

· 配伍 ·

合欢花-远志单味药及药对对慢性不可预知应激大鼠抑郁样行为及海马 CREB, NOX2 表达的影响

王冰梅¹, 乔盼¹, 王微¹, 宋伍¹, 刘畅¹, 王星焯¹, 张影², 应达时^{2,3*}, 董锡钧^{1*}

(1. 长春中医药大学, 长春 130117; 2. 吉林农业科技学院, 吉林 吉林 132101;
3. 长春市应氏中医门诊部, 长春 130022)

[摘要] 目的: 观察合欢花-远志单味药及药对改善慢性不可预知应激大鼠抑郁样行为的作用, 并通过海马组织超微结构及环腺苷酸反应元件结合蛋白(CREB), 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶2(NOX2)表达水平初步研究其机制。方法: 72只Wistar大鼠随机分为正常组、模型组、合欢花组、远志组、合欢花-远志药对组及氟西汀组。除正常组外, 其余5组均采用慢性不可预知应激刺激与孤养相结合的方法制备抑郁模型。自造模第1天起, 合欢花组、远志组和药对组分别给与总生药量 $1.05\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的水煎液, 氟西汀组给予 $2.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量盐酸氟西汀水溶液, 正常组和模型组给予蒸馏水, 连续灌胃28 d。分别于造模前1 d及造模后第7, 14, 21, 28天进行敞箱实验和强迫游泳实验, 第28天电镜观察海马组织形态学改变, 紫外分光光度法检测海马组织超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测CREB和NOX2表达水平。结果: 行为学实验结果显示, 与正常组比较, 模型组大鼠水平活动次数和糖水消耗量减少, 游泳不动时间增加($P<0.05$, $P<0.01$); 与模型组比较, 合欢花组、远志组和药对组大鼠水平活动次数和糖水消耗量明显增加, 游泳不动时间明显缩短($P<0.05$, $P<0.01$); 与单味药比较, 药对组各项行为学指标差异有统计学意义($P<0.05$)。形态学结果发现, 模型组海马组织线粒体肿胀明显, 超微结构被破坏, 而各给药组大鼠海马组织超微结构接近正常。与正常组比较, 模型组海马组织SOD活性降低, MDA含量升高($P<0.01$); 与模型组比较, 合欢花组、远志组和药对组大鼠海马组织SOD活性升高, 而MDA含量降低($P<0.05$, $P<0.01$); 与单味药比较, 药对组差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。Real-time PCR和Western blot结果表明, 与正常组比较, 模型组大鼠海马组织NOX2表达增加, CREB的表达减少($P<0.05$, $P<0.01$); 与模型组比较, 合欢花组、远志组和药对组大鼠海马组织NOX2表达减少, CREB表达增加($P<0.05$, $P<0.01$); 与单味药比较, 药对组大鼠海马组织NOX2和CREB蛋白表达差异有统计学意义($P<0.01$)。结论: 合欢花-远志单味药及药对能改善慢性不可预知应激大鼠的抑郁样行为, 可能与减少氧化应激和上调CREB表达、下调NOX2表达有关。

[关键词] 合欢花; 远志; 药对; 抑郁症; 行为学; 环腺苷酸反应元件结合蛋白(CREB); 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶2(NOX2)

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)17-0032-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211604

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210702.1530.003.html>

[网络出版日期] 2021-07-02 16:45

Effect of Albiziae Flos and Polygalae Radix Alone and Their Combination on Depression-like Behavior and CREB and NOX2 Expression in Hippocampus of Chronic Unpredictable Stress-induced Rats

WANG Bing-mei¹, QIAO Pan¹, WANG Wei¹, SONG Wu¹, LIU Chang¹, WANG Xing-ye¹,
ZHANG Ying², YING Da-shi^{2,3*}, DONG Xi-jun^{1*}

(1. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

[收稿日期] 20210423(007)

[基金项目] 2015年度吉林省科技厅国际科技合作项目(20150414045GH)

[第一作者] 王冰梅, 博士, 博士后, 教授, 硕士生导师, 从事中西医结合基础研究, E-mail: 345712323@qq.com

[通信作者] *应达时, 博士, 主任医师, 从事中医药临床与实验研究, E-mail: 981016773@qq.com;

