

· 药理 ·

## $\beta$ -细辛醚改变抑郁模型大鼠行为 及对海马 MEK-ERK 级联通路的影响

金铭<sup>1,2</sup>, 蔡珍珍<sup>1</sup>, 刘得水<sup>1</sup>, 李公启<sup>1</sup>, 弓箭<sup>1</sup>, 张晓杰<sup>1\*</sup>

(1. 齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

**[摘要]** **目的:**探讨 $\beta$ -细辛醚对改善抑郁模型大鼠行为及调节大鼠海马组织中丝裂原细胞外激酶-细胞外信号调节蛋白激酶(MEK-ERK)级联通路的作用。**方法:**2~3月龄SD大鼠80只,分为4组(对照组、模型组、氟西汀组和 $\beta$ -细辛醚组),每组20只。孤养并给予慢性轻度不可预见性刺激。于模型复制成功后第2天开始,分别给予氟西汀组和 $\beta$ -细辛醚组1次/d灌胃,给药剂量分别为氟西汀 $1.2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , $\beta$ -细辛醚 $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。于实验第1,7,14,21天,对每组大鼠进行体重测量、行为学分值评定、糖水消耗量测定。采用RT-PCR法对海马组织中MEK,ERK mRNA行定量分析。免疫组织化学法检测MEK,*p*-ERK蛋白表达水平。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠随着造模天数增加而表现体重下降,第14天开始,体重下降明显,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );Open-field-test水平、垂直运动得分与糖水偏爱度显著降低,第7天开始表现明显差异( $P < 0.01$ );海马组织中MEK,ERK基因水平显著降低( $P < 0.01$ );MEK,*p*-ERK蛋白表达降低( $P < 0.05$ )。与模型组比较, $\beta$ -细辛醚组大鼠行为学评定结果改善,第14,21天体重增加差异显著( $P < 0.05$ );Open-field-test运动评分于14d开始升高,差异具有明显统计学意义( $P < 0.01$ );糖水偏爱度升高;海马组织中MEK,ERK mRNA水平上调( $P < 0.01$ ),MEK,*p*-ERK蛋白表达增强,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。效果与氟西汀组相近。**结论:** $\beta$ -细辛醚可有效缓解大鼠抑郁症状,其机制可能与增加大鼠海马组织中的MEK,*p*-ERK蛋白表达有关。

**[关键词]**  $\beta$ -细辛醚; 海马; 抑郁; 丝裂原细胞外激酶; 细胞外信号调节蛋白激酶

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0113-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180113

## Effect of Beta-asarone on Behavior and Expression of Protein MEK and ERK in Hippocampus in Rat Model of Depression

JIN Ming<sup>1,2</sup>, CAI Zhen-zhen<sup>1</sup>, LIU De-shui<sup>1</sup>, LI Gong-qi<sup>1</sup>, GONG Jian<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-jie<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Medicine, Qiqihaer Medical College, Qiqihaer 161006, China;

2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of beta-asarone on the behaviors and the expressions of mitogen extracellular kinaes (MEK) and extra cellular signal-regulated protein kinase (ERK) in the hippocampus of depression model rats. **Method:** Eighty adult Sprague-Dawley rates were divided into 4 groups randomly: the normal control group; the model group; the fluoxetine control group; the  $\beta$ -asarone group, 20 in each one. Solitary and chronic mild unpredictability were used to stimulation on each one except the normal group. On the second day of a successful model, the fluoxetine and the  $\beta$ -asarone group were given corresponding drugs once a

