

温胆汤对精神分裂症模型大鼠海马 TrkB、CREB 表达的影响

张媛, 朱金华, 张米兰, 陈静, 万红娇*
(江西中医药大学, 南昌 330004)

[摘要] 目的:探讨温胆汤对精神分裂症(SCZ)模型大鼠海马组织酪氨酸蛋白激酶受体B(TrkB)、环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)表达变化的影响。方法:将54只大鼠随机分为正常组、模型组、温胆汤高、中、低剂量组和氯氮平组,每组9只。各组大鼠均以灌胃的方式给药21d,温胆汤高、中、低剂量组的给药剂量分别为40、20、10 g·kg⁻¹温胆汤药液,氯氮平组为0.02 g·kg⁻¹氯氮平原液,正常组和模型组则灌胃同等容量的生理盐水。在末次给药2h后,除正常组外,对其余5组大鼠予以腹腔注射0.6 mg·kg⁻¹地卓西马来酸盐(MK-801),建立SCZ模型。通过旷场实验观察大鼠的自发活动水平,苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠海马CA1区病理形态变化,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马组织TrkB、磷酸化(p)-TrkB、CREB和p-CREB的蛋白表达,免疫组化检测海马CA1区TrkB、CREB的蛋白表达,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测海马组织TrkB、CREB mRNA表达水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠自发活动水平显著增加($P<0.01$),海马CA1区神经元细胞排列松散紊乱,部分神经元细胞变性,海马组织TrkB、p-TrkB、CREB、p-CREB蛋白、海马CA1区TrkB、CREB蛋白及海马组织TrkB、CREB mRNA表达均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,温胆汤各组大鼠自发活动水平显著降低($P<0.01$),海马CA1区神经元细胞排列相对整齐、胞体形态较为规则,神经元变性等现象较少;温胆汤中、低剂量组海马组织TrkB蛋白表达明显升高($P<0.05$),温胆汤各剂量组海马组织p-TrkB、CREB、p-CREB蛋白表达明显升高($P<0.05$);温胆汤各剂量组海马CA1区TrkB蛋白表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),温胆汤中、低剂量组海马CA1区CREB蛋白表达显著升高($P<0.01$);温胆汤高、低剂量组海马组织TrkB mRNA表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),温胆汤中、低剂量组CREB mRNA表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:温胆汤可以通过降低SCZ模型大鼠自发活动水平、改善海马神经元病理损伤、增加TrkB、p-TrkB、CREB、p-CREB的表达,从而预防SCZ及其认知障碍的发生、发展。

[关键词] 温胆汤; 酪氨酸蛋白激酶受体B(TrkB); 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB); 精神分裂症; 认知障碍

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)03-0026-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221705

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220830.1557.025.html>

[网络出版日期] 2022-08-31 08:50:07

Effect of Wendantang on Expression of TrkB and CREB in Hippocampus of Rats with Schizophrenia

ZHANG Yuan, ZHU Jinhua, ZHANG Milan, CHEN Jing, WAN Hongjiao*
(Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Wendantang on the expression of receptor tyrosine kinase receptors B (TrkB) and cyclic adenosine monophosphate response element binding protein (CREB) in the hippocampus of rats with schizophrenia (SCZ). **Method:** Fifty-four rats were randomly divided into a normal group, a model group, high (40 g·kg⁻¹), medium (20 g·kg⁻¹), low-dose (10 g·kg⁻¹) Wendantang groups, and a clozapine (0.02 g·kg⁻¹) group, with 9 rats in each group. All groups of rats were given corresponding drugs by gavage for 21 d. The normal and model groups were given equal volume of normal saline. Except the normal

[收稿日期] 2022-06-21

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81860814);江西省自然科学基金项目(20202BABL206128);江西省教育厅科技项目(GJJ201246);江西省研究生创新专项基金项目(YC2020-S369)