*董锡钧, 硕士, 主任医师, 从事中医药临床与实验研究, E-mail: dongxijun1064@163.com

2. Jilin Agricultural Science and Technology University, Jilin 132101, China;
3. Changchun Yingshi Medicine Clinics, Changchun 130022, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Albiziae Flos (AF) and Polygalae Radix (PR) alone and their combination on the improvement of depression-like behavior in rats with chronic unpredictable stress (CUS) as well as on hippocampal ultrastructure and the expression of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein (CREB) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 2 (NOX2), to explore their action mechanisms. **Method:** Seventy-two Wistar rats were randomly divided into the normal group, model group, AF group, PR group, AF-PR group, and fluoxetine group. Rats in all groups except for the normal group were exposed to CUS and separated feeding to induce depression. Since the first day of modeling, rats in the AF group, PR group, AF-PR group were provided with the corresponding decoction containing $1.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ total crude drug by gavage, the ones in the fluoxetine group with $2.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ fluoxetine hydrochloride aqueous solution, and those in the normal group and model group with the distilled water, for 28 successive days. The open field test and forced swimming test were performed 1 d before modeling and 7, 14, 21, 28 d after modeling, respectively. The morphological changes in hippocampus were observed under an electron microscope on the 28th day. The superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) levels in hippocampus were detected by ultraviolet spectrophotometry, and the expression levels of CREB and NOX2 were detected by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot. **Result:** The behavioral experiment results showed that the number of horizontal activities and sugar water consumption in the model group declined as compared with those in the normal group, while the immobility time in the forced swimming test was prolonged ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the AF group, PR group, and AF-PR group exhibited elevated number of horizontal activities, increased sugar water consumption but shortened immobility time in the forced swimming test ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the AF group or PR group, the AF-PR group showed significantly different behavioral indexes ($P < 0.05$). Morphological results showed that the mitochondria of the model group were obviously swollen and the ultrastructure of the hippocampus was destroyed. By contrast, the hippocampal ultrastructure in each administration group was close to normal. The comparison with the normal group revealed that the activity of SOD in the hippocampus of the model group was significantly reduced, whereas the content of MDA was elevated ($P < 0.01$). Compared with the model group, the AF group, PR group, and AF-PR group displayed increased activity of SOD and decreased content of MDA in the hippocampal tissues ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with AF or PR alone, the herbal pair AF-PR resulted in significant differences in the above-mentioned indexes ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The results of Real-time PCR and Western blot demonstrated that NOX2 expression in the hippocampus of the model group was up-regulated in comparison with that in the normal group, while the CREB expression was down-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the AF group, PR group, and AF-PR group all showed diminished NOX2 expression but elevated CREB expression in the hippocampal tissues ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The protein expression levels of NOX2 and CREB in the AF group or PR group were significantly different from those in the AF-PR group ($P < 0.01$). **Conclusion:** AF and PR alone and their combination improve the depression-like behavior of rats exposed to CUS, which may be related to the reduction of oxidative stress, the up-regulation of CREB expression, and the down-regulation of NOX2 expression in hippocampus.

[Keywords] Albiziae Flos; Polygalae Radix; herbal pair; depression; behavioral experiment; cyclic adenosine monophosphate response element binding protein (CREB); nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 2 (NOX2)

抑郁症是一种严重的精神疾病,临床表现为心境低落、思维迟缓、言语动作减少,并伴随有食欲减

退、睡眠障碍等躯体症状^[1]。目前全世界有超过3.5亿人患有抑郁症,且发病率在逐年增加,给家庭和社会带来沉重的经济负担^[2]。中医药对本病的治疗具有悠久的历史,优势明显。合欢花能合心志,有解郁之功效;远志具有安神益智的功能,改善心肾不交引起的失眠多梦、健忘惊悸等症状^[3]。二药是临床常用的安神中药,现代药理学已证实对动物模型均具有显著的抗抑郁作用^[4]。近年来对抗抑郁的复方研究多集中在开心散、甘麦大枣汤、酸枣仁汤等^[5],抗抑郁的药对研究中酸枣仁和远志、合欢花的报道较多^[6]。研究表明,远志、酸枣仁合用可显著减少反复低温应激模型动物及促肾上腺皮质激素释放激素诱发应激模型动物的戊巴比妥睡眠时间^[7]。酸枣仁-合欢花药对可以激活皮质细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)/环腺苷酸反应元件结合蛋白(CREB)信号传导通路,增强通路中关键因子的表达,从而改善大鼠的抑郁样行为^[8]。目前对合欢花和远志合用的抗抑郁效果及其作用机制研究尚无报道。课题组前期实验研究发现合欢花-远志药对能缩短悬尾实验和强迫游泳实验的不动时间,改善小鼠的绝望行为。为了进一步证明该药对的抗抑郁作用,本研究通过慢性轻度不可预知应激加孤养方法建立大鼠抑郁模型,比较合欢花和远志单药及药对对抑郁模型大鼠的运动行为及海马组织CREB,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶2(NOX2)表达的影响,初步探索其抗抑郁作用机制,为二药的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 雄性Wistar大鼠,8~9周龄,体质量180~220 g,由长春市亿斯实验动物技术有限公司提供,合格证号SCXK(吉)2020-0002。该实验得到长春中医药大学实验动物伦理委员会的批准,编号20180029。

