

舒郁胶囊对 PMDD 肝气郁证模型大鼠 Cav1.2 介导的 CaM/CaMK II 信号通路的影响

李艺杰¹, 王美艳², 薛玲^{1*}, 宋春红^{3*}

(1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 烟台市中医院, 山东烟台 264000;
3. 山东中医药大学实验中心, 济南 250355)

[摘要] **目的:**观察舒郁胶囊对强迫游泳应激诱导的经前烦躁障碍(premenstrual dysphoric disorder, PMDD)肝气郁证大鼠的影响,探讨 L 型钙通道(L-type calcium channel, LTCC) Cav1.2 亚型介导的钙调蛋白(CaM)/CaMK II 信号通路在 PMDD 肝气郁证发生中的机制。**方法:**动情周期规律的大鼠进行 3 次强迫游泳实验,筛选出 48 只雌性 Wistar 大鼠进入实验,两次非接受期和接受期悬浮不动时间差值绝对值平均值最小的 12 只为正常组,其余 36 只分为模型组、舒郁胶囊组(0.408 g·kg⁻¹·d⁻¹),氟西汀组(2.7 mg·kg⁻¹·d⁻¹)。给药组连续给药 2 个动情周期,模型组和正常组给以等量纯水。采用旷场实验、强迫游泳悬浮不动时间及悬浮不动次数评价模型和药物干预效果。免疫荧光、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白质免疫印迹(Western blot)检测各组大鼠海马脑中 L 型钙通道 α_{1c} 亚型(CACNA_{1c}),CaM 依赖性蛋白激酶 II (CaMK II) 的分布及表达。**结果:**CACNA_{1c} 蛋白主要分布在细胞膜上,CaMK II 蛋白主要分布在的细胞质内;与正常组比较,模型组大鼠体质量、旷场总路程显著下降($P < 0.05, P < 0.01$),强迫游泳悬浮不动时间、悬浮不动次数显著升高($P < 0.05, P < 0.01$),海马脑区细胞排列散乱,CACNA_{1c} 和 CaMK II 表达升高($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,氟西汀和舒郁胶囊组大鼠体质量、旷场总路程明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),强迫游泳悬浮不动时间、悬浮不动次数明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),海马脑区细胞排列整齐,CACNA_{1c} 和 CaMK II 表达明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**利用强迫游泳可成功诱导出 PMDD 肝气郁证大鼠模型。舒郁胶囊可能通过 Cav1.2 介导的 CaM/CaMK II 信号通路发挥治疗作用,显著改善 PMDD 肝气郁证大鼠的行为学变化。

[关键词] 经前烦躁障碍肝气郁证; 舒郁胶囊; L 型钙通道 α_{1c} 亚型; CaM 依赖性蛋白激酶 II

[中图分类号] R22;R24;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)10-0130-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181034

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180309.1018.009.html>

[网络出版时间] 2018-03-09 13:24

Effect of Shuyu Capsule on Cav1.2-mediated CaM/CaMK II Signaling Pathway in Rats with PMDD Liver-Qi Stagnation Syndrome Model

LI Yi-jie¹, WANG Mei-yan², XUE Ling^{1*}, SONG Chun-hong^{3*}

(1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250355, China;
2. Yantai Hospital of TCM, Yantai 264000, China;
3. Experimental Center, Shandong University of TCM, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Shuyu capsule on premenstrual dysphoric disorder (PMDD) type liver-qi depression rats induced by forced swimming test, in order to investigate the mechanism of L-type calcium channel (LTCC) Cav1.2 subtype-mediated Calmodulin (CaM) /CaMK II signaling pathway in the

[收稿日期] 20171225(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81403294,81603510)

[第一作者] 李艺杰,在读硕士,从事中药调肝方药药理研究,E-mail:596183691@qq.com

[通信作者] *薛玲,硕士,教授,从事中药调肝方药药理研究,Tel:0531-89628471,E-mail:xxueling@163.com;