[第一作者] 张媛,在读硕士,从事中医药与神经保护作用研究,E-mail:249208732@qq.com

[通信作者] *万红娇,博士,教授,博士生导师,从事中医药与神经保护作用研究,E-mail:ann.wan@163.com

group, the other 5 groups were given $0.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ dizocilpine maleate (MK-801) at 2 hours after the last administration for intraperitoneal injection to induce the rat model of SCZ. The level of spontaneous activity of rats was observed by open field experiment. Histomorphological changes in the hippocampal CA1 area was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The protein expression levels of TrkB, phosphorylated-TrkB (p-TrkB), CREB, and phosphorylated-CREB (p-CREB) were detected by Western blot. The protein expression levels of TrkB and CREB in the hippocampal CA1 area were observed by immunohistochemistry. The mRNA expression levels of TrkB and CREB in the hippocampus were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** As compared with the normal group, the level of spontaneous activity in the model group was significantly increased ($P < 0.01$). The arrangement of neuronal cells in the hippocampus CA1 area was loose and disorganized, and some neurons were denatured in the model group. The protein expression levels of TrkB, p-TrkB, CREB, and p-CREB in the hippocampus, the protein expression levels of TrkB and CREB in the hippocampal CA1 area, and the mRNA expression of TrkB and CREB in the hippocampus were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). As compared with the model group, the level of spontaneous activity in all Wendantang groups were significantly decreased ($P < 0.01$). The neuronal cells in the hippocampal CA1 area of rats in all Wendantang groups were relatively neatly and closely arranged, the morphology of cell body was more regular, and neurons degeneration was rarely observed. The protein expression level of TrkB in the hippocampus was significantly higher in the medium and low-dose Wendantang groups ($P < 0.05$). The protein expression levels of p-TrkB, CREB, and p-CREB in the hippocampus were significantly higher in all Wendantang groups ($P < 0.05$). The protein expression of TrkB in the hippocampal CA1 area was significantly increased in all Wendantang groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The protein expression of CREB in the hippocampal CA1 area was significantly increased in the medium and low-dose Wendantang groups ($P < 0.01$). The mRNA expression of TrkB in the hippocampus was significantly increased in the high and low-dose Wendantang groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The mRNA expression of CREB was significantly increased in the medium and low-dose Wendantang groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Wendantang can prevent the occurrence and development of SCZ and cognitive impairment by decreasing the level of spontaneous activity, improving the pathological damage of hippocampal neurons, and increasing the expression levels of TrkB, p-TrkB, CREB, and p-CREB.

[Keywords] Wendantang; receptor tyrosine kinase receptors B (TrkB); cyclic adenosine monophosphate response element binding protein (CREB); schizophrenia; cognitive impairment

美国国立精神卫生研究所(NIMH)认为,精神分裂症(SCZ)是一种慢性、严重、并能致残的脑部失调疾病,常在青年或壮年时期发作。认知障碍作为SCZ的临床表现之一,贯穿于此病发生的整个过程,是SCZ的核心症状^[1]。国内外的研究表明SCZ认知障碍的发病机制主要包括神经发育和大脑结构异常、与认知障碍相关的易感基因异常、神经递质功能紊乱及免疫炎症反应等。而脑源性神经营养因子(BDNF)被认为是认知障碍的分子学基础^[2-4]。目前,越来越多的研究证明,酪氨酸蛋白激酶受体B(TrkB)和环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)在神经精神性疾病认知障碍中发挥着关键作用,TrkB是神经营养蛋白酪氨酸激酶受体家族的成员之一,可以与其高亲和力配体BDNF结合从而

促进自身磷酸化,磷酸化的TrkB则通过活化海马神经细胞内的下游信号传导级联,进一步激活CREB,加强长时程记忆并且增强突触可塑性,维持神经元的存活与神经突生长,从而发挥调节学习记忆等生物学效应^[5-7]。

祖国医学多将SCZ列于“癫狂”等神志病中论述,《临证指南医案》^[8]言:“癫由积忧积郁,病在心脾包络……故气郁则痰迷,神志为之混淆”,提示“气滞痰凝”是该病的主要病机。温胆汤见于陈无择所著《三因极一病证方论》,由陈皮、茯苓、半夏、枳实、竹茹、甘草、大枣、生姜8味组成,具有理气化痰、利胆和胃的功效^[9]。在临床中,刘秉忠教授使用温胆汤治疗痰气郁结的SCZ患者,治疗效果十分显著^[10],温胆汤也常与利培酮、富马酸喹硫平、奥氮平

等药物联合治疗此病^[11-12]。本课题组先前的实验已证实温胆汤能够改善SCZ模型大鼠海马组织超微结构、并具有上调BDNF的表达水平和提高大鼠学习记忆等相关认知功能,以及调节免疫炎症因子等作用^[13-18]。故本研究通过观察温胆汤对模型大鼠自发活动的行为改变、海马组织病理形态变化,以及海马组织中TrKB、CREB的表达水平,探讨温胆汤干预SCZ模型大鼠的可能作用机制,从而为温胆汤防治SCZ的临床应用提供相关实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD雄性大鼠54只,从湖南斯莱克景达实验动物有限公司购买,体质量180~220 g,8~12周龄,合格证号SCXK(湘)2019-0004。大鼠饲养条件为温度24~26℃,湿度45%~55%、12 h昼夜节律(8:00—20:00),给予充足的饲料和水,于上述环境中适应性饲养1周。本实验已通过江西中医药大学实验动物伦理委员会审查并批准(JZLLSC20210032)。

1.2 药物及制备 温胆汤方药购买于江西中医药大学附属医院中药房,每方中含生药38 g,方药组成为法半夏6 g、竹茹6 g、枳实6 g、陈皮9 g、茯苓4.5 g、炙甘草3 g、红枣2颗、生姜3片,批号分别为190401、2008001、191102、190402、190302、191002、190701、191008,所有饮片均通过江西中医药大学曹岚副教授鉴定。上述药物于水中浸泡30 min后开始煎药,第1次煎药加入的水量为药材量的8倍,大火煎煮,待沸腾后文火煎煮40 min取药液,第2次则加入6倍水量,待沸腾后文火煎煮30 min取药液,合并2次药液并经纱布过滤。使用转蒸发仪浓缩配制为含生药质量浓度2、1、0.5 g·mL⁻¹,储存于4℃冰箱。氯氮平(上海上药信谊药厂有限公司,国药准字31190505)。

