

## 芍药苷对血虚肝郁证大鼠海马 CA1 区 sGCβ1 和 5 种 PDE 亚型蛋白表达的影响

王景霞 周恬恬 朱映黎 王成龙 吴丽 张建军

**【摘要】 目的** 研究芍药苷对血虚肝郁证大鼠海马环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)含量及 CA1 区 cGMP 合成酶即可溶性鸟苷酸环化酶(soluble guanylyl cyclaseβ1, sGCβ1)和水解酶即磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)不同亚型(PDE1A、PDE2A、PDE5A、PDE9A、PDE10A)蛋白表达的干预作用。**方法** 56 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、芍药苷高剂量组、芍药苷低剂量组,每组 14 只。采用辐射结合束缚法建立血虚肝郁证模型,空白组、模型组灌胃等量蒸馏水,给药组分别灌以 40 mg/kg、20 mg/kg 的芍药苷,共造模 21 天。治疗结束后,采用放射免疫法测定 cGMP 含量;免疫组化法检测 sGCβ1、PDE1A、PDE2A、PDE5A、PDE9A、PDE10A 的蛋白表达。**结果** 与模型组相比,芍药苷高剂量组可降低 cGMP 含量( $P<0.01$ ),并下调 PDE1A、PDE2A、PDE5A、PDE9A 的蛋白表达( $P<0.05$ ),且上调 PDE10A 的蛋白表达( $P<0.05$ )。**结论** 芍药苷对于 cGMP 水解酶不同亚型存在双向调控,与抑制合成酶发挥协同作用,降低 cGMP 的含量,下调 NO/cGMP 通路,从而改善血虚肝郁证引起的大脑功能损伤。

**【关键词】** 血虚肝郁证; 芍药苷; 环磷酸鸟苷; 磷酸二酯酶; 可溶性鸟苷酸环化酶

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.07.004

**Effects of paeoniflorin on the expression of SGCβ1, different subtypes of PDE in the hippocampus CA1 Zone of rats with blood deficiency and liver depression syndrome** WANG Jing-xia, ZHOU Tian-tian, ZHU Ying-li, et al. School of Basic Medical Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: ZHANG Jian-jun, E-mail: zhangjianjun@bucm.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To observe the influence of paeoniflorin on the content of cGMP and the protein expressions of cGMP synthase namely SGCβ1 and hydrolases PDE1A, PDE2A, PDE5A, PDE9A, PDE10A in the hippocampus CA1 zone of rats with blood deficiency and liver depression syndrome. **Methods** The rat model was established by chronic restraint stress combined with irradiation. From the 1st day of modeling, the normal and model group was treated with same amount of distill water, the treatment group were given corresponding medicines. On the 21th day of modeling, the brain tissue and hippocampus were removed. The content of cGMP was detected by RIA. IHC was used to observe the protein expressions of sGCβ1, PDE1A, PDE2A, PDE5A, PDE9A and PDE10A. **Results** Compared with the model group, the content of cGMP in the dose of 40mg/kg Paeoniflorin was reduced ( $P<0.01$ ) and the protein expressions of PDE1, PDE2A, PDE5A, PDE9A were reduced ( $P<0.05$ ), and the protein expressions of PDE10A were increased significantly ( $P<0.05$ ). **Conclusions** Paeoniflorin could play a role of dual-directional regulation effects on the activities of different subtypes of hydrolases, which give

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81173569)

作者单位: 100029 北京中医药大学基础医学院中药教研室[王景霞、周恬恬(硕士研究生)、朱映黎(博士研究生)、王成龙(硕士研究生)、吴丽(硕士研究生)、张建军]

作者简介: 王景霞(1976-),女,博士,副教授,硕士生导师。研究方向:中药药性基本理论。E-mail: wjx117@sohu.com

通讯作者: 张建军(1965-),博士,研究员,博士生导师。研究方向:基于中药基本理论的药效机理及物质基础研究。E-mail: zhangjianjun@bucm.edu.cn

play to synergistic effect with the inhibition of synthase, and comprehensively reduce the content of cGMP to relieve the brain damage of the blood deficiency and liver depression syndrome.