*宋春红,博士,讲师,从事中药调肝方药药理研究,Tel:0531-89628471,E-mail:sch-64552@126.com

pathogenesis of PMDD stagnation of liver-Qi. **Method:** Totally 48 female Wistar rats with regular estrous cycle were selected by three forced swimming. The mean absolute value of difference value between non-acceptance period and suspension time was calculated. The 12 rats with the lowest mean value was included in the normal group, and the remaining 36 rats were divided into model group, Shuyu capsule group ($0.408 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and fluoxetine administration group ($2.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). The drug group was given for continuously two estrous cycles, and the model group and the normal group were given the same amount of pure water. The open field test, immobility duration and immobility frequency were used to evaluate the model and drug intervention effect. The distribution and expressions of L-type calcium Channel α_{1c} (CACNA_{1c}) and CaMK II genes in hippocampus of rats were detected by immunofluorescence, real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot. **Result:** CACNA_{1c} protein was mainly distributed in the cell membrane, CaMK II protein was mainly distributed in the cytoplasm. Compared with the normal group, the body weight and total distance of open field text of model group were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), immobility duration and immobility frequency of model group were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), hippocampus cells was scattered, CACNA_{1c} and CaMK II expressions were increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in model group. Compared with the model group, the body weight and total distance of open field text of model group were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), immobility duration and immobility frequency of model group were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), hippocampus cells was scattered, the expressions of CACNA_{1c} and CaMK II were decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in fluoxetine group and Shuyu capsule group. **Conclusion:** The rat model of PMDD liver-Qi stagnation can be successfully induced by forced swimming. Shuyu capsule may play a therapeutic role through Cav1.2-mediated CaM/CaMK II signaling pathway and significantly improve the behavioral changes of rats with PMDD stagnation of liver-qi stagnation.

[**Key words**] premenstrual dysphoric disorder liver-qi stagnation syndrome; Shuyu capsule; L-type calcium Channel α_{1c} (CACNA_{1c}); Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II)

经前烦躁障碍 (premenstrual dysphoric disorder PMDD) 以女性黄体期出现临床显著的精神情绪症状, 月经开始症状消失为特征, 其发生率大约占育龄期妇女的 5.5% (符合 DSM-5 诊断标准)^[1]。因其严重影响患者的生活质量、家庭及社会的稳定而备受国内外医学及社会学界的共同关注。在 PMDD 患者中, 36% 的患者曾患有抑郁症, 严重者出现自杀行为^[1]。CACNA_{1c} 编码 L 型钙通道 (L-type calcium channel, LTCC) Cav1.2 亚型的 α_{1c} 亚基, 是抑郁症疾病的候选基因之一, 口服钙可有效治疗 PMDD 患者^[2]。那么 Cav1.2 介导的钙调蛋白 (CaM)/CaM 依赖性蛋白激酶 II (CaMK II) 信号通路 with PMDD 肝气郁证的发生是否相关, 尚未见相关文献报道。舒郁胶囊是疏肝解郁的有效方剂, 治疗抑郁症, PMDD 效果显著^[3-4], 课题组前期研究证实, 舒郁胶囊可改善通过强迫游泳诱导的 PMDD 肝气郁大鼠的抑郁样行为^[5], 在离体实验研究中发现, 慢性束缚应激制备的 PMS 肝气郁证大鼠模型血清可增加原代神经元中 LTCC 电流的密度, 而舒郁胶囊含药血清可抑制海马神经元内钙离子浓度, 降低海马神经元细

胞内的 LTCC 电流^[6]。笔者推测舒郁胶囊可能是通过 Cav1.2 介导的 CaM/CaMK II 信号通路发挥治疗作用。因此本研究通过观察舒郁胶囊对强迫游泳诱导 PMDD 肝气郁证大鼠行为以及钙信号通路中关键基因 CACNA_{1c}, CaMK II 表达和分布的影响, 探索该信号通路在 PMDD 肝气郁证中的作用以及舒郁胶囊治疗 PMDD 肝气郁的微观作用靶点, 同时揭示了 PMDD 又一发病机制, 为后期治疗该病症提供新思路。

1 材料

1.1 动物 SPF 级健康 Wistar 雌性大鼠, 体质量 130 ~ 150 g, 120 只。由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供, 合格证号 SCXK (鲁) 2014-0007。实验研究获得山东中医药大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 药物及试剂 舒郁胶囊 (中国青岛海川创新生物天然药物研究中心, 国药准字 2014L11169); 盐酸氟西汀胶囊 (中国中化药品工业有限公司, 批号 53515001); BCA 试剂盒 (中国博士德生物科技有限公司, 批号 BQ-0146); 蛋白免疫印迹 (Western blot) 抗体 [β -肌动蛋白 (β -actin) 鼠单克隆一抗, 羊抗鼠二

抗,羊抗兔二抗(中国天津三箭生物科技有限公司,批号分别为 KM9001, LK2003, ZB4502);CACNA_{1c}鼠单克隆一抗(美国 Abcam 公司,批号 ab84814);CaMK II, p-CaMK II 兔多克隆一抗(美国 Cell Signaling 公司,批号分别为 3362, 12716)。免疫荧光抗体[CACNA_{1c}鼠单克隆一抗(美国 Novus 公司,批号 NBP1-22439);CaMK II 兔多克隆一抗(中国 NOVUS 公司,批号 NBP2-13006);羊抗鼠二抗,羊抗兔二抗(美国 Abcam 公司,批号分别为 ab150115, ab150077);逆转录试剂盒(美国 Thermo 公司,批号#k1622);荧光染料试剂盒(瑞士罗氏公司,批号 04887352001)。

