

· 药理 ·

百合知母汤总皂苷调节 5-HT 功能治疗抑郁症的作用机制

李子雯, 贾丹, 党院霞, 高英, 李卫民*
(广州中医药大学 中药学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**分析百合知母汤总皂苷(SBZ)调节 5-羟色胺(5-HT)功能治疗抑郁症状的作用机制,同时探讨百合知母的药对优势。**方法:**SD 大鼠采用孤养配合慢性不可预见性温和刺激诱发抑郁模型,分为抑郁症模型组,百合总皂苷组($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),知母总皂苷组($220\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),SBZ 组($240\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),百忧解组(FLU, $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),另设正常组,每组 11 只;正常组和抑郁症模型组给予等量 0.5% 阿拉伯树胶溶液,其他组别给予相应剂量的药物。测量各组大鼠强迫游泳不动时间,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血液、大脑 5-HT 含量;免疫荧光检测大脑皮层及海马 5-HT_{1a} 阳性表达。实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测海马 5-HT 合成基因色氨酸羟化酶 1(TPH1),突触囊泡单胺转运体(SLC18A1),突触相关蛋白-25(SNAP25) mRNA 水平以及 5-HT_{1a} 受体信号传导下游调节基因 RGS19 在血液以及下丘脑的 mRNA 表达。蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 5-HT 转运体蛋白(SERT)在海马和下丘脑表达水平。**结果:**与模型组比较,SBZ 明显降低抑郁大鼠强迫游泳不动时间($P < 0.05$),上调血液以及大脑 5-HT 含量($P < 0.05$),上调大脑皮层以及海马 5-HT_{1a} 阳性表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。SBZ 上调海马 TPH1,SLC18A1 和 SNAP25 mRNA 表达,同时上调血液、下丘脑组织 RGS19 mRNA 表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。SBZ 下调海马和下丘脑 SERT 蛋白表达($P < 0.01$)。**结论:**SBZ 激活 5-HT 合成基因 TPH1 表达,同时下调 SERT 表达抑制 5-HT 重摄取,增加中枢 5-HT 含量;上调 5-HT_{1a} 受体及其下游 RGS19 基因表达调节受体功能及其信号传递;同时 SBZ 通过上调 SLC18A1 和 SNAP25 表达改善神经突触递质传递能力,最终达到抗抑郁的效果。SBZ 抗抑郁药效与百合总皂苷、知母总皂苷对比具有显著优势。

[关键词] 百合知母汤总皂苷; 抗抑郁; 5-羟色胺(5-HT); 作用机制; 药对优势

[中图分类号] R22;R24;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)19-0131-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181822

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180628.1751.008.html>

[网络出版时间] 2018-06-29 11:26

Mechanism of Saponins of Baihe Zhimu Tang in Treating Major Depression by Regulating 5-HT Function

LI Zi-wen, JIA Dan, DANG Yuan-xia, GAO Ying, LI Wei-min*
(School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of
Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the mechanism of total saponins of Baihe Zhimu Tang (SBZ) in regulating 5-hydroxytryptamine (5-HT) function for treatment of major depression, and to explore the pharmacodynamic advantages of SBZ versus total saponins of Lili Bulbus (SL) or total saponins of Anemarrhenae Rhizoma (SA). **Method:** The depression model rats were induced by using unpredictable mild stimulation combined with feeding alone, and were divided equally into five groups: the major depression model group (MDD), total saponins of SL group ($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), total saponins of SA group ($220\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), total saponins of SBZ group ($240\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and fluoxetine hydrochloride group (FLU, $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Another normal group was

[收稿日期] 20180304(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273897)

[第一作者] 李子雯,在读硕士,从事新药研究与开发,Tel:020-39358466,E-mail:1058536228@qq.com

[通信作者] *李卫民,教授,从事中药有效成分研究,Tel:020-39358466,E-mail:liweimin@gzucm.edu.cn

also set up, $n = 11$ in each group. The normal group and MDD group received the equal amount of 0.5% Arabic gum solution, and corresponding doses of drugs were given in other groups. The immobility time in forced swimming test and the levels of 5-HT in blood and cerebral tissues of experiment rats were measured. Immunofluorescence staining was used to detect the positive expressions of 5-HT1a in the cerebral cortex and hippocampus. Reverse transcription and polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to test the mRNA transcription levels of genes in hippocampus: 5-HT synthesis gene tryptophan hydroxylase (1TPH1), Synaptic vesicular monoamine transporter18A1 (SLC18A1), synaptic protein-25 (SNAP25); the expression of RGS19 in blood and hypothalamus were also detected. The expression of 5-HT transporter protein (SERT) in hippocampus and hypothalamus was detected by Western blot. **Result:** There was a significant difference between model group and normal group ($P < 0.01$). As compared with model group, SBZ significantly reduced the immobility time of depressed rats in forced swimming test ($P < 0.05$), up-regulated 5-HT levels in blood and brain ($P < 0.05$) and the positive expression of 5-HT1a in cerebral cortex and hippocampus ($P < 0.05$, $P < 0.01$). According to the results of SBZ significantly increased the mRNA expression of TPH1, SLC18A1 and SNAP25 in hippocampal, and up-regulated the mRNA expressions of RGS19 in blood and hypothalamus ($P < 0.05$, $P < 0.01$); SBZ reduced the expression of SERT protein in hippocampus and hypothalamus ($P < 0.01$), thereby increased the central content of 5-HT. **Conclusion:** SBZ can activate 5-HT synthesis gene TPH1 expression, down-regulate SERT expression, inhibit reuptake, increase the content of 5-HT in central tissues. SBZ could also up-regulate the expression of 5-HT1a receptor and its downstream gene RGS19 to regulate receptor function and signal transduction; improve the neurotransmitters transmission ability by up-regulating the expression of SLC18A1 and SNAP25, and finally achieve the anti-depression function. Results showed that SBZ had significant pharmacodynamic advantages in antidepressant efficacy as compared to SL and SA.