**【Key words】** Blood deficiency and liver depression syndrome; Paeoniflorin; Cyclic guanosine monophosphate; Phosphodiesterase; Soluble guanylyl cyclase  $\beta 1$

白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia Lactiflora* Pall. 的根,首载于《神农本草经》,苦酸微寒,归肝脾经,功能养血敛阴,柔肝止痛,平抑肝阳,是临床治疗血虚肝郁证的常用药物<sup>[1]</sup>。芍药苷是白芍的主要有效成分,课题组前期研究表明其对血虚肝郁证候模型大鼠功能损伤确有改善作用<sup>[2]</sup>,并发现其作用机制可能与调节环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)的合成和水解有关<sup>[3-4]</sup>,但具体作用靶点尚不明确。由于影响 cGMP 水解的磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)存在多种亚型<sup>[5]</sup>,其中 PDE1、PDE2、PDE10 作为针对 cGMP 和 cAMP 两种底物的水解酶类,又存在着对于 cGMP 含量调节的不一致<sup>[6]</sup>。故本实验通过观察芍药苷对血虚肝郁模型大鼠海马 cGMP 含量及 CA1 区 cGMP 合成酶即可溶性鸟苷酸环化酶(soluble guanylyl cyclase  $\beta 1$ , sGC $\beta 1$ )和水解酶即磷酸二酯酶各亚型 PDE1A、PDE2A、PDE5A、PDE9A、PDE10A 蛋白表达的干预作用,探讨 cGMP 与血虚肝郁证的内在联系,以及芍药苷影响模型大鼠海马 cGMP 动态平衡的高效靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠 56 只,清洁级,体质量 180~200 g,由斯贝福(北京)实验动物技术有限公司提供,动物许可证编号:SCXK(京)2011-0004。

### 1.2 实验药品

芍药苷:自制,经白芍饮片提取分离精制而成, HPLC 法测定纯度高达 96%;白芍饮片购自安徽亳州,由北京中医药大学基础医学院中药教研室鉴定。

### 1.3 试剂与仪器

鸟苷酸环化酶测试盒(北京华英生物技术研究); ab24824 兔抗大鼠 sGC $\beta 1$ (批号:GR89594-9,购自 Abcam 公司); ab14599 兔抗大鼠 PDE1A(批号:GR86777-8,购自 Abcam 公司); ab125677 兔抗大鼠 PDE2A(批号:GR9115-4,购自 Abcam 公司); ab14672 兔抗大鼠 PDE5A(批号:GR69387-5,购自 Abcam 公司); ab125672 兔抗大鼠 PDE9A(批号:GR168578-1,购自 Abcam 公司); ab177933 兔抗大鼠 PDE10(批号:GR141519-3,购自 Abcam 公司);

abSV0002-兔 IgG 两步法免疫组化试剂盒(批号:08CD4A,购自武汉博士德公司生物工程有限公司); DAB 试剂盒(批号:1309170031,购自福州迈新生物技术开发有限公司)。

### 1.4 分组和给药

雄性 SD 大鼠 56 只,随机分为空白组、模型组、芍药苷低剂量组(20 mg/kg)和芍药苷高剂量组(40 mg/kg)分别相当于白芍饮片的 1 g/kg、2 g/kg,每组 14 只。从造模第 1 天开始给药,正常组和模型组灌胃等量蒸馏水,其余各组灌胃相应药物,共造模 21 天。

### 1.5 造模方法

大鼠常规单笼饲养适应数天后称重。除正常组外,其余各组每天不定时束缚 3 小时,于束缚第 7 天,采用<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 放射源全身辐照 1 次,剂量为 3.5 Gy,剂量率为 191.55 cGy/min,辐照距离 4 m。辐照后,各组大鼠继续单笼饲养,模型组每天不定时束缚 3 小时,连续 14 天<sup>[7]</sup>。

