

催眠方煎剂对小鼠海马GABA_A受体mRNA表达的影响

黄晓舞^{1*},冯 慧²(1.解放军总医院,北京 100853;2.总参旗坛寺门诊部,北京 100034)

中图分类号 R392;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)11-0972-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.11.05

摘要 目的:研究催眠方煎剂对小鼠海马GABA_A受体mRNA表达的影响。方法:实验分为空白对照(等体积蒸馏水)、地西洋(2 mg/kg)与催眠方煎剂(2 g/kg)组。应用实时荧光定量PCR法检测小鼠海马GABA_A受体mRNA的表达。结果:与空白对照组比较,催眠方煎剂组小鼠海马GABA_{A-α₁}mRNA表达显著增强,GABA_{A-α₂}mRNA表达无显著变化。结论:催眠方煎剂通过特异性作用于GABA_{A-α₁}受体而发挥镇静催眠作用。

关键词 实时荧光定量PCR;催眠方;GABA_A受体

Effects of Cuimian Prescription Decoction on mRNA Expression of GABA_A Receptor in Hippocampus of Mice
HUANG Xiao-wu¹, FENG Hui² (1.General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; 2.Clinical Department of Zhantan Temple, Headquarters of General Staff, Beijing 100034, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the Cuimian prescription on mRNA expression of GABA_A receptor in hippocampus of mice. METHODS: Mice were divided into 3 groups, i.e. blank control group (equal volume of distilled water) group, diazepam (2 mg/kg) group and Cuimian prescription decoction (2 g/kg) group. mRNA expression of GABA_A in hippocampus of mice was detected by RT-PCR techniques. RESULTS: Compared with blank control group, mRNA expression of GABA_A in hippocampus of mice increased in Cuimian prescription decoction group. CONCLUSION: Cuimian prescription decoction has edative and hypnotic effects by increasing the gene expression level of GABA_{A-α₁} receptor.

KEYWORDS Real-time PCR; Cuimian prescription; GABA_A receptor

恶性黑色素瘤(Malignant melanoma, MM)简称恶黑,是一类起源于神经嵴黑色素细胞的恶性肿瘤。Maniotis AJ等^[4]研究发现,恶性黑色素瘤存在一种特殊的血液供应方式即血管生成拟态,肿瘤细胞本身可以形成类似于血管的管道,肿瘤通过这些管道与宿主血管相连,进而为肿瘤的生长、侵袭和转移提供血供。

目前研究发现,与肿瘤血管生成有关的因子有30多种,其中VEGF起着重要的作用,它能特异地促进细胞分裂、增殖及迁移。Bayer-Garner B等^[5]发现,VEGF在恶性黑色素瘤中表达率为42%,而细胞痣以及非典型复合痣无表达。Salven P等^[6]发现,32%的原发性恶性黑色素瘤表达VEGF,而转移性恶性黑色素瘤高表达至90%。VEGF的主要机制为:(1)VEGF诱导内皮细胞表达整合素-1及其配体,介导内皮细胞浸润和转移^[7]。(2)VEGF诱导内皮细胞分泌多种组织蛋白酶及其组织因子,降解细胞外基质,介导内皮细胞迁移,诱导新生血管生成^[8]。

本研究通过复制小鼠黑色素瘤模型,发现RCG可以抑制小鼠黑色素瘤的生长并且具有剂量依赖性。结果表明,RCG高、中、低剂量组VEGF蛋白表达相对灰度值显著低于模型组($P < 0.01$),VEGF mRNA表达与模型组比较也显著下降($P < 0.01$),以上结果说明RCG对肿瘤具有一定的抑制作用。该结论可为探索出一条更为有效的黑色素瘤药物治疗方法提供实验基础。

