

# $\beta$ -细辛醚对抑郁模型大鼠行为及生物钟基因表达的影响

王俊苹, 董海影\*, 赵春明, 高志影, 弓箭, 吴淑琴, 兴桂华  
(齐齐哈尔医学院 病理学系, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**[摘要]** **目的:**探讨 $\beta$ -细辛醚对抑郁模型大鼠生物钟基因(clock)表达的影响。**方法:**将雄性SD大鼠随机分为正常组,模型组,agomelatine(褪黑素药物激动剂)组, $\beta$ -细辛醚低、高剂量组5组,每组10只。给予28d慢性不可预见性刺激(CMUS),复制大鼠抑郁模型。第8天开始模型组、agomelatine组、 $\beta$ -细辛醚组分别给予生理盐水,agomelatine( $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), $\beta$ -细辛醚低、高剂量组( $12.5, 25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), $5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,ig。于给药前及第28天分别检测大鼠体重、水平活动次数及糖水偏爱度,评价大鼠行为学改变。处死大鼠冰上取脑,利用实时PCR及Western blot方法,检测生物钟基因在各组大鼠脑中表达。**结果:**在行为学方面,模型组大鼠28d后体重的增加程度,水平活动次数及糖水偏爱度均显著低于正常组及给药组。在基因表达方面,与正常组相比较,模型组clock的表达显著高于正常组,agomelatine组, $\beta$ -细辛醚2个剂量组clock的表达无显著差别;与模型组相比较,agomelatine组, $\beta$ -细辛醚两剂量组clock的表达显著低于模型组。**结论:** $\beta$ -细辛醚可能通过影响抑郁大鼠生物钟基因clock在脑中的表达改变大鼠的抑郁状态。

**[关键词]** 抑郁症;  $\beta$ -细辛醚; 生物钟基因

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0170-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020170

## Effect of Beta-asarone on Behaviors and Expression of Circadian Genes in Rat Model of Depression

WANG Jun-ping, DONG Hai-ying\*, ZHAO Chun-ming, GAO Zhi-ying, GONG Jian, WU Shu-qin, XING Gui-hua (Institute of Pathology, Qiqihaer Medical University, Qiqihaer 161006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of beta-asarone on the expression of circadian gene clock in depression model rats. **Method:** Male SD rats were randomly divided into five groups: normal group, model group, agomelatine (melatonin agonist group drug), beta-asarone low-dose group, high-dose group with 10 rats in each group, chronic unpredictable stimulation (CMUS) was given for 28 days to copy the rat model of depression. From the beginning of the eighth day model group, agomelatine group, beta-asarone low-dose groups, beta-asarone high-dose group were given normal saline, agomelatine ( $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), beta-asarone ( $12.5, 25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ),  $5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$  gavage. The body weight, horizontal movement and sucrose preference were detected for assessing rat ethological changes on the beginning of the experiment and the 28<sup>th</sup> day. Then they were sacrificed and, taken the rats brain out on the ice. The expression of circadian gene were detected by using Q-PCR, Western blotting. **Result:** On behaviors, after 28 days the increases of the model rat body weight were significantly lower than normal group and drug group. On expression of the circadian gene clock, compared with normal group, the expression of circadian gene clock in model group was significantly higher than that in normal group. There was no significant difference among the agomelatine group, beta-asarone two doses group, and the normal group on the expression of the circadian gene clock; compared with the model group, the expression of the gene in agomelatine group, beta-asarone two doses group were significantly lower than the model group; compared with agomelatine group, no significant difference in the expression of clock among the beta-asarone low dose group, the beta-asarone high dose group and the agomelatine group. **Conclusion:** beta-asarone may improve the depressive state in

**[收稿日期]** 20140721(008)

**[基金项目]** 齐齐哈尔市科学技术计划项目(SFGG-201203)

**[第一作者]** 王俊苹, 硕士生, 助理实验师, 从事病理学研究, Tel: 15845228562, E-mail: wjp\_512439@163.com

**[通讯作者]** \* 董海影, 博士, 讲师, 从事病理学教学与研究, Tel: 13359520303, E-mail: 354498599@qq.com

depression by affecting the expression of the depression in circadian clock genes clock rats.

