

乌灵胶囊对抑郁大鼠脑组织中乙酰化 H3 及 5-HTT、TH 表达的影响

黎功炳¹ 雷 宁² 覃树勇¹ 龙 军^{1△} 陈德书¹ 易 伟¹

(1 重庆市大足区妇幼保健院 重庆 402360 2 成都理工大学材料与化学化工学院化工与制药系 四川 成都 610059)

摘要 目的 观察乌灵胶囊对抑郁大鼠脑组织中乙酰化组蛋白 H3 及 5-羟色胺受体(5-HTT)、酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)表达的影响。方法 SD 大鼠随机分为对照组、模型组及乌灵胶囊低、高剂量组。取大鼠脑组织,分别采用实时荧光定量 PCR 法和 western blot 法检测脑组织中乙酰化组蛋白 H3、组蛋白 H3、5-HTT、TH 蛋白和 mRNA 的表达。结果 乌灵胶囊明显增强大鼠脑组织中乙酰化组蛋白比例和 5-HTT、TH 蛋白和 mRNA 的表达($P<0.05$)。结论 乌灵胶囊治疗抑郁症的机制可能与升高脑组织乙酰化组蛋白含量,从而促进 5-HTT、TH 的表达有关。

关键词 抑郁 5-HTT;TPH 乌灵胶囊 组蛋白 H3

中图分类号 Q95-3 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 19-3642-03

The Effect of Wuling Capsule on the Expression of Acetyl Histone H3, 5-HTT and TH in the Brain Tissue of Depressed Rats

LI Gong-bing¹, LEI Ning², QIN Shu-yong¹, LONG Jun^{1△}, CHEN De-shu¹, YI Wei¹

(1 Maternal and Child Care Service Centre of Dazu county, Chongqing, 402360;

2 Department of Chemical & Pharmaceutical Engineering, College of Material and Chemistry and Chemical Engineering, Chengdu University of Technology, Sichuan, Chengdu 610059, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effect of Wuling capsule on the expression of acetyl histone H3, 5-HTT and TH in the brain tissue of depressed rats. **Methods:** Rats were divide into control, model and two doses groups of Wuling capsule. Contents of acetyl histone H3, histone H3, 5-HTT and TH mRNA and protein in he brain tissue of depressed rats were measured by realtime RT-PCR and western blot methods, respectively. **Results:** Wuling capsule could increase the expression of acetyl histone H3, 5-HTT and TH mRNA and protein in the brain tissue of depressed rats. **Conclusion:** Wuling capsule could cure athymia, this maybe concerned with its effect on acetyl histone H3, 5-HTT and TH expression.

Key words: Athymia; 5-HTT; TPH; Wuling capsule; Histone H3

Chinese Library Classification: Q95-3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2012) 19-3642-03

抑郁症是以显著而持久的抑郁情感或心境改变为主要特征,是与应激密切相关的一类精神疾病^[1]。近年来,随着社会竞争的日益加剧,在日常生活、学习和工作中,人们承受的生理、心理压力越来越大,抑郁症的发病率呈逐年上升趋势。现代医学治疗抑郁症虽然已取得较为可靠的疗效,但仍然存在着副作用大、价格昂贵等诸多缺点,并不能完全满足临床的需求。随着中医界对抑郁症认识的不断深入,近年来中医治疗抑郁症在临床上已经取得了较大的发展,收到很好的治疗效果,乌灵胶囊已经广泛应用于临床治疗抑郁症,并取得很好疗效^[2,3],本实验拟对其治疗抑郁症的机制进行深入探讨,为临床合理用药提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与药物

乌灵胶囊:浙江佐力药业有限公司(国药准字

Z19990048),总 RNA 提取试剂盒\逆转录-聚合酶链反应试剂盒购自 Takara 公司,5-HTT、TH、H3、乙酰化 H3 一抗(millipore 公司),二抗购自北京中杉公司。

1.2 动物

SD 大鼠 24 只,重 180~220 g,雄性,由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供。