* 副主任药师。研究方向:药品质量控制和物流管理。电话:010-66939338。E-mail:huangxw9266@vip.sina.com

参考文献

- [1] 罗红宇,余新威. 赤鲋生物活性物质的研究现状[J]. 中国海洋药物杂志, 2007, 26(1): 54.
- [2] 刘安军, 尤玲玲, 贾永利, 等. 软骨多糖对小鼠肉瘤细胞S180抑瘤作用[J]. 中国肿瘤, 2006, 15(11): 772.
- [3] 郭斌, 樊海燕, 贾玉海, 等. 鲑鱼骨素对荷瘤小鼠免疫功能的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2002, 29(2): 104.
- [4] Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry[J]. *Am J Pathol*, 1999, 155(3): 739.
- [5] Bayer-Garner B, Hough AJ, Smoller BR. Vascular endothelial growth factor expression in malignant melanoma: prognostic versus diagnostic usefulness[J]. *Mod Pathol*, 1999, 12(8): 770.
- [6] Salven P, Heikkilä P, Joensuu H. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in metastatic melanoma [J]. *Br J Cancer*, 1997, 76(7): 930.
- [7] Thurston G. Complementary actions of VEGF and angiopoietins on blood vessel permeability and growth in mice [J]. *J Anat*, 2002, 200(5): 529.
- [8] Naskar R, Thanos S. Retinal gene profiling in a hereditary rodent model of elevated intraocular pressure[J]. *Mol Vis*, 2006(12): 199.

(收稿日期:2012-03-15 修回日期:2012-08-05)

催眠方是临床上经常使用的民间验方,具有平肝熄风、活络化痰、镇静催眠的功效^[1],是由酸枣仁、灵芝、合欢皮等多味中药组成的复方,其中酸枣仁具有宁心安神益阴敛汗的功效^[2],灵芝具有安神补气的功效,合欢皮具有一定解郁安神的作用。在前期的动物行为药理学实验中笔者已经证实催眠方具有减少小鼠自主活动次数和协同戊巴比妥睡眠的镇静催眠作用。为了进一步研究催眠方的镇静催眠机制,笔者对催眠方进行了神经药理方面的研究, γ -氨基丁酸A受体(GABA_A)是临床常用神经活性药物的作用靶点^[3-4],苯二氮草(Benzodiazepine)类药物通过它而发挥镇静催眠的作用^[5-6]。本研究把GABA_A受体作为药物作用靶点,通过实时荧光定量PCR(qPCR)技术检测催眠方煎剂对小鼠海马GABA_A受体mRNA表达的影响,旨在探讨催眠方煎剂发挥镇静催眠作用的分子机制。

1 材料

1.1 仪器

iCycler荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司);3K30型低温高速离心机(美国Sigma公司);DYY-8C型电泳仪(北京六一仪器厂);UV6100型紫外分光光度计(上海元析仪器有限公司);Chemilmager™ 5500型凝胶成像分析系统(美国Alpha Innotech公司)。

1.2 药品与试剂

催眠方煎剂(解放军总医院中药房提供);地西洋片(天津药业焦作有限公司,批号:20110401);总RNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司];cDNA合成试剂盒、PCR试剂盒(美国Bio-Rad公司); β -actin、GABA_A- α_1 、GABA_A- α_2 引物(英国Invitrogen公司)。

1.3 动物

清洁级昆明种小鼠30只,♀♂兼用,体质量(20±2)g,由解放军总医院实验动物中心提供[动物使用许可证号:SCXK(京)2011-0004]。饲养温度为(23±1)℃,12h人工循环光照(光照期8:00-20:00),自由摄食饮水。实验前于饲养环境中适应3d。

2 方法

2.1 催眠方煎剂的制备

将催眠方药材1kg粉碎,用10倍体积的蒸馏水浸泡12h,置10000ml的圆底烧瓶中,加热回流3次,每次2h,用漏斗过滤,收集滤液,将滤液进行薄膜浓缩。

2.2 分组与给药

实验分为3组,即空白对照(等体积蒸馏水)、地西洋(2mg/kg)与催眠方煎剂(2mg/kg)组。ig给药,每天1次,连续7d。

2.3 取材

末次给药10min后,脱颈处死小鼠,迅速取出大脑,于冰盘上快速分离出海马,立即置液氮中,随后于-80℃贮藏,备用。

2.4 RNA抽提和质量检测

根据总RNA提取试剂盒说明书提取小鼠海马中的总RNA。所得总RNA通过琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计来检测纯度及浓度。总RNA用紫外分光光度计于260、280nm波长处测定吸光度(OD)值,测定核酸的纯度(OD₂₆₀/OD₂₈₀),质量浓度=OD₂₆₀×40×稀释倍数/1000(μg/μl)。另取总RNA提取液5μl,加上样缓冲液1μl混合,1%琼脂糖凝胶电泳,电压140V,时间30min,紫外灯下观察18、28S条带,扫描并保存图像。总RNA提取完整无降解,再按说明书操作步骤反转录合成cDNA。