[**Key words**] total saponins of Baihe Zhimutang; antidepressant efficacy; 5-hydroxytryptamine (5-HT); mechanism; pharmacodynamic advantages

“百合病”名首见于汉·张仲景所著《金匱要略》，定义为以神志恍惚、精神不定，伴饮食消化异常为主要临床表现的一类神志疾病。《金匱要略》中以百合为主药的经方如百合知母汤以百合7枚知母9克，用于治疗百合病。抑郁症是一种常见的精神障碍性疾病，其主要的临床症状为持续的抑郁样情绪、快感缺失、睡眠障碍等^[1-2]，并常伴有肠道不适^[3-4]。现代疾病机制研究表明，抑郁症(MDD)与单胺类神经递质5-羟色胺(5-HT)功能失调关系密切^[5-8]。5-HT是一种存在于大脑、肠道和血液中神经递质。研究显示中枢5-HT水平以及5-HT1a受体蛋白水平普遍减少是抑郁症患者的标志之一^[9-10]。五羟色胺转运体(serotonin transporter, SERT)是一种对5-HT有高度亲和力的跨膜转运蛋白，在五羟色胺神经传递的微调中起关键作用。在抑郁症治疗中，作用于SERT的选择性五羟色胺再摄取抑制剂(SSRIs)是抗抑郁首选治疗药物^[11]。

通过中西研究与对比，笔者发现百合病的病症描述与现代医学中抑郁症有颇多相似，临床上亦将一些治疗百合病的经典方及其类方用于治疗抑郁症

且取效显著^[12-14]。笔者的前期药效研究结果亦显示百合知母汤具有良好抗抑郁以及抑郁症引发的肠道不适的药效^[15-16]，且研究表明其抗抑郁药效主要作用成分为总皂苷^[17-19]。在此基础上，本研究进一步对百合知母汤总皂苷调节5-HT功能改善抑郁症状的作用机制进行探究。同时笔者对百合知母药对与单味药的药效进行比较，探讨百合知母药对优势。

1 材料

1.1 动物 SPF级成年雄性SD大鼠，体质量180~220g，购自广东省医学实验动物中心，动物合格证号SCXK(粤)2008-0002。饲养于广州中医药大学实验动物中心，实验通过广州中医药大学动物伦理委员会批准(批号dSPF201311)，温度20~25℃，相对湿度40%~60%，光照周期12h，昼夜间断照明，常规饲料喂养。实验前大鼠适应环境7d。所有的实验和程序根据中国国家科学和技术管理委员会颁发的实验动物管理规定实施。

1.2 药物与试剂 百合、知母药材分别购自江苏、湖南、兰州等地，由广州中医药大学张丹雁教授鉴定为正品。百合总皂苷、知母总皂苷、百合知母汤总皂

苷(百合-知母 1:1),原药材由 70% 醇渗漉后经大孔树脂富集自制所得,纯度达 50% 以上。高效液相检测百合皂苷(对照品自制,纯度 $\geq 99.99\%$)与知母皂苷(以知母皂苷 B_2 计)的提取得率分别为 0.6% 和 7%。盐酸氟西汀分散片(美国礼来公司,批号 2014A);trizol-A + 总 RNA 提取试剂,反转录试剂盒(天根生化科技有限公司,批号分别为 DP424, FP314);EvaGreen 2 × qPCR MasterMix(美国 ABM 公司, MasterMix);5-HT1a, SERT 微量蛋白(Tubulsa), β -肌动蛋白(β -actin)一抗(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab227165, ab181034, ab6160, ab8224);辣根过氧化物酶标记二抗(上海翊圣生物科技有限公司,33101ES60),大鼠 5-HT 试剂盒(华美生物公司,批号 CSB-E08364r)。