**[收稿日期]** 20140416(034)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81173576)

**[第一作者]** 金铭,在读硕士,Tel:13766557666,E-mail:jinming0852@163.com

**[通讯作者]** \* 张晓杰,博士,教授,硕士生导师,从事病理学研究与管理,Tel:13904620258,E-mail:Zhangxj@sohu.com

day by gastrogavage for 21 days ( $1.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  to the fluoxetine control group,  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  to the  $\beta$ -asarone group). At 1, 7, 14, 21 days, weight was measured, Open-field-test and sucrose consumption volume were detected, Real-time PCR was used for quantitative analysis of MEK and ERK mRNA. The protein expression of MEK and *p*-ERK in the hippocampus were tested by immunohistochemical staining method. **Result:** Compared with the normal group, the weight of the rats in the model group was decreased, on the 14<sup>th</sup> day, the rats lose weight obviously ( $P < 0.05$ ). The scores of Open-field-test and sugar water preference were reduced significantly since the 7<sup>th</sup> day of the experiment ( $P < 0.01$ ). The level of MEK, ERK mRNA were decreased ( $P < 0.01$ ), and the protein expressions of MEK, *p*-ERK were declined ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the scores of  $\beta$ -asarone group in the Open-field-test and sucrose consumption volume were improved. The changes of rats'weight was found on the 14<sup>th</sup> day and 21<sup>th</sup> ( $P < 0.05$ ). The scores of Open-field-test increased until 14<sup>th</sup> day ( $P < 0.01$ ). The levels of MEK and ERK mRNA were Up-regulated ( $P < 0.01$ ), the protein expressions of MEK and *p*-ERK were increased ( $P < 0.05$ ) in the hippocampus. Similar effects were observed in fluoxetin group. **Conclusion:** Beta-asarone could alleviate the symptoms of depression in rats effectively, its mechanism might be related to increasing the protein expression of MEK and *p*-ERK in the rat hippocampus.

[**Key words**] beta-asarone; hippocampus; depression; mitogen extracellular kinaes; extra cellular signal-regulated protein kinase

随着人们生活水平的不断提高,生活节奏的不断加快,抑郁症(Depression)的发生逐年增加。关于抑郁症的研究也趋于广泛和深入<sup>[1-2]</sup>。石菖蒲作为中医治疗脑病的常用药物,以其醒神益智,健脑开窍为主要作用。根茎中主要成分为挥发油,其中包含 $\alpha$ -细辛醚和 $\beta$ -细辛醚<sup>[3]</sup>。前期研究提示, $\beta$ -细辛醚可以作用于丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶-1(mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, MKP-1)、应激活化蛋白激酶-1(mitogen and stress activated protein kinase-1, MSK-1)、cAMP 反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)等细胞因子<sup>[4]</sup>,发挥抗抑郁作用。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen2 activated protein kinase, MAPK)级联是细胞内广泛存在的丝/苏氨酸蛋白激酶超家族,是将细胞质的信号传递至细胞核并引起细胞核发生变化的重要物质。丝裂原细胞外激酶(mitogen extracellular kinaes, MEK),细胞外信号调节蛋白激酶(extra cellular signal-regulated protein kinase, ERK)是 MAPK 的重要途径之一。本实验基于前期研究,继续探讨 $\beta$ -细辛醚对抑郁模型大鼠 MEK-ERK 信号通路的影响。

## 1 材料

**1.1 动物** 清洁级成年雄性 SD 大鼠,2~3 月龄,体重 360~380 g,由青岛动物实验中心提供,合格证号 SCXK(鲁)2009-0007。

**1.2 药品及试剂** 盐酸氟西汀胶囊(苏州俞氏药业有限公司,批号 100201), $\beta$ -细辛醚对照品(天津

一方科技有限公司,批号 00011017-T9k),免疫组化 SP 试剂盒,DAB 显色剂,PBS 缓冲液(福州迈新生物技术开发有限公司,批号分别为 1210229710,1208300031,12090701),RNA 提取试剂盒(北京康为试剂生物科技有限公司,批号 CW0580A),逆转录试剂盒 SYBR<sup>®</sup> ExScript<sup>™</sup> RT-PCR Kit(Perfect Real Time,批号 BK3601),PCR 试剂盒(宝生物工程公司,批号 BK1906)。羊抗兔 MEK 抗体,羊抗兔 *p*-ERK 抗体(Cell Signaling Technology, CST,批号分别为 #4694s,#4695s)。

**1.3 仪器** 2700 型 PCR System 扩增仪(Applied Biosystems 公司),ABI 7300 型荧光定量 PCR 仪(ABI 公司),CX31R BSF 型光学显微镜(Olympus),DP801 型图像分析系统(Alphamiager 公司),DK-8D 型电热恒温水浴箱(上海合恒仪器设备有限公司),METTLER TOLEDO 型 pH 测试仪(上海秋腾贸易有限公司),79-1 型磁力加热搅拌器(上海雷磁新泾仪器有限公司),THZ-82 型恒温振荡器(江苏太仓医疗器械厂),AL204 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),HL-2000 型电子杂交箱[香港兴万电子仪器(厦门)有限公司]。

