醋拌匀,闷透,置锅内炒干,取出放凉。c-fos—抗血PV-6002、DAB试剂盒,批号:E074,南京建成生物技术有限公司。

1.3 仪器 倒置生物显微镜,日本Olympus;电子天平,梅特勒-托利多(上海)公司;TGLL-16B台式高

速离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;LEICA TP 1020组织全自动脱水机,德国LEICA公司;PCR扩增仪(DNA Thermal Cycler),Biomtra公司;WO-9413B型凝胶成像分析系统,北京六一仪器厂;LEICA EG 1160生物组织包埋机及冷冻机,德国LEICA公司;BINDER培养箱,德国宾德公司。

1.4 实验方法

1.4.1 含药血清的制备 Wistar大鼠40只,随机分为4组,分别为香附生品组、香附醋制品组、空白对照组及模型组。给药组分别灌胃香附生品与醋制品水提取液($20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),水提取液浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,空白组灌胃生理盐水,灌胃容积均为 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,每天给药2次,早晚各1次,连续给药1周,于末次给药后1 h取血,采集的全血于 4°C 静置2 h后,低温离心机离心, $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心15 min,分离血清,经 56°C 恒温灭活30 min处理后,在超净台上用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌, -20°C 保存备用。

1.4.2 动物模型制备 (1)鞘内置管^[2]:SD雄性大鼠腹腔注射5%水合氯醛($6 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),取俯卧位,在L3~4间隙处作长约3 cm的皮肤纵切口,分离L4棘突两侧肌肉,暴露L4与L3棘突间隙,分离此间隙上下的筋膜及肌肉组织,插入细导管2 cm固定。取无运动障碍的大鼠于置管3 d后鞘内注射2%利多卡因 $20 \mu\text{L}$,如注药后30 s未出现双下肢麻痹,则舍去不用。(2)疼痛模型的建立^[2]:用 $100 \mu\text{L}$ 微量注射器在大鼠足底部注射5%福尔马林 $100 \mu\text{L}$ 。

1.4.3 疼痛行为学观察及评分 大鼠足底注射福尔马林后出现缩腿、舔咬注射爪等痛反应。注射后立即用秒表连续记录1 h内的缩腿、舔咬时间(s)。

1.4.4 动物分组及给药 选择鞘内成功置管的雄性大鼠 40 只，随机分为 4 组，每组 10 只，分别为空白对照组、模型组、香附生品组、香附醋制品组。鞘内置管后 5 d，模型组、香附生品组、香附醋制品组大鼠于左后足掌部皮下注射 5 % 福尔马林 100 μ L 致痛，致痛前 10 min，模型组鞘内注射空白血清，香附生品及醋制品组均鞘内注射香附生品及醋制品含药血清，空白对照组则足底注射生理盐水 100 μ L 和鞘内注射空白血清。

1.4.5 免疫组化法检测大鼠脊髓 c-fos 表达 采用 DAKO EnVision 二步法显色系统，按照试剂盒说明依次切片脱蜡和水化、抗原修复、滴加一抗、EnVision 孵育、DAB 显色，最后二甲苯透明，中性树胶封片，显微镜观察蛋白表达情况。

1.5 统计学处理方法 实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，组间差异的显著性检验运用 SPSS13.0 软件提供的非参数检验和单因素方差分析方法。

2 结果

2.1 对疼痛行为反应的影响 见表 1。与模型组比较，香附生品组、醋制品组均可减少大鼠缩腿、舔爪累计时间($P < 0.01$)；与香附生品组比较，醋制品组可减少大鼠缩腿、舔爪累计时间($P < 0.01$)。

表 1 对大鼠缩腿、舔爪累计时间的影响

组别	n	缩腿、舔爪时间 /s
空白对照组	10	10.84 $\pm$ 0.22
模型组	10	1003.01 $\pm$ 125.04*
香附生品组	10	699.25 $\pm$ 101.64*#
香附醋制品组	10	396.11 $\pm$ 81.76*#▲