1.3 仪器

微量核酸定量仪(eppendoff 公司),实时定量 PCR 仪(ABI 公司),凝胶成像系统(Bio-RAD 公司)。

1.4 方法

1.4.1 实验分组及模型制备 分组 24 只 SD 大鼠分为对照组、乌灵胶囊低高剂量组(分别给予乌灵胶囊 40 mg、80 mg,溶于 1 mL 双蒸水灌胃,1 次/天)、模型组(给予等量双蒸水灌胃,1 次/天),每组 6 只动物。模型制备 正常对照组不接受任何刺激,其余各组接受 7 种(电击足底、冰水游泳、倾斜鼠笼潮湿饲养、昼夜颠倒、禁水、禁食)不同的刺激,每天一种,周而复始。具体方法:电击足底(36V 交流电,每隔 1min 刺激 1 次,每次刺激 10s,共 30 次)、冰水游泳(4℃,5 min)。连续刺激 21 天,21 天后处死取脑组织。

1.4.2 总 RNA 的提取及荧光定量逆转录聚合酶链反应 取

作者简介 黎功炳(1965),副主任医师,电话:13500360827,

E-mail 290797831@qq.com

△通讯作者 龙军,主治医师,电话:13500360827,

E-mail 290797831@qq.com

(收稿日期 2012-02-16 接受日期 2012-03-13)

50~100mg 脑组织,加入 1mL Trizol,匀浆器研磨成匀浆后,室温静置 5 min,加入 0.2 mL 氯仿,摇匀,室温静置 10 min,4℃ 10000 rpm 离心 15 min,将上层水相转移至新的离心管中,加入等体积的异丙醇,摇匀,室温静置 10min 后 4℃ 10000 rpm 离心 10 min,弃上清,1mL 75%乙醇清洗 1 次后 7500 rpm 离心 5 min,将 RNA 沉淀晾干,用 40 μL 无 RNA 酶去离子水溶解。逆转录按试剂盒说明书进行。荧光定量聚合酶链反应参见试剂盒说明书:1 μL cDNA 样本 2 min;随后 94℃ 30 s,退火温度 60℃ 30 s,72℃ 45s,共 40 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。采用 "primer premier 5.0" 软件设计引物,引物由上海生工生物技术有限公司合成。引物 GAPDH 上游:5' AAGTTCAACGGCAGACAG TCAA 3',GAPDH 下游:5' TCCACGACATACTCAGCACC 3' 产物长度:128bp,退火温度:60℃;5-HTT 上游:5' ATCCGACCACTTCTTTCCG 3',5-HTT 下游:5' TTCATCCCTCCTTCACTCC 3',产物长度:106bp,退火温度:60℃;TH 上游:5' GACGCGCAGACAGTCTCAT 3',TH 下游:5' AGAACAGCATTCCCATCCCT 3',产物长度:143 bp,退火温度:60℃。

1.4.3 western blot (I) 蛋白抽提 取 5~10×10⁵ 个细胞,吸取

100 μL 蛋白裂解液加入到细胞内,4℃ 旋转 15 分钟。12000 rpm 离心 10 min,吸上清。(2) Western blot 蛋白上样后 80 V 电泳 2 h,100 V 恒压湿转 1 h,转膜结束后 5%脱脂奶粉封闭 30 分钟,根据抗体的稀释比将相应的一抗加入 5%脱脂奶粉中,用封膜带封好后放入 4℃ 冰箱过夜。TBST 洗膜,3 遍,每次 10 min。然后加入二抗,二抗的稀释比一般为 1:3000,方法和加一抗相同,封好口后放室温 40-50 min。TBST 洗膜,同一抗。显影液显影,凝胶成像仪获取图像。

1.4.4 统计学方法 所有数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,应用 SPSS 11.0 对数据进行统计学处理,统计学方法采用卡方检验,当 P<0.05 时认为有统计学意义。

