

# 抑郁模型大鼠海马组织中内质网应激调控因子的表达及 $\beta$ -细辛醚的干预作用

金铭, 蔡珍珍, 韩俊岩, 顾福灵, 林岩, 董海影, 宋晓明,  
帅智峰, 何宝国, 沈云虹, 肖薇, 张晓杰\*  
(齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**[摘要]** 目的:研究抑郁模型大鼠海马组织中内质网应激调控因子的表达及  $\beta$ -细辛醚的干预作用,并探讨其相关的作用机制。方法:建立慢性轻度不可预见性应激刺激(CUMS)大鼠模型,将 100 只大鼠随机分为 5 组,分别为正常组,模型组,氟西汀组( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), $\beta$ -细辛醚低剂量组( $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )和高剂量组( $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),每组 20 只,从造模第 8 天开始每天灌胃 1 次给药,连续 21 d。于实验的第 0 天和第 29 天进行旷场实验;采用 Nissl 染色法观察各组大鼠海马组织神经元尼氏体的变化;实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)技术检测各组大鼠海马组织蛋白激酶 R 样内质网激酶(PERK),CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP),钙网蛋白(CRT) mRNA 表达情况;蛋白质免疫印迹(Western blot)技术检测各组大鼠海马组织 PERK,CHOP,CRT 蛋白表达。结果:经 28 d 慢性不可预见性温和刺激后,模型组大鼠与正常组大鼠比较,水平运动和垂直运动得分明显减少( $P < 0.05$ ); $\beta$ -细辛醚低、高剂量组和氟西汀组大鼠与模型组比较,水平运动和垂直运动得分明显增加( $P < 0.05$ )。尼氏染色结果显示,模型组大鼠海马组织神经元细胞浆着色变浅,尼氏小体颗粒明显减少; $\beta$ -细辛醚低、高剂量组大鼠海马区神经元形态相对较好,尼氏小体颗粒较模型组增多。模型组与正常组大鼠比较,PERK,CHOP,CRT mRNA 表达上调( $P < 0.05$ ),与模型组比较, $\beta$ -细辛醚低、高剂量组和氟西汀组中 PERK,CHOP,CRT mRNA 表达明显下调( $P < 0.05$ )。与正常组比较,模型组大鼠 PERK,CHOP,CRT 蛋白表达均明显升高( $P < 0.05$ );与模型组大鼠比较,氟西汀组、 $\beta$ -细辛醚低、高剂量组 PERK,CHOP,CRT 蛋白表达明显减少( $P < 0.05$ )。结论: $\beta$ -细辛醚可能是通过调节海马内质网功能发挥抗抑郁作用。

**[关键词]**  $\beta$ -细辛醚; 抑郁; 内质网应激蛋白激酶 R 样内质网激酶(PERK); CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP); 钙网蛋白(CRT)

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)08-0124-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017080124

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170210.0837.002.html>

[网络出版时间] 2017-02-10 8:37

## Expression of Endoplasmic Reticulum Stress-regulating Factor in Hippocampus of Depressive Rats and Intervention of $\beta$ -Asarone

JIN Ming, CAI Zhen-zhen, HAN Jun-yan, GU Fu-ling, LIN Yan, DONG Hai-ying, SONG Xiao-ming,  
SHUAI Zhi-feng, HE Bao-guo, SHEN Yun-hong, XIAO Wei, ZHANG Xiao-jie\*  
(Qiqihar Medical College, Qiqihar 161006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the expression of endoplasmic reticulum stress regulators in hippocampus of depressive rats and the intervention effect of  $\beta$ -asarone. **Method:** Totally 100 SD rats were randomly divided into five groups: the normal control group, the model group, the fluoxetine group ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), the  $\beta$ -asarone low-dose group ( $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and the high-dose group ( $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), with 20 in each one. The depression model

[收稿日期] 20161223(001)

[基金项目] 黑龙江省科技厅攻关项目(PC13S06)