1.3 仪器 EG1150 型石蜡包埋机, RM2235 型石蜡切片机(德国 Leica 公司);DHG9030A 型烘箱(武汉恒泰丰科试验设备有限公司);BX51TRF 型显微镜(日本尼康公司);10127105P-G 型载玻片(江苏世泰公司);JA2003 型电子分析天平(上海浦春计量仪器有限公司);VS-1300L-U 型超净工作台(苏州净化有限公司);Multiskan FC 型酶标仪, Pico 17 型高速低温离心机, ABI9700 型 PCR 仪(美国 Thermo 公司);SI-A256 型涡旋振荡器(美国 Scientific industries 公司);CFX96 型荧光定量 PCR 仪, 1658003 型垂直电泳槽, Criterion 型蛋白转印系统, 1708195 型成像系统, 1645052 型 Powerpac Basic 基础电源(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 模型制备 造模方法采用孤养配合慢性不可预见性温和刺激诱导抑郁模型。空白组大鼠 5 只/笼饲养,模型及给药组大鼠 1 只/笼饲养,所有大鼠均自由摄食及饮水,定时更换垫料。正常组不做任何处理,抑郁症模型组和给药组平行采用慢性不可预见性温和刺激进行造模^[20-21],同时参照 Winner 等^[22]的方法加以改进,9 种刺激因子包括禁水(24 h),禁食(24 h),热水游泳(45 °C, 5 min),冰水游泳(4 °C, 5 min),高速震荡(10 min),潮湿垫料(24 h),笼内障碍物(24 h),夹尾(20 min),束缚(2 h),每日随机安排 1 种,同种刺激不能连续出现,使动物不能预料刺激的发生,连续给予 6 周刺激,诱发大鼠慢性应激抑郁模型。

2.2 分组与给药 大鼠适应环境后采用体质量及 open-field 行为学评分进行分组,体质量及评分相近的大鼠分为正常组,抑郁症模型组,百合总皂苷组

(SB),知母总皂苷组(SZ),百合知母汤总皂苷组(SBZ),百忧解组(FLU),每组 11 只。根据临床用量及参考提取效率等转换,给药剂量设置为 SB 100 mg·kg⁻¹, SZ 220 mg·kg⁻¹, SBZ 240 mg·kg⁻¹, FLU 参照文献给予 10 mg·kg⁻¹^[23]。各给药组动物于造模第 1 天同时根据体质量灌胃给药,药物用 0.5% 阿拉伯树胶配成相应的混悬液,正常组和抑郁症模型组给予等量 0.5% 阿拉伯树胶溶液,每天 1 次。

2.3 体质量检测 实验开始后,每周记录大鼠体质量,以观察各组实验大鼠体质量的变化。

2.4 强迫游泳实验 将大鼠放入透明游泳桶(直径 25 cm,高 48 cm)中,水深 40 mm,常温。实验时每次 1 只,每只大鼠游泳 6 min,记录大鼠后 4 min 的不动秒数,判定不动的标准,大鼠在水中停止挣扎或呈漂浮状态,仅有轻微的肢体运动。检测实验前 1 d 需进行适应性游泳。

2.5 血浆、组织样本采集与检测 实验造模与给药 6 周后,大鼠深度麻醉,腹腔静脉取血,取大脑分离海马及下丘脑。部分组织脱水、包埋、切片,进行免疫荧光检测;部分组织 -80 °C 保存,以备后期实验使用。

2.6 血浆与大脑组织匀浆检测 5-HT 含量 血液 3 000 r·min⁻¹离心 15 min 后取血浆,大脑组织磷酸盐缓冲液(PBS)匀浆后 3 000 r·min⁻¹离心 15 min 取上清液,严格按照酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒说明书操作检测血浆及大脑组织中 5-HT 含量。

2.7 免疫荧光检测 5-HT1a 阳性表达 取大鼠组织切片行免疫荧光检测 5-HT1a 阳性表达并进行统计。大脑切片梯度脱蜡处理,磷酸缓冲液高温高压进行抗原修复, H₂O₂ 处理 30 min,一抗 4 °C 孵育(1:1 000)过夜,二抗常温孵育(1:1 万)1 h, PBS 洗去二抗,显色剂显色 30 s, ddH₂O 停止显色并封片,显微镜下观察并拍照统计,使用 Image J 进行统计。

2.8 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 5-HT 相关基因表达 取血液、海马、下丘脑组织提取总 RNA,转录为 cDNA,检测海马组织中色氨酸羟化酶 1(TPH1),突触囊泡单胺转运体(SLC18A1),突触相关蛋白-25(SNAP25) mRNA 的表达。检测血液和下丘脑组织中 G 蛋白信号转导调节因子 19 抗体(RGS19)的表达。各基因引物由生工生物公司合成,引物序列见表 1。Real-time PCR 扩增程序为预变性 98 °C 反应 2 min; PCR

反应条件为 98 °C 预变性 20 s, 60 °C 变性 30 s, 循环 40 次, 使用仪器配套软件对数据进行分析得到每个样本的循环阈值 (cycle threshold, C_t 值), 并通