注：与空白对照组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.01$ ；与香附生品组比较，▲ $P < 0.01$ 。

2.2 对 c-fos 蛋白表达的影响 见图 1。空白对照组未见阳性细胞，模型组可见大量阳性细胞，与空白对照组比较，模型组脊髓背角 c-fos 表达增加；与模型组比较，生品组、醋制品组脊髓背角 c-fos 表达减少；与香附生品组比较，香附醋制品组脊髓背角 c-fos 表达减少。

3 讨论

醋制是香附的主要炮制法之一，香附醋制能增强疏肝理气、止痛作用。福尔马林致痛模型是目前国内外已公认的、较短期机械或热刺激更为可靠的动物疼痛模型，已普遍应用于疼痛机制研究及镇痛药物评价。Fos 是原癌基因 c-fos 的表达产物，是一种

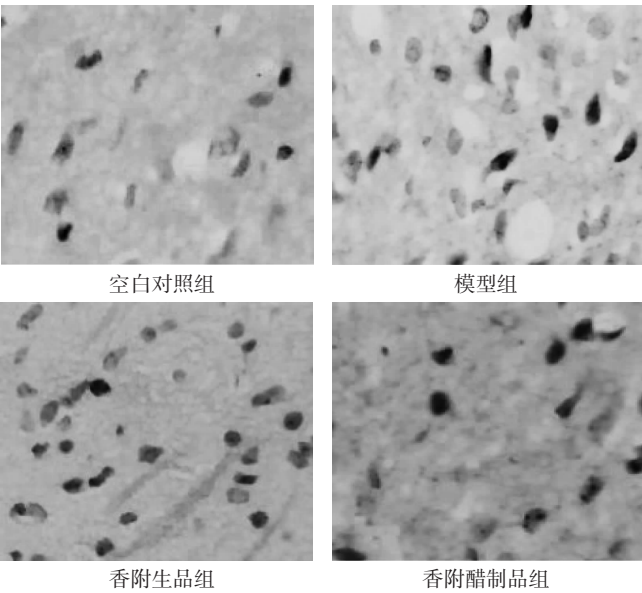


图 1 大鼠脊髓背角 c-fos 蛋白表达($\times 400$)

Figure 1 Protein expression of c-fos in the spinal dorsal horn

核内磷酸蛋白，Fos 与其他核内 DNA 结合蛋白组成调节转录的 AP-1 复合物，从而干扰其他基因的转录速率，外界刺激引起第二信使变化诱导 c-fos 表达，通过 c-fos 将第二信使介导的短时程信号在基因表达上转变成长时程信号，从而使感觉信号的传入发生改变，c-fos 的表达是评价药物镇痛效能的有效方法^[3-4]。

本研究采用福尔马林致痛大鼠模型，对大鼠缩腿、舔爪时间进行行为学观察。并采用免疫组化的方法对 c-fos 的蛋白表达进行了检测。结果表明，香附生品组、醋制品组均可减少大鼠缩腿、舔爪累计时间，且醋制品组作用更加显著。痛刺激前或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，且与香附生品比较，醋制品能明显减少 c-fos 蛋白表达，表明香附醋制后可能通过减少 c-fos 蛋白表达，抑制与痛信号的传导和调控有关的脊髓背角 FLI 神经元的活性，阻止痛信号在脊髓内的传导，从而增强镇痛作用。

参考文献：

[1] 孙昌云，潘小毛. 香附的炮炙与临床应用[J]. 中医药临床杂志，2008，20(1)：69.
[2] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京：人民卫生出版社，1982：890.
[3] Berrocal YA, Pearse DD, Andrade CM, et al. Increased spinal c-Fos expression with noxious and non-noxious peripheral stimulation after severe spinal contusion[J]. Neurosci Lett, 2007, 413 : 58.
[4] Fukuda T, Watanabe K, Hisano S, et al. Licking and c-Fos expression in the dorsal horn of the spinal cord after the formalin test. Anesth Analg, 2006, 102 : 811.

(编辑：邓响潮)