[第一作者] 金铭, 硕士, 从事抗抑郁研究, Tel:13766557666, E-mail:744271@qq.com

[通讯作者] \* 张晓杰, 博士生导师, 从事抗抑郁症病理研究, Tel:0452-2663169, E-mail:ZXJ4456@sina.com

was established by CUMS. On the 8<sup>th</sup> day after modeling, rats in fluoxetine group and  $\beta$ -asarone group were treated with fluoxetine or  $\beta$ -asarone once daily through intragastric administration for 21 days (10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> for the fluoxetine group, 25 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> for the  $\beta$ -asarone low-dose group, 50 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> for the  $\beta$ -asarone high-dose group). The open field test was carried out to assess the CUMS model and rats' ethological changes on the 0<sup>th</sup> and 29<sup>th</sup> day; The changes of nissl bodies in hippocampus neurons were observed by Nissl staining; The mRNA expressions of protein kinase R sample endoplasmic reticulum kinase (PERK), CCAAT/EBP homologous protein (CHOP), calprotectin (CRT) were tested by Real-time fluorescent quantitative PCR; The protein expressions of PERK, CHOP and CRT were detected by Western blot. **Result:** After CUMS for 28 days, scores of horizontal motion and vertical motion in model group were obviously lower than control group ( $P < 0.05$ ), whereas those in  $\beta$ -asarone low-dose group,  $\beta$ -asarone high-dose group, fluoxetine group were higher model group ( $P < 0.05$ ). Nissl staining results showed that the color of neurons in control group became light, with less nissl bodies;  $\beta$ -asarone low-dose group,  $\beta$ -asarone high-dose group show more normal hippocampus neurons, with more Nissl bodies than model group. Compared with the model group, mRNA expressions of PERK, CHOP and CRT were up-regulated significantly in the model group, compared with control group ( $P < 0.05$ ); whereas those were down-regulated in  $\beta$ -asarone low dose group,  $\beta$ -asarone high dose group and fluoxetine group compared with the model group ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, protein expressions of PERK, CHOP and CRT were up-regulated significantly in the model group ( $P < 0.05$ ); whereas those were down-regulated in fluoxetine group,  $\beta$ -asarone low dose group,  $\beta$ -asarone high dose group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The antidepressant effect of  $\beta$ -asarone may be correlated with the regulation of endoplasmic reticulum functions.

[**Key words**]  $\beta$ -asarone; depression; protein kinase R sample endoplasmic reticulum kinase (PERK); CCAAT/EBP homologous protein (CHOP); calprotectin (CRT)

抑郁症是指以显著而持久的情绪低落、活动能力减退、思维与认知功能迟缓为主要临床特征的一类心境障碍。WHO 最新统计全球患病率约 11%，并预测 2020 年抑郁症将成为全球第 2 位医疗疾患<sup>[1]</sup>。现有抗抑郁药物多是针对单胺类神经递质的功能改变而发挥作用，但有着如起效慢、副作用大等明显缺陷。寻找一种天然抗抑郁药物和新的抗抑郁靶点成为抑郁症研究的重点。近年来，内质网应激在神经系统疾病发生、发展中的作用也开始逐渐被关注，关于内质网应激可以引起神经元的凋亡已经在许多神经退行性疾病的发病机制研究中得到证实，包括帕金森病、阿尔茨海默病等。细胞内质网应激后的未折叠蛋白反应 (UPR) 作为细胞应激后的反应，既有保护作用，又有致凋亡作用，在不同疾病中的角色各不相同。已有实验验证了内质网应激调控因子直接或间接的对神经细胞产生作用<sup>[2-4]</sup>，有研究表明，抑郁症激活了内质网应激的保护性应答 UPR<sup>[5]</sup>。前期实验已表明  $\beta$ -细辛醚对 CUMS 大鼠有明显的改善抑郁样行为的作用<sup>[6]</sup>，但对其作用机制并不十分明确。本实验主要从内质网应激角度，探讨抑郁症的发生、发展是否与其相关，以及  $\beta$ -细辛醚对抑郁动物模型的治疗作用。