1.3 仪器 Smart 3.0 型行为学视频采集与分析系统(西班牙 Panlab 公司),XR-SuPerMaze 型动物行为分析系统(上海欣软信息科技有限公司),Biophotometer Plus-M1 型核酸蛋白测定仪(德国 Eppendorf 公司),Roche LightCycler 480 型 PCR 扩增仪(瑞士罗氏公司),ChemiDoc™ MP Imaging System 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 强迫游泳诱导 PMDD 肝气郁证大鼠模型 大鼠自由进食进水,每日于 20:30 开灯,8:30 关灯,适应性饲养 1 周。采用阴道涂片镜检法确定大鼠的动情周期^[7],通过连续 9 d 阴道涂片筛选动情周期规律大鼠 132 只进入实验。通过强迫游泳实验(FST)筛选 PMDD 肝气郁证模型大鼠 36 只和正常组大鼠 12 只^[8-9],将 132 只大鼠在 5 个动情周期进行 3 次 FST 实验,第 1 次和第 3 次分别在大鼠的第 1 个和第 5 个动情周期的非接受期时进行,第 2 次在大鼠第 3 个动物周期的接受期时进行,计算两次大鼠非接受期和接受期悬浮不动时间差值绝对值平均值,笔者选取差值数值大的前 1/3 大鼠 36 只作为模型组,差值小的 12 只大鼠作为正常组。将差值大的 36 只大鼠分为模型组、舒郁胶囊 + 模型组、氟西汀 + 模型组。分组之后,在动物周期的非接受期的动情间期进行给药,给药 2 个动情周期(第 1 个动物周期期间开始,第 3 个动情周期期间结束),每日上午 9:00 给药,舒郁胶囊和氟西汀均为治疗 PMDD 肝气郁有效药物,因此实验中给药剂量均为临床有效剂量的 8 倍剂量给药,舒郁胶囊给予 0.408 g·kg⁻¹·d⁻¹;氟西汀给予 2.7 mg·kg⁻¹·d⁻¹,正常组和模型组给以等量纯水。

2.2 大鼠数据采集和分析 每周称量大鼠体质量,最后 1 次给药结束后,进行旷场实验,强迫游泳实

验。通过 Panlab 的 Smart 3.0 实验动物行为视频采集与分析系统和上海欣软信息科技有限公司的实验动物行为视频采集分析系统(SuperMaze)记录大鼠的活动情况及运动轨迹,并分析旷场运动总路程(total distance),强迫游泳悬浮不动时间、强迫游泳悬浮不动次数。

大鼠行为学检测结束后,在动情周期非接受期取材。每组选取 9 只大鼠快速断头取脑,分离海马置于无外源 RNase 的 1.5 mL 离心管中,迅速放入液氮中,用于实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和 Western blot 实验。剩余大鼠 10% 水合氯醛麻醉,用生理盐水和多聚甲醛进行心脏灌流、固定,迅速剥离全脑,置于多聚甲醛固定液中 4 °C 固定。

2.3 Real-time PCR 实验检测大鼠海马 CACNA_{1c}, CaM, CaMK II mRNA 表达水平 按照 trizol 试剂盒说明提取总 RNA,利用逆转录试剂盒进行反转录,条件为 37 °C 15 min,50 °C 5 min,98 °C 5 min,4 °C。引物序列为 CACNA_{1c} 上游 5'-CGAGGATACGCTTCCAGAGG-3', 20 bp,下游 5'-CTGACGGTAGAGATGGTTCGC-3', 20 bp; CaM 上游 5'-GACTGTCATGCGGTCCTACTGG-3', 20 bp,下游 5'-TGACCTGTCCGTCTCCATCAAT-3', 22 bp; CaMK2a 上游 5'-CCTGGAATGACAGCCTTT-3', 18 bp,下游 5'-ACTGAGTGATGCGGATGTAG-3', 20 bp; CaMK2b 上游 5'-CGGAAGCAGGAAATCATC-3', 18 bp,下游 5'-CCAGCAGGTTCTCAAAGTAGA-3', 21 bp;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)上游 5'-GGCAA GTTCAACGGCACAGT-3', 20 bp,下游 5'-TGGTGAAGACGCCAGTAGACTC-3', 22 bp。RNA 变性条件为 65 °C 5 min,逆转录条件为 37 °C 15 min,50 °C 5 min,98 °C 5 min,4 °C 保存。在 PCR 扩增仪进行扩增。PCR 扩增条件为 95 °C 20 s,95 °C 5 s,60 °C 30 s,40 个循环。采用 LightCycle96 SW1.1 软件分析系统,2^{-ΔΔCt}法进行相对定量计算。