1.3 试剂 地卓西平马来酸盐(MK-801,美国Sigma公司,批号105M4606V);SAP二抗试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号SAP-9100);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京雷根生物技术有限公司,批号DH0006);CREB一抗(美国Cell Signaling Technology公司,批号#9197);TrKB、磷酸化(p)-TrKB、p-CREB一抗(英国Abcam公司,批号分别为ab187041、ab229908、ab32096);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号GB12002);TRIzol(美国Invitrogen公司,批号15596-026);逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(日本Takara公司,批号分别为RR036B、RR086B)。

1.4 仪器 LabTech EV311型旋转蒸发仪(北京莱伯泰科仪器股份有限公司);旷场实验测试箱(规格100 cm×100 cm×40 cm,自制);Ethovision XT10.0视频采集系统与分析软件[诺思达(北京)信息技术有限公司];RM-2255型石蜡切片机(德国Leica公司);BV-2型垂直电泳槽、BT-2型转印电泳槽(武汉赛维尔生物科技有限公司);Step One Plus™型Real-time PCR仪(美国Thermo公司)。

2 方法

2.1 分组、给药与造模 将54只大鼠随机分为正常组、模型组、温胆汤高、中、低剂量组和氯氮平组,每组9只。各组大鼠均给予相应药物以灌胃的方式给药21 d,温胆汤高、中、低剂量组的给药剂量分别为40、20、10 g·kg⁻¹,氯氮平组为0.02 g·kg⁻¹,正常组和模型组则灌胃同等容量的生理盐水(给药剂量根据“人和动物药物等效剂量表”换算)。于末次给药2 h后,对模型组、温胆汤高、中、低剂量组和氯氮平组大鼠予以腹腔注射MK-801,注射剂量为0.6 mg·kg⁻¹,建立SCZ模型^[19],正常组则予以腹腔注射相同剂量的生理盐水。

2.2 指标检测 于造模第2天完成旷场实验,待旷场实验结束2 d后,采用腹腔注射1%戊巴比妥钠(40 mg·kg⁻¹)麻醉大鼠,分别经心脏灌注取全脑放入4%多聚甲醛中固定保存和取其大脑剥离海马组织置于液氮中速冻保存,用以进行观察与检测。

2.3 旷场实验 于安静环境中开始实验,将大鼠放入旷场测试箱底部中心,正上方视频采集设备同时开始摄像,计时观察5 min,实验过程中注意避光,且保持4周参照物固定不变,应用Ethovision XT10.0视频采集系统与分析软件分析测定每只大鼠的移动距离和移动速度,评判大鼠的自发活动水平。在每1只大鼠实验结束后,清除粪便并用乙醇擦拭测试箱底部及四周,避免余留气味干扰实验,对实验结果产生影响。

2.4 HE染色观察大鼠海马组织形态变化 大鼠脑组织经4%多聚甲醛固定48 h后,切取包含海马的大脑组织块,厚度约5 mm,放入包埋盒中进行梯度乙醇脱水及包埋。采用冠状位连续切片的方式将包埋好的组织切至厚度为4 μm的组织片,经捞片、60℃温箱中烤片1.5 h、脱蜡、水化、HE染色、脱水、透明、中性树脂胶封片后,于光学显微镜下观察海马CA1区组织形态变化。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠海马TrKB、p-TrKB、CREB和p-CREB蛋白表达 于液氮

中取出冻存的样本,称取海马组织约60 mg,充分匀浆后加入裂解液,BCA法测定总蛋白浓度后,置于沸水中浴变性15 min,进行SDS-PAGE凝胶电泳,结束后转至PVDF膜,室温封闭1.5 h后,分别加入TrkB、p-TrkB、CREB、p-CREB一抗(1:1 000),GAPDH一抗(1:2 000)后,4℃摇床孵育12 h,二抗(1:3 000)室温孵育2 h后,在避光条件下进行显影。使用AlphaEase FC软件分析各条带灰度值,目的蛋白的表达量均由目的蛋白条带灰度值/GAPDH条带灰度值表示。

2.6 免疫组化检测大鼠海马CA1区TrkB、CREB蛋白表达 石蜡切片水化后,采用高压法进行抗原修复3 min,依次经3%过氧化氢孵育30 min、山羊血清封闭30 min后,滴加一抗TrkB(1:500)、CREB(1:5 000)4℃孵育过夜。次日滴加二抗生物素标记山羊抗兔IgG聚合物30 min、辣根酶标记链霉卵白素工作液30 min,进行DAB显色、苏木素复染、盐酸乙醇分液分化、封片等步骤后,于400倍镜下拍照观察,Image J软件分析平均积分吸光度AA。

2.7 Real-time PCR检测大鼠海马TrkB、CREB mRNA表达 于液氮中取出冻存的海马组织约60 mg,置于预冷的研磨钵中,加入液氮反复研磨成粉末状,TRIzol法提取总RNA,紫外微量分光光度计测定RNA含量,取总RNA 2 μg进行逆转录,合成cDNA。PCR扩增反应体系:20 μL反应体系为2×SYBR Green 10 μL; cDNA 1 μL; Forward Primer 1 μL; Reverse Primer 1 μL; ddH₂O 7 μL。扩增条件为95℃预变性5 min,95℃变性15 s,60℃退火30 s,72℃延伸40 s共40个循环。mRNA的表达量使用相对定量计算公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。引物由江苏凯基生物技术股份有限公司设计并合成,见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
TrkB	上游 ACCAAACCAATCGGGAGCAT	107
	下游 ATGTCTCGCCAACCTTGAGCA	
CREB	上游 GTGACGGAGGAGCTTGACC	131
	下游 AATCTGTGGCTGGGCTTGAA	
GAPDH	上游 TGTTCTAGAGACAGCCGCAT	83
	下游 AATCCGTTACACCGACCT	

