

逍遥散对肝郁脾虚证大鼠胃组织基因表达谱的影响

李晓红¹ 陈家旭² 张煜¹ 臧知明¹ 杨力强¹

(1 广西中医药大学, 南宁, 530200; 2 北京中医药大学, 北京, 100029)

摘要 目的:在全基因组水平上系统探讨逍遥散大、中、小剂量对慢性束缚应激肝郁脾虚证大鼠胃组织基因表达谱的影响及其抗应激调节机制。方法:采用 Agilent 大鼠全基因组表达谱芯片检测慢性束缚应激肝郁脾虚证大鼠模型(每天束缚 3 h, 连续 21 d)正常组、模型组、逍遥散组(大、中、小剂量)胃组织基因表达的差异,筛选出组间两两比较的差异基因表达谱,并利用生物信息学技术对差异基因表达谱进行 GO 功能分析、信号通路分析。结果:模型组、逍遥散大、中、小剂量组具有不同的差异基因表达谱,多条生物过程和信号通路的功能被显著上调或下调,其中模型组、逍遥散大、中、小剂量组差异基因参与的显著生物过程分别有 597、1216、817、924 个功能基因群,参与的显著信号通路分别有 27、60、41、59 条。结论:肝郁脾虚证具有胃组织差异表达基因组学背景,逍遥散大、中、小剂量对肝郁脾虚证大鼠胃组织众多差异表达基因及功能改变的信号通路、生物过程均有一定的干预作用,中剂量结果显示优于大剂量和小剂量。

关键词 逍遥散;肝郁脾虚证;胃组织;基因表达谱

Effects of Xiaoyao Powder on stomach gene expression profile of rats with liver-depression and spleen deficiency

Li Xiaohong¹, Chen Jiayu², Zhang Yu¹, Zang Zhiming¹, Yang Liqiang¹

(1 Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2 Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To systematically investigate the different effects of large, medium and small dose of Xiaoyao Powder on gene expression profile in stomach tissue of rats with the syndrome of liver-depression and spleen-deficiency induced by chronic immobilization stress and to study the anti-stress regulatory mechanism of the three different doses at the whole genome. **Methods:** The rat whole genome expression chips (Agilent) were used to detect the differences of gene expression in the Stomach of the rat model with the syndrome of liver-depression and spleen-deficiency induced by 21-day chronic immobilization stress (3 hours per day) in normal group, model group and Xiaoyao Powder groups (large, medium and small dose, respectively), and any differential gene expression profiles between groups were recognized and selected. Then the differential gene expression profiles were analyzed through gene ontology and signal pathway using bioinformatics. **Results:** The differential gene expression profiles of model group and Xiaoyao Powder groups (large, medium and small dose) were different. The functions of multiple biological processes and signaling pathways were significantly up-regulated or down-regulated. The significantly-changed biological processes participated by differential gene of the model group and the Xiaoyao Powder groups (Large, medium and small dose) had 597, 1216, 817, 924 function gene groups respectively, and signal pathways had 27, 60, 41, 59 respectively. **Conclusion:** The syndrome of liver-depression and spleen-deficiency has the background of differentially expressed genomics in stomach. The large, medium and small dose of Xiaoyao Powder all have certain intervention effects on multiple stomach differentially expressed genes, the signal pathways and the biological processes whose functions are both changed. The result shows the medium dose of Xiaoyao Powder is better than the large and small dose.

Key Words Xiaoyao powder; Syndrome of liver depression and spleen deficiency; Stomach tissue; Gene expression profile

中图分类号: R289.3; R277.7 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2017.03.005

证候生物学基础及中药复方药效作用机制的发现和阐明是中医药现代化和国际化进程中面临的关键科学问题。基因芯片具有高通量、大规模、平行性分析及自动化程度高的特点,能够在同一时间内平行分析大量的基因,进行大信息量的筛选与检测分

析,因而能整体宏观地研究生物体基因的表达及功能。近年来,在中医药研究中基因芯片技术已广泛应用于中医证候、体质、中药复方作用机制、中药有效成分筛选等领域^[1]。肝郁脾虚证是临床上的常见证型,逍遥散是治疗肝郁脾虚证的经典名方。本研

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81360526;81560750);广西自然科学基金项目(编号:2013GXNSFAA019129);广西特色实验动物病证模型重点实验室建设项目(编号:桂教科研[2014]14)

