

逍遥散对肝郁脾虚证大鼠下丘脑基因表达谱的影响

李晓红¹ 陈家旭² 孔鹏云¹ 肖艳芬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对慢性束缚应激肝郁脾虚证大鼠下丘脑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)下丘脑基因表达的差异, 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 909、712、516、1322 个功能基因群, 参与的显著信号通路分别有 60、57、41、90 条。结论: 肝郁脾虚证具有下丘脑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下丘脑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, 大剂量和中剂量结果显示优于小剂量。

关键词 逍遥散; 肝郁脾虚证; 下丘脑; 基因表达谱

Effects of Xiaoyao Powder on hypothalamus gene expression profile of rats with liver-stagnation and spleen-deficiency syndrome

Li Xiaohong¹, Chen Jiaxu², Kong Pengyun¹, Xiao Yanfen¹, Yang Liqiang¹

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

Abstract Objective: To systematically investigate the effect of Xiaoyao powder on hypothalamus gene expression profile of rats with syndrome of liver-depression and spleen-deficiency induced by chronic immobilization stress and its anti-stress regulatory mechanism at the whole genome. **Methods:** The rat whole genome expression chips (Agilent) were used to detect gene expression differences in the hypothalamus of the rat model with liver-stagnation and spleen-deficiency syndrome induced by chronic immobilization stress (daily immobilization stress for 3 h for 21 days) in normal group, model group and Xiaoyao powder group (large, medium and small doses) and any different gene expression profiles between groups were recognized and selected. The hypothalamus gene expression profile was studied through gene ontology and signal pathway analyses 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 909, 712, 516, 1322 respectively, and signal pathways had 60, 57, 41, 90 respectively. **Conclusion:** The liver-stagnation and spleen-deficiency syndrome has the background of differentially expressed genomics in hypothalamus. The large, medium and small doses of Xiaoyao powder all have a certain intervention effect on multiple hypothalamus differentially expressed genes, signal pathway and biological process whose functions are both changed. The result shows the large and medium doses are better than the small dose.

Key Words Xiaoyao Powder; The Live-stagnation and Spleen Deficiency Syndrome; Hypothalamus; Gene Expression Profile

中图分类号: R289.3; R277.7 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2017.03.006

基因芯片是目前发展最为成熟的生物芯片, 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]。肝郁脾虚证是肝失疏泄、脾失健运所致的中医证候, 是临床上的常见证型。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, 是治

疗肝郁脾虚证的经典名方, 也是中医治疗情志病的经典方剂之一, 广泛应用于精神科和神经科疾病如抑郁症、焦虑症、心脏神经官能症、睡眠障碍等的治疗中^[2-4]。慢性应激可以导致抑郁症已成为公认事实, 有抑郁症史自杀患者的行为表现与慢性应激引发症状非常一致, 肝郁脾虚是抑郁症最常见证型^[5-6], 是抑郁症中医核心病机^[7]。因此, 为了进一

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: lxyuan2008@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: yllq6606@163.com

步发现和阐明肝郁脾虚证的生物学基础及逍遥散防治肝郁脾虚证、抑郁症及抗慢性应激的作用机制,本研究应用 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中枢下丘脑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 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$,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^[8]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 $16.7 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,中剂量用药量为 $8.35 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,小剂量用药量为 $4.175 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,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,在超净台内冰上剥离出完整大脑取下丘脑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°C 冰箱保存用于基因芯片实验。

1.2.4 基因芯片检测下丘脑差异基因表达谱 每组选取 3 只大鼠的下丘脑标本提取总 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 $4 \times 44\text{K}$ 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 $\text{Fold change} \geq 2.0$ 标准来确定差异表达基因。使用 topGO^[9] 进行差异基因的 GO 分析,使用标准的富集计算方法对差异基因进行 Pathway 分析,Pathway 来源于 KEGG 数据库。