## 1 材料

**1.1 动物** 清洁级雄性 SD 大鼠，2~3 月龄，体重 180~200 g，哈尔滨医科大学实验动物医学部，合格证号 SCXK(黑)2013-0001。本研究获得齐齐哈尔医学院实验动物伦理委员会批准[(齐)伦审(2016)11 号]。

**1.2 药物及试剂**  $\beta$ -细辛醚对照品(天津一方科技有限公司，批号 00011017-T9K)，盐酸氟西汀胶囊(苏州俞氏药业有限公司，批号 100201)，尼氏染色液(北京索莱宝科技有限公司，批号 G1360)，PrimeScript RT reagent 试剂盒(日本 TaKaRa 公司，批号 RR037Q)；蛋白激酶 R 样内质网激酶(PERK)，CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)，钙网蛋白(CRT)抗体(美国 Cell Signaling 公司，批号分别为 #9451, #1649, #811)；山羊抗鼠 IgG，山羊抗兔 IgG(北京康为世纪生物科技有限公司，批号分别为 CW0102, CW0103)。

**1.3 仪器** ABI7300 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)，PURELAB PLUS 型超纯水系(美国 Bio-Rad 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],AlphaImager 图像分析系统(美国 AlphaImager 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组** 100 只大鼠适应性喂养 1 周后,随机分为 5 组,正常组不给予任何刺激和药物;模型组给予生理盐水灌胃;氟西汀组给予盐酸氟西汀  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ;  $\beta$ -细辛醚低剂量组给予  $\beta$ -细辛醚  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃;  $\beta$ -细辛醚高剂量组给予  $\beta$ -细辛醚  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃。每组大鼠 20 只。

**2.2 CUMS 模型建立及给药**<sup>[7]</sup> 正常组大鼠每 5 只一笼饲养,自由饮食饮水。其他各组大鼠单笼孤养,每天选用一种应激方式,持续 28 d,每种应激方式使用不超过 3 次,避免大鼠耐受。具体应急方式为强迫冰水游泳 10 min ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ),禁食水 24 h,束缚 24 h,热刺激 5 min ( $45 \text{ }^\circ\text{C}$ ),声音刺激 12 h ( $120 \text{ dB}$ ),夹尾 3 min,鼠笼倾斜 24 h ( $45^\circ$ ),潮湿环境 24 h,昼夜颠倒、通宵拥挤、摇晃 1 h 及闪光灯照射 12 h。除正常组外其余各组从造模开始后第 8 天开始给予生理盐水或相应药物,每天 1 次,共 28 d。

**2.3 旷场实验** 在造模前(0 d)和造模第 29 天进行旷场实验观察各组大鼠行为学变化。实验用敞箱为无盖方箱,高 40 cm,长宽均为 125 cm,箱内四壁涂成黑色,底板白色,底板用黑线划成 25 个  $25 \text{ cm} \times 25 \text{ cm}$  的等边方格。实验进行时环境安静,敞箱周围参照物不变。将单只大鼠轻放于敞箱底板正中心的方格内,记录大鼠 3 min 内动作行为表现包括水平穿越格数、直立次数。以大鼠的四肢完全进入一个方格区域作为水平运动的 1 分,以双前肢完全抬离地面作为直立次数的 1 分。每检测完一只大鼠后用 75% 乙醇彻底清洁敞箱并干燥后再进行下一只大鼠的检测。

**2.4 尼氏体(Nissl)染色** 制备石蜡切片后脱蜡,经过脱苯水化、水洗、染色,Nissl Differentiation 分化 5 s,脱水透明后显微镜观察,图片采集。

**2.5 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测 PERK, CHOP, CRT mRNA 表达** 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成,根据 GenBank 上公布的基因序列,利用 DNASTar 软件进行比对,找到其保守区,根据 Primer Express 软件,分别设计 PERK, CHOP, CRT 引物,PERK 引物上游 5'-GCTGTGATAATGCGTCCAGT-3',下游 5'-AGGTAGACAAGGTGGCTTCG-3'; CHOP 引物上游 5'-CTGGAAGCCTGCTATGAGGA-3',下游 5'-TAGG