1.2 药品与试剂 合欢花、远志饮片(安国祁安药业有限公司,批号200101),经长春中医药大学中药鉴定教研室齐伟晨副教授鉴定合欢花为豆科植物合欢 *Albizia julibrissin* 的干燥花序,远志为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* 的干燥根。采用传统煎药方法,分别将合欢花、远志单独或等量配伍制备成水煎液,冻干后保存。盐酸氟西汀胶囊(苏州礼来苏州制药有限公司,批号J20030017);TRIzol Universal总RNA提取试剂盒,普通RNA产物纯化试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号分别为W9113, U9019);BCA蛋白浓度测定试剂盒, BeyoRT II

cDNA第一链合成试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为120320201209, 120219200624);SYBR实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(近岸蛋白科技有限公司,批号0517451); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国CST公司,批号4970S);兔抗大鼠CREB一抗(北京博奥森生物技术公司,批号AD092414);NOX2多克隆抗体(英国Abcam公司,批号ab80508);山羊抗兔二抗(北京索莱宝科技有限公司,批号20201130);超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒,丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20201002,20200912)。

1.3 仪器 SZ-LGJ-10A型冷冻干燥机(上海舜制仪器公司);1200EX型透射电镜(日本日立公司);Mini-PROTEAN Tetra型垂直电泳槽,Mini Trans-Blot型湿转印槽及PowerPac Basic型电泳仪电源(美国Bio-Rad公司);Fusion FX SPECTRA型多功能成像系统(法国Vilber公司);PowerGen500型匀质器,PikoReal型Real-time PCR仪,Legend Micro21R型高速冷冻离心机,NanoDrop 2000c型分光光度计(美国Thermo Fisher公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药 适应性饲养1周后,将72只大鼠随机分为6组,分别为正常组、模型组、合欢花组、远志组、合欢花-远志药对组(简称药对组)及氟西汀组,每组12只。除正常组外,其他各组均制备抑郁模型,采取单笼孤养,并循环随机进行7种慢性轻度不可知应激刺激^[9-10],分别为黑白颠倒、电击足底、冰水游泳、禁食、禁水、夹尾、悬尾,每天进行1种刺激,7种刺激轮流进行,每周以不同的顺序循环1次(禁食、禁水不可接续进行),完成4个循环共28 d,通过行为学指标观测判定造模成功^[11]。正常组大鼠按时给予食水,不做其他任何处理。自造模第1天开始各组大鼠灌胃给药,合欢花组、远志组和药对组分别给与总生药量 $1.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的水煎液(临床等效量);氟西汀组给予 $2.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量盐酸氟西汀水溶液;正常组和模型组给予蒸馏水,每天1次,连续28 d。

2.2 大鼠一般状态观察 每日称量大鼠体质量,观察记录各组动物精神状态、毛色光泽度、进食、活动及死亡状况。

2.3 敞箱实验 自制敞箱,长、宽、高均80 cm,其内漆为黑色,并将底面划分为面积相等的25个方格。将大鼠轻轻捉放于敞箱中间,适应2 min后,连续拍

摄大鼠自主活动录像3 min。回放录像,计数大鼠三爪跨格的水平活动次数^[12]。于造模前1 d及造模第7,14,21,28天各进行1次观察。

2.4 糖水消耗实验 于造模前3 d给予1%蔗糖水2瓶,前2 d给予1%蔗糖水和纯水各1瓶进行训练。自造模开始每天给予1%蔗糖水和纯水各1瓶,记录大鼠饮用糖水量^[13]。于造模前1 d及造模第7,14,21,28天各进行1次记录。

2.5 游泳不动时间测定 将大鼠放入盛有常温清水的方形水桶(底面尺寸为30 cm×45 cm,液面高度为50 cm),观察其5 min内的游泳活动,测定并计算其处于不再挣扎、漂浮不动状态的总时间^[14]。于造模前1 d及造模第7,14,21,28天各进行1次观察。

2.6 透射电镜观察大鼠海马组织超微结构 造模第28天末次给药4 h后处死大鼠,快速取出海马组织,其中一部分放入液氮中保存,另一部分组织块置于2.5%戊二醛/0.1 mol·L⁻¹二甲胍酸钠缓冲液(pH 7.4)中固定,梯度脱水,包埋切片,待透射电镜观察^[15]。

2.7 海马组织中SOD活性和MDA含量检测 处死大鼠后迅速取脑并分离海马组织,冷生理盐水漂洗,滤纸吸干水分,称质量,匀浆,12 000 r·min⁻¹低温离心15 min(离心半径7 cm,下同),按照说明书方法检测上清液中SOD活性和MDA含量。