2.4 Western blot 实验检测大鼠海马 CACNA_{1c}, CaMK II, p-CaMK II 蛋白表达水平 每组织 100 mg 加入 RIPA 裂解液 1 mL 匀浆、冰上裂解 30 min,于 4 °C,12 000 r·min⁻¹离心 5 min,取上清。BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,按样品体积,SDS 凝胶上样,体积按照 1:3 加入缓冲液,95 °C 变性 5 min,总蛋白 50 μg 上样,10% SDS-PAGE 电泳分离 2 h,300 mA 湿转 90 min 至 NC 膜上,封闭 2 h, TBST 洗 3 次,再分别与 β-actin 鼠单克隆一抗(1:800),CACNA_{1c}鼠单克隆一抗(1:1 000),CaMK II 兔

多克隆一抗(1:1 000), p-CaMK II 兔多克隆一抗(1:1 000)孵育 4 ℃ 过夜, TBST 洗 3 次。羊抗鼠二抗(1:3 000), 羊抗兔二抗(1:3 000)室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, ECL 发光法显色, 成像仪成像。使用 Image J 软件对蛋白条带进行灰度值分析。目的蛋白灰度值/ β -actin 灰度值得到目的蛋白相对值。

2.5 免疫荧光检测大鼠海马 CACNA_{1C}, CaMK II 蛋白分布及表达 制备全脑组织切片, 37 ℃ 烘箱中烘烤过夜, 二甲苯、梯度乙醇、纯水进行脱蜡, 0.1 mol·L⁻¹ 柠檬酸缓冲液修复, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤, 滴加正常山羊血清室温封闭 30 min, 一抗(1:100)4 ℃ 过夜, PBS 洗涤, 二抗(1:200)37 ℃ 孵育 30 min, PBS 洗涤, 封片, 荧光显微镜采集图像,

Image J 软件进行分析。

2.6 统计学分析 使用 Graphad Prism6 统计, 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 One-way ANOVE 分析处理, 两组组间比较采用配对样本 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠宏观行为学结果

3.1.1 对 PMDD 大鼠体质量变化的影响 实验开始之前各组大鼠体质量无明显区别, 在实验开始后模型组大鼠体质量呈下降趋势, 给药结束后, 与正常组大鼠比较, 模型组大鼠体质量显著降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 氟西汀与舒郁胶囊组大鼠体质量显著升高($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 舒郁胶囊对 PMDD 大鼠体质量变化的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第 1 天	第 10 天	第 20 天	第 30 天	第 40 天
正常	-	143.91 ± 9.15	159.05 ± 8.64	162.39 ± 9.73	167.57 ± 13.04	172.65 ± 10.80
模型	-	141.43 ± 9.39	157.59 ± 4.47	155.65 ± 7.36	152.79 ± 8.85	142.08 ± 10.07 ²⁾
氟西汀	0.002 7	142.83 ± 8.98	157.79 ± 9.86	164.33 ± 12.54	169.07 ± 10.22	171.34 ± 8.30 ⁴⁾
舒郁胶囊	0.408	142.33 ± 9.36	159.93 ± 6.92	165.43 ± 9.45	168.00 ± 10.58	174.42 ± 9.05 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⁾ $P < 0.01$ (表 2~6 同)。

3.1.2 对 PMDD 大鼠旷场实验总路程的影响 与正常组比较, 模型组大鼠旷场总路程显著降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 氟西汀与舒郁胶囊组大鼠旷场总路程显著升高($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 舒郁胶囊对 PMDD 大鼠旷场实验总路程的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	旷场总路程/cm
正常	-	51 595 ± 351
模型	-	29 060 ± 754 ¹⁾
氟西汀	0.002 7	53 973 ± 184 ⁴⁾
舒郁胶囊	0.408	52 884 ± 134 ³⁾

3.1.3 对 PMDD 大鼠悬浮不动时间、次数影响 与正常组比较, 模型组大鼠非接受期的悬浮不动时间与悬浮不动次数明显升高($P < 0.05, P < 0.01$); 与模型组比较, 氟西汀与舒郁胶囊组大鼠非接受期的悬浮不动时间与悬浮不动次数明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

3.2 各组大鼠海马中 Cav1.2 介导的 CaM/CaMK II

表 3 舒郁胶囊对 PMDD 大鼠悬浮不动时间、次数影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 3 Effect of Shuyu capsule on comparison in immobility duration total(second) and immobility number total of PMDD rats($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	悬浮不动时间/s	悬浮不动数/次
正常	-	387.73 ± 19.25	121.18 ± 9.230
模型	-	493.72 ± 23.44 ¹⁾	188.27 ± 13.55 ²⁾
氟西汀	0.002 7	365.11 ± 26.03 ⁴⁾	130.66 ± 21.80 ⁴⁾
舒郁胶囊	0.408	382.40 ± 12.79 ³⁾	143.91 ± 15.14 ³⁾