2 结果

2.1 乌灵胶囊对抑郁大鼠脑组织中 H3、乙酰化 H3 蛋白的影响

本实验采用 realtime RT-PCR 方法测定了脑组织中 H3、乙酰化 H3 蛋白的含量,结果如表 1、图 1 所示。抑郁大鼠脑组织中乙酰化 H3/H3 明显下降,给予乌灵胶囊后,抑郁大鼠脑组织中乙酰化 H3/H3 明显增加 (P<0.05)。

表 1 乌灵胶囊对抑郁大鼠脑组织中乙酰化 H3/H3 的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=6)

Table 1 The effect of Wuling capsule on the expression of acetyl histone H3/ histone H3 in depressed rats

Group	Histone H3	Acetyl histone H3	Acetyl Histone / histone H3
Model	785.24± 116.52	183.25± 26.15	0.24± 0.052
Control	659.28± 124.36	462.13± 73.52	0.70± 0.13
Wuling capsul (40mg/kg)	764.52± 134.85	257.84± 45.31	0.34± 0.065*
Wuling capsul (80mg/kg)	795.63± 152.64	325.68± 58.24	0.41± 0.083**

Note:* P<0.05,**P<0.01 vs model group.

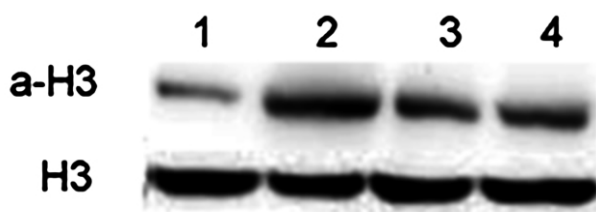


图 1 抑郁大鼠脑组织中乙酰化 H3/H3 的表达

1. 模型组,2. 正常对照组,3. 乌灵胶囊 40mg/kg 组 4. 乌灵胶囊 80mg/kg 组

Fig. 1 The expression of acetyl histone H3/ histone H3 in depressed rats

1. model group 2. control group 3. wuling capsule(40mg/kg) group 4. wuling capsule(80mg/kg) group

2.2 乌灵胶囊对抑郁大鼠脑组织中 TH、5-HTT mRNA 的影响

本实验采用 realtime RT-PCR 方法测定了脑组织中 TH 和 5-HTT mRNA 的含量,结果如表 2、图 2 所示。抑郁大鼠脑组织中 TH 和 5-HTT mRNA 表达明显下降,给予乌灵胶囊后,抑郁大鼠脑组织中 TH 和 5-HTT mRNA 表达明显增加 (P<0.05)。

2.3 乌灵胶囊对抑郁大鼠脑组织中 TH、5-HTT 蛋白的影响

本实验采用 realtime RT-PCR 方法测定了脑组织中 TH 和 5-HTT 蛋白的含量,结果如表 3、图 2 所示。抑郁大鼠脑组织中 TH 和 5-HTT 蛋白表达明显下降,给予乌灵胶囊后,抑郁大鼠

脑组织中 TH 和 5-HTT 蛋白表达明显增加 (P<0.05, P<0.01)。

3 讨论

5-羟色胺 (5-HT) 是单胺类中枢神经递质,在脑神经细胞内生物合成,而且具有一定的储存、释放、与受体结合、灭活的过程。任何一个环节出现问题,都可能会导致 5-HT 系统的功能失调,引起疾病发生,尤其是精神疾病的发生^[4,5]。5-羟色胺神经元位于脑干中缝的几组核团,但其发出的投射纤维可分布于大脑皮质、皮质下区、小脑、脑干及脊髓等广大部位。5-HT 能被 5-羟色胺转运体 (5-HTT) 转运入突触前神经元进行再利用,5-HTT 功能障碍会影响 5-HT 的重摄取,导致疾病的发生^[6,7]。酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 是儿茶酚胺 (多巴胺、去甲肾上腺素和肾上腺素) 合成的限速酶。酪氨酸羟化酶表达下降则可直接引起儿茶酚胺合成下降,促进抑郁症的发生、发展^[8,9]。