过相对定量法, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 为内参采用 (Livak) $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 的相对表达量。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of genes for PCR

基因	上游引物 5'-3'	下游引物 5'-3'	引物长度/bp
RGS19	TCTTCTGGCTGGCTTGTGAG	AGTCCAGGCTGACCTCCTTG	123
TPH1	ACCATCTTCCGAGAGCTGAA	GACGTTGTCTTCCCGATAGC	108
SNAP25	TCATCCGCAGGTAACAAAC	GCGATTCTGGGTGCAATCT	131
GAPDH	CACGGCAAGTTCACGGCACAGT	AGCGGAAGGGGGGAGATGAT	111

2.9 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 SERT 蛋白的表达 取海马以及下丘脑组织提取蛋白, 蛋白印记检测海马以及下丘脑 SERT 蛋白表达情况。往电泳槽加入电泳缓冲液, 加样, 30 mA 条件下电泳 90 min。转膜装置放在冰上, 250 mA 条件下转膜 90 min。取出 PVDF 膜, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min; TBST 配制 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min; SERT 一抗按 1:500 比例稀释, 4 °C 孵育 12 h, 回收一抗, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min; 二抗按 1:1 万比例稀释, 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min; 显色剂显色并拍照, 使用 Image J 进行灰度值的统计分析, 计算蛋白的相对表达量。

2.10 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件进行

统计学分析, 各组实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 t 检验进行组间检验, 用单因素方差分析进行总体差异的检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对抑郁大鼠体质量的影响 实验前各组大鼠体质量无明显差异, 1 周后, 与正常组比较, 抑郁模型组体质量显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 用药 3 周后, SB, SBZ, FLU 组大鼠体质量明显升高 ($P < 0.05$); 用药 4 周后全部给药组均能明显升高模型大鼠体质量 ($P < 0.05, P < 0.01$), 其中以 SBZ 改善效果最佳。给药 3~4 周 SBZ 与 FLU 组大鼠体质量相近, 在给药后期 (5~6 周), SBZ 改善体质量的效果优于阳性药 FLU。见表 2。

表 2 SBZ 对抑郁大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of SBZ on body weight in MDD rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	0 周	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周
正常	-	200.36 ± 3.04	274.17 ± 2.32	323.92 ± 3.62	366.18 ± 4.23	388.07 ± 3.63	401.77 ± 2.67	405.50 ± 4.69
模型	-	204.18 ± 3.25	263.72 ± 3.13 ¹⁾	293.87 ± 3.57 ¹⁾	299.12 ± 4.54 ¹⁾	316.25 ± 6.01 ¹⁾	328.31 ± 6.70 ¹⁾	330.95 ± 6.02 ¹⁾
SB	100	199.07 ± 3.63	255.27 ± 3.89	282.06 ± 4.31	321.41 ± 5.78 ²⁾	326.56 ± 5.31 ³⁾	348.36 ± 9.13 ²⁾	356.16 ± 9.96 ²⁾
SZ	220	201.26 ± 4.23	261.91 ± 2.86	295.02 ± 6.08	332.78 ± 10.49	346.96 ± 11.05 ²⁾	366.96 ± 11.18 ²⁾	370.87 ± 11.66 ²⁾
SBZ	240	202.07 ± 3.63	258.41 ± 3.31	288.82 ± 3.66	323.36 ± 5.30 ²⁾	339.88 ± 6.21 ³⁾	364.15 ± 8.17 ³⁾	367.06 ± 8.16 ³⁾
FLU	10	203.41 ± 2.67	255.30 ± 4.31	286.55 ± 4.96 ²⁾	321.11 ± 3.32 ²⁾	338.25 ± 5.83 ³⁾	355.93 ± 4.92 ²⁾	358.74 ± 4.09 ²⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (表 3, 4 同)。

3.2 对抑郁大鼠强迫游泳实验不动时间的影响 与正常组比较, 抑郁模型大鼠强迫游泳不动时间显著升高, 绝望状态出现时间早且状态持续时间长, 抑郁样行为显著 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各皂苷组与 FLU 均能显著缩短抑郁大鼠不动时间 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.3 对抑郁大鼠血液与大脑 5-HT 水平的影响

与正常组比较, 模型组大鼠血液与大脑 5-HT 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, SB, SZ 及 SBZ 均能显著上调抑郁模型大鼠血液和大脑 5-HT 含量 ($P < 0.05$), 使其接近正常水平。各皂苷组药效与 FLU 相近。见表 4。

3.4 对抑郁大鼠大脑皮层、海马 CA 区和 DG 区 5-HT1a 蛋白阳性表达的影响 抑郁模型大鼠大脑

表 3 SBZ 对抑郁大鼠强迫游泳实验不动时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of SBZ on immobility time in forced swimming test in MDD rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	强迫游泳不动时间/s
正常	-	77.50 ± 5.976
模型	-	115.30 ± 7.522 ¹⁾
SB	100	82.83 ± 4.578 ²⁾
SZ	220	82.17 ± 12.43 ²⁾
SBZ	240	83.17 ± 9.813 ²⁾
FLU	10	82.17 ± 2.701 ²⁾