信号通路中关键基因的表达

3.2.1 对强迫游泳诱导 PMDD 大鼠海马 CACNA_{1C}, CaM, CaMK II- α , CaMK II- β mRNA 表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠海马中 CACNA_{1C}, CaM, CaMK II- α , CaMK II- β mRNA 表达均明显升高($P < 0.05, P < 0.01$); 与模型组比较, 氟西汀与舒郁胶囊组大鼠海马中 CACNA_{1C}, CaM, CaMK II- α , CaMK II- β mRNA 表达均明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

表 4 舒郁胶囊对 PMDD 大鼠海马 CACNA_{1C}, CaM, CaMK II- α , CaMK II- β mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Shuyu capsule on expression of CACNA_{1C}, CaM, CaMK II- α and CaMK II- β mRNA in hippocampus of PMDD rats($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CACNA _{1C}	CaM	CaMK II- α	CaMK II- β
正常	-	0.87 ± 0.04	0.84 ± 0.04	0.69 ± 0.11	0.66 ± 0.26
模型	-	1.42 ± 0.10 ¹⁾	1.65 ± 0.20 ²⁾	1.32 ± 0.51 ¹⁾	1.30 ± 0.19 ¹⁾
氟西汀	0.002 7	0.84 ± 0.09 ⁴⁾	0.94 ± 1.43 ⁴⁾	0.08 ± 0.19 ³⁾	0.59 ± 0.02 ⁴⁾
舒郁胶囊	0.408	0.87 ± 0.17 ⁴⁾	0.87 ± 0.11 ⁴⁾	0.77 ± 0.03 ³⁾	0.67 ± 0.08 ³⁾

3.2.2 对 PMDD 大鼠海马 CACNA_{1C}, CaMK II, p-CaMK II 蛋白表达影响 与正常组比较,模型组大鼠海马中 CACNA_{1C}, CaMK II, p-CaMK II 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,氟西汀与舒郁胶囊组大鼠海马中 CACNA_{1C}, CaMK II, p-CaMK II 蛋白表达均明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 5,图 1。

表 5 舒郁胶囊对 PMDD 大鼠海马 CACNA_{1C}, CaMK II, p-CaMK II 蛋白表达影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of Shuyu capsule on expression of CACNA_{1C}, CaMK II and p-CaMK II protein in hippocampus of PMDD rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CACNA _{1C} / β -actin	CaMK II / β -actin	p-CaMK II /CaMK II
正常	-	0.597 ± 0.075	0.606 ± 0.034	0.598 ± 0.017
模型	-	0.924 ± 0.024 ²⁾	0.872 ± 0.038 ¹⁾	0.914 ± 0.011 ²⁾
氟西汀	0.002 7	0.614 ± 0.035 ⁴⁾	0.613 ± 0.014 ³⁾	0.657 ± 0.014 ⁴⁾
舒郁胶囊	0.408	0.621 ± 0.015 ⁴⁾	0.687 ± 0.017 ³⁾	0.687 ± 0.013 ⁴⁾

要分布在细胞质内。与正常组比较,模型组大鼠海马脑区, CACNA_{1C}, CaMK II 荧光强度均明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,氟西汀与舒郁胶囊组大鼠海马中 CACNA_{1C}, CaMK II 荧光强度均明显降低 ($P < 0.05$)。见表 6,图 2。

表 6 舒郁胶囊对 PMDD 大鼠海马 CACNA_{1C}和 CaMK II 荧光强度的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

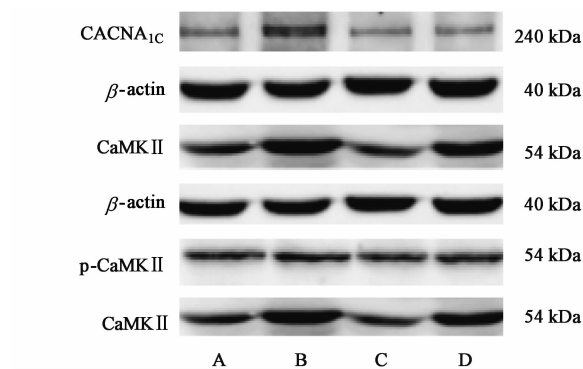
Table 6 Effect of Shuyu capsule on fluorescence intensity of CACNA_{1C} and CaMK II in hippocampus of PMDD rats($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CACNA _{1C}	CaMK II
正常	-	117 713 ± 289.0	131 839 ± 493.0
模型	-	137 849 ± 710.4 ¹⁾	150 708 ± 349.4 ¹⁾
氟西汀	0.002 7	107 906 ± 686.7 ³⁾	126 464 ± 133.7 ³⁾
舒郁胶囊	0.408	109 007 ± 876.7 ³⁾	129 317 ± 181.0 ³⁾