组蛋白修饰的改变属于表观遗传学范畴,组蛋白是构成染色质的关键性结构,通过翻译后修饰途径可对其进行甲基化、乙酰化、磷酸化或泛素化等修饰,染色质中各种组蛋白修饰方式共同构成了 "组蛋白密码",它们的综合作用决定了染色质的转录活性^[10,11]。抑郁症的病因学研究由来已久,目前仍无法确切阐述其病理生理学机制,主流观点认为该疾病是遗传和环境因素相互作用的结果。表观遗传学机制的引入在一定程度上拓展了抑郁症病因学研究者的视野,提供了一种解释环境因素影

表 2 乌灵胶囊对抑郁大鼠脑组织中 TH,5-HTT mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=6)

Table 2 The effect of Wuling capsule on the expression of acetyl histone H3/ histone H3 in depressed rats

Group	TH/GAPDH	NE/GAPDH
Model	0.14± 0.019	0.23± 0.034
Control	0.52± 0.092	0.76± 0.13
Wuling capsul (40mg/kg)	0.19± 0.021*	0.28± 0.046*
Wuling capsul (80mg/kg)	0.28± 0.035**	0.42± 0.083**

Note:* P<0.05,** P<0.01 vs model group.

表 3 乌灵胶囊对抑郁大鼠脑组织中 TH,5-HTT 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=6)

Table 3 The effect of Wuling capsule on the expression of 5-HTT and TH in depressed rats

Group	TH/GAPDH	5-HTT/GAPDH
Model	0.085± 0.017	0.047± 0.011
Control	0.92± 0.18	0.95± 0.19
Wuling capsul (40mg/kg)	0.21± 0.045**	0.12± 0.024**
Wuling capsul (80mg/kg)	0.38± 0.063**	0.34± 0.046**

Note:** P<0.01 vs model group.

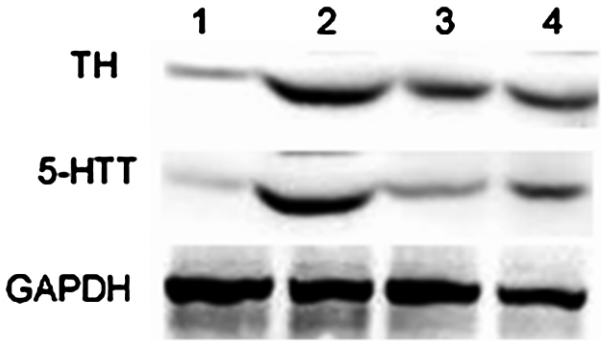


图 2 抑郁大鼠脑组织中乙酰化 5-HTT、TH 的表达

1. 模型组, 2. 正常对照组, 3. 乌灵胶囊 40mg/kg 组 4. 乌灵胶囊 80mg/kg 组

Fig.2 The expression of 5-HTT and TH in depressed rats

1. model group 2. control group 3. wuling capsule(40mg/kg) group 4. wuling capsule(80mg/kg) group

响基因表达的可能机制。现有研究表明,组蛋白 H3 的乙酰化修饰可以促进 5-HTT 和 TH 的表达,从而抑制抑郁症的发展^[12-14]。一般认为抗抑郁剂的主要药理学机制是调节单胺类神经递质系统,目前越来越多的表观遗传学研究的证据对抗抑郁剂药理机制做出了新的诠释。

本实验复制了大鼠抑郁模型深入研究乌灵胶囊抗抑郁的机制,发现,乌灵胶囊能升高大鼠脑组织中乙酰化 H3 的含量,说明乌灵胶囊可调控大鼠的表观遗传,其升高 TH、5-HTT 的含量,抗抑郁作用可能与其调控表观遗传有关,这对其抗抑郁药理作用机制有中药提示作用,其调控表观遗传表达的机制值得进一步深入研究探讨。

参考文献(References)