GATGCAGGGTCAAGAG-3'; CRT 引物上游 5'-CTG GGTATGGCTTCCACTTC-3',下游 5'-GGCTACTTGG CTGTTTCAGG-3';  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)引物上游 5'-TCAGGTCATCACTATCGGCAAT-3',下游 5'-AAA GAAAGGCTGTAAAACGCA-3'。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。总 RNA 提取后,反转录合成 cDNA,采用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒相应反应体系进行 PCR 反应,总体积为  $25 \text{ } \mu\text{L}$ 。分别扩增 PERK, CHOP, CRT 与  $\beta$ -actin 基因,每个样本做 3 个复孔,得到阈循环值( $C_t$ )平均值,按照公式计算  $\Delta\Delta C_t$  值:  $\Delta C_t$  (试验样品) =  $C_t$  (试验样品,目的基因) -  $C_t$  (试验样品,内参基因);  $\Delta C_t$  (基准样品) =  $C_t$  (基准样品,目的基因) -  $C_t$  (基准样品,内参基因);  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$  (试验样品) -  $\Delta C_t$  (基准样品) 式中各个样本 mRNA 表达水平均以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  表示。

**2.6 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测 PERK, CHOP, CRT 蛋白表达** 眼科剪剪碎样品(冰上操作),按照一定比例与蛋白裂解液震荡混匀, $4 \text{ }^\circ\text{C}$  裂解, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  低温离心 10 min,抽提蛋白样本。考马斯亮蓝法检测各样本蛋白含量。取一定量的样本加入等体积的  $2 \times$  Laemmil 蛋白上样缓冲液,沸水浴变性 5 min。取等体积蛋白样品经过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离,湿转法转移硝酸纤维素膜(NC 膜)上,封闭液温箱孵育 3 h,一抗  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 15 min,加入辣根过氧化物酶标记二抗,温室孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,每次 15 min,显色,暗室曝光,清水洗涤终止反应。扫描条带,并用图像分析软件进行分析处理。

**2.7 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 软件进行统计,计量数据使用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间采用 One-way ANOVA 单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验法,方差不齐时采用 Dunnett's T3 进行两两比较,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对抑郁大鼠模型行为学的影响** 于造模开始前 1 d 进行旷场实验,测得各组大鼠水平运动穿越数和垂直运动直立数均无统计学差异。经 28 d 慢性不可预见性温和刺激后,模型组大鼠和正常组大鼠比较水平运动穿越数和垂直运动直立数均出现明显减少( $P < 0.05$ );与模型组大鼠比较,氟西汀组、 $\beta$ -细辛醚低、高剂量组大鼠水平运动穿越数和垂直运动直立数均明显增加( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1  $\beta$ -细辛醚对抑郁大鼠模型行为学的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

Table 1 Effect of  $\beta$ -asarone on behavior in rat model of depression ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	0 d		28 d	
		水平运动穿越数/格	垂直运动直立数/次	水平运动穿越数/格	垂直运动直立数/次
正常	-	89.26 $\pm$ 12.33	23.27 $\pm$ 5.16	86.22 $\pm$ 10.31	12.69 $\pm$ 2.00
模型	-	87.63 $\pm$ 13.80	24.30 $\pm$ 6.11	21.09 $\pm$ 5.38 <sup>1)</sup>	3.12 $\pm$ 0.89 <sup>1)</sup>
氟西汀	10	86.85 $\pm$ 14.51	24.07 $\pm$ 6.82	80.78 $\pm$ 11.05 <sup>2)</sup>	12.46 $\pm$ 1.76 <sup>2)</sup>
$\beta$ -细辛醚	25	88.35 $\pm$ 11.92	23.59 $\pm$ 4.45	81.52 $\pm$ 14.07 <sup>2)</sup>	12.09 $\pm$ 2.07 <sup>2)</sup>
	50	89.27 $\pm$ 15.78	23.61 $\pm$ 5.02	81.33 $\pm$ 12.76 <sup>2)</sup>	11.97 $\pm$ 1.95 <sup>2)</sup>