[Key words] depression; beta-asarone; circadian clock genes

抑郁症是临床上常见的精神疾病之一,患者存在着情绪障碍、认知功能障碍及执行功能障碍等额叶损伤的主要表现<sup>[1]</sup>。生物体的生理活动、行为等多种生命迹象以 24 h 为周期,呈节律性震荡的一种生物节律,又称近日节律(circadian rhythm)<sup>[2]</sup>。轮班作业或跨子午线飞行导致时差,经常造成外部或内部的时间节律的不同步,导致人的情绪变化、失眠甚至出现不同程度的精神障碍。近日节律主钟位于下丘脑视交叉上核(SCN),其调控作用大部分由钟基因决定的。在生物节律的相关基因中,clock 基因作为 Bmal 1 基因是的分子伴侣,协同 Bmal 1 基因对生物钟正反馈通路进行调节<sup>[3]</sup>。褪黑素主要由松果体分泌,与特异性受体结合,调整生物的昼夜节律。Agomelatine 作为一种褪黑素受体激动剂,在调整生物节律方面具有较好的作用,对抑郁症的治疗有较好的效果。<sup>[4]</sup>现代中药药理学研究表明石菖蒲具有开窍醒脑的作用,其根茎中提取的主要成分  $\beta$ -细辛醚挥发油,具有抗抑郁作用<sup>[5]</sup>,但其抗抑郁的机制尚未明确。本实验通过对治疗后大鼠脑组织的研究,探讨生物钟基因 clock 在  $\beta$ -细辛醚抗抑郁症大鼠脑组织中的表达。

## 1 材料

**1.1 药品及试剂**  $\beta$ -细辛醚对照品(天津一方科技有限公司,批号 00011017-T9K), agomelatine(褪黑素受体激动剂,法国 Servie 公司, cas: 138112-76-2), clock 抗体( abcam, ab134165), GAPDH( cw0100A), 山羊抗小鼠 IgG( cw0102), 山羊抗兔 IgG( cw0103), DEPC( cw0579), BCA 蛋白定量试剂盒( cw0014), ECL 发光试剂盒( cw0049), 均为康为世纪公司提供,细胞核与细胞浆蛋白抽提试剂盒( Beyotime 公司, P20028), TRIzon Reagent 总 RNA 提取试剂盒, Prime Script RT reagent Kit( TaRaKa, cat: RR370A), SYBR Premix Ex Taq( TaKaRa, cat: RR420A)。其他试剂均为国产,分析纯。

**1.2 仪器** ABI7300 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司), DYCA-24D 型垂直电泳仪(国产)。

**1.3 动物** 选取雄性 SD 大鼠,清洁级, 2~3 月龄,筛选体重(180±10) g,由大连医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(辽)2008-0002。

## 2 方法

**2.1 动物分组** 利用敞箱实验,进行行为学评分,

敞箱实验总得分低于 30,或高于 120 的动物予以剔除。选择得分相近,体重、摄食量、糖水消耗量无显著差异的大鼠,根据糖水实验消耗结果和体重情况随机分为正常组,模型组, agomelatine 组,  $\beta$ -细辛醚低、高剂量组,每组 10 只。

**2.2 建立抑郁症大鼠模型** 正常组给予常规饲养,不接受任何刺激。其余 4 组接受慢性轻度不可预见性应激刺激(CMUS),刺激方法根据 Katz 法改进<sup>[6]</sup>, 28 d 随机应激,包括电击足底(电流强度 10 mA,每隔 1 min 刺激 1 次,每次持续 10 s,共 30 次)、冰水游泳(4℃, 5 min)、热应激(45℃, 5 min)、摇晃(1 次/s, 15 min)、夹尾(1 min)、禁水(2 4 h)、禁食(48 h)和昼夜颠倒等刺激。

**2.3 分组给药** 正常组给予常规饲养,不给药,其余 4 组于第 8 天开始 ig,持续 3 周。模型组,每笼 1 只,给予生理盐水 ig, 5 mL·kg<sup>-1</sup>; agomelatine 组,每笼 1 只,给予 agomelatine 40 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> ig, 5 mL·kg<sup>-1</sup>;  $\beta$ -细辛醚低、高剂量组,每笼 1 只,给予  $\beta$ -细辛醚 12.5, 25 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> ig, 5 mL·kg<sup>-1</sup>。

## 2.4 大鼠的行为学评价

**2.4.1 体重测量** 于给药前和第 28 天对大鼠进行体重测定。

**2.4.2 旷场试验** 于试验前和第 28 天对大鼠进行敞箱试验进行行为学测试。将动物置于高 60 cm, 边长 100 cm 周边和底面均为黑色的方形旷场中,光照度为 60 lux,室内隔音。观察者在行为实验室内用摄像系统观察记录动物在旷场内前 3 min 的行为表现,包括水平活动距离,水平活动距离可以通过行为跟踪分析系统获得数据。