## 2 方法

**2.1 动物分组** 大鼠适应性喂养 1 周,自由进食水。保持环境干燥,通风,温度 18~20℃,无噪声,无人光源。进行敞箱试验(Open-field-test),选取得分相近的 80 只大鼠进行分组,按随机数字表法分为 4 组:正常对照组, $\beta$ -细辛醚组,氟西汀组,模型

组。每组 20 只。

**2.2 造模及给药** 正常组每笼 5 只饲养,正常进食,不给予任何刺激。 $\beta$ -细辛醚组,氟西汀组,模型组每笼一只孤养,接受慢性轻度不可预见性应激刺激(chronic unpredictable mild stress stimulation, CUMS)<sup>[5-6]</sup>,每天进行一种不可预知的刺激,持续 21 d,每种刺激使用不超过 4 次,避免大鼠适应刺激,刺激方法根据 Katz 法改进。具体方法:摇晃(30 min),倾斜鼠笼(45°,24 h),禁食水(24 h),束缚(24 h),热刺激(45 °C,5 min),冰水游泳(4 °C,5 min),夹尾(3 min),潮湿环境(100 g 垫料中加入 200 mL 水,24 h)。造模开始计为第 1 天。第 8 天起, $\beta$ -细辛醚组按 25 mg·kg<sup>-1</sup>ig 给药。氟西汀组按 1.2 mg·kg<sup>-1</sup>ig 给药。模型组 ig 给予等量生理盐水,每天 1 次。

**2.3 测量体重** 于造模第 1,7,14,21 天,分别对各组大鼠进行称重。

**2.4 Open-field-test 行为学评价** 于造模第 1,7,14,21 天,进行 Open-field-test 试验。具体方法:制作一高 40 cm,底边长 80 cm 的正方体无盖箱子,箱内 4 壁涂黑。底面为白色,用黑线画出 5×5 个小方格,每方格 16 cm×16 cm。将大鼠从正中方格放入箱内,记录 3 min 内大鼠水平移动距离(大鼠四肢完全进入一个小方格内记 1 分),垂直次数(双前肢完全离开地面至放下记 1 分),修饰次数(理毛次数)和粪便颗粒数。每只大鼠单独测试,测试期间环境安静,周围参照物静止不变。每只大鼠测试结束后用 10% 乙醇清理箱壁及底面。

**2.5 糖水消耗试验** 于造模第 1,7,14,21 天,对大鼠进行糖水偏爱度测试。各组大鼠分别给予纯水 200 mL,1% 蔗糖水 200 mL。测量并记录 1 h 内纯水和 1% 蔗糖水的消耗量,计算各组大鼠糖水偏爱度。

$$\text{糖水偏爱度} = \frac{1\% \text{蔗糖水消耗量}}{(1\% \text{蔗糖水消耗量} + \text{纯水消耗量})} \times 100\%$$

**2.6 检测大鼠海马组织内 MEK,ERK 基因表达** 取冻存大鼠海马组织于 4 °C 解冻后,放入经过 DEPC 处理的 EP 管中,在低温冰块上进行操作,首先将组织块剪碎,加入 1 mL Trizol 液体进行组织匀浆。

**提取总 RNA:**按照 RNAiso Reagent 试剂盒提取大鼠海马组织总 RNA,通过紫外分光光度计以及琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的纯度、浓度及其完整性。