作者简介:李晓红,医学博士,副教授,从事中医证候生物学基础研究, Tel: (0771) 4733794, E-mail: lsyuan2008@126.com

通信作者:杨力强,教授,医学博士,从事方证研究, Tel: (0771) 4733794, E-mail: ylq6606@163.com

究应用 Agilent 大鼠基因表达谱芯片,观察了逍遥散大、中、小剂量对慢性束缚应激肝郁脾虚证大鼠外周胃组织差异基因表达谱的影响。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物与分组 SD 雄性大鼠 75 只,体质量(200 ± 20)g,购自广西医科大学动物实验中心[动物许可证号:SCXK(桂)2009-0002],适应性饲养 1 周后按体质量随机分为正常对照组、模型组、逍遥散大、中、小剂量组,每组 15 只。光照节律 12L:12D(6:00—18:00),饲养于普通级动物房,室内温度保持为(22 ± 2)℃,相对湿度保持为 30%,大鼠喂常规饲料及饮用水。

1.1.2 药物 实验所用中药复方选用《太平惠民和剂局方》中的逍遥散,组成药物购自广西中医药大学附属瑞康医院,按邓中甲^[2]主编的第七版《方剂学》教材所载药物组成比例:柴胡 30 g、当归 30 g、白芍 30 g、白术 30 g、茯苓 30 g、炙甘草 15 g、煨姜和薄荷少许(本次实验各用 10 g)用水煎成汤剂,浓缩至含生药量 1.67 g/mL。

1.2 方法

1.2.1 模型制备 采用慢性束缚应激结合孤养方法制作肝郁脾虚证大鼠模型,将模型组和逍遥散大、中、小剂量组大鼠进行捆绑束缚并单笼饲养造模,每日于夜间 18:00—6:00 点束缚 3 h,束缚时间点随机,连续 21 d。

1.2.2 药物干预 正常对照组大鼠群养不予束缚,自由进食、饮水及自主活动。自造模第 1 天开始,每日在束缚前 1 h 给各组大鼠灌胃,逍遥散组大鼠灌服逍遥散中药煎液,根据成人逍遥散每日用量,按体表面积换算成大鼠大剂量用药量为 16.7 g/(kg · d),中剂量用药量为 8.35 g/(kg · d),小剂量用药量为

4.175 g/(kg · d),灌胃容积为 1 mL/100 g 体质量,正常组、模型组大鼠每日灌服大剂量同等换算量的生理盐水,造模期间根据大鼠体质量调整给药量。

1.2.3 取材 造模 21 d 结束后取材标本,各组大鼠以 2% 戊巴比妥钠腹腔注射进行深度麻醉(40 mg/kg),铡刀断头,在超净台内冰上剖开大鼠腹腔,暴露内脏,切取全胃,沿胃小弯侧剪开,用预冷的 0.9% 生理盐水彻底冲洗干净,切取胃体中部上 1/3 约 0.3 cm × 0.5 cm 小块的胃组织置冻存管中迅速放入液氮速冻。取材完毕将标本放入 -80℃ 冰箱保存用于基因芯片实验。

1.2.4 基因芯片检测胃组织差异基因表达谱 每组选取 3 只大鼠的胃组织标本提取总 RNA,使用 NanoDrop ND-1000 评估 RNA 的纯度和浓度,通过标准变性凝胶电泳评估 RNA 完整性。总 RNA 质检后进行芯片实验,芯片为 Agilent Rat 4 × 44K Gene Expression Microarrays, RNA 样品标记和芯片杂交根据 Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis 实验方案(Agilent Technology)执行,由上海康成生物工程有限公司完成基因表达谱检测。

1.3 数据处理与分析 使用 Agilent Feature Extraction 软件(v11.0.1.1)获得芯片图,并读值,得到原始数据。使用 GeneSpring GX v12.1 软件(Agilent Technologies)对原始数据进行 Quantile 标准化和随后的数据处理。原始数据标准化后经过筛选高质量探针进行进一步分析。2 个样品间差异表达基因通过 Fold Change 筛选,以 Fold change ≥ 2.0 标准来确定差异表达基因。使用 topGO^[3]进行差异基因的 GO 分析,使用标准的富集计算方法进行 Pathway 分析,Pathway 来源于 KEGG 数据库。