表 4 SBZ 对抑郁大鼠血液与大脑 5-HT 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of SBZ on level of 5-HT in plasma and brain in MDD rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	血液 5-HT	大脑 5-HT
正常	-	39.21 ± 1.15	26.53 ± 2.79
模型	-	34.55 ± 0.44 ¹⁾	15.85 ± 0.77 ¹⁾
SB	100	37.78 ± 0.35 ²⁾	22.25 ± 2.78 ²⁾
SZ	220	36.61 ± 0.27 ²⁾	22.82 ± 2.01 ²⁾
SBZ	240	37.19 ± 0.70 ²⁾	22.21 ± 2.15 ²⁾
FLU	10	36.57 ± 0.90 ²⁾	23.10 ± 2.07 ²⁾

皮层和海马 CA, DG 区 5-HT1a 受体阳性表达细胞单位面积内数量明显下降且荧光强度减弱, 经统计与正常组比较具有明显差异 ($P < 0.05, P < 0.01$), 表明 5-HT1a 受体功能受到抑制。SZ 与 SBZ 能显著上调大脑各区域 5-HT1a 的阳性表达细胞数以及表达强度 ($P < 0.05$)。而 SB 对 5-HT1a 受体的表达

无明显调节作用。三组药效对比显示百合知母汤总皂苷具有更显著的药效作用。见图 1, 表 5。

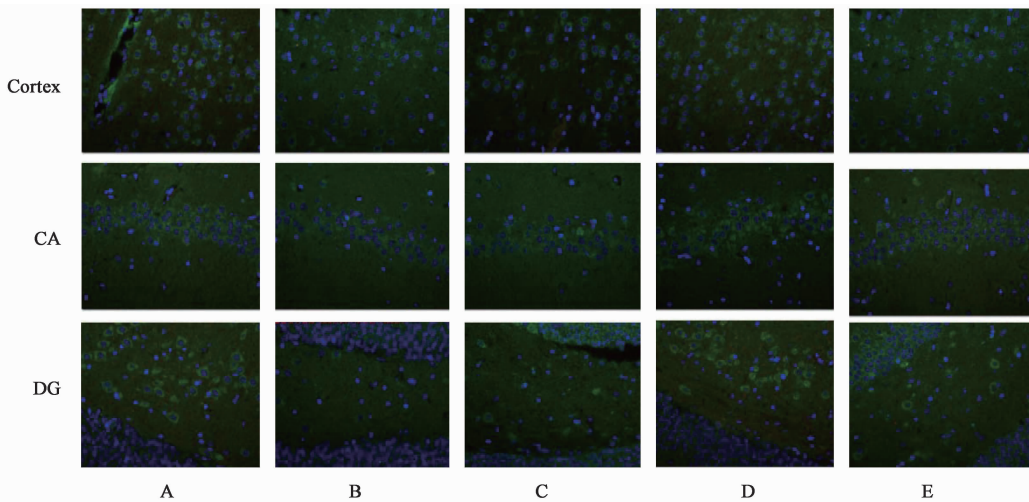
表 5 SBZ 对抑郁大鼠大脑皮层、海马 CA 区和 DG 区 5-HT1a 蛋白阳性表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Effect of SBZ on active expression of 5-HT1a protein in cortex, CA and DG region in hippocampus in MDD rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	皮层阳性表达	海马 CA 区阳性表达	海马 DG 区阳性表达
正常	-	4.21 ± 0.51	2.50 ± 0.42	4.69 ± 0.33
模型	-	1.84 ± 0.12 ²⁾	1.33 ± 0.16 ¹⁾	1.19 ± 0.09 ¹⁾
SB	100	2.32 ± 0.23	1.32 ± 0.17	1.19 ± 0.02
SZ	220	2.53 ± 0.20 ³⁾	2.33 ± 0.09 ³⁾	2.27 ± 0.27 ³⁾
SBZ	240	2.49 ± 0.21 ³⁾	2.53 ± 0.17 ³⁾	3.52 ± 0.23 ³⁾

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 6 ~ 8 同)。

3.5 对抑郁大鼠海马 TPH1, SLC18A1, SNAP25 mRNA 及血液和下丘脑 RGS19 mRNA 表达的影响
与正常组比较, 模型组大鼠海马 TPH1, SLC18A1, SNAP25 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与模型组比较, SBZ 效果最佳, 均能上调 TPH1 和 SLC18A1, SNAP25 的表达 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 6。与正常组比较, 模型组大鼠血液以及下丘脑中 RGS19 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, SZ, SBZ 均能显著上调抑郁大鼠血液以及下丘脑中 RGS19 的低表达状况, 其中 SBZ 在下丘脑中的效果更佳 ($P < 0.01$)。见表 7。