4 讨论

强迫游泳可对大鼠造成恐惧的“行为绝望”,从而诱导出大鼠的抑郁样情绪^[10-11]。本实验将动情周期规律的大鼠在非接受期(类似人的经前期)和接受期(类似于人的经行后的卵泡期)的悬浮不动时间与悬浮不动次数进行对比,筛选在非接受期悬浮不动时间与悬浮不动次数明显高于接受期(类似于临床 PMDD 肝气郁证患者经前期出现抑郁状态,经后期抑郁样情绪降低现象)的大鼠作为 PMDD 模型大鼠进入实验^[5]。给药结束后,模型组大鼠在非接受期的悬浮不动时间与悬浮不动次数明显高于正常组大鼠,结合评价大鼠对新环境焦虑样情绪的旷场实验结果,模型组大鼠活动总路程明显低于正常组,证明通过强迫游泳制备的 PMDD 肝气郁证模型制备成功^[5],药物治疗组在强迫游泳和旷场实验中均与正常组大鼠无明显变化,说明舒郁胶囊对 PMDD 肝气郁大鼠的抑郁样行为具有良好的治疗作用。

钙通道是维持细胞内 Ca²⁺ 稳定的主要通道,由 4 个亚单位组成,主要有 $\alpha 1, \alpha 2\delta, \beta 1-4$ 和 γ 。



A. 正常组;B. 模型组;C. 氟西汀组;D. 舒郁胶囊组(图 2 同)

图 1 各组 CACNA_{1C}, CaMK II, p-CaMK II 蛋白的表达

Fig.1 Expression of CACNA_{1C}, CaMK II and p-CaMK II protein in each group

3.2.3 对 PMDD 大鼠海马 CACNA_{1C}和 CaMK II 荧光强度的影响 在各组大鼠海马中, CACNA_{1C}, CaMK II 主要分布在海马 CA1, CA3 的锥体细胞部位, CACNA_{1C}主要分布在细胞膜上分布, CaMK II 主

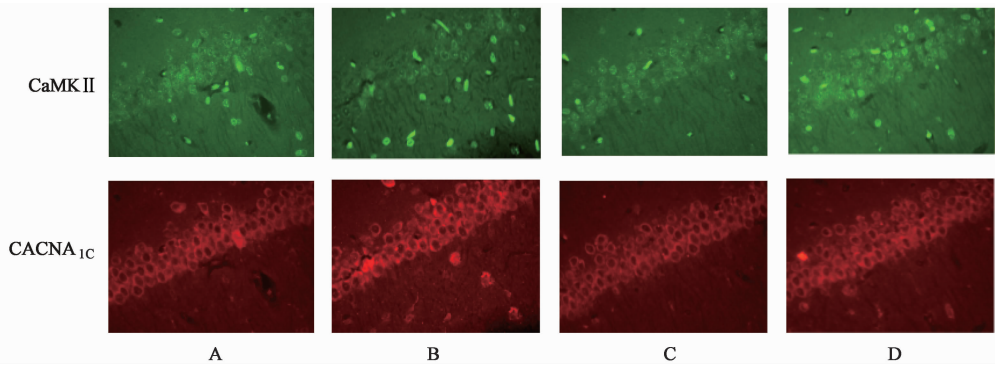


图2 CACNA_{1C}和CaMK II荧光分布及表达(免疫荧光, ×400)

Fig.2 Fluorescence distribution and expression of CACNA_{1C} and CaMK II (immunofluorescence, ×400)

CACNA_{1C}编码L型钙通道(LTCC)Cav1.2亚型的 α_{1C} 亚基,是抑郁症的易感基因之一。研究发现,PMS肝气郁证模型大鼠下丘脑中CACNA_{1C}蛋白表达明显升高^[12],模型大鼠血清干预的海马神经元内Ca²⁺浓度明显升高^[13],并且在敲除小鼠的CACNA_{1C}基因杂合子后,Cav1.2蛋白表达水平和L型钙离子通道钙离子流均下调,小鼠不易出现抑郁的表现^[14]。由此笔者可推测,CACNA_{1C}的表达升高导致细胞内钙离子浓度升高,诱发抑郁样表现。结合本实验研究结果,模型组大鼠海马中CACNA_{1C}基因的表达明显高于正常组大鼠,说明PMDD肝气郁的发生与CACNA_{1C}表达升高有关。舒郁胶囊组CACNA_{1C}表达明显低于模型组大鼠,与正常组大鼠无明显差异,说明舒郁胶囊治疗PMDD肝气郁症的作用机制与降低模型组海马内CACNA_{1C}的表达有关。