2 结果

2.1 芯片散点图 见图 1。

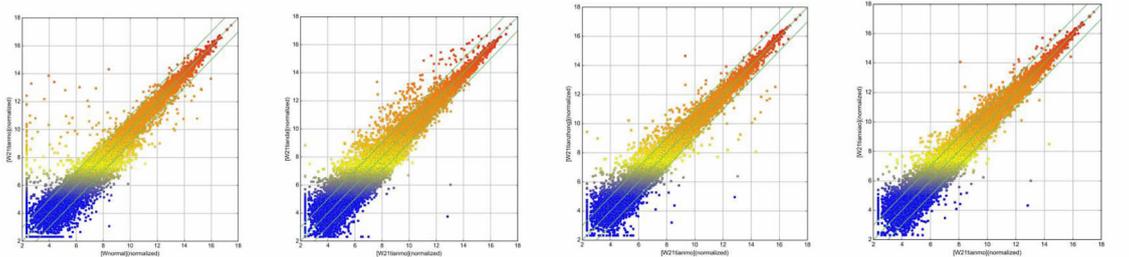


图 1a 模型组与正常组相比 图 1b 大剂量组与模型组相比 图 1c 中剂量组与模型组相比 图 1d 小剂量组与模型组相比

图 1 组间两两比较的样本标准化后的散点分布图

注:图 1a ~ 图 1d 为组间两两比较的样本标准化后的散点分布图,横纵坐标代表样本,每个点代表基因表达情况,点在上面斜线以上为上调大于 2 倍的基因,代表纵坐标的样本相对高表达,点在斜线以下为下调大于 2 倍的基因,代表横坐标的样本相对高表达,点离斜线越远说明信号值越高,点在上下斜线中间的为无差异变化。

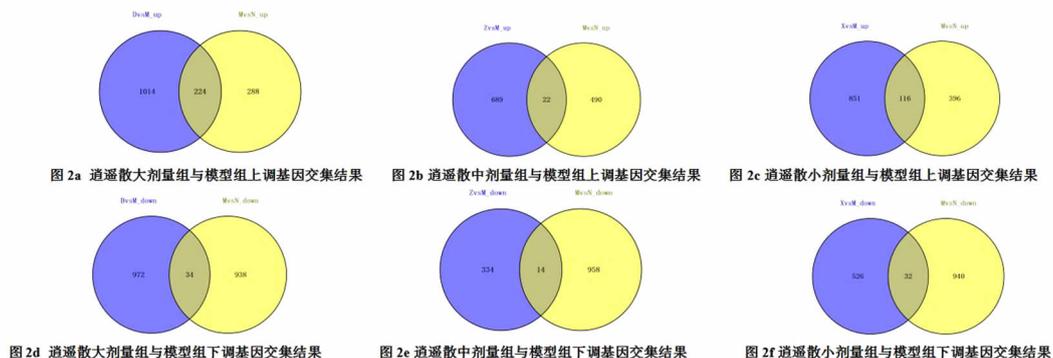


图 2 逍遥散大、中、小剂量组与模型组上调和下调基因交集结果图

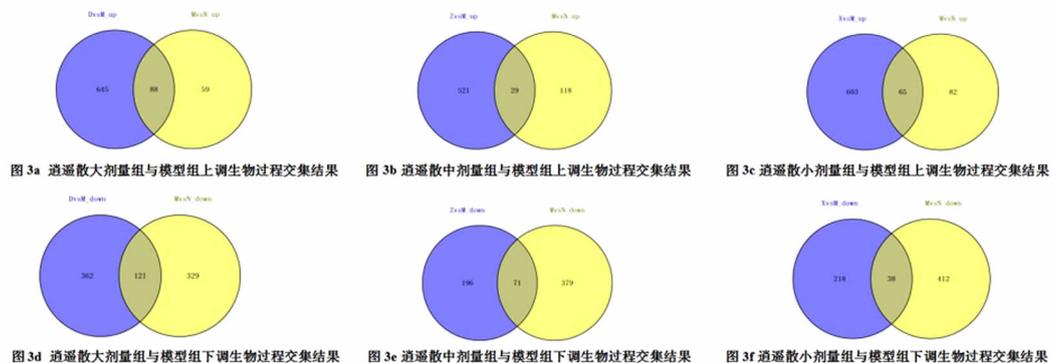


图 3 逍遥散大、中、小剂量组与模型组功能上调和下调的生物过程交集结果图

表 1 逍遥散大、中、小剂量干预后模型组功能没有逆转的信号通路名称

组别	上调通路	下调通路
逍遥散大剂量组	1. Protein digestion and absorption(双向调节通路) 2. Retinol metabolism 3. Fat digestion and absorption 4. Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 5. Drug metabolism-cytochrome P450 6. Salivary secretion	1. Glutathione metabolism(双向调节通路) 2. Transcriptional misregulation in cancer
逍遥散中剂量组	Protein digestion and absorption(双向调节通路)	
逍遥散小剂量组	1. Protein digestion and absorption(双向调节通路) 2. Retinol metabolism 3. Drug metabolism-cytochrome P450 4. Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 5. Chemical carcinogenesis 6. Salivary secretion	Carbohydrate digestion and absorption