[1] Agius M, Gardner J, Liu K, et al. An audit to compare discharge rates and suicidality between antidepressant monotherapies prescribed for unipolar depression[J]. Psychiatr Danub,2010,22(2):346-349
[2] 李振, 赵忠新. 乌灵胶囊基础及临床应用研究进展[J]. 中成药,2010,

32(1):120-121

Li Zhen, Zhao Zhong-xin. The research progress of fundament and clinical application of wuling capsule [J]. Chinese Traditional Patent Medicine,2010, 32(1):120-121

[3] 卢燕婉, 吕海东, 秦东香. 乌灵胶囊治疗轻度抑郁症的临床研究[J]. 中成药,2010,32(6):1083-1084
Lu Yan-wan, Lv Hai-dong, Qin Dong-xiang. The clinical research of wuling g capsule curing slight depressive disorder [J]. Chinese Traditional Patent Medicine,2010,32(6):1083-1084
[4] Hodges MR, Richerson GB. The role of medullary serotonin (5-HT) neurons in respiratory control: contributions to eupneic ventilation, CO₂ chemoreception, and thermoregulation [J]. J Appl Physiol,2010, 108(5):1425-1432
[5] Liu FY, Qu XX, Ding X, et al. Decrease in the descending inhibitory 5-HT system in rats with spinal nerve ligation [J]. Brain-Res,2010, 1330(5):45-60
[6] Viisanen H, Pertovaara A. Roles of the rostroventromedial medulla and the spinal 5-HT (1A) receptor in descending antinociception induced by motor cortex stimulation in the neuropathic rat [J]. Neurosci Lett,2010,476(3):133-137
[7] Gerra G, Zaimovic A, Castaldini L, et al. Relevance of perceived childhood neglect, 5-HTT gene variants and hypothalamus-pituitary-adrenal axis dysregulation to substance abuse susceptibility [J]. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2010,153B(3):715-722
[8] Reynolds KB, MacGillivray L, ZettlerM, et al. Role of the dopamine transporter in mediating the neuroleptic-induced reduction of tyrosine hydroxylase-immunoreactive midbrain neurons. Brain Res [J]. 2011, 21(6):1394:24-32
[9] Meza E, Waliszewski SM, Caba M. Circadian nursing induces PER1 protein in neuroendocrine tyrosine hydroxylase neurones in the rabbit doe[J]. J Neuroendocrinol,2011,23(6):472-480

(下转第 3617 页)

E2F1 可能通过对钾离子通道基因的表达调控,实现对相应组织的作用机理影响,相应调控作用的紊乱也将导致心脏、脑或消化系统疾病的发生。

在对 G 蛋白偶联受体与 E2F1 调控研究中,我们也获得了 11 个受 E2F1 调控的 G 蛋白偶联受体基因。但这些基因的表达不具有一致的表达特异性,难以确定 E2F1 对 GPCR 的调控作用效果。

我们的研究从基因组全局性角度出发,在一定程度上表明 E2F1 可以通过对离子通道、G 蛋白偶联受体等重要的跨膜信号转导基因的转录调控,实现对某些组织中相应基因的表达产生影响,从而引起生理和病理机制的改变,对于了解心脏病、脑病,以及消化系统疾病的发生有一定借鉴意义。

参考文献(References)