**2.4.3 糖水消耗试验** 在敞箱实验结束后,各组大鼠给予 1% 蔗糖溶液 200 mL,纯水 200 mL,测定 1 h 动物的饮用 1% 蔗糖水和纯水量。计算动物的糖水偏爱度

$$\text{糖水偏爱} = \frac{\text{糖水消耗}}{\text{总液体消耗}} \times 100\%$$

**2.5 取材和保存** 同一时间处死所有大鼠,冰上取脑,依据《大鼠脑立体定位图谱》在解剖显微镜下分离鼠脑中的下丘脑视交叉上核(SCN),液氮中保存。

**2.6 检测 clock 基因的 mRNA 水平的表达** 从液氮中取出冻存的脑组织分离,用锡纸将 4 组组织分别称量,取 40 mg 脑组织放入预冷过的匀浆器液氮中研磨至组织完全碎裂后,加入 1 mL 的 TRIzon 溶

液混匀。总 RNA 提取:根据 TRIzol Reagent 总 RNA 试剂盒说明提取组织中的总 RNA,利用琼脂糖凝胶电泳,检测提取总 RNA 的纯度和完整性。RT 逆转录反应:根据 RT 逆转录试剂盒说明,加入试剂盒内的各试剂进行总 RNA 的逆转录为 cDNA。42 ℃, 15 min; 85 ℃, 5 s。PCR 扩增反应:根据实时定量 PCR 试剂盒的要求,加入荧光试剂,引物,双蒸水及 cDNA 等扩增试剂配制成总体积为 25 μL 体系,利用实时定量 PCR 仪对 cDNA 进行扩增,每个样本设置 3 个复孔。

引物序列如下: clock: Forward: 5'-CAGTAGCA-CACGCTTCCTCA-3'; Reverse: 5'-CACTCAAGACGACCCTCACA-3'。分别扩增 clock 基因,得到循环 C<sub>t</sub> 值,利用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法计算 mRNA 的表达水平。

**2.7 检测 clock 基因蛋白水平的表达** 利用蛋白提取试剂盒提取大鼠大脑 SCN 区总蛋白,利用酶标仪测定蛋白浓度,用 buffer 和蛋白裂解液给蛋白定量统一浓度。配置聚丙烯酰胺-SDS 凝胶,电泳分离蛋白,蛋白上样量为 30 g · L<sup>-1</sup>,转膜后使用 5% 的脱脂奶粉封闭 NC 膜 4 ℃ 过夜。一抗 clock, GAPDH 孵育 NC 膜 3 h。二抗鼠 IgG, 兔 IgG 分别孵育 1.5 h。荧光发光试剂盒曝光。用 ImageJ2x 分析软件分析条带灰度,半定量比较分析,并采用自身灰度值校正,以目的基因条带与内参基因 GAPDH 的比值来表示蛋白的表达水平。

**2.8 统计处理** 利用 SPSS 13.0 对数据进行统计学处理,各组计数以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间两两比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 行为学指标检测

**3.1.1 体重** 测定结果大鼠的体重随着刺激时间的增加,28 d 后 5 组大鼠的体重存在不同程度的增加。与模型组相比较,正常组大鼠, agomelatine 组与 β-细辛醚 2 个剂量组的体重增重明显,两两组间比较 *P* < 0.05 有统计学意义;与 agomelatine 组, β-细辛醚两剂量组的体重之间体重增重情况比较,无明显差异。见表 1。

**3.1.2 行为学评分** 与给药前相比,模型组大鼠的水平活动评分明显降低 (*P* < 0.05);与模型组比较, agomelatine 组及 β-细辛醚组水平活动评分显著高于模型组 (*P* < 0.05)。而正常组与给药组相比较,水平活动评分没有显著变化; agomelatine 组与 β-细辛醚组间无明显差异。根据大鼠对糖水的偏爱程度,通过糖水偏好实验对大鼠的抑郁状况进行评估。28

表 1 各组大鼠间体重的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Comparison of the body weight in different group rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg · kg <sup>-1</sup>	体重/g	
		给药前	28 <sup>th</sup>
正常	-	382 ± 12	511 ± 16 <sup>1)</sup>
模型	-	380 ± 13	449 ± 18
agomelatine	40	377 ± 12	486 ± 15 <sup>1)</sup>
β-细辛醚	12.5	378 ± 11	486 ± 15 <sup>1)</sup>
	25	380 ± 14	484 ± 17 <sup>1)</sup>