2.8 Real-time PCR检测大鼠海马组织中CREB和NOX2的mRNA表达 将海马组织剪碎,加入TRIzol 0.5 mL用匀浆仪低温匀浆20 s,按照试剂盒说明提取总RNA,NanoDrop测定RNA浓度。纯化后用逆转录试剂盒转化为cDNA,20 μL反应体系中加入PCR反应液10 μL,上下游引物各0.2 μL,cDNA模板1 μL。95 °C预变性1 min;95 °C变性15 s;60 °C退火延伸30 s,40个循环^[16]。以2^{-ΔΔC_t}表示基因的相对表达量。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,引物序列见表1。

表1 PCR引物序列

Table1 Primers sequence of PCR

引物	序列	长度/bp
CREB	上游 5'-CCAAACTAGCAGTGGGCAGTA-3'	166
	下游 5'-TCCATCAGTGGTCTGTGCAT-3'	
NOX2	上游 5'-TTTCAAGATGCGTGAAACTAC-3'	167
	下游 5'-AATCCCTGCTCCCACTAACA-3'	
β-actin	上游 5'-GCCAACAAGTGGTATTCTCCA-3'	120
	下游 5'-TGCCGTCTTTCATCACACAG-3'	

2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠海马组织中CREB和NOX2蛋白表达 将海马组织剪碎,用RIPA溶液裂解,低温匀浆,12 000 r·min⁻¹离心15 min,分离上清得到细胞总蛋白,BCA法检测蛋白浓度。SDS-PAGE凝胶电泳,湿转至PVDF膜,室温下封闭2 h。孵育CREB一抗(1:2 000),NOX2一抗(1:4 000)及β-actin一抗(1:1 000),4 °C过夜,洗膜,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:1万),孵育2 h。用ECL化学发光法显色,凝胶成像系统检测并拍照,免疫印迹条带采用Quantity One软件分析。

2.10 统计学分析 所有数据采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析,实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间样本均数比较采用One-way ANOVA方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般状态 造模前,各组大鼠皮毛干净有光泽,寻觅探查等自主活动较多。自第3天开始,模型组大鼠精神状态逐渐变差,毛色晦暗,反应迟钝,自主活动减少,常蜷缩不动;各给药组大鼠较正常组活动减少,但明显比模型组大鼠精神状态佳。

3.2 对抑郁大鼠水平活动次数的影响 与正常组比较,模型组大鼠造模后第14,21,28天水平运动次数明显减少($P<0.05$, $P<0.01$)。第21天起,与模型组比较,合欢花组、远志组、药对组和氟西汀组大鼠的运动次数明显增加($P<0.05$, $P<0.01$);第28天,药对组与合欢花组、远志组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

3.3 对糖水偏好的影响 第14天时,与正常组比较,模型组大鼠的糖水消耗量显著降低($P<0.01$),结合敞箱实验结果,证明大鼠抑郁模型制备成功。第14天后,与模型组比较,各给药组大鼠糖水消耗量明显增加($P<0.05$, $P<0.01$)。第28天,药对组与合欢花组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

3.4 对抑郁大鼠游泳不动时间的影响 第14天至第28天,与正常组比较,模型组游泳不动时间显著延长($P<0.01$);与模型组比较,合欢花组、远志组、药对组和氟西汀组游泳不动时间明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。第28天时,药对组与合欢花组、远志组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表4。

3.5 对海马组织超微结构的影响 透射电镜观察发现,造模第28天,正常组大鼠海马神经元结构未见异常,核膜呈清晰完整的双层膜结构,线粒体结构良好,神经胶质细胞无增生;模型组大鼠海马神

表 2 合欢花-远志对抑郁大鼠水平活动次数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 2 Effect of Albiziae Flos-Polygalae Radix on number of horizontal activity in open field test of depression rats ($\bar{x}\pm s, n=12$) 次

组别	剂量/g·kg ⁻¹	造模前 1 d	造模后 7 d	造模后 14 d	造模后 21 d	造模后 28 d
正常		57.17±3.79	52.17±3.51	55.42±4.36	54.08±9.28	54.50±2.88
模型		54.17±3.38	49.67±4.03	42.58±2.39 ¹⁾	37.01±6.52 ²⁾	33.83±3.04 ²⁾
合欢花	1.05	56.83±5.02	45.58±3.53	41.42±2.15	40.03±4.34 ³⁾	39.04±3.52 ^{3,5)}
远志	1.05	55.50±4.03	45.25±4.39	41.76±2.31	42.43±5.01 ³⁾	38.58±2.78 ^{3,5)}
药对	1.05	55.00±5.64	46.17±4.82	49.48±2.88 ⁴⁾	46.69±6.21 ⁴⁾	48.13±3.31 ⁴⁾
氟西汀	0.002 1	55.75±3.47	46.10±3.72	51.17±1.99 ⁴⁾	57.17±8.85 ⁴⁾	49.37±4.97 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与药对组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$ (表 3~7 同)。