2.2 差异表达基因 1)模型组与正常组比较差异表达基因(简称模型组差异基因):与正常组比较,模型组筛选出 1 484 个差异基因,其中 512 个上调基因,972 个下调基因。2)逍遥散组与模型组比较差异表达基因(简称逍遥散组差异基因):逍遥散大剂量组与模型组比较筛选出 2 244 个差异基因,其中 1 238 个上调基因,1 006 个下调基因;逍遥散中剂量组与模型组比较筛选出 1 059 个差异基因,其中 711 个上调基因,348 个下调基因;逍遥散小剂量组与模型组比较筛选出 1 525 个差异基因,其中 967 个上调基因,558 个下调基因。3)逍遥散组差异基

因与模型组差异基因交集结果:逍遥散大、中、小剂量组的 2 244、1 059、1 525 个差异基因分别与模型组 1 484 个差异基因进行交集,结果分别有 258(上调 224 个,下调 34 个)、36(上调 22 个,下调 14 个)、148(上调 116 个,下调 32 个)个共同差异基因仍为上调或下调表达,从共同差异基因数目看逍遥散大剂量和小剂量没有逆转模型组差异表达的基因数目远多于中剂量。图 2a ~ 图 2f 分别表示逍遥散大、中、小剂量组与模型组上调和下调基因交集结果。2.3 差异表达基因 GO 功能分析结果 1)模型组差异基因参与的显著生物过程涉及 597 个功能基因

群,其中功能上调的生物过程有 147 条,主要集中在表皮细胞分化、肽交联、角质化、蛋白水解、脂溶性维生素代谢过程等方面;功能下调的生物过程有 450 条,主要集中在突触传递、多细胞生物信号、神经冲动的传递、细胞组分组织或生物发生、神经肽信号通路等方面。

2) 逍遥散大剂量组差异基因参与的显著生物过程涉及 1 216 个功能基因群,其中功能上调的生物过程有 733 条,主要集中在生物黏附、对伤害的反应、组织发育、角质形成细胞分化、免疫系统过程等方面;功能下调的生物过程有 483 条,主要集中在系统过程、多细胞生物过程、神经系统过程、感觉知觉、细胞表面受体信号通路等方面;逍遥散中剂量组差异基因参与的显著生物过程涉及 817 个功能基因群,其中功能上调的生物过程有 550 条,主要集中在有丝分裂、细胞周期过程、细胞组分组织或生物发生、核分裂、染色体分离等方面;功能下调的生物过程有 267 条,主要集中在正调节分泌、细胞分泌、正调节运输、蛋白质分泌、生物过程的正调节等方面;逍遥散小剂量组差异基因参与的显著生物过程涉及 924 个功能基因群,其中功能上调的生物过程有 668 条,主要集中在发育过程、组织发育、解剖结构发育、角质形成细胞分化、多细胞生物体发育等方面;功能下调的生物过程有 256 条,主要集中在肌器官形态发生、心血管系统发育、有机阴离子转运、平滑肌细胞分化、多细胞生物过程等方面。

3) 逍遥散组生物过程与模型组生物过程交集结果:逍遥散大、中、小剂量组的 1 216、817、924 条生物过程分别与模型组 597 条生物过程进行交集,结果分别有 209(上调 88 条、下调 121 条,其中 32 条为双向调节通路)、100(上调 29 条、下调 71 条,其中 19 条为双向调节通路)、103(上调 65 条、下调 38 条,其中 24 条为双向调节通路)条相同生物过程的功能仍为上调或下调表达,从交集部分相同的生物过程看逍遥散大剂量组没有逆转模型组功能改变的生物过程远多于中剂量和小剂量。图 3a ~ 图 3f 分别表示逍遥散大、中、小剂量组与模型组功能上调和下调的生物过程交集结果。

2.4 差异基因信号通路(Pathway)结果 1) 模型组差异基因参与的显著通路共有 27 条,其中上调通路 11 条,主要表现在视黄醇代谢、细胞色素 P450 对外源性物质的代谢、药物代谢、甘油代谢、谷胱甘肽代谢等通路功能的改变;下调通路 16 条,主要表现在胰腺分泌、叶酸生物合成、神经活性配体-受体相互