### 1.6 放射免疫法检测 cGMP 含量

于造模结束后第 2 天,动物断头取海马组织,匀浆后加入 2 mL 无水乙醇离心,取上清;用 75% 乙醇洗沉淀,匀浆后再离心;去上清,于 60℃ 烤箱烘干备用。按试剂盒操作,测定大鼠海马组织中 cGMP 含量。以全自动放射免疫- $\gamma$ -计数器测定沉淀组织中每分钟的放射性脉冲数,并采用 Log-Logic 数学模型拟合标准曲线,由计算机读出测定值。

### 1.7 免疫组化法测定芍药苷对血虚肝郁证大鼠 sGC $\beta 1$ 及 5 种 PDE 亚型蛋白表达的影响

于造模结束后第 2 天,各组取 7 只大鼠,用生理盐水和多聚甲醛进行心脏灌注固定;取大鼠脑组织置于 4% 多聚甲醛溶液中 4℃ 固定 24 小时后,石蜡包埋切片。经常规脱蜡处理后,置于 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 分钟灭活内源性酶,浸入 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液热修复 10 分钟;滴加 5% BSA 封闭液,37℃ 滴加一抗,4℃ 过夜,滴加聚合 HRP 标记抗兔 IgG (SV-0002)。以上各步之间除 5% BSA 封闭液外均用 0.1 mol/L PBS 洗 3 次,每次 3 分钟。使用 DAB 显色试剂盒室温显色,蒸馏水充分洗涤,苏木精复染;脱水封片。用 Nikon 4500 数码相机和 Nikon

E200 型显微镜组合拍摄图像,Image pro Plus 6.0 图像分析系统进行图像分析。每组随机测试 5 张切片,每张切片测试一个视野,测定光密度(intergralopt density,IOD)。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件统计分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,各组数据经正态检验后,均符合正态分布,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),方差齐时,用 Dunnett 检验法,方差不齐时用 Tamhane's T2 检验法。组间多重比较采用 LSD 检验法。 $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 芍药苷对海马组织 cGMP 含量的影响

经过 21 天的复合造模,模型组大鼠脑中第二信使发生了较大改变。与空白组相比,海马组织 cGMP 含量显著升高( $P<0.01$ );与模型组相比,给予高剂量芍药苷能降低 cGMP 含量,差异显著( $P<0.01$ )。见表 1。

2.2 芍药苷对海马 CA1 区 sGCβ1 及 5 种 PDE 亚型蛋白表达的影响

经过 21 天的复合造模,模型组大鼠海马中 cGMP 合成酶与水解酶都发生了变化,其中 sGCβ1 蛋白表达较空白组有所升高,但差异无统计学意义;与空白组相比,PDE1A、PDE2A、PDE5A、PDE9A 蛋白表达显著升高( $P<0.05$ ),PDE10A 蛋白表达显著降低( $P<0.05$ )。

表 1 各组大鼠海马组织 cGMP 的含量( $\bar{x}\pm s,n=7$ )

组别	cGMP
空白组	8.63±0.10
模型组	9.53±0.21 <sup>a</sup>
芍药苷低剂量组	9.28±0.51
芍药苷高剂量组	8.69±0.20 <sup>b</sup>

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

与模型组相比,给予低剂量芍药苷有降低 sGCβ1 和 PDE1A 蛋白表达的趋势,但无统计学差异;并能显著降低 PDE2A、PDE5A、PDE9A 蛋白的表达( $P<0.05$ ),升高 PDE10A 蛋白的表达( $P<0.05$ )。

与模型组相比,给予高剂量芍药苷可以降低 sGCβ1 蛋白的表达,并能够降低 PDE1A、PDE2A、PDE5A、PDE9A 蛋白表达( $P<0.05$ ),升高 PDE10A 蛋白的表达( $P<0.05$ )。见表 2,图 1~6。