A. 正常组; B. 模型组; C. SB 组; D. SZ 组; E. SBZ 组

图 1 SBZ 对抑郁大鼠大脑皮层、海马 CA 区和 DG 区 5-HT1a 蛋白阳性表达的影响 (免疫荧光, ×400)

Fig. 1 Effect of SBZ on active expression of 5-HT1a protein in cortex, CA and DG region in hippocampus in MDD rats (IF, ×400)

表 6 SBZ 对抑郁大鼠海马 TPH1, SLC18A1, SNAP25 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Effect of SBZ on relative mRNA expression of TPH1, SLC18A1, SNAP25 in hippocampus in MDD rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

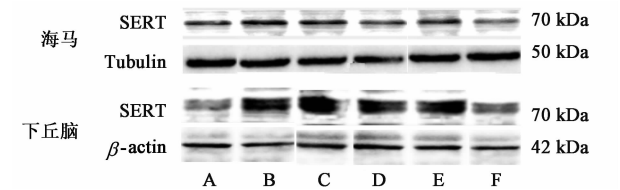
组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	TPH1	SLC18A1	SNAP25
正常	-	1.81 ± 0.30	1.45 ± 0.01	1.17 ± 0.04
模型	-	0.91 ± 0.14 ¹⁾	1.01 ± 0.01 ²⁾	0.96 ± 0.01 ²⁾
SB	100	0.67 ± 0.09	1.23 ± 0.07 ³⁾	1.03 ± 0.03 ³⁾
SZ	220	0.87 ± 0.07	1.26 ± 0.04 ⁴⁾	0.96 ± 0.05
SBZ	240	1.72 ± 0.19 ⁴⁾	1.23 ± 0.07 ³⁾	1.17 ± 0.07 ³⁾

表 7 SBZ 对抑郁大鼠血液和下丘脑 RGS19 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 7 Effect of SBZ on relative mRNA expressions of RGS19 in blood and hypothalamus in MDD rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	血液中 RGS19	下丘脑中 RGS19
正常	-	3.36 ± 0.47	2.76 ± 0.35
模型	-	1.05 ± 0.18 ²⁾	1.01 ± 0.06 ²⁾
SB	100	2.13 ± 0.34	1.90 ± 0.10 ³⁾
SZ	220	2.31 ± 0.43 ⁴⁾	2.01 ± 0.27 ³⁾
SBZ	240	2.88 ± 0.61 ⁴⁾	2.60 ± 0.14 ⁴⁾

3.6 对抑郁大鼠海马与下丘脑 SERT 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠海马和下丘脑 SERT 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,SZ 以及 SBZ 均能使 SERT 蛋白表达下调,有显著性差异,具有与 5-HT 重摄取抑制剂 FLU 相同的作用机制。SB 对 SERT 蛋白表达无明显作用。见图 2,表 8。



A. 正常组; B. 模型组; C. SB 组; D. SZ 组; E. SBZ 组; F. FLU 组

图 2 各组大鼠海马与下丘脑 SERT 蛋白表达

Fig. 2 Protein expression of SERT in hippocampus and hypothalamus in rats of each group

3.7 百合知母汤总皂苷改善 5-HT 系统功能抗抑郁的药效机制 百合知母汤通过激活 5-HT 合成基因 TPH1 的表达,并能下调 SERT 蛋白水平抑制 5-HT 重摄取,从而增加中枢 5-HT 含量;同时上调 5-HT1a 受体及其下游 RGS19 基因表达调节受体功

表 8 SBZ 对抑郁大鼠海马与下丘脑 SERT 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 8 Effect of SBZ on protein expression of SERT in hippocampus and hypothalamus in MDD rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	海马 SERT/Tubulin	下丘脑 SERT/ β -actin
正常	-	0.59 ± 0.02	0.44 ± 0.02
模型	-	0.91 ± 0.04 ²⁾	0.97 ± 0.01 ²⁾
SB	100	0.79 ± 0.01	0.94 ± 0.06
SZ	220	0.53 ± 0.04 ⁴⁾	0.79 ± 0.02 ³⁾
SBZ	240	0.58 ± 0.02 ⁴⁾	0.70 ± 0.08 ⁴⁾
FLU	10	0.35 ± 0.01 ⁴⁾	0.56 ± 0.02 ⁴⁾

能及其信号传递;百合知母汤还上调 SLC18A1 和 SNAP25 表达改善神经突触对神经递质的传递能力,在上述作用机制的共同作用下,达到抗抑郁的效果。见图 3。

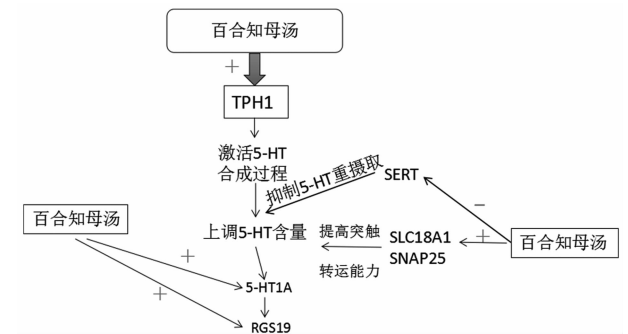


图 3 百合知母汤总皂苷改善 5-HT 功能治疗抑郁症可能作用机制
Fig. 3 Possible mechanisms of antidepressant effects of SBZ