表 3 合欢花-远志对抑郁大鼠糖水消耗量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 3 Effect of Albiziae Flos-Polygalae Radix on sugar water consumption of depression rats ($\bar{x}\pm s, n=12$) mL

组别	剂量/g·kg ⁻¹	造模前 1 d	造模后 7 d	造模后 14 d	造模后 21 d	造模后 28 d
正常		21.03±3.03	22.13±3.89	22.75±2.23	21.77±3.72	22.94±2.85
模型		20.28±4.97	19.28±4.16	15.08±2.73 ²⁾	13.28±4.97 ²⁾	12.33±3.50 ²⁾
合欢花	1.05	20.57±3.64	19.35±5.27	18.98±2.92 ³⁾	16.02±3.71	15.97±1.68 ^{3,5)}
远志	1.05	19.63±2.67	18.19±2.34	18.69±2.70 ³⁾	17.29±2.66 ³⁾	16.33±2.84 ³⁾
药对	1.05	20.44±2.98	19.19±2.34	19.18±3.62 ⁴⁾	18.79±2.21 ⁴⁾	19.50±3.08 ⁴⁾
氟西汀	0.002 1	19.94±3.26	18.67±4.42	19.23±2.23 ⁴⁾	18.64±3.55 ³⁾	17.42±2.53 ⁴⁾

表 4 合欢花-远志对抑郁大鼠游泳不动时间的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 4 Effect of Albiziae Flos-Polygalae Radix on immobility time in swim test of depression rats ($\bar{x}\pm s, n=12$) s

组别	剂量/g·kg ⁻¹	造模前 1 d	造模后 7 d	造模后 14 d	造模后 21 d	造模后 28 d
正常		42.58±5.27	41.43±6.62	43.5±6.26	44.42±3.61	44.42±3.93
模型		43.08±6.24	45.04±7.54	58.25±5.83 ²⁾	60.47±4.32 ²⁾	64.25±4.84 ²⁾
合欢花	1.05	43.33±6.32	41.94±6.80	50.64±4.87 ³⁾	53.78±5.44 ³⁾	58.32±3.37 ^{3,5)}
远志	1.05	42.42±5.10	43.16±5.21	52.57±5.94 ³⁾	52.59±3.0 ⁴⁾	58.11±4.72 ^{4,5)}
药对	1.05	42.92±4.97	43.91±4.46	51.33±4.64 ³⁾	47.30±4.36 ⁴⁾	48.00±3.59 ⁴⁾
氟西汀	0.002 1	42.50±6.26	42.18±5.06	46.18±5.27 ⁴⁾	46.92±5.98 ⁴⁾	47.78±4.37 ³⁾

经元水肿崩解,核膜双层膜结构模糊不清或消失,线粒体肿胀,嵴结构破坏,可见神经胶质细胞增生;合欢花组和远志组切片可见神经元轻微水肿,核膜双层膜结构较为清晰,线粒体结构未见异常,可见肿胀的神经胶质细胞;而氟西汀组和药对组大鼠海马神经元改变最为轻微,呈基本正常结构,核膜双层膜结构清晰完整,线粒体结构良好,神经胶质细胞未见明显增生。见图 1。

3.6 对海马组织 SOD 活性和 MDA 含量的影响

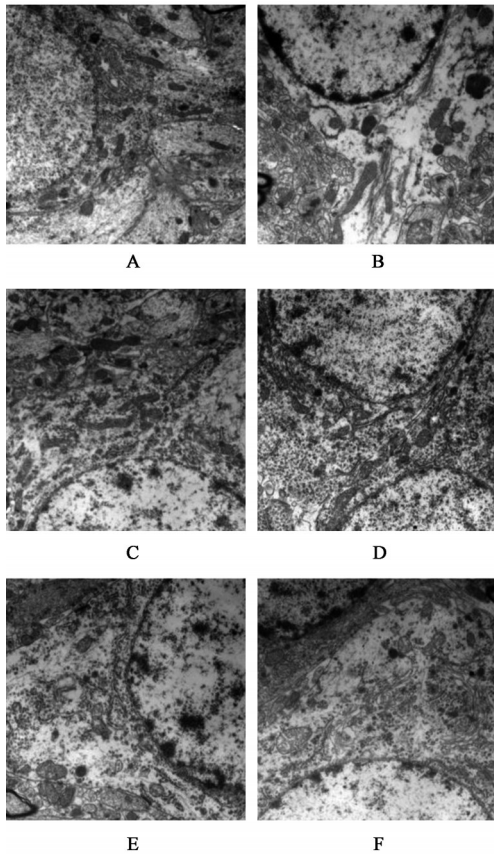
造模第 28 天,与正常组比较,模型组大鼠海马组织 SOD 活性显著降低,而 MDA 含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,远志组和药对组 MDA 含量明显降低($P<0.05, P<0.01$),药对组 SOD 活性明显升高($P<0.05$);药对组与合欢花组、远志组比较,SOD 活性差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。见表 5。