2 结果

2.1 芯片散点图 见图 1。

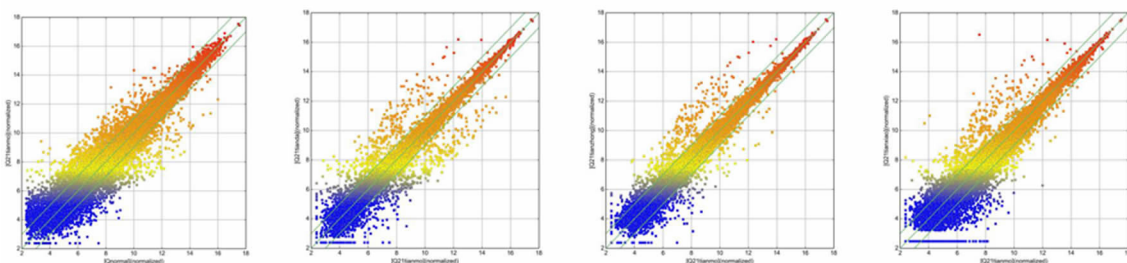


图 1a 模型组与正常组相比

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。

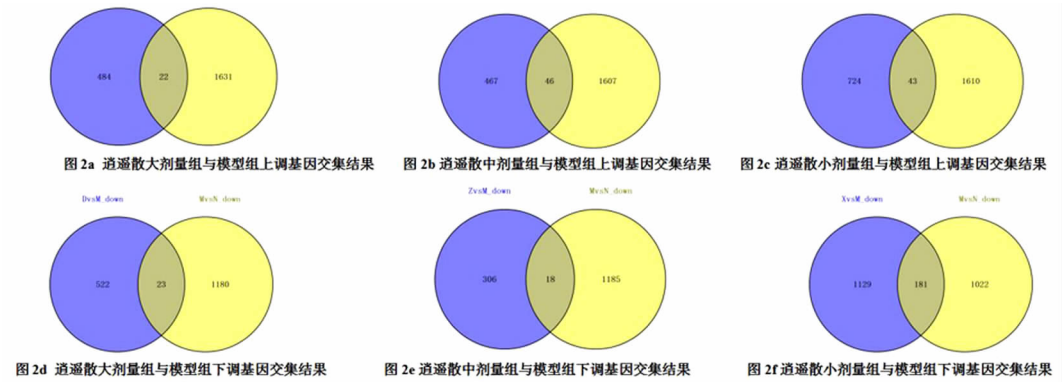


图 2 逍遥散大、中、小剂量组与模型组上调和下调基因交集结果图

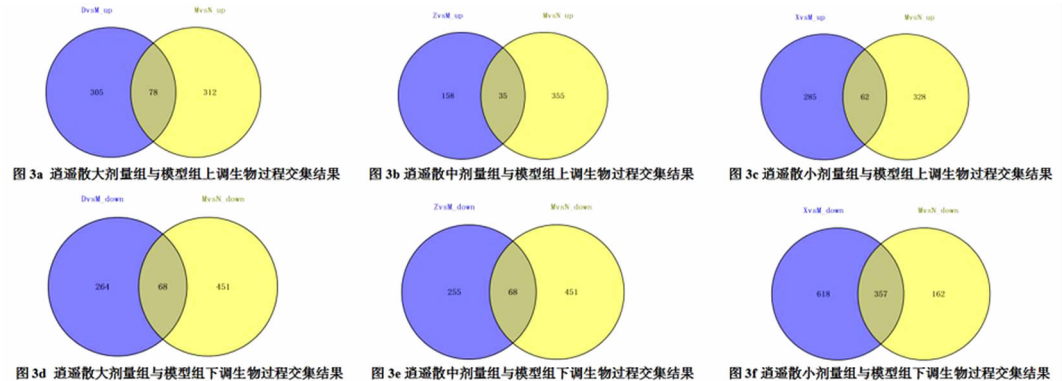


图 3 逍遥散大、中、小剂量组与模型组功能上调和下调的生物过程交集结果图

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. MAPK signaling pathway(双向调节通路) 2. Calcium signaling pathway(双向调节通路) 3. Leukocyte transendothelial migration 4. Circadian entrainment(双向调节通路)	1. Amphetamine addiction 2. Salivary secretion
逍遥散中剂量组	1. Viral myocarditis 2. HTLV-I infection 3. Allograft rejection 4. Autoimmune thyroid disease 5. Epstein-Barr virus infection	Amphetamine addiction
逍遥散小剂量组	1. Allograft rejection 2. Type I diabetes mellitus 3. Autoimmune thyroid disease 4. Graft-versus-host disease 5. Natural killer cell mediated cytotoxicity 6. Viral myocarditis 7. HTLV-I infection 8. Regulation of actin cytoskeleton 9. MAPK signaling pathway(双向调节通路) 10. Cell adhesion molecules(CAMs) 11. Endocytosis 12. Antigen processing and presentation 13. Phagosome 14. Amoebiasis 15. Epstein-Barr virus infection	1. Retrograde endocannabinoid signaling 2. Rap1 signaling pathway 3. MAPK signaling pathway(双向调节通路) 4. MicroRNAs in cancer 5. Adrenergic signaling in cardiomyocytes 6. Amphetamine addiction 7. GnRH signaling pathway 8. Proteoglycans in cancer 9. Calcium signaling pathway(双向调节通路) 10. ErbB signaling pathway 11. T cell receptor signaling pathway 12. Circadian entrainment(双向调节通路) 13. Melanogenesis 14. Salivary secretion 15. Long-term potentiation 16. Thyroid hormone synthesis 17. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy(ARVC) 18. Thyroid hormone signaling pathway 19. Rap1 signaling pathway 20. Bacterial invasion of epithelial cells

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 2 856 个差异基因,其中 1 653 个上调基因,1 203 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 1 051 个差异基因,其中 506 个上调基因,545 个下调基因;逍遥散中剂量组与模型组比较筛选出 837 个差异基因,其中 513 个上调基因,324 个下调基因;逍遥散小剂量组与模型组比较筛选出 2 077 个差异基因,其中 767 个上调基因,1 310 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 1 051、837、2 077 个上下调差异基因分别与模型组 2 856 个上下调差异基因进行交集,结果分别有 45(上调 22 个,下调 23 个)、64(上调 46 个,下调 18 个)、224(上调 43 个,下调 181 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和大剂量。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 909 个功能基因群,其中功能上调的生物过程有 390 条,主要集中在神经递质转运的调节、调节神经递质分泌、系统过程、多细胞生物过程、膜去极化等方面;功能下调的生物过程有 519 条,主要集中在细胞组分组织或细胞水平的生物发生、神经系统发育、正调节神经发生、前脑发育、信号的预处理等方面。

2)逍遥散大剂量组差异基因参与的显著生物过程涉及 715 个功能基因群,其中功能上调的生物过程有 383 条,主要集中在甘油酯分解代谢过程,调节运输、调节系统过程、肌细胞发育、血管重塑等方面;功能下调的生物过程有 332 条,主要集中在系统发育、多细胞生物体发育、解剖结构发展、组织发育、对环磷腺苷(cAMP)的反应等方面;逍遥散中剂量组差异基因参与的显著生物过程涉及 516 个功能基因群,其中功能上调的生物过程有 193 条,主要集中在肌细胞发育、脂蛋白代谢过程、心室心肌细胞发育、蛋白质自身磷酸化的正调节、蛋白脂质化等方面;功能下调的生物过程有 323 条,主要集中在对有机物的反应、对环磷腺苷(cAMP)的反应、组织发育、细胞分裂、细胞单价无机阳离子体内平衡等方