4 讨论

本实验对百合知母汤总皂苷通过改善 5-HT 功能治疗抑郁症的药效机制进行了分析探究,并与单味药百合总皂苷、知母总皂苷进行了对比分析,探讨药对使用优势。绝望状态和血液以及中枢 5-HT 含量显著降低是抑郁症的代表性表型,在前期实验基础上,本实验进一步证实百合知母汤总皂苷能显著改善抑郁模型大鼠绝望状态。血液以及大脑 5-HT 含量检测结果显示百合知母汤总皂苷提高抑郁模型大鼠血液以及大脑 5-HT 含量,改善病理状态。

5-HT1a 在中枢系统的分布与表达与抑郁症密切相关,5-HT1a 受体表达于中缝核,海马和前额叶皮质,参与 5-HT 的重摄取抑制过程,是涉及情绪控制和抗抑郁药物的作用靶点^[24-28]。百合知母汤总皂苷能显著上调抑郁大鼠大脑皮层以及海马 CA 区, DG 区的 5-HT1a 阳性表达神经细胞数目以及

5-HT_{1a}的蛋白阳性表达强度,改善 5-HT_{1a} 受体活性,加强 5-HT 神经递质受体激活状态,同时笔者发现百合知母汤总皂苷能显著上调 5-HT_{1a} 受体下游 G 蛋白信号调节基因 RGS19 的表达。RGS19 作为高度有效的 GAP 参与调节 5-HT_{1a} 受体的下游 G 蛋白信号,研究发现其有助于调节抑郁小鼠的抗抑郁和抗焦虑样行为,RGS19 可能在控制 FGF-1 受体和 5-HT_{1a} 受体之间的协同互动时发挥重要的作用,并一起介导抗抑郁作用^[29-30]。综上所述,百合知母汤总皂苷能通过改善 5-HT_{1a} 受体及其下游的信号传导,改善中枢的 5-HT 神经递质受体功能及其信号传导。

笔者对中枢神经递质合成和传递相关基因的检测结果表明,百合知母汤总皂苷显著上调 TPH1 基因的 mRNA 转录,促使 5-HT 合成。SLC18A1 与 SNAP25 的正常功能控制着谷氨酸、单胺类神经递质以及氨基丁酸类神经递质的递质释放。百合知母汤总皂苷可上调 SLC18A1 和 SNAP25 的 mRNA 表达,改善中枢神经突触前体与突触后体囊泡运输递质能力,加快包括 5-HT 在内的神经递质信号的传递过程。SERT 负责转运神经突触间隙的 5-HT,通过抑制 5-HT 转运提高神经间隙的 5-HT 含量是治疗抑郁症的靶点之一。FLU 是临床常用的 5-HT 重摄取抑制剂,其通过抑制 SERT 功能抑制 5-HT 重摄取,增加中枢 5-HT 含量达到抗抑郁的效果^[31-32]。笔者通过检测海马和下丘脑 SERT 蛋白表达发现,百合知母汤总皂苷能下调 SERT 的表达,抑制 5-HT 重摄取,表明百合知母汤总皂苷具有类似 FLU 的 5-HT 重摄取抑制的作用。

与单味药百合、知母总皂苷的药效对比结果显示,百合知母汤总皂苷整体药效优于单味药,具有药效叠加效应,在临床应用百合、知母治疗情志疾病时应联合使用。

[参考文献]