3.7 对海马组织 CREB 及 NOX2 mRNA 表达的影响

造模第 28 天,与正常组比较,模型组大鼠海马组织 CREB mRNA 的表达显著降低,NOX2 mRNA 的表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠海马 CREB mRNA 的表达明显升高,而 NOX2 mRNA 的表达明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表 6。

3.8 对海马组织 CREB 及 NOX2 蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组大鼠海马组织 CREB 的表达水平明显降低($P<0.05$),NOX2 的表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,合欢花组、远志组、药对组和氟西汀组 CREB 的表达水平明显升高($P<0.05, P<0.01$);药对组与远志组、合欢花组比较,CREB 和 NOX2 的表达有显著性差异($P<0.01$)。见表 7,图 2。



A. 正常组; B. 模型组; C. 合欢花组; D. 远志组; E. 药对照组; F. 氟西汀组(图2同)

图1 合欢花-远志对抑郁大鼠海马组织超微结构的影响(电镜扫描, $\times 2500$)

Fig. 1 Effect of Albiziae Flos-Polygalae Radix on ultrastructure of hippocampal tissue in depression rats (TEM, $\times 2500$)

表5 合欢花-远志对抑郁大鼠海马SOD活性及MDA含量的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 5 Effect of Albiziae Flos-Polygalae Radix on SOD activity and MDA content in hippocampus of depression rats ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	SOD/ $U \cdot mg^{-1}$	MDA/ $nmol \cdot g^{-1}$
正常		134.52 \pm 24.74	3.94 \pm 0.73
模型		82.72 \pm 9.72 ²⁾	8.25 \pm 1.27 ²⁾
合欢花	1.05	84.37 \pm 7.05 ⁵⁾	6.26 \pm 0.99 ⁵⁾
远志	1.05	96.23 \pm 15.82 ⁶⁾	5.48 \pm 0.90 ³⁾
药对	1.05	112.38 \pm 14.73 ³⁾	4.23 \pm 0.76 ⁴⁾
氟西汀	0.002 1	106.93 \pm 11.34 ³⁾	5.26 \pm 1.04 ³⁾

4 讨论

本研究采用慢性不可预知应激加孤养制备的抑郁模型,该模型能较好地体现抑郁患者情绪低落、活动减少和思维迟缓的核心症状^[17]。且造模成本低廉、操作简便、结果可靠,是研究抑郁症发病机制和抗抑郁药物作用机制的理想模型^[18]。常规抗抑郁药物疗效欠佳,副作用较大,患者依从性低^[19]。

表6 合欢花-远志对抑郁大鼠海马CREB及NOX2 mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Albiziae Flos-Polygalae Radix on expression of CREB and NOX2 mRNA in hippocampus of depression rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	CREB	NOX2
模型		0.69 \pm 0.06 ²⁾	1.23 \pm 0.07 ²⁾
合欢花	1.05	0.83 \pm 0.12 ³⁾	1.12 \pm 0.08 ³⁾
远志	1.05	0.82 \pm 0.09 ³⁾	1.09 \pm 0.11 ³⁾
药对	1.05	0.84 \pm 0.14 ⁴⁾	1.06 \pm 0.09 ⁴⁾
氟西汀	0.002 1	0.84 \pm 0.13 ⁴⁾	1.07 \pm 0.10 ⁴⁾

注:设正常组个指标mRNA相对表达量为1。

表7 合欢花-远志对抑郁大鼠海马CREB及NOX2蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Albiziae Flos-Polygalae Radix on expression of CREB and NOX2 proteins in hippocampus of depression rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	CREB/ β -actin	NOX2/ β -actin
正常		0.44 \pm 0.01	0.41 \pm 0.02
模型		0.36 \pm 0.01 ¹⁾	0.56 \pm 0.03 ²⁾
合欢花	1.05	0.38 \pm 0.02 ^{3,6)}	0.58 \pm 0.01 ⁶⁾
远志	1.05	0.53 \pm 0.03 ^{4,6)}	0.43 \pm 0.02 ⁴⁾
药对	1.05	0.78 \pm 0.01 ⁴⁾	0.43 \pm 0.02 ⁴⁾
氟西汀	0.002 1	0.82 \pm 0.02 ⁴⁾	0.41 \pm 0.01 ⁴⁾