- [1] Muller H, Bracken AP, Vernell R, et al. E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis[J]. *Genes Dev*,2001,15(3):267-285
- [2] Gaborit N, Le Bouter S, Szuts V, et al. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart[J]. *J Physiol*,2007,582(Pt 2):675-693
- [3] Greener ID, Tellez JO, Dobrzynski H, et al. Ion channel transcript expression at the rabbit atrioventricular conduction axis [J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*,2009,2(3):305-315
- [4] Baldini E, Camerini A, Sgambato A et al. Cyclin A and E2F1 overexpression correlate with reduced disease-free survival in node-negative breast cancer patients[J]. *Anticancer Res*,2006,26(6B): 4415-4421
- [5] Movassagh M, Bicknell KA, Brooks G. Characterisation and regulation of E2F-6 and E2F-6b in the rat heart: a potential target for myocardial regeneration[J]. *J Pharm Pharmacol*,2006,58(1):73-78
- [6] Jiang C, Xuan Z, Zhao F, et al. TRED: a transcriptional regulatory element database, new entries and other development [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007,35(Database issue):137-140
- [7] Patel PD, Bochar DA, Turner DL, et al. Regulation of tryptophan hydroxylase-2 gene expression by a bipartite RE-1 silencer of transcription/neuron restrictive silencing factor (REST/NRSF) binding motif[J]. *J Biol Chem*,2007,282(37):26717-26724
- [8] Rao JN, Neumann L, Wenzel S, et al. Structural studies on the RNA-recognition motif of NELF E, a cellular negative transcription elongation factor involved in the regulation of HIV transcription[J]. *Biochem J*,2006,400(3):449-456
- [9] Harmar AJ, Hills RA, Rosser EM, et al. IUPHAR-DB: the IUPHAR database of G protein-coupled receptors and ion channels [J]. *Nucleic Acids Res*,2009,37(Database issue):680-685
- [10] Tilford CA, Siemers NO: Gene set enrichment analysis[M]. *Methods Mol Biol*,2009,563:99-121
- [11] Wu CH, Apweiler R, Bairoch A, et al. The Universal Protein Resource (UniProt): an expanding universe of protein information[J]. *Nucleic Acids Res*,2006,34(Database issue):D187-191
- [12] Klein H, Vingron M. Using transcription factor binding site co-occurrence to predict regulatory regions[J]. *Genome Inform*,2007,18:109-118
- [13] Qian Z, Lu L, Liu X, et al. An approach to predict transcription factor DNA binding site specificity based upon gene and transcription factor functional categorization[J]. *Bioinformatics*,2007,23(18):2449-2454
- [14] McCall M, Brown T, Hunter WN, et al. The crystal structure of d (GGATGGGAG): an essential part of the binding site for transcription factor IIIA[J]. *Nature*,1986,322(6080):661-664
- [15] Rani TS, Bapi RS. Analysis of n-gram based promoter recognition methods and application to whole genome promoter prediction [J]. *In Silico Biol*,2009, 9(1-2):S1-16
- [16] Wang X, Xuan Z, Zhao X, et al. High-resolution human core-promoter prediction with CoreBoost_HM[J]. *Genome Res*,2009,19(2):266-275
- [17] Westholm JO, Xu F, Ronne H, et al. Genome-scale study of the importance of binding site context for transcription factor binding and gene regulation[J]. *BMC Bioinformatics*,2008,9:484
- [18] Berman BP, Nibu Y, Pfeiffer BD, et al. Exploiting transcription factor binding site clustering to identify cis-regulatory modules involved in pattern formation in the Drosophila genome[J]. *Proc Natl Sci USA*,2002,199(2):757-762
- [9] Kottom TJ, Han J, Zhang Z, et al. Pneumocystis carinii expresses an active Rtt109 histone acetyltransferase[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011,44(6):768-776
- [10] Masumi A. Histone acetyltransferases as regulators of nonhistone proteins: the role of interferon regulatory factor acetylation on gene transcription[J]. *J Biomed Biotechnol*,2011,42(4)
- [11] Akiba Y, Cave JW, Akiba N, et al. Histone deacetylase inhibitors de-repress tyrosine hydroxylase expression in the olfactory bulb and rostral migratory stream [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 393(4):673-677
- [12] Carneiro K, Donnet C, Rejtar T, et al. Histone deacetylase activity is necessary for left-right patterning during vertebrate development[J]. *BMC Dev Biol*,2011,25(11):29
- [13] Morita K, Gotohda T, Arimochi H, et al. Histone deacetylase inhibitors promote neurosteroid-mediated cell differentiation and enhance serotonin-stimulated brain-derived neurotrophic factor gene expression in rat C6 glioma cells [J]. *J Neurosci Res*,2009,87(11): 2608-2614

(上接第 3644 页)