**逆转录反应:**按照 SYBR<sup>®</sup> ExScript<sup>™</sup> 实时定量 PCR Kit 反转录试剂盒操作方法进行试验:反转录

反应 42 °C,15 min,反转录酶失活反应 95 °C,2 min。

**PCR 反应:**采用 SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) kit 试剂盒相应反应体系,总体积为 25  $\mu$ L。引物的序列如下:MEK-F1:5'-CCCTTGACCTGAGT-GATGAG-3', MEK-R1:5'-CATAGCCCTTCCATTCCA-GA-3', ERK-F1:5'-TCCTTGGGAGGGAAGATACC-3', ERK-R1:5'-ATGACAATCCCCTAGCTCCA-3', GAPDH-F1:5'-TCCAGTATGACTCTACCCACG-3', GAPDH-R1:5'-CACGACATACTCAGCACCAG-3'。分别扩增 MEK、ERK 和 GAPDH 基因,每个样本做 3 个复孔,得到阈值循环值(*Ct*)平均值,按照公式计算  $\Delta\Delta C_t$  值:

$$\Delta C_T(\text{test}) = C_T(\text{target, test}) - C_T(\text{ref, test})$$

$$\Delta C_T(\text{calibrator}) = C_T(\text{target, cal}) - C_T(\text{ref, cal})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{test}) - C_T(\text{calibrator})$$

式中各个样本 mRNA 表达水平均以  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  表示。

**2.7 检测大鼠海马组织内 MEK,ERK 蛋白表达** 取石蜡包埋的大鼠海马组织,于相应部位进行连续切片各 5 张,采用过氧化物酶标记的链霉卵白素(SP)法进行免疫组织化学染色,并 DAB 显色,通过苏木素复染、PBS 洗涤、盐酸乙醇分化后返蓝,常规脱水、透明、中性树脂封片。每一张切片在阳性表达区域挑选 10 个无重叠视野,使用 Olympus 显微镜、DP801 形态分析软件进行图像采集处理,图像分析仪进行分析,测出 MEK,*p*-ERK 蛋白抗原表达的总面积、阳性细胞数和平均吸光度 *A*,计算其积分吸光度(*IA*)。

**2.8 统计方法** 运用 SPSS 13.0 软件包,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 各组大鼠体重变化** 实验进行到第 14 天时,与模型组比较,对照组大鼠体重高于模型组,第 21 天时,与模型组比较,对照组、氟西汀组与  $\beta$ -细辛醚组大鼠体重明显增加。见表 1。

**3.2 大鼠行为学评价** 与模型组比较,氟西汀组和  $\beta$ -细辛醚组的水平与垂直运动分值均高于模型组,差异具有统计学意义。见表 2~3。

**3.3 糖水偏爱度** 与模型组比较,氟西汀组与  $\beta$ -细辛醚组大鼠的糖水偏爱度均增高。与对照组比较,氟西汀组与  $\beta$ -细辛醚组差异不显著。见表 4。

**3.4 大鼠海马组织 MEK,ERK 基因表达水平** 对照组、氟西汀组与  $\beta$ -细辛醚组中 MEK 基因的  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  值明显高于模型组,差异具有统计学意义( $P <$

0.05), 氟西汀组与  $\beta$ -细辛醚组的  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  与对照组相比较略低, 但差异不具有统计学意义。模型组中 ERK 基因的  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  值低于对照组, 氟西汀组与  $\beta$ -细辛

组中 ERK 的基因表达较模型组上调, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。各组大鼠海马组织中 MEK, ERK mRNA 含量分别见表 5~6。

表 1  $\beta$ -细辛醚对大鼠不同时间体重变化的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	体重/g			
		1 d	7 d	14 d	21 d
正常	-	382.47 $\pm$ 12.87	404.31 $\pm$ 13.39	452.53 $\pm$ 16.74 <sup>1)</sup>	511.49 $\pm$ 16.53 <sup>1)</sup>
模型	-	380.55 $\pm$ 13.09	401.70 $\pm$ 15.24	419.87 $\pm$ 17.81 <sup>2)</sup>	449.23 $\pm$ 17.93 <sup>2)</sup>
氟西汀	1.2	376.39 $\pm$ 12.21	402.27 $\pm$ 14.83	440.76 $\pm$ 15.82 <sup>1)</sup>	485.75 $\pm$ 14.60 <sup>1)</sup>
$\beta$ -细辛醚	25	379.69 $\pm$ 14.06	398.95 $\pm$ 14.76	442.19 $\pm$ 16.33 <sup>1)</sup>	484.48 $\pm$ 17.37 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与正常组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