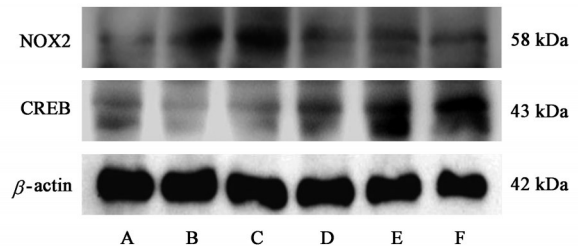


图2 大鼠海马组织NOX2及CREB蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of NOX2 and CREB proteins expression in hippocampus of rats

近年来,安神类中药在抑郁症的治疗中发挥重要作用,成为研究热点。已有研究表明,石菖蒲、朱砂、茯神等都具有一定的抗抑郁作用^[20]。合欢花水提物能够增加抑郁模型大鼠敞箱实验活动次数,升高大鼠海马组织CREB的表达^[21]。远志醇提物能有效改善慢性应激抑郁大鼠模型的行为,敞箱实验中水平运动、垂直运动增加,糖水消耗明显增加^[22-23]。本研究发现,合欢花-远志药对能够显著增加抑郁大鼠的活动,降低游泳不动时间,增加糖水消耗量,抗抑郁作用优于单味药。

海马是产生应激反应的重要脑区^[24],这一区域

组织损伤是抑郁症发病机制之一^[25]。中枢活性氧(ROS)在抑郁病理机制中发挥了重要作用,而ROS的产生依赖于NOX2^[26]。研究表明慢性应激导致大鼠抑郁样行为与大脑脂质过氧化代谢产物MDA水平增高有关^[27]。本项研究中,电镜观察发现模型组大鼠海马组织结构损伤严重,而合欢花-远志单味药及药对可显著减轻神经元水肿的程度,改善其微观结构形态,对抑郁模型大鼠海马组织具有保护作用。此外,合欢花-远志药对能够升高海马组织中SOD活性,降低MDA含量,使NOX2表达水平明显下降,有效保护慢性应激引起的脂质过氧化损伤。

CREB是一种具有选择性特异结合环磷酸腺苷(cAMP)反应元件功能的核蛋白^[28]。抑郁症患者海马组织中磷酸化CREB含量显著降低,这一观点已被临床研究所证实^[29]。动物实验也表明,动物海马组织损伤时,其内部的CREB表达不活跃^[30]。本研究发现模型组大鼠海马CREB mRNA及蛋白的表达显著低于正常组,而在合欢花-远志单味药及药对的干预下CREB表达明显升高。

综上,合欢花-远志单味药及药对可以改善抑郁模型大鼠的情绪、行为及海马组织超微结构,且能够减轻海马组织氧化应激损伤,升高海马组织中CREB的表达,降低NOX2的表达,具有一定的抗抑郁作用。其对CREB信号通路上下游的具体调控作用有待进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] NIELSEN B, CEJVANOVIC V, WORTWEIN G, et al. Increased oxidation of RNA despite reduced mitochondrial respiration after chronic electroconvulsive stimulation of rat brain tissue [J]. *Neurosci Lett*, 2019, 690: 1-5.
- [2] POSTAL M, APPENZELLER S. The importance of cytokines and autoantibodies in depression [J]. *Autoimmun Rev*, 2015, 14(1): 30-35.
- [3] 刘尚泉,薛善彬. 安神中药饮片安全分析[J]. *实用中医药杂志*, 2018, 34(6): 747-748.
- [4] 李兆珍,李炜,张丹参. 远志治疗抑郁症的药理研究[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2019, 33(9): 711-712.
- [5] 李传朋,刘玉,魏品球,等. 逍遥散及其类方与有效成分抗抑郁作用机制研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(6): 243-250.
- [6] 曹智怡,李玲,范丽丽,等. 酸枣仁-合欢花对抑郁模型大鼠行为学及内质网应激PERK/ATF4/CHOP通路

的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(7): 66-72.