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

### 3.2 对抑郁大鼠模型海马神经元形态的影响

经 28 d 慢性不可预见性温和刺激后,尼氏染色观察可见,正常组大鼠海马组织神经元形态较好,蓝紫色尼氏小体颗粒较多。模型组大鼠海马组织尼氏小体颗粒明显减少,细胞形态发生改变,神经元细胞出现核固缩,胞浆着色变浅,出现空泡。 $\beta$ -细辛醚低、高剂量组大鼠海马区神经元形态相对较好,尼氏小体颗粒较模型组增多,与氟西汀组的作用效果相似。见图 1。

### 3.3 对抑郁大鼠模型海马组织 PERK, CHOP, CRT mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果可见,经 28 d 慢性不可预见性温和刺激后,与正常组比较,模型组大鼠 PERK, CHOP, CRT mRNA 表达明显升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,氟西汀组, $\beta$ -细辛醚低、高剂量组大鼠 PERK, CHOP, CRT mRNA 表达明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

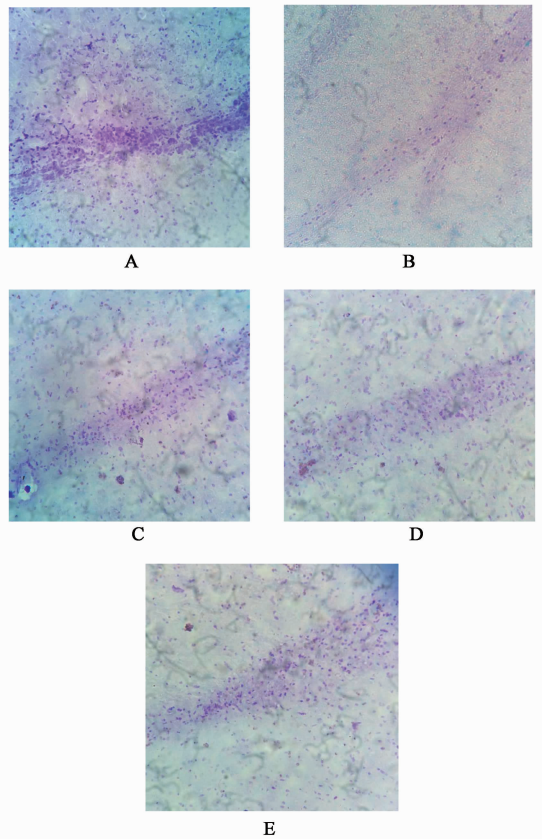
表 2  $\beta$ -细辛醚对抑郁大鼠模型海马组织 PERK, CHOP, CRT mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of  $\beta$ -asarone on expression of PERK, CHOP and CRT mRNA in hippocampus in rat model of depression ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	PERK	CHOP	CRT
正常	-	1.04 $\pm$ 0.08	1.04 $\pm$ 0.12	1.00 $\pm$ 0.12
模型	-	2.06 $\pm$ 0.29 <sup>1)</sup>	2.06 $\pm$ 0.24 <sup>1)</sup>	1.98 $\pm$ 0.16 <sup>1)</sup>
氟西汀	10	1.48 $\pm$ 0.26 <sup>2)</sup>	1.47 $\pm$ 0.21 <sup>2)</sup>	1.55 $\pm$ 0.33 <sup>2)</sup>
$\beta$ -细辛醚	25	1.67 $\pm$ 0.21 <sup>2)</sup>	1.68 $\pm$ 0.22 <sup>2)</sup>	1.64 $\pm$ 0.21 <sup>2)</sup>
	50	1.46 $\pm$ 0.29 <sup>2)</sup>	1.57 $\pm$ 0.33 <sup>2)</sup>	1.50 $\pm$ 0.34 <sup>2)</sup>

### 3.4 对抑郁大鼠模型海马组织 PERK, CHOP, CRT 蛋白表达的影响

28 d 慢性不可预见性温和刺激后,与正常组比较,模型组大鼠 PERK, CHOP, CRT 蛋白表达均明显升高 ( $P < 0.05$ );与模型组大鼠比较,氟西汀组, $\beta$ -细辛醚低、高剂量组 PERK, CHOP, CRT 蛋白表达明显减少 ( $P < 0.05$ )。见图 2,表 3。