表 2  $\beta$ -细辛醚对大鼠不同时间 Open-Field-test 水平运动得分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Open-Field-test 水平运动得分/次/3 min			
		1 d	7 d	14 d	21 d
正常	-	89.26 $\pm$ 12.33	88.49 $\pm$ 10.61 <sup>1)</sup>	87.28 $\pm$ 11.64 <sup>1)</sup>	87.40 $\pm$ 11.50 <sup>1)</sup>
模型	-	87.63 $\pm$ 13.80	60.45 $\pm$ 11.15 <sup>3)</sup>	42.25 $\pm$ 12.54 <sup>3)</sup>	20.86 $\pm$ 4.69 <sup>3)</sup>
氟西汀	1.2	86.85 $\pm$ 14.51	77.60 $\pm$ 12.09 <sup>1)</sup>	79.01 $\pm$ 12.37 <sup>1)</sup>	79.78 $\pm$ 13.75 <sup>1)</sup>
$\beta$ -细辛醚	25	88.35 $\pm$ 11.92	77.18 $\pm$ 10.64 <sup>1)</sup>	78.92 $\pm$ 10.56 <sup>1)</sup>	80.34 $\pm$ 15.91 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与正常组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

表 3  $\beta$ -细辛醚对大鼠不同时间的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Open-Field-test 垂直运动得分/次/3 min			
		1 d	7 d	14 d	21 d
正常	-	23.27 $\pm$ 5.16	17.49 $\pm$ 4.13 <sup>1)</sup>	14.64 $\pm$ 3.05 <sup>1)</sup>	13.73 $\pm$ 2.01 <sup>1)</sup>
模型	-	24.30 $\pm$ 6.11	9.68 $\pm$ 2.24 <sup>2)</sup>	7.31 $\pm$ 1.27 <sup>2)</sup>	5.77 $\pm$ 0.97 <sup>2)</sup>
氟西汀	1.2	24.07 $\pm$ 6.82	16.83 $\pm$ 3.05 <sup>1)</sup>	14.23 $\pm$ 2.44 <sup>1)</sup>	14.02 $\pm$ 2.13 <sup>1)</sup>
$\beta$ -细辛醚	25	23.59 $\pm$ 4.45	16.37 $\pm$ 3.18 <sup>1)</sup>	13.89 $\pm$ 2.65 <sup>1)</sup>	14.24 $\pm$ 2.65 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与正常组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表 4~5 同)。

表 4  $\beta$ -细辛醚对大鼠不同时间糖水偏爱度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	糖水偏爱度/%			
		1 d	7 d	14 d	21 d
正常	-	67.59 $\pm$ 9.84	73.80 $\pm$ 9.53	79.81 $\pm$ 16.98 <sup>1)</sup>	82.14 $\pm$ 11.21 <sup>1)</sup>
模型	-	69.33 $\pm$ 10.16	67.03 $\pm$ 10.23	50.95 $\pm$ 15.19 <sup>2)</sup>	39.73 $\pm$ 14.30 <sup>2)</sup>
氟西汀	1.2	69.10 $\pm$ 9.47	66.95 $\pm$ 7.84	74.31 $\pm$ 14.22 <sup>1)</sup>	78.06 $\pm$ 11.84 <sup>1)</sup>
$\beta$ -细辛醚	25	68.44 $\pm$ 9.22	66.94 $\pm$ 7.14	73.19 $\pm$ 13.83 <sup>1)</sup>	77.58 $\pm$ 10.67 <sup>1)</sup>

表 5  $\beta$ -细辛醚对大鼠海马组织中 MEK mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	$C_T$ MEK	$G_T$ GAPDH	$\Delta C_{TMEK}$	$\Delta C_{TGAPDH}$	$\Delta\Delta C_T$	MEK 相对表达量
				$(C_{TMEK} - C_{TMEK \text{ blank}})$	$(C_{TGAPDH} - C_{TGAPDH \text{ blank}})$	$(\Delta C_{TMEK} - \Delta C_{TGAPDH})$	
正常	-	17.01 $\pm$ 0.12	14.09 $\pm$ 0.10	-17.49 $\pm$ 0.08	-18.81 $\pm$ 0.06	1.32 $\pm$ 0.02	0.40 <sup>1)</sup>
模型	-	20.54 $\pm$ 0.07	14.11 $\pm$ 0.07	-13.96 $\pm$ 0.04	-18.79 $\pm$ 0.02	4.83 $\pm$ 0.02	0.04 <sup>2)</sup>
氟西汀	1.2	18.44 $\pm$ 0.10	14.13 $\pm$ 0.11	-16.06 $\pm$ 0.08	-18.77 $\pm$ 0.05	2.71 $\pm$ 0.03	0.15 <sup>1)</sup>
$\beta$ -细辛醚	25	18.58 $\pm$ 0.14	14.10 $\pm$ 0.09	-15.92 $\pm$ 0.10	-18.80 $\pm$ 0.11	2.88 $\pm$ 0.01	0.14 <sup>1)</sup>