- [7] 张智华,文莉,陈海洋,等. 远志常用配伍的实验研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(12): 224-228.
- [8] 施学丽,曹智怡,马晓聪,等. 对药酸枣仁-合欢花对抑郁模型大鼠行为学及皮质ERK-CREB细胞信号转导通路的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2020, 31(1): 8-14.
- [9] GUO L, CHEN Y X, HU Y T, et al. Sex hormones affect acute and chronic stress responses in sexually dimorphic patterns: consequences for depression models [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2018, 95: 34-42.
- [10] 于彩媛,李宁,张建军. 青阳参总苷对慢性不可预知轻度应激大鼠的抗抑郁作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(13): 95-98.
- [11] 郭盼盼. 开心散合安神汤对慢性不可预知应激刺激抑郁模型大鼠行为学及海马5-羟色胺的影响[J]. *实用中医药杂志*, 2018, 34(12): 1410-1411.
- [12] 吴红芳,金齐颖,曹金英,等. BDNF在慢性不可预见性温和刺激应激大鼠海马星形胶质细胞中的表达[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(9): 61-64.
- [13] 徐凤凤,徐达,朱含笑,等. 甘草苷通过减少杏仁核细胞凋亡改善卒中后抑郁大鼠的抑郁行为[J]. *国际脑血管病杂志*, 2021, 29(4): 277-284.
- [14] 陈明珠,陈静,黄幼霞,等. 绿萼梅总黄酮对慢性应激抑郁模型大鼠抑郁行为的影响及机制研究[J]. *中国药房*, 2017, 28(13): 1758-1762.
- [15] 王洪财,王波定,陈海,等. 低氧血症对轻型颅脑损伤大鼠海马结构二次脑损伤的实验研究[J]. *浙江医学*, 2015, 13: 1129-1132, 1135.
- [16] 胡茂林,宗小芬,梁炜,等. 抑郁症模型大鼠海马区磷酸化环磷酸腺苷反应元件结合蛋白1表达水平及神经元和突触超微结构的研究[J]. *中华精神科杂志*, 2015, 48(2): 92-97.
- [17] YAN T M, FAN W T, LIU L, et al. The effects of Xingnao Jieyu capsules on post-stroke depression are similar to those of fluoxetine [J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8(19): 1765-1772.
- [18] 宇庆迎,杨莹,刘墨林,等. 实验动物抑郁模型研究进展[J]. *医学综述*, 2021(8): 1574-1579, 1584.
- [19] 杨帅,何勇,崔显勋,等. 张金生运用交泰丸合磁朱丸治疗顽固性失眠经验[J]. *中医药临床杂志*, 2017, 29(9): 1436-1437.
- [20] 戴建国,王中立,陈琳,等. 6种宁神类药物抗抑郁作用动物实验研究[J]. *南京中医药大学学报*, 2014, 30(2): 192-194.

- [21] 王爱梅,未小明,陈亚奇,等. 合欢花水提物对抑郁模型大鼠学习记忆及海马 CREB 表达的影响[J]. 神经解剖学杂志,2015,31(6):771-776.
- [22] 孙艳,谢婷婷,王东晓,等. 中药远志对慢性应激抑郁大鼠 BDNF 及其受体 TrkB mRNA 表达的影响[J]. 南方医科大学学报,2009,29(6):1199-1203.
- [23] 谢婷婷,孙艳,王东晓,等. 远志 YZ-50 对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及血清 CRH ACTH 和 COR 的影响[J]. 解放军药理学学报,2008,24(2):95-98.
- [24] BHAGYA V R, SRIKUMAR B N, VEENA J, et al. Short-term exposure to enriched environment rescues chronic stress-induced impaired hippocampal synaptic plasticity, anxiety, and memory deficits[J]. *J Neurosci Res*,2017,95(8):1602-1610.
- [25] ARDALAN M, WEGENER G, RAFATI A H, et al. S-ketamine rapidly reverses synaptic and vascular deficits of hippocampus in genetic animal model of depression[J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2017, 20(3):247-256.
- [26] WAGHELA B N, VAIDYA F U, PATHAK C. Upregulation of NOX-2 and Nrf-2 promotes 5-fluorouracil resistance of human colon carcinoma (HCT-116) cells[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2021, 86(3):262-274.
- [27] FOYET H S, TCHINDA DEFFO S, KOAGNE Y P, et al. Ficus sycomorus extract reversed behavioral impairment and brain oxidative stress induced by unpredictable chronic mild stress in rats [J]. *BMC Complement Altern Med*,2017,17(1):502.
- [28] ETTCHETO M, ABAD S, PETROV D, et al. Early preclinical changes in hippocampal CREB-binding protein expression in a mouse model of familial Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 55(2016):1-11.
- [29] FENG D D, ANG Y, TANG T, et al. Research on serum objective indicators related to depression patients with liver Qi stagnation syndrome by using chemometrics method [J]. *Int J Psychiatry*, 2017, 44(3):573-576.
- [30] MOTAGHINEJAD M, MOTEVALIAN M, FATIMA S, et al. Curcumin confers neuroprotection against alcohol-induced hippocampal neurodegeneration via CREB-BDNF pathway in rats [J]. *Biomed Pharmacother*,2017,87:721-740.

[责任编辑 周冰冰]