2.8 统计学分析 所有数据均采用SPSS 24.0软件进行统计分析,用 $\bar{x}\pm s$ 表示,当数据符合正态分布且方差齐时,多组间比较使用单因素方差分析,方差

不齐则使用Dunnett's T3检验,两组间比较采用t检验,均以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对SCZ模型大鼠自发活动水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠的移动距离与移动速度显著升高($P<0.01$);与模型组比较,温胆汤各组与氯氮平组大鼠的移动距离和移动速度显著下降($P<0.01$)。见表2。

表2 温胆汤对SCZ模型大鼠移动距离和移动速度的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 2 Effect of Wendantang on distance and speed of displacement of rat with SCZ model ($\bar{x}\pm s, n=9$)

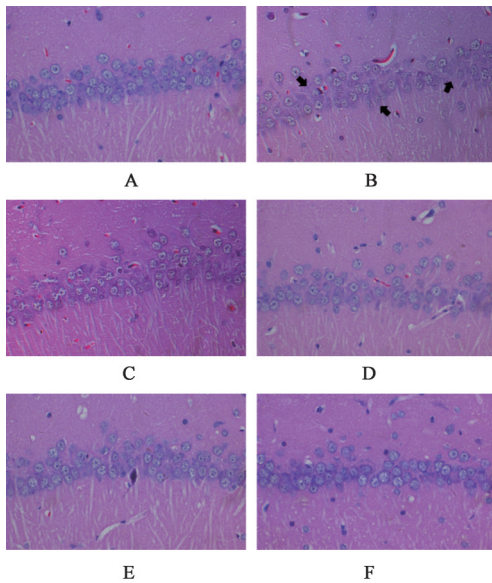
组别	剂量/g·kg ⁻¹	移动距离/cm	移动速度/cm·s ⁻¹
正常组		2 770.62±370.99	9.24±1.24
模型组		4 139.30±741.57 ²⁾	13.80±2.47 ²⁾
温胆汤高剂量组	40	2 564.16±818.48 ⁴⁾	8.55±2.73 ⁴⁾
温胆汤中剂量组	20	2 488.64±620.99 ⁴⁾	8.30±2.07 ⁴⁾
温胆汤低剂量组	10	2 087.72±620.57 ⁴⁾	6.96±2.07 ⁴⁾
氯氮平组	0.02	1 763.25±797.37 ⁴⁾	5.88±2.66 ⁴⁾

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3-表5同)

3.2 对SCZ模型大鼠海马组织形态的影响 正常组海马CA1区神经元细胞排列整齐,密度适中,形态规则,胞质丰满,胞体轮廓清晰。而与正常组比较,模型组海马CA1区神经元细胞之间间隙明显、排列松散紊乱,部分神经元细胞变性,如胞体破裂或固缩深染。与模型组比较,温胆汤各组与氯氮平组大鼠海马CA1区神经元细胞排列较为整齐、紧密,胞体形态相对规则,胞体破裂和固缩深染等现象较少。见图1。

3.3 对SCZ模型大鼠海马组织TrkB、p-TrkB、CREB、p-CREB蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组海马组织中TrkB、p-TrkB、CREB和p-CREB的蛋白表达均显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,温胆汤中、低剂量组,以及氯氮平组海马组织中TrkB的蛋白表达明显升高($P<0.05$),温胆汤各组与氯氮平组海马组织中p-TrkB、CREB和p-CREB的蛋白表达均明显升高($P<0.05$)。见图2、表3。

3.4 对SCZ模型大鼠海马CA1区TrkB、CREB表达的影响 与正常组比较,模型组海马CA1区TrkB、CREB的表达明显降低($P<0.05, P<0.01$),与模型组比较,温胆汤各组与氯氮平组海马CA1区TrkB的表达明显升高($P<0.05, P<0.01$),温胆汤中、低剂量组海马CA1区CREB的表达显著升高($P<$



注: A. 正常组; B. 模型组; C. 温胆汤高剂量组; D. 温胆汤中剂量组; E. 温胆汤低剂量组; F. 氯氮平组(图2-图4同)
图1 温胆汤对SCZ模型大鼠海马CA1区组织形态的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Wendantang on histomorphology of hippocampal CA1 region of rat with SCZ model (HE, ×400)