表 2 各组大鼠海马组织 sGCβ1、PDE1A、PDE2A、PDE5A、PDE9A、PDE10A 积分光密度( $\bar{x}\pm s,n=7$ )

组别	sGCβ1	PDE1A	PDE2A	PDE5A	PDE9A	PDE10A
空白组	1551.64±299.64	1098.36±165.30	4598.90±669.94	3021.33±659.61	2786.88±456.03	5451.54±563.91
模型组	2142.28±169.18	2102.00±290.74 <sup>b</sup>	7324.37±280.75 <sup>b</sup>	6048.61±1203.20 <sup>a</sup>	5753.97±803.02 <sup>b</sup>	3475.50±523.48 <sup>a</sup>
芍药苷低剂量组	1836.90±216.52	1472.06±199.72	4817.96±563.65 <sup>d</sup>	3452.96±729.98 <sup>c</sup>	3577.36±435.41 <sup>c</sup>	5355.05±450.18 <sup>c</sup>
芍药苷高剂量组	1660.19±140.62	1282.94±206.55 <sup>c</sup>	4820.34±672.96 <sup>d</sup>	3154.77±621.76 <sup>c</sup>	2914.46±743.69 <sup>d</sup>	5318.86±712.30 <sup>c</sup>

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ ,<sup>d</sup> $P<0.01$ 。

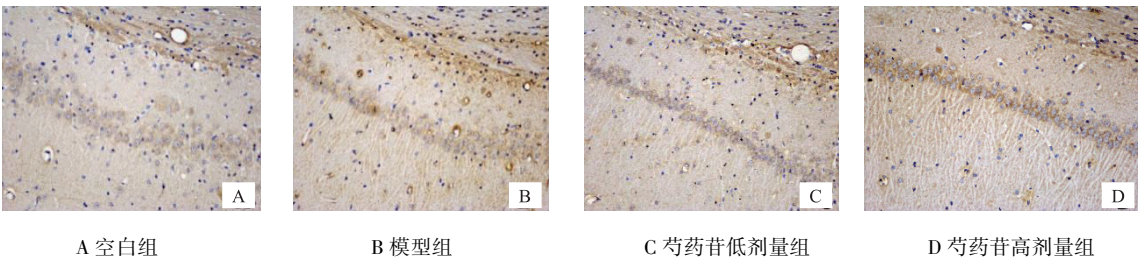


图 1 各组大鼠海马 CA1 区 sGCβ1 表达的影响(IHC ×200)

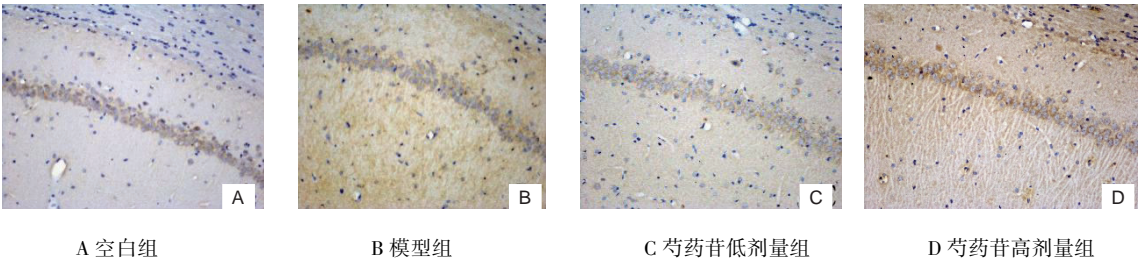
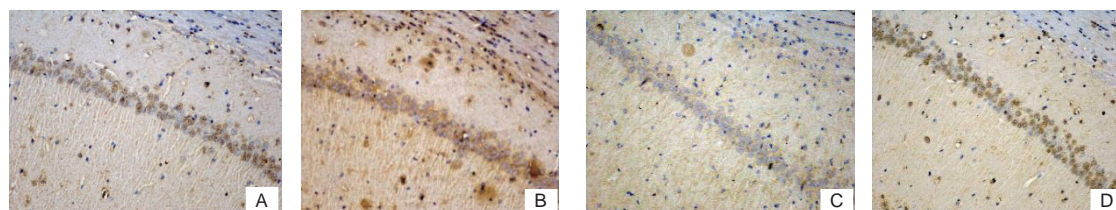