CaM是中枢神经系统最重要的钙离子受体蛋白,直接参与神经元的应激和修复过程^[15-16]。钙离子与CaM结合,CaMK II,活化的CaMK II可自发磷酸化,促使p-CaMK II表达。CACNA_{1C}主要分布在细胞膜上,是细胞膜上主要钙通道,CACNA_{1C}基因表达升高导致细胞内钙离子浓度升高,促使钙离子与CaM结合体增多,进而激活CaMK II,促使pho-CaMK II表达增多。CaMK II分布在细胞质内,是钙调蛋白依赖的蛋白激酶系统(CaMKs)重要蛋白之一,可以对钙离子信号做出反应^[17]。CaMK II具有 α, β, γ 和 δ 4种基因型。其中 α, β 两种基因型主要在神经组织中表达^[18]。研究发现,在抑郁症模型大鼠中,CaMK II- α ,CaMK II- β 表达均有升高现象,抗抑郁药可降低基因的表达缓解抑郁样行为^[19-20]。CaMK II的 α, β 亚基磷酸化,形成p-CaMK II,可维持长时程增强,蛋白磷酸酶脱磷酸可使自身磷酸化

CaMK II回到未磷酸化状态,保证在正常情况下p-CaMK II可维持在低含量水平^[21]。p-CaMK II可使N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDA)磷酸化^[22],NMDAR拮抗剂对抑郁症治疗有显著效果^[23]。结合本研究结果,模型组大鼠海马中CaMK II- α ,CaMK II- β ,p-CaMK II表达较正常组大鼠显著升高,舒郁胶囊组与正常组大鼠无明显差异。笔者可推测,CaMK II- α ,CaMK II- β ,p-CaMK II表达升高可诱发PMDD肝气郁证,舒郁胶囊治疗PMDD肝气郁症的作用机制与降低模型组海马内CaMK II- α ,CaMK II- β ,p-CaMK II表达有关。

舒郁胶囊是著名老中医张珍玉教授依据多年经验研发出的国内治疗抑郁症的有效方剂,临床疗效确切^[24],主要由白芍、柴胡、香附、甘草等中药组成,其中柴胡、白芍为君药,柴胡中主要成分柴胡皂苷、白芍主要成分芍药苷具有抗抑郁作用^[25-26]。现代研究发现,舒郁胶囊可通过调节5-HT, GABA含量达到治疗抑郁症的目的^[27]。氟西汀为5-HT再摄取抑制剂,可有效治疗抑郁症,也是治疗PMDD有效作用药物^[28]。本研究以氟西汀作为阳性药,进一步验证舒郁胶囊对PMDD肝气郁证具有良好的治疗作用,与现有研究结果一致^[29]。因此笔者可以推测Cav1.2介导的CaM/CaMK II钙通路中关键基因表达异常可引起PMDD肝气郁证的发生,舒郁胶囊可纠正该通路中关键基因的异常变化达到治疗的目的。

[参考文献]

[1] Scalea T, Pearlstein T. Premenstrual dysphoric disorder [J]. Psychiatr Clin North Am, 2017, 40(2): 201-216.
[2] Shehata N A. Calcium versus oral contraceptive pills containing drospirenone for the treatment of mild to moderate premenstrual syndrome: a double blind