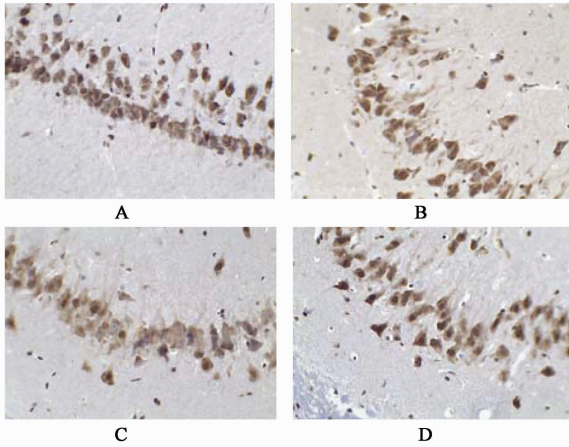
3.5 大鼠海马组织 MEK, p-ERK 蛋白表达 模型组大鼠海马区 MEK 蛋白表达明显低于正常组, 通过图像分析成像系统分析测得相对光密度值较正常组降低 ( $P < 0.05$ ), 差异具有统计学意义, 氟西汀组与

$\beta$ -细辛醚组所测值高于模型组且低于对照组; 对照组、氟西汀组与  $\beta$ -细辛醚组大鼠海马区 p-ERK 蛋白表达明显高于模型组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。各组蛋白表达见图 1~2。

表 6  $\beta$ -细辛醚对大鼠海马组织中 ERK mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	C <sub>T</sub> ERK	G <sub>T</sub> GAPDH	$\Delta C_{TERK}$ (C <sub>TERK</sub> - C <sub>TERK blank</sub> )	$\Delta C_{TGAPDH}$ (C <sub>TGAPDH</sub> - C <sub>TGAPDH blank</sub> )	$\Delta \Delta C_T$ ( $\Delta C_{TERK} - \Delta C_{TGAPDH}$ )	ERK 相对 表达量
正常	-	18.39 ± 0.06	14.09 ± 0.10	-16.11 ± 0.01	-19.41 ± 0.03	3.30 ± 0.02	0.10 <sup>1)</sup>
模型	-	19.21 ± 0.11	14.11 ± 0.07	-15.29 ± 0.04	-19.39 ± 0.08	4.10 ± 0.04	0.06 <sup>2)</sup>
氟西汀	1.2	18.66 ± 0.04	14.13 ± 0.11	-15.84 ± 0.06	-19.37 ± 0.04	3.53 ± 0.02	0.09 <sup>1)</sup>
$\beta$ -细辛醚	25	18.64 ± 0.13	14.10 ± 0.09	-15.86 ± 0.05	-19.40 ± 0.02	3.54 ± 0.03	0.09 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> P < 0.05;与正常组比较<sup>2)</sup> P < 0.01。



A. 正常组;B. 模型组;C. 氟西汀 1.2 mg·kg<sup>-1</sup>组;  
D.  $\beta$ -细辛醚 25 mg·kg<sup>-1</sup>组(图 2 同)

图 1  $\beta$ -细辛醚对大鼠海马组织 MEK 蛋白表达影响(免疫组化染色, ×400)