2.5 反转录

采用Bio-Rad公司反转录试剂盒进行反转录,所有操作均在冰上完成。反转录反应体系:5×iScript reaction mix 4μl; iScript reverse transcriptase 1μl; Nuclease-free water 5μl; RNA template 10μl,共计20μl。反应条件:25℃5min,42℃30min,85℃5min。

2.6 RT-PCR

扩增反应体系:反转录产物1μl;上、下游引物各1μl; SsoFast EvaGreen SuperMix 10μl; RNase/DNase-free water 7μl,共计20μl。目的基因与内参照基因在相同反应条件下同时扩增。反应条件:95℃30s,35个扩增循环(95℃5s,60℃10s)。35个循环后进行溶解曲线分析。以 β -actin作为内参,计算产物相对量。GABA_A受体mRNA的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算,Ct值为目标扩增产物达到设定阈值所经历的循环数。相对定量分析运用Bio-Rad-iQ5自带的分析软件进行分析^[7]。目的基因引物序列见表1^[8-9]。

表1 目的基因引物序列

目的基因	引物序列	片段长度, bp
β -actin	上游引物5'-TGACGAGGCCAGAGCAAGA-3'	331
	下游引物5'-ATGGGCACAGTGTGGGTGAC-3'	
GABA _A - α_1	上游引物5'-CCAGAAAAGCCAAAGAAAGTGAAGGATCCT-3'	176
	下游引物5'-GGGTTCTGGCGGTTTTGTCTCAGGCTGAC-3'	
GABA _A - α_2	上游引物5'-AATGACAAGAAAAAGAGAAAGGCTCCGTC-3'	187
	下游引物5'-GGCTTCGGCTGGCTTGTCTCTGGCTTCTT-3'	

2.7 统计学方法

用Excel Spss软件进行数据处理和统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异用t检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 总RNA琼脂糖凝胶电泳

所提取总RNA经1%琼脂糖凝胶电泳检测可见28、18S清晰条带,泳道上无明显弥散痕迹,其中28、18S条带亮度比值约为2:1,表明RNA无明显降解。紫外分光光度计检测,OD₂₆₀/OD₂₈₀比值约为1.9~2.1。说明所提取的总RNA质量较好,纯度较高。RNA凝胶电泳见图1。

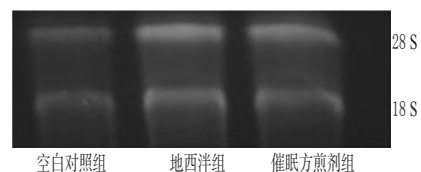


图1 RNA凝胶电泳图

Fig 1 Gel electrophoregrams of RNA

3.2 扩增产物溶解曲线分析

GABA_A- α_1 、GABA_A- α_2 与 β -actin溶解峰都为单峰,且为特征峰,说明PCR扩增为特异性扩增。溶解曲线与扩增曲线见图2。

3.3 GABA_A受体mRNA qPCR分析

与空白对照组比较,催眠方煎剂组小鼠GABA_A- α_1 受体mRNA水平显著升高($P < 0.01$);而催眠方煎剂组小鼠GABA_A- α_2 受体mRNA水平没有明显改变。GABA_A受体的mRNA表达见图3。