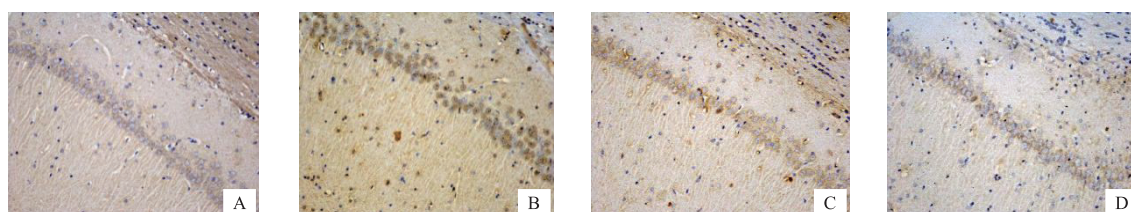
图 2 各组大鼠海马 CA1 区 PDE1 表达的影响(IHC ×200)





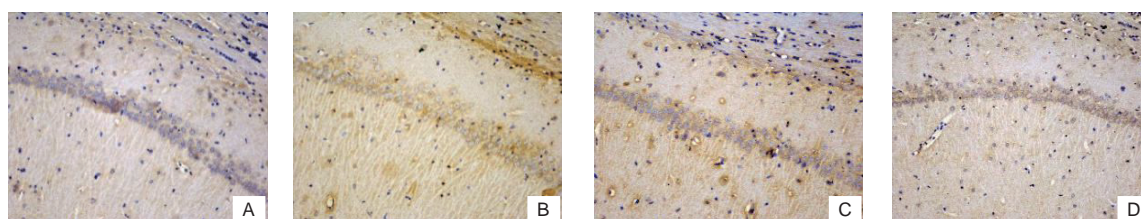
A 空白组 B 模型组 C 芍药苷低剂量组 D 芍药苷高剂量组

图 3 各组大鼠海马 CA1 区 PDE2 表达的影响(IHC ×200)



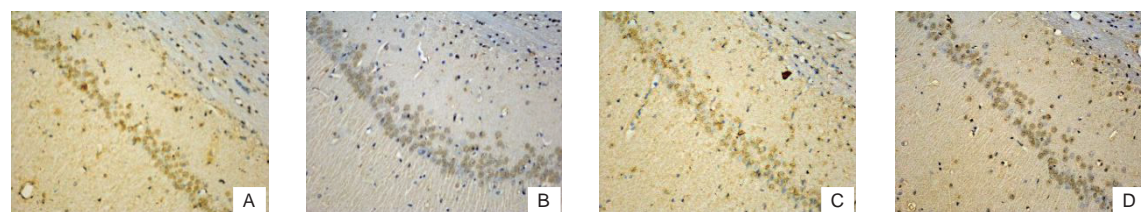
A 空白组 B 模型组 C 芍药苷低剂量组 D 芍药苷高剂量组

图 4 各组大鼠海马 CA1 区 PDE5 表达的影响(IHC ×200)



A 空白组 B 模型组 C 芍药苷低剂量组 D 芍药苷高剂量组

图 5 各组大鼠海马 CA1 区 PDE9 表达的影响(IHC ×200)



A 空白组 B 模型组 C 芍药苷低剂量组 D 芍药苷高剂量组

图 6 各组大鼠海马 CA1 区 PDE10 表达的影响(IHC ×200)