- randomized placebo controlled trial [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2016, 198:100-104.
- [3] WANG X L, GAO J, WANG X Y, et al. Treatment with Shuyu capsule increases 5-HT1AR level and activation of cAMP-PKA-CREB pathway in hippocampal neurons treated with serum from a rat model of depression [J]. Mol Med Rep, 2017, doi:10.3892/mmr.2017.8339.
- [4] GAO X, SUN P, QIAO M, et al. Shu Yu capsule, a traditional Chinese medicine formulation, attenuates premenstrual syndrome depression induced by chronic stress constraint [J]. Mol Med Report, 2014, 10(6): 2942-2948.
- [5] 朱德豪. 强迫游泳应激诱导经前烦躁障碍 (PMDD) 肝气郁证大鼠模型的制备以及模型大鼠神经递质及其受体的变化 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2016.
- [6] 宋春红, 李芳, 郭英慧, 等. 舒郁胶囊及主要组份对 PMS 肝气郁证大鼠海马中 CACNA1C 蛋白表达和功能的影响 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(10): 1476-1477.
- [7] 印丹丹, 封瑞, 任丽菲, 等. 阴道涂片法鉴定大鼠生理周期的应用评价 [J]. 解剖科学进展, 2014, 20(4): 360-363.
- [8] Casarrubea M, Roy V, Sorbera F, et al. Temporal structure of the rat's behavior in elevated plus maze test [J]. Behav Brain Res, 2013, 237:290-299.
- [9] WANG Y, MEI H, LU X, et al. Ziziphi spinosae lily powder suspension in the treatment of depression-like behaviors in rats [J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17(1):238.
- [10] 尹平, 陈泽钦, 韩树珂, 等. 电针对抑郁大鼠行为学及海马 β -CaMK II 蛋白的影响 [J]. 世界中医药, 2017, 12(2):386-389.
- [11] Berezova I V, Shishkina G T, Kalinina T S, et al. Behavior in the forced-swimming test and expression of BDNF and Bcl-x1 genes in the rat brain [J]. Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova, 2011, 61(3):332-339.
- [12] 宋春红, 王杰琼, 李芳, 等. 白芍提取物对 PMS 肝气郁证大鼠下丘脑 Cav1.2 介导的 CaM/CaMK II/BDNF 信号通路的影响 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(10):1794-1800.
- [13] 柳新. 白香丹胶囊对 PMS 肝气逆证模型大鼠的药理机制研究—含药血清对大鼠海马神经元 5-HTR2C 的表达及其下游 IP_3 /DAG/ Ca^{2+} 信号通路的影响 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2012.
- [14] DAO D T, Mahon P B, CAI X, et al. Mood disorder susceptibility gene CACNA1C modifies mood-related behaviors in mice and interacts with sex to influence behavior in mice and diagnosis in humans [J]. Biol Psychiatry, 2010, 68(9):801-810.
- [15] LIU X B, Murray K D. Neuronal excitability and calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II: location, location, location [J]. Epilepsia, 2012, 53(S1): 45-52.
- [16] WANG S Q, LI X J, QIU H B, et al. Anti-epileptic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides by inhibition of intracellular calcium accumulation and stimulation of expression of CaMK II α in epileptic hippocampal neurons [J]. PLoS One, 2014, 9(7):e102161.
- [17] Ferrari L F, Bogen O, Levine J D. Role of nociceptor CaMK II in transition from acute to chronic pain (hyperalgesic priming) in male and female rats [J]. J Neurosci, 2013, 33(27):11002-11011.
- [18] 邓丽丽, 杨晓霞, 王欢, 等. 砷暴露对不同发育阶段小鼠仔鼠海马 CaMK II 表达水平的影响 [J]. 沈阳医学院学报, 2016, 18(5):361-363.
- [19] MA J, DUAN Y, QIN Z, et al. Overexpression of α CaMK II impairs behavioral flexibility and NMDAR-dependent LTD in the medial prefrontal cortex [J]. Neuroscience, 2015, 310:528-540.
- [20] LI K, HU H L. α CaMK II in lateral habenula mediates core symptoms of depression [J]. Science (New York), 2013, 341(6149):1016-1020.
- [21] 杨琨. 产前应激对子代大鼠海马钙依赖性激酶系统作用的研究 [D]. 西安: 西北大学, 2009.
- [22] 曹守彬, 申文, 张婷, 等. 姜黄素对骨癌痛大鼠脊髓 CaMK II 磷酸化的影响 [J]. 世界最新医学信息文摘: 连续型电子期刊, 2015, 15(25):11-12.
- [23] Ostadhadi S, Norouzijavidan A, Chamanara M, et al. Involvement of NMDA receptors in the antidepressant-like effect of tramadol in the mouse forced swimming test [J]. Brain Res Bull, 2017, 134:136-141.
- [24] 李鹏. 舒郁胶囊联合氟西汀治疗抑郁症 (轻、中度) 肝气郁证疗效观察及对 HPA 轴影响机制研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2016.
- [25] 董海影, 张静艳, 柏青杨, 等. 柴胡皂苷 A 对抑郁模型大鼠海马神经细胞凋亡的保护作用 [J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(7):1935-1937.
- [26] 崔广智, 金树梅. 芍药苷对强迫游泳小鼠脑内单胺递质的影响 [J]. 天津中医药大学学报, 2012, 31(2): 83-84.
- [27] 王海娟, 刘小菊, 高杰, 等. 舒郁胶囊抗抑郁机制研究进展 [J]. 中国中医药现代远程教育杂志, 2016, 14(18):141-144.
- [28] Steinberg E M, Cardoso G M, Martinez P E, et al. Rapid response to fluoxetine in women with premenstrual dysphoric disorder [J]. Depress Anxiety, 2012, 29(6): 531-540.
- [29] 侯金良. 择时慢性束缚应激诱导 PMDD 肝气郁证大鼠模型效度估计及舒郁胶囊干预机制初探 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2013.

[责任编辑 周冰冰]