4 讨论

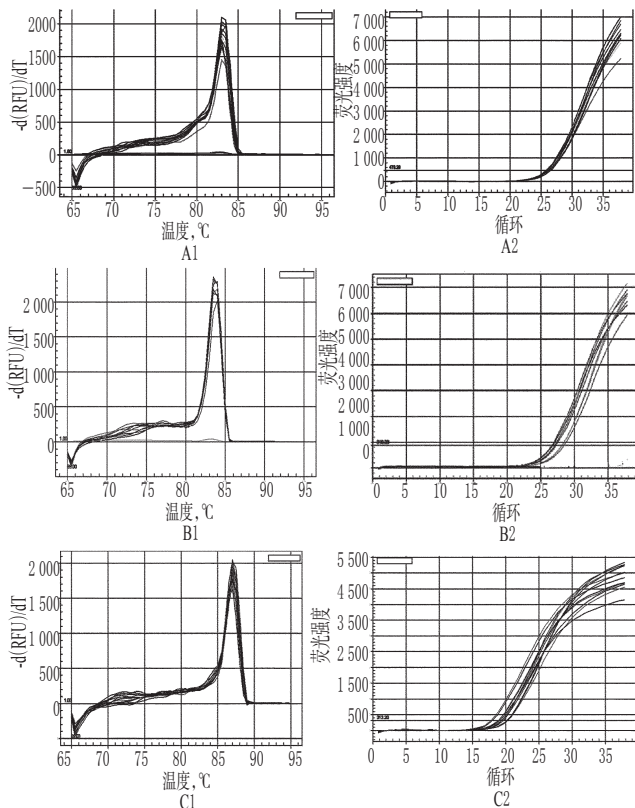


图2 溶解曲线与扩增曲线

A1. GABA_A-α₁溶解曲线; A2. GABA_A-α₁扩增曲线; B1. GABA_A-α₂溶解曲线; B2. GABA_A-α₂扩增曲线; C1. β-actin溶解曲线; C2. β-actin扩增曲线

Fig 2 The melting curve and amplification curve

A1. melting curve of GABA_A-α₁; A2. melting curve of GABA_A-α₁; B1. melting curve of GABA_A-α₂; B2. melting curve of GABA_A-α₂; C1. melting curve of β-actin; C2. melting curve of β-actin

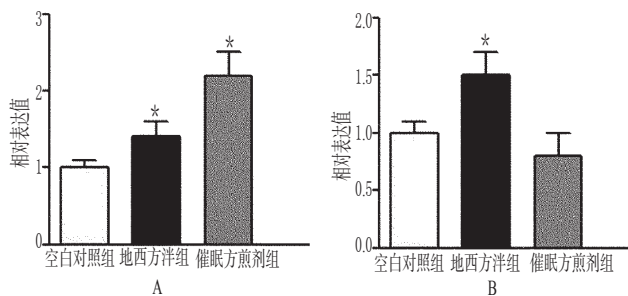


图3 GABA_A受体mRNA的表达

A. GABA_A-α₁; B. GABA_A-α₂
与空白对照组比较: *P < 0.01

Fig 3 Comparison of mRNA expression of GABA_A receptor

A. GABA_A-α₁; B. GABA_A-α₂
vs. blank control group: *P < 0.01

本研究中笔者采用了EvaGreen法,它属于非探针类Real-Time qPCR。EvaGreen是一种荧光染料,能够非特异性结合双链DNA,结合后,EvaGreen能够发射荧光信号,而未结合的染料发出的荧光极其微弱,这样荧光信号的增加与PCR产物的增加完全同步。因此,EvaGreen被广泛应用于核酸表达的检测。但是,EvaGreen的缺点是它能与所有双链DNA相结合,容易产生引物二聚体和非特异性扩增等,针对这一缺

点,我们可以通过溶解曲线来分析判断PCR反应的特异性。溶解峰都为单峰并且为特征峰,说明PCR扩增为特异性扩增。在本研究中,GABA_A-α₁、GABA_A-α₂和β-actin溶解峰都为单峰并且都为特征峰,说明本研究的PCR扩增为特异性扩增^[10]。

GABA_A受体是由GABA识别位点、BDZ识别位点和氯离子通道三部分组成的大分子蛋白质复合物,也称GABA_A/BDZ受体。苯二氮草类与GABA_A受体复合物上的BDZ受体结合,促进GABA与GABA_A受体结合,增加Cl⁻通道开放的频率而增加Cl⁻内流,产生中枢抑制效应。GABA_A受体含有14个不同的亚单位,按其氨基酸排列次序可分为α、β、γ、δ亚单位,α、β和γ亚单位是产生对BDZ类高度亲和的基本需要。中枢神经系统内BDZ类的结合位点有两种,含有这些位点的受体分别是ω₁受体(由α₁-β₁-γ₂组成)和ω₂受体(由α₂-β₁-γ₂组成)^[11-12]。ω₁受体主要与镇静催眠作用有关,ω₂受体与认知功能有关。BDZ类对ω₁受体和ω₂受体的作用无选择性,在发挥抗焦虑和镇静催眠作用的同时,具有肌肉松弛、记忆力减退、耐受和成瘾性等副作用,使其应用受到很大限制^[13-15]。