0.01)。见表4及图3、图4。

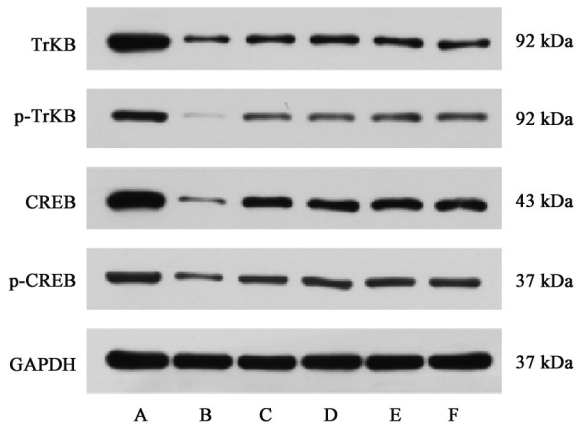


图2 各组大鼠海马组织TrkB、p-TrkB、CREB、p-CREB蛋白电泳
Fig. 2 Electrophoresis of TrkB, p-TrkB, CREB and p-CREB in hippocampal in each groups of rats

表3 温胆汤对SCZ模型大鼠海马组织TrkB、p-TrkB、CREB、p-CREB蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Wendantang on expression of TrkB, p-TrkB, CREB and p-CREB proteins in hippocampal rat with SCZ model ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TrkB/GAPDH	p-TrkB/GAPDH	CREB/GAPDH	p-CREB/GAPDH
正常组		1.15±0.09	0.62±0.15	1.43±0.37	0.79±0.25
模型组		0.34±0.05 ²⁾	0.12±0.10 ²⁾	0.18±0.11 ²⁾	0.22±0.11 ²⁾
温胆汤高剂量组	40	0.50±0.09	0.31±0.07 ³⁾	0.50±0.08 ³⁾	0.44±0.06 ³⁾
温胆汤中剂量组	20	0.52±0.11 ³⁾	0.31±0.06 ³⁾	0.49±0.06 ³⁾	0.45±0.05 ³⁾
温胆汤低剂量组	10	0.54±0.11 ³⁾	0.33±0.04 ³⁾	0.50±0.08 ³⁾	0.45±0.06 ³⁾
氯氮平组	0.02	0.52±0.12 ³⁾	0.32±0.04 ³⁾	0.51±0.05 ³⁾	0.44±0.06 ³⁾

3.5 对SCZ模型大鼠海马组织TrkB、CREB mRNA表达的影响 与正常组比较,模型组海马组织中TrkB、CREB mRNA的表达均显著降低($P < 0.01$),与模型组比较,温胆汤高、低剂量组海马组织中TrkB mRNA的表达明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),温胆汤中、低剂量组及氯氮平组海马组织中CREB mRNA表达明显升高($P < 0.05, P < 0.01$)。见表5。

4 讨论

SCZ有三大症候群,阴性症状一般表现为精神抑郁,沉默寡言,消极悲观;阳性症状多为急躁易怒,偶可伴妄见、妄闻等表现,以及学习、记忆缺陷等认知功能障碍。SCZ的发病往往被认为与大脑谷氨酸递质系统功能紊乱有着密切联系, Kim等学者早在1980年报道了SCZ患者的脑脊液中谷氨酸浓度低下,随后许多来自于临床和动物模型的研究认为,谷氨酸N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体是谷氨酸功能系统中最重要的受体,其功能减退会导致SCZ发生^[20]。MK-801是选择性较强的NMDA受体拮抗剂,被广泛应用于SCZ动物模型建立,其能够使神经元发出的神经递质传递失常,导致海马神经元突触生长异常,并诱发大鼠学习、记忆等认知功能下降和自发活动增加等行为学异常^[21]。课题组前期已通过Morris水迷宫实验发现,在造模前予以温胆汤在一定程度上能够改善由MK-801诱导的学习、记忆等认知功能下降^[18]。有研究报道表明,自发活动增加是由于在MK-801阻断NMDA受体后,大脑额叶皮质和中脑-边缘多巴胺系统被激活,从而导致多巴胺的释放增加,说明自发活动水平与谷氨酸系统和多巴胺系统之间的互相调节有关^[22]。吴金华等^[19]学者研究发现,应用一次性腹腔注射0.15 mg·kg⁻¹的MK-801对大鼠移动行为无明显变化,而注射0.3、0.6、1.0 mg·kg⁻¹的MK-801可以明显增加大鼠的活动,10 mg·kg⁻¹的MK-801则会明显降低大鼠的活动,提示MK-801对大鼠移动的剂

表4 温胆汤对SCZ模型大鼠海马CA1区TrkB和CREB蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Wendantang on expression of TrkB and CREB proteins in hippocampal CA1 region of rats with SCZ model ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TrkB	CREB
正常组		0.159±0.011	0.123±0.007
模型组		0.107±0.013 ²⁾	0.100±0.012 ¹⁾
温胆汤高剂量组	40	0.138±0.007 ³⁾	0.110±0.016
温胆汤中剂量组	20	0.145±0.018 ⁴⁾	0.137±0.006 ⁴⁾
温胆汤低剂量组	10	0.153±0.013 ⁴⁾	0.133±0.012 ⁴⁾
氯氮平组	0.02	0.132±0.014 ³⁾	0.116±0.007