A. 正常组;B. 模型组;C. 氟西汀组;D.  $\beta$ -细辛醚 25  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;E.  $\beta$ -细辛醚 50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组(图 2 同)

图 1  $\beta$ -细辛醚对抑郁大鼠模型海马神经元形态的影响 (Nissl,  $\times 200$ )

Fig. 1 Effect of  $\beta$ -asarone on morphology of hippocampal neurons in rat model of depression (Nissl,  $\times 200$ )

## 4 讨论

石菖蒲总挥发油为抗惊厥、镇静作用的主要部位, $\beta$ -细辛醚是挥发油的主要成分,约占 63.2% ~ 81.2%,大脑是  $\beta$ -细辛醚的主要分布器官, $\beta$ -细辛醚极易透过血脑屏障,在脑内半衰期也比其他器官长,这为  $\beta$ -细辛醚对大脑的药理作用提供了依据<sup>[8,9]</sup>。本实验采用慢性温和刺激的方法建立的抑郁症大鼠模型,更接近人类抑郁症中慢性、低水平应激导致抑

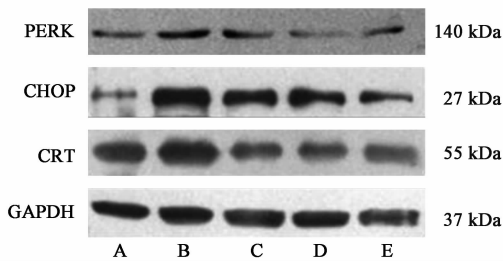


图 2  $\beta$ -细辛醚对抑郁大鼠模型海马组织 PERK, CHOP, CRT 蛋白表达的影响(图 2 同)

Fig. 2 Effect of  $\beta$ -asarone on expression of protein PERK, CHOP and CRT in hippocampus in rat model of depression

表 3  $\beta$ -细辛醚对抑郁大鼠模型海马组织 PERK, CHOP, CRT 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effect of  $\beta$ -asarone on expression of protein PERK, CHOP and CRT in hippocampus in rat model of depression( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	PERK	CHOP	CRT
正常	-	100.00 $\pm$ 17.68	100.00 $\pm$ 16.23	100.00 $\pm$ 19.78
模型	-	236.24 $\pm$ 31.95 <sup>1)</sup>	346.22 $\pm$ 42.93 <sup>1)</sup>	205.22 $\pm$ 27.71 <sup>1)</sup>
氟西汀	10	162.29 $\pm$ 30.66 <sup>2)</sup>	239.55 $\pm$ 39.62 <sup>2)</sup>	159.91 $\pm$ 32.55 <sup>2)</sup>
$\beta$ -细辛醚	25	180.97 $\pm$ 36.00 <sup>2)</sup>	272.33 $\pm$ 40.32 <sup>2)</sup>	165.18 $\pm$ 24.46 <sup>2)</sup>
	50	145.55 $\pm$ 35.56 <sup>2)</sup>	230.69 $\pm$ 47.33 <sup>2)</sup>	146.29 $\pm$ 37.18 <sup>2)</sup>

西汀组的作用效果相似。提示  $\beta$ -细辛醚有效保护了 CUMS 大鼠海马组织,提高 CUMS 大鼠神经元活性。这与前期的实验研究相吻合<sup>[10-11]</sup>。

当机体受到长期刺激时,内质网应激(ERS)发生,随后细胞启动 UPR,通过减少大量堆积的未折叠蛋白从而减轻 ERS。刺激持续存在时,内质网面对应激状态的各种调控手段耗竭,细胞所承受的压力超过其最大负荷,通过 UPR,内质网相关凋亡(ERAD)过程即被启动<sup>[12]</sup>。从而使长期应激的神经细胞走向凋亡。