- [1] Choi M R, Hwang S, Park G M, et al. Effect of fluoxetine on the expression of tryptophan hydroxylase and 14-3-3 protein in the dorsal raphe nucleus and hippocampus of rat [J]. *J Chem Neuroanat*, 2012, 43 (2): 96-102.
- [2] Toyokawa S, Uddin M, Koenen K C, et al. How does the social environment get into the mind: epigenetics at the intersection of social and psychiatric epidemiology [J]. *J Chem Neuroanat*, 2011, 74(1): 67-74.
- [3] Lee Y T, HU L Y, SHEN C C, et al. Risk of psychiatric disorders flowing irritable bowel syndrome: a nationwide population-based cohort study [J]. *PLoS One*, 2015, 10(15): 98-104.
- [4] TANG Y R, YANG W W, WANG Y L, et al. Sex differences in the symptoms and psychological factors that influence quality of life in patients with irritable bowel syndrome [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2012, 24(8): 702-707.
- [5] 陈鹏宇,胡泽卿. 5-羟色胺能系统在抑郁症中的研究进展 [J]. *神经疾病与精神卫生*, 2008, 8(4): 325-327.
- [6] Fakhoury M. Revisiting the serotonin hypothesis: implications for major depressive disorders [J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 53(5): 2778-2786.
- [7] Healy D. Serotonin and depression [J]. *BMJ*, 2015, 350(21): 1771.
- [8] LIU M Y, REN Y P, WEI W L, et al. Changes of serotonin (5-HT), 5-HT_{2A} receptor, and 5-HT transporter in the sprague-dawley rats of depression, myocardial infarction and myocardial infarction co-exist with depression [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2015, 128 (14): 1905-1909.
- [9] Sargent P A, Kjaer K H, Bench C J, et al. Brain serotonin 1A receptor binding measured by positron emission tomography with WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2000, 57(2): 174-180.
- [10] Drevets W C, Thase M E, Moses-Kolko E L, et al. Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review [J]. *Nucl Med Biol*, 2007, 34(5): 865-877.
- [11] 范东芬,奚耕思,梁开丹,等. 五羟色胺转运体的研究进展 [J]. *生命科学*, 2011, 4(5): 385-389.
- [12] 杨维华,孙振侠,谢京旭. 百合大枣汤治疗百合病 56 例临床观察 [J]. *北京中医*, 1999, 3: 35-36.
- [13] 张秋雨,于永军,回景芳. 百合地黄汤加甘麦大枣汤抗抑郁作用实验研究 [J]. *医药导报*, 2011, 30(7): 875-877.
- [14] 郑水庆,张汉明,陈万生. 百合知母汤抗抑郁作用的理论与实验研究 [D]. 上海:第二军医大学, 2007.
- [15] 陈丹,高淑怡,李卫民,等. 百合和知母抗失眠及抗抑郁症的药效研究 [J]. *现代中医药*, 2013, 4: 14-19.
- [16] 贾丹,陈迎春,陈丹,等. 百合知母汤抗抑郁的药效研究 [J]. *北方药学*, 2014, 11(8): 4-5.
- [17] 黄江剑. 百合抗抑郁有效部位质量标准及药理作用研究 [D]. 广州:广州中医药大学, 2011.
- [18] 路明珠,张治强,伊佳,等. 知母皂苷 B-II 抗抑郁作用及其机制研究 [J]. *药学实践杂志*, 2010, 28(4): 283-287.

- [19] 郭秋平. 百合的质量研究及抗抑郁作用探讨[D]. 广州: 广州中医药大学, 2009.
- [20] 王睿, 费洪新, 王琪, 等. 补阳还五汤对慢性不可预知性温和应激抑郁模型小鼠行为及脑海马 CA3 区病理形态学影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(1): 158-162.
- [21] 王永辉, 冯振宇, 刘慧宇, 等. 当归补血汤对慢性轻度不可预见性刺激抑郁模型大鼠行为学及 HPA 轴的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(8): 112-116.
- [22] Winner P, Towell A, Sampson D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1987, 93(3): 358-364.
- [23] Lee L J. Neonatal fluoxetine exposure affects the neuronal structure in the somatosensory cortex and somatosensory-related behaviors in adolescent rats [J]. *Neurotox Res*, 2009, 15(3): 212-223.
- [24] Nina K, Popova S. 5-HT1A receptor as a key player in the brain 5-HT system [J]. *Rev Neurosci*, 2013, 24(2): 191-204.
- [25] Adam S B, Christoph A, HU A, et al. 5-HT1A receptors on mature dentate gyrus granule cells are critical for the antidepressant response [J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18(11): 1606-1616.
- [26] Lambús-Señas L, Mnie-Filali O, Certin V, et al. Functional correlates for 5-HT1A receptors in maternally deprived rats displaying anxiety and depression-like behaviors [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2009, 33(2): 262-268.
- [27] LI Y, Kasper F R, Connie S, et al. Serotonergic receptor mechanisms underlying antidepressant-like action in the progesterone withdrawal model of hormonally induced depression in rats [J]. *Behav Brain Res*, 2013, 256(13): 520-528.
- [28] Nugent A C, Carlson P J, Bain E E, et al. Mood stabilizer treatment increases serotonin type 1A receptor binding in bipolar depression [J]. *J Psychopharmacol*, 2013, 27(10): 894-902.
- [29] Kim G, Lee Y, Jeong E Y, et al. Acute stress responsive RGS proteins in the mouse brain [J]. *Mol Cells*, 2010, 30(2): 161-165.
- [30] WANG Q, Terauchi A, Yee C H, et al. 5-HT1A receptor-mediated phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) is modulated by regulator of G protein signaling protein 19 [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(9): 1846-1852.
- [31] 范东芬, 奚耕思, 梁开丹, 等. 五羟色胺转运体的研究进展[J]. *生命科学*, 2011, 23(4): 385-389.
- [32] Serretti A, Calati R, Mandelli L, et al. Serotonin transporter gene variants and behavior: a comprehensive review [J]. *Curr Drug Targets*, 2006, 7(12): 1659-1669.

[责任编辑 周冰冰]