面。逍遥散小剂量组差异基因参与的显著生物过程涉及 1 322 个功能基因群,其中功能上调的生物过程有 347 条,主要集中在调节心脏收缩、调节系统过程、细胞因子产生的正调节、脂蛋白代谢过程、钙离子转运等方面;功能下调的生物过程有 975 条,主要集中在本土化、细胞过程的正调节、运输、主要代谢过程的调节、神经系统发育等方面。

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 715、516、1 322 条功能上调和下调的生物过程分别与模型组 909 条功能上调和下调的生物过程进行交集,结果分别有 146(上调 78 条、下调 68 条,其中有 62 条为双向调节)、103(上调 35 条、下调 68 条,其中有 40 条为双向调节)、419(上调 62 条、下调 357 条,其中 99 条为双向调节)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小剂量组没有逆转模型组功能改变的生物过程远多于大剂量和中剂量。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 60 条,其中上调通路 29 条,主要表现在 MAPK 信号通路、抗原加工与提呈、内吞、EB 病毒感染、自然杀伤细胞介导的细胞毒性等通路功能的改变;下调通路 31 条,主要表现在 MAPK 信号通路、促性腺激素释放激素(GnRH)信号通路、钙信号通路、神经营养因子信号通路、甲状腺激素合成、胰腺分泌等通路功能的改变。

2)逍遥散大剂量组差异基因参与的显著通路共有 57 条,其中上调通路 31 条,主要表现在致心律失常性右心室心肌病、肥厚性心肌病(HCM)、紧密连接、甘油代谢、血管内皮生长因子(VEGF)信号通路等通路功能的改变;下调通路 26 条,主要表现在移植物抗宿主病、抗原加工与提呈、I 型糖尿病、安非他明成瘾、同种异体移植排斥等通路功能的改变;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 13 条,主要表现在病毒性心肌炎、癌症中的转录失调、酮体的合成和降解、碳代谢、血管内皮生长因子(VEGF)信号通路等通路功能的改变;下调通路 28 条,主要表现在细胞黏附分子、抗原加工与提呈、吞噬体、病毒性心肌炎、人类 T 淋巴细胞白血病病毒 I 型(HTLV-1)感染等通路功能的改变;逍遥散小剂量组差异基因参与的显著通路共有 90 条,其中上调通路 30 条,主要表现在同种异体移

植排斥、I 型糖尿病、自身免疫性甲状腺疾病、移植物抗宿主病、自然杀伤细胞介导的细胞毒性等通路功能的改变;下调通路 60 条,主要表现在逆行内源性大麻素信号、粘着斑、吗啡成瘾、Rap1 信号通路、雌激素信号通路等通路功能的改变。

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 57、41、90 条显著通路分别与模型组 60 条显著通路进行交集,结果分别有 6(其中 3 条为双向调节通路)、6、35(其中 4 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小剂量组没有逆转模型组功能改变的显著信号通路远多于中剂量和大剂量。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

中医学的发展以临床疗效为基石,以整体观念和辨证论治为理论和思维特色。中药复方是中医治病的主要临床应用形式,其进入机体后,通过多成分、多途径、多靶点的协同整合作用发挥了单味药无法获得的治疗效果^[10]。证候是中医学认识疾病、临床诊疗和疗效判定的核心基础。证候作为一种有规律的病理表现或一种功能表现,必然有其内在的物质结构来支配它,以往的研究表明反映中医证候规律的“物质基础”不仅是一些特征性物质,而且可能是“组”“群”“谱”集成的形式^[11-13]。系统生物学是当前生命复杂体系研究比较公认的科学思维方式和研究手段,中医学的整体观、辨证论治和方剂配伍等理论与系统生物学的意旨有相同之处。基因芯片技术是系统生物学的主要技术平台之一,根据芯片的功能可以分为基因表达谱芯片和 DNA 测序芯片。基因芯片具有高通量,并行分析的特点,能够在同一时间内并行分析大量的基因,进行大信息量的筛选与检测分析,优于其他传统的技术方法,因而能整体宏观地研究生物体基因的表达及功能。生物信息学主要研究内容是与生物基因组研究相关的生物信息的获取、加工、储存、分配、分析和解释,其实质就是利用计算机科学和网络技术来解决生物学问题。基因芯片可以大规模地筛选药物,能够在药物和基因之间架起桥梁,从基因水平研究和解释药物的作用机制和药物的不良反应^[14]。因此,运用基因芯片获得中医证候及中药复方的基因表达谱数据,通过生物信息学方法的处理,有望从基因水平阐释证候的分子生物学基础及中药复方的作用机制。