CRT 是一类可溶性的、存在于内质网的热休克蛋白,在高等生物体内,其存在于大多数有核细胞中,尤其在非肌肉组织中含量非常丰富。CRT 在大鼠和人类中表现出结构和功能高度的保守性,参与肿瘤抗原提呈、血管发生及细胞凋亡等多种生物学功能,能够识别内质网中错误折叠的 MHC-I 类分子重链,协助内质网正确合成蛋白。近年来多项研究提出 CRT 在动物抑郁行为发生的过程中,参与调节未折叠蛋白和错误折叠蛋白蓄积,维持正常的内质网功能,以减轻抑郁样行为<sup>[13-15]</sup>。本实验中模型组大鼠海马组织中内质网分子伴侣 CRT 表达高于正常组,实验结果与文献研究相一致<sup>[16-17]</sup>。给药组 CRT 表达下调,提示在抑郁模型大鼠海马组织中,CRT 起到了神经保护作用。

郁症发病及发展的机制,CUMS 大鼠模型的抑郁行为可保持几个月,长期应用抗抑郁药可改善抑郁样行为。行为学测试发现, $\beta$ -细辛醚可以明显改善大鼠抑郁样行为,提示  $\beta$ -细辛醚具有一定的抗抑郁作用。

尼氏染色中 Nissl 小体大且多,说明神经元合成蛋白质的功能较强;相反在神经元受损伤时,Nissl 小体的数量会减少。尼氏染色可以形象的反映神经元细胞的生存状态。实验发现, $\beta$ -细辛醚低、高剂量组海马神经元尼氏小体颗粒明显增多,与阳性药氟

PERK 属于 ERS 感受器中的一种,内质网应激早期,PERK 通过自身磷酸化和二聚化使真核细胞蛋白翻译起始复合体(eukaryotic translation initiation factor 2, eIF2)的  $\alpha$  亚基第 51 位的丝氨酸 Ser 发生磷酸化,阻止与葡萄糖基转移酶结合,抑制目标蛋白质的起始翻译,阻碍蛋白质合成,降低细胞内的蛋白负荷,减轻了 ER 的负担<sup>[18]</sup>。结合已有的实验证实使用 PERK 选择性抑制剂 U0126 可以加重神经元的死亡<sup>[19]</sup>,推测 PERK 在神经元的保护中也起到了一定的正性作用。笔者研究发现 PERK 在模型组表达增加,给予  $\beta$ -细辛醚后,PERK 表达下调。

CHOP 在正常细胞中广泛分布,但表达量很低,一般会与同一家族的其他成员形成二聚体,参与到细胞的各种生理过程。实验组经过多年的抑郁模型大鼠行为学及海马组织的相关研究,此项关于内质网应激的研究中,发现 CHOP 与 PERK 一样,在模型组的表达升高,经过药物治疗后,表达下降,由此推断在抑郁模型大鼠海马组织中,CHOP 与 PERK 被持续而强烈的诱导后启动 PERK/CHOP 途径,最终导致细胞的死亡。

内质网应激的发生表现在 CRT 表达上调,PERK 磷酸化及 CHOP 表达增加,ERS 相关凋亡途径活化;CRT 抑制表达时,PERK 磷酸化降低,CHOP 表达降低,表明 ERS 相关凋亡途径受到抑制。该实

实验证实了 PERK 和 CHOP 蛋白表达与 CRT 呈正相关。该实验中模型组大鼠海马组织中 CRT 表达高于正常组,给药组 CRT 表达下调,模型组中 PERK 及 CHOP 表达趋势与 CRT 相同,与模型组比较,试验药物组与阳性药物组 PERK, CHOP 及 CRT 均下调,因此可以推测适度下调 CRT 可以发挥神经细胞内源性保护作用。马儒林等<sup>[20]</sup>的研究也证实过内质网应激发生可调节大鼠海马损伤。

综上所述,本实验研究了抑郁症发生时内质网内部相关应激因子的变化及  $\beta$ -细辛醚的抗抑郁作用,证实了内质网应激在抑郁症中起到了重要的作用, $\beta$ -细辛醚的可能是通过调节内质网功能发挥抗抑郁作用,为将来抑郁症的临床治疗与转归提出了新的探索方向。

[参考文献]

[1] Kendler K S, Gardner C O. Dependent stressful life events and prior depressive episodes in the prediction of major depression: the problem of causal inference in psychiatric epidemiology [J]. Arch Gen Psychiatry, 2010, 67(11): 1120-1137.