作用、蛋白质消化和吸收、癌症中的转录失调等通路功能的改变。

2) 逍遥散大剂量组差异基因参与的显著通路共有 60 条,其中上调通路 48 条,主要表现在阿米巴病、蛋白质消化和吸收、吞噬体、细胞黏附分子、ECM-受体相互作用等通路功能的改变;下调通路 12 条,主要表现在神经活性配体-受体相互作用、嗅觉转导、Jak-STAT 信号通路、青春晚期糖尿病、细胞因子-细胞因子受体相互作用等通路功能的改变;逍遥散中剂量组差异基因参与的显著通路共有 41 条,其中上调通路 30 条,主要表现在孕激素介导的卵母细胞成熟、吞噬体、肥厚性心肌病、细胞周期、胰腺分泌等通路功能的改变;下调通路 11 条,主要表现在丁酸代谢、多巴胺能神经突触、昼夜周期、细胞因子-细胞因子受体相互作用、朊病毒病等通路功能的改变;逍遥散小剂量组差异基因参与的显著通路共有 59 条,其中上调通路 46 条,主要表现在移植物抗宿主病、同种异体移植物排斥、I 型糖尿病、细胞黏附分子、自身免疫性甲状腺疾病等通路功能的改变;下调通路 13 条,主要表现在 Jak-STAT 信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用、碳水化合物消化吸收、PI3K-Akt 信号通路、乙型肝炎等通路功能的改变。

3) 逍遥散组信号通路与模型组信号通路交集结果:逍遥散大、中、小剂量组的 60、41、59 条显著通路分别与模型组 27 条显著通路进行交集,结果分别有 8(其中 2 条为双向调节通路)、1(为双向调节通路)、7(其中 1 条为双向调节通路)条共同通路的功能仍为激活或抑制,从交集部分相同的信号通路看逍遥散中剂量组逆转了模型组功能改变的所有显著信号通路。由于篇幅原因,交集图省略,表 1 列出逍遥散大、中、小剂量干预后模型组功能没有逆转的信号通路名称。

3 讨论

中医学把认识疾病的焦点放在了整体功能上,中医的证涉及西医多个系统、多个层面。肝郁脾虚证患者的临床表现除有精神情志异常外,常伴有纳呆、嗝气、腹痛、腹胀、腹泻等消化系统症状,学者们从脑肠轴学说和脑肠理论解释这一病理机制,认为这一病理机制与脑-肠轴学说和脑肠互动理论是异曲同工^[4]。以往的研究表明抑郁症、功能性消化不良(FD)、肠易激综合征(IBS)的中医辨证分型均以肝郁脾虚为主^[5-7],研究也认为抑郁症是脑区神经回路的异常,认为脑与外周存在强调的双向性相互作用^[8],通过功能性磁共振成像技术(fMRI)也发现,

IBS患者大脑皮质的活动性与内脏感觉及IBS症状呈现同步改变的现象^[9],课题组前期的研究也显示肝郁脾虚证大鼠存在脑肠互动功能障碍^[10]。逍遥散最早记载于《太平惠民和剂局方》,由柴胡、白芍、白术、茯苓、当归、甘草、生姜、薄荷8味药物组成,大量实验和临床研究报道^[11-13]显示逍遥散对肝郁脾虚证有很好疗效,广泛应用于精神科和神经科疾病如抑郁症、焦虑症以及多种胃肠道疾病如功能性消化不良(FD)、肠易激综合征(IBS)、术后胃肠功能紊乱等的治疗中^[14-16]。