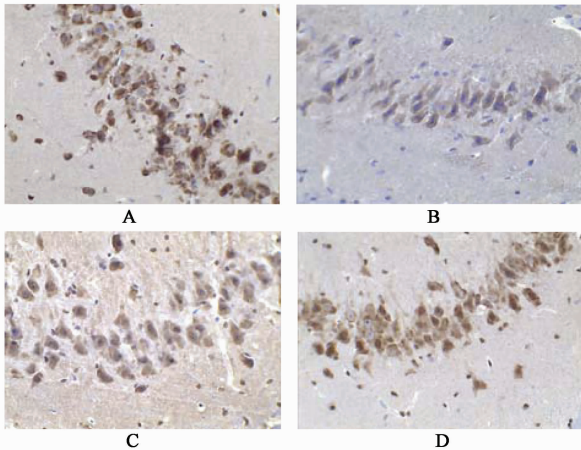


图 2  $\beta$ -细辛醚对大鼠海马区 p-ERK 蛋白表达的影响(免疫组化染色, ×400)

#### 4 讨论

该实验利用孤养结合 CUMS 制造大鼠抑郁模型,通过大鼠行为学变化,糖水偏爱度的改变,并结合大鼠海马组织中抗抑郁因子变化,进一步探讨  $\beta$ -细辛醚的抗抑郁作用。

Open-field-test 作为评价实验受体在新环境中自主行为、紧张程度等的一种手段,可以对比反应出

实验动物在陌生环境中所产生的异常行为,该评分结果可以有效评价大鼠抑郁程度<sup>[7-9]</sup>。糖水消耗百分比降低,提示实验受体快感缺失。动物处于抑郁状态。该实验中,随着造模时间的增加,大鼠 Open-field-test 水平运动和垂直运动得分均显著降低,糖水消耗百分比亦相应降低,大鼠逐渐出现明显的抑郁症状,达到预期标准。

氟西汀作为实验对比阳性药,通过前期预实验确定最适剂量后应用于大鼠。该药是目前应用于临床治疗抑郁症的首选药物,为了明确  $\beta$ -细辛醚的确切疗效,与其进行横向对比,更有助于分析  $\beta$ -细辛醚的抗抑郁作用。

MKP-1 属于神经营养因子,它可以通过负反馈调控 MAPK 包括相应级联反应(neurotrophic factor-MAPK cascade)。MEK 是 MAPK 通路中一个非常关键的酶,位于 ERK 的上游<sup>[10]</sup>,MEK 是双特异性激酶,可以调节苏氨酸和酪氨酸,使其磷酸化,从而激活 ERK。亦有实验证实,MEK 对 ERK 的持久激活可以促进细胞生长<sup>[11]</sup>。

该实验结果显示,通过 CUMS 孤养的大鼠,经过氟西汀与  $\beta$ -细辛醚的灌服后,MEK 在抑郁组大鼠海马组织内表达降低,在氟西汀及  $\beta$ -细辛醚组中表达升高,其基因与蛋白表达趋势一致。ERK 基因表达在抑郁组大鼠海马组织中亦呈降低趋势,在氟西汀及  $\beta$ -细辛醚组中升高,并形成磷酸化的 ERK,结合大鼠行为学评分改善,可以证实,通过使用  $\beta$ -细辛醚可以减少大鼠抑郁症状的发生,并明显改善抑郁大鼠海马组织中的 MEK, pERK 的表达,作用效果与氟西汀组差异不明显。该实验结果与新进相关实验趋势一致<sup>[12-14]</sup>。实验提示  $\beta$ -细辛醚抗抑郁作用确切,其机制可能与增强大鼠海马组织中的 MEK、p-ERK 蛋白有关。

#### [参考文献]

[1] 王洋洋. 抑郁症的中西医研究进展[D]. 北京:北京中医药大学,2011.

# 小柴胡汤下调 JAK2, STAT3 的表达治疗大鼠肝纤维化

李晋<sup>1</sup>, 徐尚福<sup>2</sup>, 金凤<sup>2</sup>, 白国辉<sup>1</sup>

(1. 遵义医学院医学与生物学研究中心, 贵州 遵义 563000;

2. 遵义医学院药理学教研室暨贵州省基础药理重点实验室, 贵州 遵义 563000)