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、小剂量干预大鼠下丘脑差异基因表达谱,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 21 d 慢性应激复制出的肝郁脾虚证大鼠具有下丘脑差异表达基因组学背景,模型组大鼠下丘脑差异基因表达谱涉及 2 856 个差异表达基因,差异表达基因参与了 909 条生物过程和 60 条信号通路的功能显著改变,涉及细胞组分、神经系统、免疫系统和垂体、甲状腺、胰腺等内分泌系统以及 MAPK 信号通路、钙信号通路、神经营养因子信号通路等等多方面的变化。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 2 856 个差异表达基因、909 条功能显著改变的生物过程、60 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 45、64、224 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,84、63、320 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,3、6、31 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 98.4%、97.7%、92.1%,生物过程逆转效果分别为 90.7%、93%、64.7%,信号通路逆转效果分别为 95%、90%、48.3%,结果显示逍遥散大、中、小剂量对单个差异基因的干预效果均达到了 90% 以上,但整体干预效果大、中剂量还是优于小剂量。另外,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。

本次研究同时应用实时荧光定量 PCR 方法对芯片结果进行了验证,所验证的差异基因和芯片结果表达趋势基本一致(验证结果放于另外文章发表),提示本次研究结果还是具有一定的客观可靠性,可为后续研究提供参考及思路,但由于本研究每个实验组只做了 3 只大鼠的基因表达谱芯片,样本例数较少,不具有足够的说服力,在今后研究工作中需扩大样本应用多种实验方法从组织、细胞及分子水平对基因表达谱进行验证和深入研究,以期阐明

(下接第 512 页)

lin-1、LC3 基因及蛋白表达变化情况能更清晰地从多角度多层次说明自噬相关蛋白 Belin-1、LC3 在慢性束缚应激抑郁症大鼠海马中的变化,从而揭示其与自噬在抑郁症发病机制中的作用。希望在今后的工作中能进一步完善研究。

参考文献

[1] Amico F, Meisenzahl E, Koutsouleris N, et al. Structural MRI correlates for vulnerability and resilience to major depressive disorder[J]. J Psychiatry Neurosci, 2011, 36(1): 15-22.

[2] A Neumeister, S Wood, O Bonne, et al. Reduced hippocampal volume in unmedicated, remitted patients with major depression versus control subjects[J]. Biol Psychiatry, 2005, 57(8): 935-937.

[3] Villanueva, R. Neurobiology of major depressive disorder[J]. Neural Plast, 2013, 2013: 873278.

[4] Ahdidan, J, LB Hviid, MM Chakravarty, et al. Longitudinal MR study of brain structure and hippocampus volume in major depressive disorder[J]. Acta Psychiatr Scand, 2011, 123(3): 211-219.

[5] Mizushima N. and M. Komatsu, Autophagy: renovation of cells and tissues[J]. Cell, 2011, 147(4): 728-741.

[6] 朱琪, 林芳. 自噬的分子标志物[J]. 药学报, 2016(1): 33-38.

[7] Matsunaga K1, Saitoh T, Tabata K, et al. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages[J]. Nat Cell Biol, 2009, 11(4): 385-396.

[8] Liang Y., XL Guo, JX Chen, et al. Effects of the chinese traditional prescription xiaoyaosan decoction on chronic immobilization stress-induced changes in behavior and ultrastructure in rat hippocampus[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 984797.