### 3 讨论

血虚肝郁证常见于现代医学的慢性心理应激引起的多种疾病<sup>[8]</sup>。而“肝主疏泄”和“肝主藏血”的功能可维持和促进全身气血的正常运行,调适各脏器对应激的反应。由于肝体阴而用阳,喜柔而恶刚,所以治疗当养血柔肝,以柔制刚,顺应肝的条达之性<sup>[9]</sup>。因此,养血柔肝也是中医抗慢性应激常采用的治疗法则。辐照结合束缚应激建立的血虚肝郁证候模型,形成了强烈的刺激,使得模型大鼠处于持续应激状态,必将导致大脑功能结构的异常。

慢性应激中信号通路失调,抗应激作用与脑中功能异常的 NO/cGMP 信号通路的正常化有关<sup>[10]</sup>。而 cGMP 作为新的信使分子,通过激活下游效应分子

cGMP 依赖性蛋白激酶、环核苷酸门控离子通道和磷酸二酯酶的合成来发挥多种生物效应,影响丝氨酸/苏氨酸磷酸化<sup>[11]</sup>,影响信号转导<sup>[12]</sup>,以及细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度,介导细胞效应<sup>[13]</sup>。前期研究结果表明<sup>[3]</sup>,芍药苷可以对抗应激产生的海马区谷氨酸 (glutamic acid, Glu) 和 NO 含量的升高,从而下调 NO/cGMP 信号通路,本实验通过测定海马组织 cGMP 含量,也验证了芍药苷对 cGMP 水平的下调作用。

现代研究表明, sGC 作为 NO 的受体及 cGMP 合成酶, sGC 的活化、失活以及脱敏对于 NO 信号通路非常重要<sup>[14]</sup>。NO 与 sGC 结合后会激活 sGC 的催化活性,即催化 GTP 转化为 cGMP。因此,以 sGC 为靶标的疾病治疗手段可以消除过多 NO 细胞毒性及 NO 耐受性的缺陷<sup>[15]</sup>, sGC 抑制剂 ODQ 可下调

NO/cGMP 通路,增强 4 mg/kg(亚有效剂量)芍药苷的作用<sup>[16]</sup>。本实验结果表明,芍药苷能显著减少 sGCβ1 的蛋白表达,说明芍药苷能通过发挥 sGC 抑制剂样作用,直接影响合成酶活性,导致 cGMP 生成减少。而由于 cGMP 参与调解抑郁焦虑与学习障碍等中枢神经系统疾病,它的含量是由合成酶和水解酶共同调控的,磷酸二酯酶 PDE5、PDE9 特异性水解 cGMP, PDE1、PDE2、PDE10 能同时水解环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)和 cGMP<sup>[17]</sup>。研究表明,PDE5 和 PDE9 的抑制剂被认为是改善记忆和增加神经发生的候选药,并且二者表达和活性的增强影响 cGMP 浓度的下降<sup>[18-19]</sup>。而 PDE1 和 PDE2 作为双重底物酶,对 cGMP 和 cAMP 含量的影响并不一致;PDE2 抑制剂可以选择性提高兴奋性突触 cGMP 水平,并提高突出可塑性和记忆功能<sup>[20]</sup>。本实验结果显示,给予芍药苷后能显著下调 PDE5、PDE9 的表达,降低 PDE1 和 PDE2 的表达,升高 PDE10 的表达。另一方面,由于 PDE2 抑制剂具有增加 NO 活性、反馈调节 NO/cGMP 通路、增加 cGMP 含量的作用<sup>[21]</sup>,而芍药苷所引起的 PDE10 的上调又对抗了由于 PDE 抑制剂样作用反馈引起的 cGMP 的合成,所以推测芍药苷是通过作用于多个靶点,相互影响,从而发挥最终的调节效应。

综上,芍药苷对于血虚肝郁证的干预作用可能是参与了 NO/cGMP 通路中影响 cGMP 含量的多个环节,不仅通过降低 sGC 含量进一步下调 NO,还对 PDE 不同亚型存在双向调节的功能,综合抵抗机体应激引起的 cGMP 的升高,发挥神经保护作用。芍药苷针对 sGC 和 PDE10 等高效靶标的调控作用,有可能就是揭示白芍养血柔肝解郁的作用特点和优势的重要环节。但是,作为共同参与情志调节,影响神经细胞兴奋性的 cAMP,也能被 PDE 水解,芍药苷对 PDE 不同亚型的影响是否同时参与了 cAMP 含量的调节,cAMP 与 cGMP 是否存在动态平衡,两条通路间是否存在共同的高效靶点,还需要进一步深入的研究。