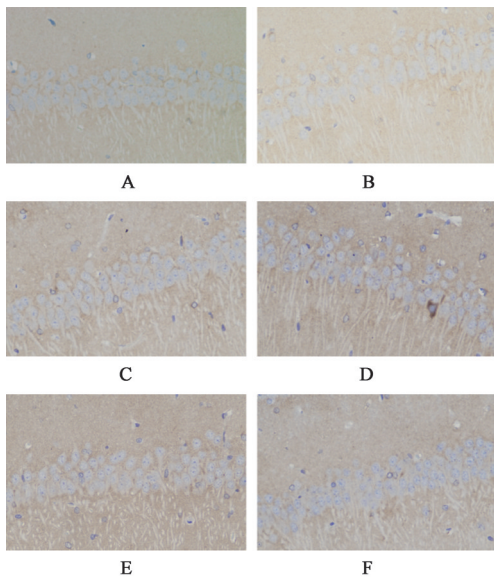


图3 温胆汤对SCZ模型大鼠海马CA1区TrkB蛋白表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of Wendantang on expression of TrkB proteins in hippocampal CA1 region of rats with SCZ model (IHC, ×400)

量效应呈钟型效应。此外, MK-801所诱发的谷氨酸功能低下SCZ大鼠模型, 与中医气滞痰凝型癫狂病的表现十分类似, 故本研究通过对大鼠进行预防性灌胃给药温胆汤21 d, 参考吴金华等^[19]造模方法对大鼠采用一次性腹腔注射MK-801(0.6 mg·kg⁻¹)急性造模, 通过旷场实验观察大鼠的自发活动水平, 研究温胆汤对SCZ模型大鼠的防治作用。旷场实验结果显示, 模型组大鼠的自发活动水平显著增加, 符合上述文献报道, 而经温胆汤干预的大鼠自发活动降低, 说明温胆汤能够逆转由MK-801引起的自发活动增加。

大脑是神经系统的最高级部分, 能够将从外界感知、获取的信息, 进行加工、处理和应用, 如感觉、语言、思维、学习、记忆、情感、行为、社交等多种脑

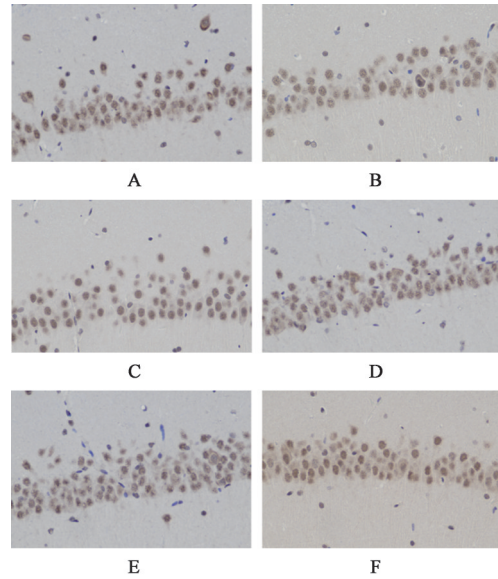


图4 温胆汤对SCZ模型大鼠海马CA1区CREB蛋白表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 4 Effect of Wendantang on expression of CREB proteins in hippocampal CA1 region of rats with SCZ model (IHC, ×400)

表5 温胆汤对SCZ模型大鼠海马组织TrkB和CREB mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Wendantang on expression of TrkB and CREB mRNA in hippocampal of rats with SCZ model ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TrkB	CREB
模型组		0.14±0.03 ²⁾	0.19±0.04 ²⁾
温胆汤高剂量组	40	1.16±0.08 ⁴⁾	1.35±0.57
温胆汤中剂量组	20	0.26±0.05	1.27±0.15 ³⁾
温胆汤低剂量组	10	0.67±0.06 ³⁾	0.55±0.03 ⁴⁾
氯氮平组	0.02	1.10±0.60	0.92±0.08 ⁴⁾

注: 设正常组TrkB和CREB mRNA相对表达量为1

活动, 而这些活动的过程被称为大脑的认知功能^[23]。学习与记忆是认知的基础, 而记忆的形成与海马的结构和功能密切相关。海马属于脑的边缘系统, 是储存记忆的重要结构, 其功能为长时记忆存储和记忆再现。海马主要被分为CA1、CA3和齿状回(DG)3个亚区, 其中CA1区是与记忆和信号传导密切相关的区域。张慧敏等^[24]学者发现, SCZ模型大鼠海马组织严重损伤, 表现为细胞变形或碎裂等神经元变性、坏死现象。

在神经元中, CREB的活性与细胞的增殖分化、存活、长期突触增强、神经发生和神经元可塑性密切相关^[25]。有数据表明, SCZ患者死后大脑中CREB的表达水平显著下降^[26], 此外, DAWSON等^[27]研究者认为, CREB缺失可以导致海马神经元变性, 提示这可能与SCZ等疾病的认知障碍有关。