注:与模型组相比<sup>1)</sup> *P* < 0.05。

d 后,除抑郁模型组大鼠外,各组大鼠对糖水的偏爱度增加。与模型组相比较,正常组、 agomelatine 组及 β-细辛醚组大鼠对糖水偏爱度显著增高,两两比较, *P* < 0.05;与正常组比较,给药组大鼠与正常组糖水偏爱度之间比较无统计学意义;同时,给药组间糖水偏爱度比较无显著差异。见表 2。

表 2 各组大鼠 Open-Field-test 水平运动得分及糖水偏爱度比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Comparison of the horizon moving scores and syrup preference by open-field-test in different group rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg · kg <sup>-1</sup>	3 min 水平运动/次		糖水偏爱度/%	
		给药前	28 <sup>th</sup> d	给药前	28 <sup>th</sup> d
正常	-	89 ± 12	87 ± 12 <sup>1)</sup>	68 ± 10	82 ± 11 <sup>1)</sup>
模型	-	88 ± 13	21 ± 5 <sup>2)</sup>	69 ± 10	51 ± 14 <sup>2)</sup>
agomelatine	40	87 ± 15	80 ± 14 <sup>1)</sup>	69 ± 9	78 ± 12 <sup>1)</sup>
β-细辛醚	12.5	86 ± 14	84 ± 14 <sup>1)</sup>	70 ± 10	78 ± 12 <sup>1)</sup>
	25	88 ± 12	80 ± 16	68 ± 9	78 ± 11 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> *P* < 0.05;与给药前比较<sup>2)</sup> *P* < 0.05 (表 3 同)。

**3.2 大鼠脑 SCN 区 clock 基因的表达** clock mRNA 的表达与模型组比较,正常组, agomelatine 组及 β-细辛醚 2 剂量组大鼠脑内 clock 基因的 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 值明显低于模型组, *P* < 0.05;与正常组比较, agomelatine 组, β-细辛醚 2 剂量组与正常组间 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 值无明显差异。

**3.3 检测 clock 蛋白表达** clock 蛋白为细胞浆蛋白表达,相对分子质量为 95 kDa。与模型组相比较,正常组, agomelatnin 组及 β-细辛醚 2 剂量组的条带灰度值明显低于模型组 (*P* < 0.05);与正常组比较, agomelatnin 组与 β-细辛醚 2 个剂量组条带灰度值与正常组无明显差异。见表 3。

### 4 讨论

哺乳动物包括人大脑 SCN 区内的 SCN 细胞是具有内源性震荡特征的自律细胞。在这些自律性细

表 3 大鼠脑 SCN 区 clock 基因的表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Expression of clock gene in SCN region of rat brain ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	$\beta$ -actin/ $C_t$	Clock/ $C_t$	2 <sup>-<math>\Delta\Delta C_t</math></sup>	clock 蛋白
正常	-	12.43 ± 0.15	20.40 ± 0.07 <sup>1)</sup>	1.01 <sup>1)</sup>	0.55 ± 0.04 <sup>1)</sup>
模型	-	12.25 ± 0.01	19.55 ± 0.29	0.59	1.03 ± 0.09
agomelatnin	40	12.20 ± 0.01	19.87 ± 0.03 <sup>1)</sup>	0.82 <sup>1)</sup>	0.54 ± 0.07 <sup>1)</sup>
$\beta$ -细辛醚	12.5	12.34 ± 0.11	20.34 ± 0.13 <sup>1)</sup>	0.79 <sup>1)</sup>	0.55 ± 0.06 <sup>1)</sup>
	25	12.25 ± 0.06	19.91 ± 0.10 <sup>1)</sup>	0.81 <sup>1)</sup>	0.57 ± 0.05 <sup>1)</sup>

注:与模型组相比较<sup>1)</sup>P < 0.05。

胞中,含有在染色体上特殊定位的钟基因,以及由钟基因表达形成的相应的氨基酸与蛋白质产物。这些产物之间相互作用,构成了生物钟调节的分子基础。主要起调控作用的生物钟因子包括:clock, bmal1, per1, per2, per3, cry1, cry2 以及 Tim 等,近 10 种调控基因。其中作为调控基因的主要因子,clock-bmal I 形成二聚体,共同调控着其他生物钟基因变化,从而影响着机体的周期节律。