### 参 考 文 献

- [1] 高学敏,钟赣生. 临床中医学[M]. 石家庄:河北科学技术出版社, 2006:906.
- [2] 李艳霞,张建军,王景霞,等. 芍药苷对血虚肝郁证大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴和单胺类神经递质的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(8):2591-2595.
- [3] 王景霞,张建军,屈胜胜,等. 芍药苷对血虚肝郁证候模型大鼠海马 CA3 区组织形态及一氧化氮通路的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(2):85-88, 145.
- [4] 朱映黎,张建军,王景霞,等. 芍药苷对血虚肝郁证模型大鼠海马 cGMP 含量及其合成与水解酶的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(3):818-820.
- [5] 陈玲,徐英,潘建春. 磷酸二酯酶参与认知与情绪调节的研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(3):357-362.
- [6] 杨菊. 磷酸二酯酶及其抑制剂的研究现状[J]. 中国厂矿医学, 2009, 22(2):216-218.
- [7] 张建军,李艳霞,王景霞,等. 辐照结合束缚应激致血虚肝郁大鼠证候模型的建立[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(7):2176-2179.
- [8] 赖永德,金红波. 探讨血虚肝郁与抑郁症的发生[J]. 四川中医, 2009, (2):30-31.
- [9] 李峰,杨维益,梁嵘,等. 从中医学看肝脏调节应激反应的作用[J]. 北京中医药大学学报, 1998, 21(1):20-22, 72.
- [10] Reiersen GW, Mastronardi XA, Licinio J, et al. Repeated antidepressant therapy increase cyclic GMP signaling in rat hippocampus[J]. Neurosci Lett, 2009, 466(3):149-153.
- [11] Revelli A, Ghigo D, Moffa F, et al. Guanylate cyclase activity and sperm function[J]. Endocr Rev, 2002, 23(4):484-494.
- [12] Schlossmann J, Feil R, Hofmann F. Insights into cGMP signalling derived from cGMP kinase knockout mice[J]. Front Biosci, 2005, 21(10):1279-1289.
- [13] Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use[J]. Pharmacol Rev, 2006, 58(3):488-520.
- [14] 陈尧,黄东晖. GC/cGMP 信号转导途径在雄性生殖作用的研究进展[J]. 生殖与避孕, 2013, 33(12):842-848.
- [15] 潘洁,钟方芳,王红艳,等. 可溶性鸟苷酸环化酶介导 NO 信号转导的结构基础及其分子机制研究[J]. 中国科学:化学, 2014, 44(4):572-585.
- [16] 王景霞,张建军,李伟,等. 芍药苷抗抑郁作用与 NO/cGMP 通路相关性研究[J]. 中药与临床, 2012, 3(1):27-28, 37.
- [17] 陈昌亮,黄爽. 磷酸二酯酶及其抑制剂的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(2):283-286.
- [18] Puzzo D, Staniszewski A, Deng SX, et al. Phosphodiesterase 5 inhibition improves synaptic function, memory, and amyloid-beta load in an Alzheimer's disease mouse model[J]. J Neurosci, 2009, 29(25):8075-8086.
- [19] 李杰,陈浩,陈国良. 磷酸二酯酶 9 及其抑制剂的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(5):409-414.
- [20] 陈玲,徐英,潘建春. 磷酸二酯酶参与认知与情绪调节的研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(3):357-362.
- [21] Boess FG, Hendrix M, Van der Staay FJ, et al. Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP synaptic plasticity and memory performance[J]. Neuropsychopharmacology, 2004, 47(7):1081-1092.

(收稿日期: 2015-10-21)

(本文编辑: 韩虹娟)