本研究结果表明,地西洋能同时增加小鼠海马中α₁和α₂亚基的表达,对ω₁和ω₂没有选择性,所以在发挥抗焦虑和镇静催眠作用的同时,具有肌肉松弛、记忆力减退、耐受和成瘾性等副作用;催眠方煎剂只增加α₁亚基的表达,而对α₂亚基的表达无明显影响,说明催眠方煎剂能选择性地作用于ω₁受体,但不影响ω₂受体,故可以避免由ω₂受体介导的认知功能损害等副作用。催眠方煎剂在治疗失眠、发挥镇静催眠作用方面优于BDZ类药物。

综上所述,本研究对进一步了解GABA_A受体的生物学功能及其与失眠发生的关系提供了一定的理论依据,同时也从另外一个角度解释了催眠方煎剂发挥镇静催眠作用的生物分子机制。催眠方煎剂的镇静催眠作用可能主要是特异性增加GABA_A受体α₁亚基的表达引起的。本研究为催眠方煎剂在临床上广泛应用奠定了一定的理论基础。

参考文献

- [1] 游秋云,吴丽丽,田代志,等.酸枣仁汤对老年失眠证候模型大鼠学习记忆及脑内自由基、一氧化氮合酶的影响[J].中华行为医学与脑科学杂志,2010,19(10):885.
- [2] 李玉娟,刘雯,杨静玉,等.酸枣仁汤的镇静催眠作用[J].沈阳药科大学学报,2002,19(2):115.
- [3] 张瑞华,李丽琴,王惠芳,等.A型γ-氨基丁酸受体结构及其有关药物[J].生命的化学,2003,23(6):441.
- [4] 汪春运.γ-氨基丁酸和神经药理[J].国外医学精神病学分册,2002,29(4):233.
- [5] 崔浩.GABA_A受体的亚型以及药理学作用[J].国外医学药学分册,2001,28(6):337.
- [6] 张妍,解军波,张彦青,等.镇静催眠药物的主要作用机制研究进展[J].中国药房,2011,22(41):3906.
- [7] Foley PF, Loh EW, Innes DJ, et al. Association studies of neurotransmitter gene polymorphisms in alcoholic Caucasians[J]. Ann NY Acad Sci,2004,1025(1):39.
- [8] Gangisetty O, Reddy DS. The optimization of TaqMan Real-Time RT-PCR assay for transcriptional profiling of GABA-A receptor subunit plasticity[J]. J Neurosci Methods, 2009,181(1):58.
- [9] Tian J, Lu Y, Zhang H, et al. Gamma-aminobutyric acid

芪苈强心胶囊对慢性心衰模型大鼠心肌纤维化及结缔组织生长因子表达的影响

张 丽*, 张 睿, 周建中*(重庆医科大学附属第一医院心内科, 重庆 400016)

中图分类号 R285;R97 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)11-0975-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.11.06

摘 要 目的:研究芪苈强心胶囊对慢性心衰(CHF)模型大鼠心肌纤维化(MF)及结缔组织生长因子(CTGF)表达的影响。方法:对大鼠施以腹主动脉部分缩窄术复制CHF模型。实验分为假手术(等容生理盐水)、模型(等容生理盐水)、依那普利(10 mg/kg)与芪苈强心胶囊高、中、低剂量(1、0.5、0.25 mg/kg)组。灌胃给药,每天1次,连续4周。检测大鼠血流动力学参数,计算左室质量指数(LVMI),天狼猩红染色(PSR)观察左室心肌胶原形态,测量胶原容积分数(CVF),免疫组化法和Western blot法检测大鼠左室心肌组织中CTGF的表达。结果:与模型组比较,芪苈强心胶囊高、中、低剂量组LVMI、CVF和CTGF表达显著减弱($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);芪苈强心胶囊高、中剂量组LVEDP显著降低, $-dp/dt_{max}$ 显著升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),病理形态学显著改善, I型/III型显著降低($P < 0.01$);芪苈强心胶囊高剂量组 $+dp/dt_{max}$ 显著升高($P < 0.05$)。结论:芪苈强心胶囊能减轻CHF模型大鼠的心室肥厚,抑制MF和改善心功能,该作用可能是通过抑制左室心肌组织中CTGF的过度表达来实现的。