[9] Zhou Y., L Lu, Z Li, et al. Antidepressant-like effects of the fractions

of Xiaoyaosan on rat model of chronic unpredictable mild stress[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 137(1): 236-244.

[10] 岳利峰, 丁杰, 陈家旭, 等. 肝郁脾虚证大鼠模型的建立与评价[J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(6): 396-400.

[11] Yorimitsu, T. and D. J. Klionsky. Autophagy: molecular machinery for self-eating[J]. Cell Death Differ, 2005, 12(Suppl 2): 1542-1552.

[12] 张雨晴, 张丽慧, 魏尔清, 等. Beclin 1 在凋亡和自噬中的调节作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2015, 31(4): 331-338.

[13] Dancourt, J., T. J. Melia. Lipidation of the autophagy proteins LC3 and GABARAP is a membrane-curvature dependent process[J]. Autophagy, 2014, 10(8): 1470-1471.

[14] H He, Y Dang, F Dai, et al. Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B [J]. J Biol Chem, 2003, 278(31): 29278-29287.

[15] Jia, J., Le W. Molecular network of neuronal autophagy in the pathophysiology and treatment of depression[J]. Neurosci Bull, 2015, 31(4): 427-434.

[16] J Zschocke, N Zimmermann, B Berning, et al. Antidepressant drugs diversely affect autophagy pathways in astrocytes and neurons——dissociation from cholesterol homeostasis[J]. Neuropsychopharmacology, 2011, 36(8): 1754-1768.

[17] M Shehata, H Matsumura, R Okubo-Suzuki, et al. Neuronal stimulation induces autophagy in hippocampal neurons that is involved in AMPA receptor degradation after chemical long-term depression[J]. J Neurosci, 2012, 32(30): 10413-10422.

[18] 沈忠飞, 王志坚, 潘巍巍, 等. 氟西汀调控 CUMS 抑郁大鼠海马突触重塑[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(9): 1642-1647.

(2017-02-20 收稿 责任编辑: 洪志强)

(上接第 508 页)

肝郁脾虚证的生物学基础及逍遥散防治肝郁脾虚证及抗慢性应激的作用机制。

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] 嵇波, 陈家旭, 鲁兆麟. 对逍遥散临床应用的思考[J]. 北京中医药大学学报, 2001, 24(5): 4-7.

[3] 俞芹. 临床应用逍遥散的体会[J]. 世界中医药, 2009, 4(1): 40-41.

[4] 王恺. 逍遥散合温胆汤加减治疗心脏神经官能症 60 例[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 194-195.

[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, 曲淼, 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] 尹冬青. 抑郁症中医证候分型诊断量表及证候特征研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.

[8] 邓中甲. 方剂学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 85.

[9] Adrian Alexa and Jorg Rahnenfuhrer (2010). topGO: topGO: Enrichment analysis for Gene Ontology[Z]. R package version 2.8.0.

[10] 向铮, 王贤亲, 刘婷, 等. 基于网络生物学方法的中药药理作用机制研究思考与探索[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2): 146-151.

[11] 管艳, 张辉, 张玮, 等. 慢性乙型病毒性肝炎肝肾阴虚证与湿热蕴结证患者外周血的差异基因表达谱分析[J]. 中西医结合学报, 2012, 10(7): 751-756.

[12] 罗和古, 丁杰, 岳广欣, 等. 大鼠肝郁脾虚证的代谢组学研究[J]. 中西医结合学报, 2007, 5(3): 307-313.

[13] 苏式兵, 胡义扬, 赵立平, 等. 慢性乙型病毒性肝炎中医证候生物学基础的研究思路[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(2): 252-255.

[14] Wang Z, Du Q, Wang F, et al. Microarray analysis of gene expression on herbal glycoside recipes improving deficient ability of spatial learning memory in ischemic mice[J]. J Neurochem, 2004, 88(6): 1406-1415.

(2017-02-20 收稿 责任编辑: 洪志强)