CREB作为神经保护的调节因子,还能够调控相关促进神经元存活的基因,如BDNF和NMDA受体^[28]。BDNF是一种重要的神经营养蛋白,由动物海马与额叶皮质中的神经元合成,在分化、再生和可塑性机制中起着至关重要的作用,若BDNF信号传导功能受损,将造成神经元生长和突触传递障碍,使大脑认知功能陷入紊乱,从而导致SCZ的发展^[29]。研究发现,BDNF可由NMDA受体激活,并经CREB调节,当NMDA受体被抑制时,BDNF的表达下降,而上调BDNF的表达可以延缓并改善由NMDA受体被抑制所带来的神经元坏死^[30]。NMDA受体是一种由3种亚基构成、位于突触后膜的离子通道蛋白,其中NMDA受体2B(NR2B)与学习记忆密切相关^[31]。RANI等^[32]研究者的实验表明,激活CREB可以上调NR2B的表达。本课题组前期研究已证实,SCZ模型大鼠学习能力下降,并伴有记忆等认知功能障碍,BDNF及NR2B的表达水平均显著下降,而温胆汤能改善模型鼠的学习、记忆等认知功能,上调BDNF和NR2B的表达水平^[13-14]。TrkB作为BDNF最有效的特异性受体之一,与BDNF结合可以促进自身的磷酸化,激活神经细胞内磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)、磷脂酶C- γ (PLC- γ)和丝裂原活化蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶(MAPK/ERK)等3个重要的下游细胞内信号级联,维持神经元细胞存活与神经突生长,调节树突形成及树突棘形态,增强突触可塑性,从而发挥对学习记忆的促进作用^[33-34]。而这些信号通路的转录均受CREB调控,意味着CREB是BDNF/TrkB的上游转录因子^[5]。有文献报道SCZ的认知障碍与CREB/BDNF/TrkB信号通路密切相关,当CREB水平不足会导致BDNF和TrkB的磷酸化降低,影响脂质转移蛋白(LTP)形成;相反,通过增加CREB的表达可以上调BDNF/TrkB信号通路、提高学习记忆并减轻海马神经元的病理损伤,从而改善SCZ模型鼠的认知功能缺陷和突触功能障碍^[35-37]。因此猜测温胆汤干预SCZ的机制可能是通过增加CREB的表达水平,促进TrkB与BDNF结合,并激活下游相关信号级联,加强神经元的修复与再生,保护海马神经元,从而改善SCZ认知障碍。

综上所述,TrkB、CREB表达水平升高可以维持神经元的存活与分化,以及调节突触可塑性,从而改善大脑的认知功能。因此,本研究通过观察温胆汤对模型大鼠自发活动行为变化,海马组织的病理损伤以及TrkB、CREB的表达变化,结果显示,在

21 d温胆汤的预防治疗下,模型大鼠自发活动水平显著降低,海马CA1区神经元细胞排列相对整齐、形态较为规则,胞体破裂和固缩深染等现象较为少见,TrkB、p-TrkB、CREB、p-CREB的相关表达升高。说明对SCZ模型大鼠予以温胆汤可以降低模型大鼠的自发活动水平、改善海马神经元病理损伤、增加TrkB、p-TrkB、CREB、p-CREB的表达,从而有效预防SCZ及其认知障碍的发生、发展。希望本研究可以为临床上使用温胆汤防治SCZ提供相关实验依据,同时也为后续深入研究SCZ的发病机制和防治方法提供新的理论依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] JAUHAR S, JOHNSTONE M, MCKENNA P J. Schizophrenia [J]. *Lancet*, 2022, 399 (10323): 473-486.
- [2] 耿文博,刘少文,张强.精神分裂症患者的认知功能障碍及认知治疗的现状[J]. *国际精神病学杂志*, 2019, 46(3): 392-395.
- [3] 王江波,罗锦秀.精神分裂症认知障碍研究进展[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2019, 27(S1): 243-246.
- [4] MIZUNO M, YAMADA K, OLARIU A, et al. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(18): 7116-7121.
- [5] MOHAMMADI A, AMOOEIAN V G, RASHIDI E. Dysfunction in brain-derived neurotrophic factor signaling pathway and susceptibility to schizophrenia, Parkinson's and Alzheimer's diseases [J]. *Curr Gene Ther*, 2018, 18(1): 45-63.
- [6] 吴丽敏,王辉,王梦瑶,等.基于TrkB-CREB的白术神经保护作用机制研究[J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(10): 2324-2330.
- [7] 郑永丽,王昊亮,李文强,等.舍曲林对缺血性脑卒中后抑郁模型大鼠海马TrkB和CREB表达的影响[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2016, 33(7): 592-595.
- [8] 叶天士. *临证指南医案* [M]. 上海:上海人民出版社, 1959: 566
- [9] 舒莹.《三因极一病证方论》温胆汤之源流考[J]. *中医药通报*, 2004(6): 42-44.
- [10] 杨爽,刘秉忠.刘秉忠论治精神分裂症验案2则[J]. *湖南中医杂志*, 2021, 37(9): 84-86.
- [11] 胡杰红.温胆汤联合氨磺必利治疗难治性精神分裂症临床观察[J]. *实用中医药杂志*, 2021, 37(4): 626-627.
- [12] 张道全,王健,刘瑞玲.温胆汤联合抗精神病药物治