关键词 芪苈强心胶囊;慢性心力衰竭;结缔组织生长因子;心肌纤维化

Effects of Qili Qiangxin Capsules on Myocardial Fibrosis and Expression of CTGF in Rats with Chronic Heart Failure

ZHANG Li, ZHANG Rui, ZHOU Jian-zhong (Dept. of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 410006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the effects of Qili qiangxin capsule on myocardial fibrosis and expression of connective tissue growth factor (CTGF) in rats with chronic heart failure (CHF). METHODS: CHF model was induced by partially banding abdominal aortic artery. Model rats were divided into sham-operation group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), enalapril group (10 mg/kg), Qili qiangxin capsule high-dose, medium-dose and low-dose groups (1, 0.5, 0.25 mg/kg). They were given medicine once a day for consecutive 4 weeks. Hemodynamic parameters and left ventricular weight index (LVMI) were detected, Picric-Sirius Red (PSR) Polarimetry was used to observe collagen morphology in left ventricular interstitial tissue, measure collagen volume fraction (CVF); the expression of CTGF in left ventricular tissue was evaluated by immunohistochemical staining and Western blot analysis. RESULTS: Compared with model group, LVMI, CVF and CTGF protein expression of Qili qiangxin capsule high-dose, medium-dose and low-dose groups decreased significantly ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). LVEDP, I CVF/III CVF of high-dose and medium-dose groups decreased significantly ($P < 0.01$); $-dp/dt_{max}$ increased significantly ($P < 0.05$); pathological morphology was improved. $+dp/dt_{max}$ of high-dose group increased significantly ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). CONCLUSIONS: Qiliqiangxin capsule attenuates ventricular hypertrophy in CHF rats, inhibits MF and improves cardiac function, which is dependent on its effect on expressions of CTGF in left ventricular tissue.

KEY WORDS Qili qiangxin capsule; Chronic heart failure; Connective tissue growth factor; Myocardial fibrosis

- inhibits T cell autoimmunity and the development of inflammatory responses in a mouse type 1 diabetes model [J]. *J Immunol*, 2004, 173(8):5 298.
- [10] 邵福源, 王宇奔. 分子神经药理学[M]. 1版. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 200.
- [11] Licata SC, Rowlett JK. Abuse and dependence liability of benzodiazepine-type drugs: GABA_A receptor modulation and beyond[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2008, 90(1): 74.
- [12] Liu J, Chen T, Norris T, et al. A high-throughput functional assay for characterization of γ -aminobutyric acid (A) channel modulators using cryopreserved transiently transfected cells[J]. *Assay Drug Dev Techn*, 2008, 6(6): 781.
- [13] Byrnes EM, Lee JO, Bridges RS. Alterations in GABA (A) receptor alpha2 subunit mRNA expression following reproductive experience in rats[J]. *Neuroendocrinology*, 2007, 85(3):148.
- [14] Tasan RO, Bukovac A, Peterschmitt YN, et al. Altered GABA transmission in a mouse model of increased trait anxiety[J]. *Neuroscience*, 2011, 183(7):71.
- [15] Gu Y, Ma Y, Wang M, et al. The effects of pinellia total alkaloids on the amino acid concentration and the GABA_A receptor expression in hippocampus region of epileptic rats [J]. *J Chin Pharmaceu Sci*, 2009, 18(3):252.

(收稿日期:2012-07-02 修回日期:2012-11-09)

* 硕士研究生。研究方向:心力衰竭的作用机制和药物治疗。电话:023-89011595。E-mail:569667123@qq.com

通信作者:主任医师,教授,硕士研究生导师。研究方向:心力衰竭的作用机制和药物治疗。E-mail:1115155663@qq.com