[2] 高轩,陈荔枝,刘振红,等.白藜芦醇通过抑制内质网应激减轻大鼠脑缺血/再灌注损伤[J].中国免疫学杂志,2016,32(1):92-96.

[3] YAN F, LI J, CHEN J, et al. Endoplasmic reticulum stress is associated with neuroprotection against apoptosis via autophagy activation in a rat model of subarachnoid hemorrhage[J]. Neurosci Lett, 2014, 563(5): 160-165.

[4] FA M, XIA L, Annu R, et al. Stress modulation of hippocampal activity-Spotlight on the dentate gyrus[J]. Neurobiol Learn Mem, 2014, 112: 53-60.

[5] Nakagawa T, ZHU H, Morishima N, et al, Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta [J]. Nature, 2000, 403(6765): 98-103.

[6] 孙玉荣,董海影,王显艳,等.  $\beta$ -细辛醚对抑郁模型大鼠行为及海马神经元的影响[J].北京中医药大学学报,2013,36(8):546-549.

[7] 李仲铭,李静华,祖淑玉,等.慢性不可预见性应激动物模型的建立与评价[J].昆明医学院学报,2009,30(2):49-52.

[8] 闫颖,赵咏梅,赵志炜,等.内质网应激通路相关分子 GRP78 及 CHOP 在糖尿病脑病小鼠海马表达的影响[J].首都医科大学学报,2011,32(1):90-94.

[9] 张悦.内质网应激介导的 CRH 诱导大鼠海马神经元凋亡[D].石家庄:河北医科大学,2012.

[10] 金铭,蔡珍珍,刘得水,等. $\beta$ -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[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(18):113-118.

[11] 金铭,蔡珍珍,董海影,等. $\beta$ -细辛醚对抑郁模型大鼠海马组织及 Bax、Bcl-2 的影响[J].中国医学创新,2014,11(18):36-38.

[12] 姜泽群,姚志华,邓正亭,等.凉血化瘀方拮抗内质网应激引起的 L02 肝细胞凋亡作用及机制研究[J].中国中药杂志,2013,38(20):3544-3548.

[13] 吴薇,刘朝奇.钙网蛋白通过内质网应激介导细胞凋亡的分子机制[J].生物技术通报,2013,10:24-27.

[14] 刘虹,韩芳,石玉秀.创伤后应激障碍大鼠海马神经元分子伴侣钙网蛋白表达的变化[J].中国医科大学学报,2012,41(12):1057-1064.

[15] 刘冬娟,肖冰,石玉秀.PTSD 样大鼠杏仁核神经元内质网分子伴侣钙网蛋白的表达[J].中国医科大学学报,2014,43(11):978-981.

[16] 刘虹,韩芳,石玉秀.创伤后应激障碍大鼠海马神经元分子伴侣钙蛋白表达的变化[J].中国医科大学学报,2012,41(12):1057-1064.

[17] Molinari M, Eriksson K K, Calanca V, et al. Contrasting functions of calreticulin and calnexin in glycoprotein folding and ER quality control [J]. Mol Cell, 2004, 13(1):125-135.

[18] Momoi T. Conformational diseases and ER stress-mediated cell death: apoptotic cell death and autophagic cell death [J]. Curr Mol Med, 2006, 6(1):111-118.

[19] Francesehini D, Giusti P, Skaper S D. MEK inhibition exacerbates ischemic calcium imbalance and neuronal cell death in rat cortical cultures [J]. Eur J Pharmacol, 2006, 533(13):18-27.

[20] 马儒林,张舜,李蓓,等.内质网应激介导的凋亡在 PBDE-47 致大鼠海马损伤中的作用[J].生态毒理学,2016,11(2):387-393.

[责任编辑 周冰冰]