**[摘要]** **目的:**探讨小柴胡汤对大鼠肝纤维化过程中肝组织 Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2) 及信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 表达的影响。**方法:**健康 SD 雄性大鼠, 适应性喂养 1 周后随机分为 5 组, 空白对照组, 模型组, 小柴胡汤高、中、低 (4, 2, 1 g·kg<sup>-1</sup>) 剂量组。模型组大鼠采用 10% 四氯化碳皮下注射, 每周 2 次制备大鼠肝纤维化模型共 14 周, 于造模第 9 周小柴胡汤各剂量组给予小柴胡汤灌胃治疗 6 周。通过测定血清中丙氨酸转氨酶 (ALT) 及天冬氨酸转氨酶 (AST) 活性反映肝脏功能, HE 染色法观察肝组织病理学变化, 免疫组化方法观察肝组织金属蛋白酶组织抑制因子-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1) 的表达, Real-time RT-PCR 检测 JAK2, STAT3 mRNA 的表达。**结果:**与空白对照组比较, 四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠外周血 ALT, AST 明显升高, 病理学呈现肝纤维化表现; 肝组织 TIMP-1, JAK2 和 STAT3 表达明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与模型组相比, 小柴胡汤中、高剂量组在血清学和病理学上均有明显改善; 与模型组相比, 小柴胡汤高剂量组肝组织 TIMP-1 表达明显降低, 小柴胡汤中、高剂量组 JAK2, STAT3 mRNA 的表达明显降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。**结论:**小柴胡汤可下调 JAK2 和 STAT3 的表达参与对大鼠肝纤维化的治疗。

**[关键词]** 肝纤维化; 小柴胡汤; 金属蛋白酶组织抑制因子-1; 激酶 2/信号转导及转录活化因子 3; 信号通路

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0118-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180118

**[收稿日期]** 20140516(011)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81360661); 贵州省科学技术基金项目(黔科合 J 字 LKZ[2010]43 号)

**[第一作者]** 李晋, 讲师, 硕士, 从事中西医结合治疗消化系统疾病研究, Tel: 0852-8609511, E-mail: lijn010502@163.com

- [2] 奚耕思, 张武会. 抑郁症发生机制研究进展[J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2011, 39(6): 64.
- [3] 魏立平, 吴玖涵. 用气相色谱法同时测定石菖蒲挥发油中  $\alpha$ -细辛醚和  $\beta$ -细辛醚的含量[J]. 解放军药学报, 2005, 21(1): 62.
- [4] 赵春明, 张晓杰, 董海影, 等.  $\beta$ -细辛醚对抑郁模型大鼠行为及海马 MKP-1, MSK-1, CREB 和 Bel-2 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(16): 272.
- [5] 郭晓云, 江开达. 慢性轻度应激抑郁动物模型研究进展[J]. 国际精神病学杂志, 2007, 34(4): 216.
- [6] 董海影, 兴桂华, 张晓杰. 不同年龄组大鼠抑郁模型评价[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(6): 1796.
- [7] 樊蔚虹, 姚建平, 杨清, 等. 柴胡疏肝散干预卒中后抑郁模型大鼠海马神经细胞凋亡的机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 216.
- [8] Jason C Wester, Diego Contreras. Differential modulation of spontaneous and evoked thalamocortical network activity by acetylcholine level *in vitro* [J]. J Neurosci, 2013, 33(45): 17951.
- [9] Vera Galdes, Nataniel Goncalves-Rosa, Beihui Liu, et al. Chronic depression of hypothalamic paraventricular neuronal activity produces sustained hypotension in hypertensive rats [J]. Exp Physiol, 2014, 99(4): 89.
- [10] 胡莺燕, 方貽儒, 禹顺英, 等. MEK 基因多态性与抑郁症的关联性研究 [J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2010, 30(6): 616.
- [11] Duman C H, Schlesinger, Kodama M, et al. A role for MAP kinase signaling in behavioral models of depression and antidepressant treatment [J]. Biol Psychiatry, 2007, 61: 661.
- [12] 孙玉荣, 张晓杰, 姚宏波.  $\beta$ -细辛醚对抑郁症模型大鼠海马区 BDNF 的影响 [J]. 中国中医药咨讯, 2012, 4(3): 69.
- [13] Nir Lipsman, Tejas Sankar, Andres M, et al. Neuromodulation for treatment-refractory major depressive disorder [J]. C M A J, 2014, 186(1): 33.
- [14] 彭希. 逍遥散抗抑郁作用的 BDNF/MEK-ERK/CREB 分子机制实验研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.

[责任编辑 聂淑琴]