- 疗精神分裂症的疗效与安全性评价[J]. 当代医学, 2020,26(12):88-90.
- [13] 张媛,朱金华,陈静,等. 基于 miRNA-219, NR2B, DISC1, CaMK II γ 探讨温胆汤干预精神分裂症模型大鼠的分子机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(1):33-40.
- [14] 高源,朱金华,张媛,等. 温胆汤对精神分裂症模型大鼠海马组织 BDNF、CaMK II 表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(4):8-12.
- [15] 田真真,徐义勇,朱金华,等. 温胆汤含药血清对 CREB mRNA 沉默海马神经元细胞凋亡及 BDNF/TrkB/CREB 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(22):1-6.
- [16] 徐义勇,朱丽娟,田真真,等. 温胆汤对精神分裂症模型鼠 NRG1-ErbB4 信号通路及海马组织超微结构的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(7):1612-1616, 1805-1806.
- [17] 朱金华,孙昊鑫,熊秋迎,等. 温胆汤对精神分裂症模型鼠血清 TNF- α , IL-6 及海马组织 Glu 活性表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(14):160-164.
- [18] 万红娇,杨翠萍,朱金华,等. 温胆汤对 MK801 诱发精神分裂症模型鼠学习记忆的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(1):83-85.
- [19] 吴金华,邹洪,于军,等. 用不同实验小鼠品系建立精神分裂症的动物模型[J]. 生理学报, 2003, 55(4):381-387.
- [20] ADELL A. Brain NMDA receptors in *Schizophrenia* and depression[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(6):947.
- [21] 徐晓津,房茂胜,缪楹,等. 不同抗精神病药物对 MK-801 诱导精神分裂症大鼠认知功能、学习记忆能力和糖脂代谢的影响[J]. 解放军医药杂志, 2022, 34(4):7-12.
- [22] SIUCIAK J A, MCCARTHY S A, CHAPIN D S, et al. Behavioral and neurochemical characterization of mice deficient in the phosphodiesterase-1B (PDE1B) enzyme [J]. *Neuropharmacology*, 2007, 53(1):113-124.
- [23] 王雪玲,王伊萌,杨佳佳,等. 记忆水平依赖的海马-前额叶神经节律交互[J]. 生物化学与生物物理进展, 2021, 48(8):907-921.
- [24] 张慧敏,姒雨泽,陈艳萍. 合欢花黄酮对精神分裂症大鼠学习记忆能力、海马组织 c-fos 蛋白和基因表达水平的影响分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 18(24):2614-2618.
- [25] LANDEIRA B S, SANTANA T, ARAÚJO J, et al. Activity-independent effects of CREB on neuronal survival and differentiation during mouse cerebral cortex development [J]. *Cereb Cortex*, 2018, 28(2):538-548.
- [26] REN X, RIZAVI H S, KHAN M A, et al. Alteration of cyclic-AMP response element binding protein in the postmortem brain of subjects with bipolar disorder and schizophrenia [J]. *J Affect Disord*, 2014, 152-154:326-333.
- [27] DAWSON N, XIAO X, MCDONALD M, et al. Sustained NMDA receptor hypofunction induces compromised neural systems integration and schizophrenia-like alterations in functional brain networks[J]. *Cereb Cortex*, 2014, 24(2):452-464.
- [28] TIRABOSCHI E, TARDITO D, KASAHARA J, et al. Selective phosphorylation of nuclear CREB by fluoxetine is linked to activation of CaM kinase IV and MAP kinase cascades [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2004, 29(10):1831-1840.
- [29] BEKINSCHTEIN P, CAMMAROTA M, IZQUIERDO I, et al. BDNF and memory formation and storage [J]. *Neuroscientist*, 2008, 14(2):147-156.
- [30] DONG Y, GREEN T, SAAL D, et al. CREB modulates excitability of nucleus accumbens neurons [J]. *Nat Neurosci*, 2006, 9(4):475-477.
- [31] 蒋志浩,陶领钢,李启斌. NMDA 受体与精神分裂症的研究进展 [J]. 北方药学, 2014, 11(10):8, 64.
- [32] RANI C S, QIANG M, TICKU M K. Potential role of cAMP response element-binding protein in ethanol-induced *N*-methyl-*D*-aspartate receptor 2B subunit gene transcription in fetal mouse cortical cells [J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 67(6):2126-2136.
- [33] 田真真,徐义勇,朱金华,等. 基于 BDNF/TrkB/CREB 信号通路探讨温胆汤干预精神分裂症认知障碍 [J]. 江西中医药, 2021, 52(4):33-36.
- [34] YOSHII A, CONSTANTINE-PATON M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease [J]. *Dev Neurobiol*, 2010, 70(5):304-322.
- [35] GUO C, LIU Y, FANG M S, et al. ω -3PUFAs improve cognitive impairments through Ser133 phosphorylation of CREB upregulating BDNF/TrkB signal in schizophrenia [J]. *Neurotherapeutics*, 2020, 17(3):1271-1286.
- [36] FANG M S, LI X, QIAN H, et al. ω -3PUFAs prevent MK-801-induced cognitive impairment in schizophrenic rats via the CREB/BDNF/TrkB pathway [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2017, 37(4):491-495.
- [37] 吴乃斌,李莉,崔璐莎,等. 丙戊酸钠对精神分裂大鼠 CREB/BDNF/TrkB 通路及神经元损伤的影响 [J]. 四川医学, 2021, 42(6):579-584.

[责任编辑 周冰冰]