褪黑素主要由松果体分泌,作为一种节律信号,能矫正人体生物钟,用于治疗睡眠节律障碍等抑郁症状<sup>[7]</sup>。agomelatnin 是法国 Servier 公司研发的一种褪黑素类抗抑郁药物,对重度抑郁症疗效明显<sup>[8]</sup>。Bansar<sup>[9]</sup>等研究表明给正常状态 SD 大鼠 agomelatnin(40 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),3 周后,对于焦虑相关的齿状回腹侧有促进细胞增殖和神经发育的作用,通过此方式来起到抗抑郁焦虑的作用。agomelatnin 有调整动物生物节律和改善动物生物焦虑的性能,主要通过激动 MT1, MT2 受体发挥作用,与褪黑激素作用相似<sup>[10]</sup>。大脑是  $\beta$ -细辛醚的重要分布器官, $\beta$ -细辛醚极易透过血脑屏障进入大脑,在脑内的半衰期比其他器官长<sup>[11]</sup>。预实验结果表明, $\beta$ -细辛醚药物使用量在 12 ~ 30 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>对抑郁模型大鼠具有较好的抗抑郁作用。

经典的生物钟基因 clock 基因,随着生物钟的变化,其在大脑 SCN 区的表达也会随之发生周期性的变化。取同一时间段的大鼠脑进行基因表达的观察,在 clock 基因转录 mRNA 的表达及 clock 蛋白表达方面,正常组、agomelatnin 组和  $\beta$ -细辛醚组大鼠表达水平低于模型组 ( $P < 0.05$ ),而 agomelatnin 组、 $\beta$ -细辛醚组大鼠与正常组大鼠脑内的基因表达水平无明显差异。实验结果表明,在同一时间内, $\beta$ -细辛醚和 agomelatnin 都可以使生物钟基因 clock 的表达水平降低,从而改善大鼠的抑郁症状。

综上所述,在大鼠脑内 SCN 区的 clock 基因的表达随着大鼠抑郁症状改变,而呈现与症状相对应的改变。 $\beta$ -细辛醚与 agomelatnin 作用相似,通过改

变同一时间内 clock 基因的表达,达到治疗抑郁症的效果。因此认为, $\beta$ -细辛醚可能通过调节抑郁症患者生物钟基因 clock 的表达来实现有效治疗抑郁症的效果。

[参考文献]

[ 1 ] Fossati P, Ergis A M, Allilaire J F. Executive functioning in unipolar depression: a review [ J ] Encephale, 2002, 28 ( 2 ) : 97.

[ 2 ] Bunney W E, Bunney B G. Molecular Clock genes in man and lower animal: possible implications for circadian abnormalities in depression [ J ]. Neuropsychopharmacology, 2000, 22 ( 4 ) : 335-345.

[ 3 ] Halberg F, Cornelissen G, Otsuka K, et al. Essays in chronomics spawned by transdisciplinary chronobiology [ J ]. Neuroendocrinol Lett, 2001, 22 ( 5 ) : 359-384.

[ 4 ] 陈权韩, 吴丽丽, 严灿. 中医时间医学与现代生物节律若干问题的探讨 [ J ]. 辽宁中医药杂志, 2010, 37 ( 10 ) : 1935-1937.

[ 5 ] 孙玉荣, 张晓杰, 姚洪波.  $\beta$ -细辛醚对抑郁症模型大鼠海马区 BDNF 的影响 [ J ]. 中国中医药资讯, 2012, 4 ( 3 ) : 69.

[ 6 ] Katz R J, Roth K A, Carroll B J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression [ J ]. Neurosci Biobehav Rev, 1981, 5 ( 2 ) : 247-251.

[ 7 ] 张石革. 褪黑素受体激动剂的研究进展与临床疗效评价 [ J ]. 中国医药用药评价与分析, 2013, 13 ( 2 ) : 112-115.

[ 8 ] 刘英鑫. Servier 公司新的抗抑郁剂 [ J ]. 国外药讯, 2002; ( 11 ) : 16-17.

[ 9 ] Bansar M, Soumier A, Hery M, et al. Agomelatine, a new antidepressant, induces regional changes in hippocampal neurogenesis [ J ]. Biol Psychiatry, 2006, 59 ( 12 ) : 1116-1127.

[ 10 ] Mailliet F, Audinot V, Malpoux B, et al. Molecular pharmacology of the ovine melatonin receptor: comparison with recombinant human MT1 and MT2 receptors [ J ]. Bioch Pharmacol, 2004, 67 ( 4 ) : 667-677.

[ 11 ] 高志影, 张春, 董海影. 石菖蒲有效成分对抑郁模型大鼠海马神经元的保护作用 [ J ]. 中国老年学杂志, 2014 ( 34 ) : 1000-1002.

[责任编辑 聂淑琴]