本研究应用Agilent大鼠全基因组表达谱芯片筛选了慢性束缚应激肝郁脾虚证模型大鼠及逍遥散大、中、小剂量干预大鼠胃组织差异基因表达谱,并应用生物信息学方法对差异基因表达谱进行了GO功能分析和信号通路分析。从研究结果看出21d慢性应激复制出的肝郁脾虚证大鼠具有胃组织差异表达基因组学背景,模型组大鼠胃组织差异基因表达谱涉1484个差异表达基因,差异表达基因参与了597条生物过程和27条信号通路的功能显著改变,涉及如表皮细胞分化、蛋白水解、脂溶性维生素代谢过程、突触传递、多细胞生物信号以及视黄醇代谢、甘油代谢、谷胱甘肽代谢、胰腺分泌、神经活性配体-受体相互作用、癌症中的转录失调等等多方面的变化。对于模型组大鼠出现的这些变化逍遥散大、中、小剂量均有一定的干预效果,显示出整体双向调节作用。逍遥散组大鼠与模型组大鼠的差异基因、生物过程、信号通路交集结果显示,模型组大鼠1484个差异表达基因、597条功能显著改变的生物过程、27条功能显著改变的信号通路经过逍遥散大、中、小剂量干预后,分别只有258、36、148个差异基因表达水平没有接近正常组大鼠仍出现上调或下调表达,177、81、79条(除外双向调节的生物过程)显著生物过程的功能仍为上调或下调状态,6、0、6条(除外双向调节的信号通路)通路的功能仍处于激活或抑制状态,差异基因逆转效果分别为82.6%、97.5%、90%,生物过程逆转效果分别为70.3%、86.4%、86.7%,信号通路逆转效果分别为77.7%、100%、77.7%,从差异基因、生物过程、信号通路逆转的百分比综合来看,中剂量的整体干预效果还是优于大剂量和小剂量。当然,研究结果也显示逍遥散大、中、小剂量除了逆转了模型组大鼠体内出现的上述变化外,逍遥散组大鼠差异表达基因还参与了众多不同于模型组大鼠的显著生物过程和显

著信号通路的功能改变,并且大、中、小剂量最显著的干预效果表现在不同方面。

本次研究结果也显示模型组大鼠众多功能改变的显著信号通路和生物过程不仅涉及代谢方面的变化,也涉及了神经系统的改变,如神经突触传递、神经冲动的传递、神经肽信号通路、神经活性配体-受体相互作用通路等等,这不仅对以往的研究结果进行了验证,也为今后从脑肠轴研究肝郁脾虚证的生物学机制提供了提供了参考及思路。

参考文献

- [1] 陈玉龙,尹素改,陈蔚文. 中医药研究应用基因芯片技术相关文献分析[J]. 中医学报,2010,9(5):1023-1025.
- [2] 邓中甲. 方剂学[M]. 北京:中国中医药出版社,2003:85.
- [3] Adrian Alexa and Jorg Rahnenfuhrer(2010). topGO:topGO:Enrichment analysis for Gene Ontology[Z]. R package version 2.8.0.
- [4] 霍清萍. 从肠易激综合征脑-肠轴学说谈肝郁脾虚病理机制[J]. 中国中西医结合消化杂志 2005,13(5):318-320.
- [5] 张海男,胡随瑜,陈泽奇,等. 抑郁症常见中医证候类型第一轮专家问卷分析[J]. 湖南医科大学学报,2002,27(6):519-521.
- [6] 唐启盛,曲森,包祖晓,等. 抑郁症中医证候规律及诊疗标准制定的研究[J]. 北京中医药大学学报,2011,2(34):77-81.
- [7] 周福生,吴文江,张庆宏. 胃肠功能性疾病证型分布的统计分析[J]. 中华国际医学杂志,2002,2(5):438-442.
- [8] Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression [J]. Nature,2008,455:894-902.
- [9] Drossman DA, Ringel Y, Vogt BA, et al. Alterations of brain activity associated with resolution of emotional distress and pain in a case of severe irritable bowel syndrome[J]. Gastroenterology,2003,124(3):754-761.
- [10] 臧知明,杨力强,李晓红. 逍遥散对慢性束缚应激肝郁脾虚证模型大鼠 NPY mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2014,29(12):14-16.
- [11] 刘玥芸,郭晓玲,赵宏波,等. 逍遥散提取物对肝郁脾虚证模型大鼠疗效的行为学评价[J]. 中华中医药杂志,2013,28(7):2138-2141.
- [12] 姜幼明,张汉霆,陈家旭. 逍遥散对慢性束缚应激肝郁脾虚证模型大鼠杏仁核 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2014,27(4):882-885.
- [13] 邹本良,张广德,顾士萍,等. 逍遥散汤剂和散剂治疗肝郁脾虚证临床疗效观察[J]. 中医杂志,2015,56(3):216-218.
- [14] 秦献魁,李萍,韩梅,等. 逍遥散治疗抑郁症随机对照试验的系统评价[J]. 中医杂志,2010,51(6):500-505.
- [15] 石君杰,戴玉英,徐发莹,等. 逍遥散对肠易激综合征大鼠内脏高敏感性的影响[J]. 浙江中西医结合杂志,2008,18(1):23-25.
- [16] 韩麦. 抗抑郁药物在功能性胃肠病中的应用[J]. 中国新药杂志,2010,19(11):944-948.