

# 基于cAMP/PKA/CREB/BDNF信号通路探讨 柴胡加龙骨牡蛎汤抗抑郁的作用机制

赵迪克<sup>1</sup>, 牛君<sup>1</sup>, 杜志欣<sup>1</sup>, 周春雨<sup>1</sup>, 丁申奥<sup>1</sup>, 杜晓丹<sup>1</sup>, 杨丽萍<sup>1\*</sup>, 毛梦迪<sup>2\*</sup>

(1. 河南中医药大学, 郑州 450046; 2. 郑州市二七区疾控中心, 郑州 450052)

**[摘要]** 目的: 该研究基于环磷酸腺苷(cAMP)/蛋白激酶A(PKA)/cAMP反应元件结合蛋白(CREB)/脑源性神经营养因子(BDNF)信号通路探究柴胡加龙骨牡蛎汤对慢性不可预见性温和应激(CUMS)法制备的大鼠抑郁模型的干预作用。方法: 随机数字表法将60只SD大鼠分为正常组、模型组、柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组和氟西汀组。除正常组外, 其他各组进行49 d的CUMS制备大鼠抑郁模型。第29天开始给药, 柴胡加龙骨牡蛎汤组低、中、高剂量组分别给予柴胡龙骨牡蛎汤颗粒剂2.89、5.78、11.56 g·kg<sup>-1</sup>, 氟西汀组给予盐酸氟西汀胶囊2.06 mg·kg<sup>-1</sup>。旷场实验和强迫游泳实验观察大鼠行为学表现, 酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定大鼠海马组织5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)、cAMP水平; 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测大鼠海马组织PKA、CREB、BDNF mRNA表达; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠海马组织PKA、BDNF蛋白表达水平; 免疫组化法(IHC)检测CREB定位表达; 苏木素-伊红(HE)染色和尼氏染色观察海马组织形态学的变化。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠强迫游泳不动时间显著增加( $P<0.01$ ); 运动总距离、中央区停留时间、中央区进入总次数、中央区运动距离均显著降低( $P<0.01$ ), 海马5-HT、NE、cAMP含量显著降低( $P<0.01$ ), PKA蛋白表达、BDNF蛋白表达和mRNA水平、CREB蛋白表达和mRNA水平显著降低( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 柴胡加龙骨牡蛎汤给药组大鼠强迫游泳不动时间均显著降低( $P<0.01$ ), 柴胡加龙骨牡蛎汤给药组大鼠运动总距离、中央区停留时间、中央区运动距离显著、中央区进入次数明显增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 柴胡加龙骨牡蛎汤给药组海马5-HT含量、NE含量、cAMP含量明显增高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 柴胡加龙骨牡蛎汤给药组海马PKA蛋白表达、CREB和BDNF的mRNA及蛋白表达都显著增加( $P<0.01$ )。HE和尼氏染色显示海马神经元结构恢复。结论: 柴胡加龙骨牡蛎汤调节抑郁大鼠海马单胺类神经递质5-HT、NE水平, 激活cAMP/PKA/CREB/BDNF信号通路, 上调BDNF表达, 保护海马神经元的结构和功能, 缓解大鼠焦虑、抑郁情绪。

**[关键词]** 柴胡加龙骨牡蛎汤; 抑郁症; 环磷酸腺苷(cAMP)/蛋白激酶A(PKA)/cAMP反应元件结合蛋白(CREB)/脑源性神经营养因子(BDNF)信号通路

[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)03-0017-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221709

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220831.1507.004.html>

[网络出版日期] 2022-09-01 09:26:34

## Exploration of Antidepressant Mechanism of Chaihu and Longgu Mulitang Based on cAMP/PKA/CREB/BDNF Signaling Pathway

ZHAO Dike<sup>1</sup>, NIU Jun<sup>1</sup>, DU Zhixin<sup>1</sup>, ZHOU Chunyu<sup>1</sup>, DING Shenao<sup>1</sup>,  
DU Xiaodan<sup>1</sup>, YANG Liping<sup>1\*</sup>, MAO Mengdi<sup>2\*</sup>

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

2. Zhengzhou Erqi District Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450052, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the intervention effect of Chaihu and Longgu Mulitang (CLMT) on

[收稿日期] 2022-06-29

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81973596); 河南中医药大学博士基金项目(00104311)

[第一作者] 赵迪克, 博士, 讲师, 从事中医药名家经方药效研究, E-mail: zhaodico@hactcm.edu.cn

[通信作者] \* 杨丽萍, 博士, 教授, 从事中西医结合治疗抑郁症研究, E-mail: biolyip@126.com;

\* 毛梦迪, 硕士, 从事中西医结合治疗抑郁症研究, E-mail: 1731532135@qq.com

rat depression model prepared by chronic unpredictable mild stress (CUMS) based on cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA)/cAMP-response element-binding protein (CREB)-brain-derived neurotrophic factor (BDNF) signaling pathway. **Method:** Sixty SD rats were divided into normal group, model group, and CLMT low-, medium- and high-dose groups and fluoxetine group (positive control) according to random number table. They, except the normal group, were treated with CUMS for 49 days to prepare the rat depression model. The CLMT low-, medium- and high-dose groups were given 2.89, 5.78 11.56 g·kg<sup>-1</sup> of CHMD granules, respectively, and the fluoxetine group was given 2.06 mg·kg<sup>-1</sup> of fluoxetine hydrochloride on the 29<sup>th</sup> day. The normal group and the model group received equal volume of normal saline for 21 days. The behavioral performance of rats were observed by open field test and forced swim test. The levels of 5-hydroxytryptamine (5-HT), norepinephrine (NE) and cAMP in rat hippocampus were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expressions of PKA, CREB, and BDNF in rat hippocampus were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and the protein expressions of PKA and BDNF were detected by Western blot. Immunohistochemistry was used to determine the expression of CREB, and hematoxylin and eosin (HE) staining and Nissl staining were used to observe the morphological changes of hippocampus. **Result:** Compared with the conditions in the normal group, the immobility time of the model group in the forced swim test was increased ( $P<0.01$ ) and the total movement distance, residence time in central area, number of entries in central area and movement distance in central area were decreased ( $P<0.01$ ). Additionally, the contents of 5-HT, NE and cAMP in hippocampus of the model group as well as the protein expressions of PKA, BDNF and CRE, the mRNA expressions of BDNF and CREB were lower than those in the normal group ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the CLMT groups had reduced immobility time ( $P<0.01$ ), elevated total movement distance, residence time in central area, number of entries in central area and movement distance in central area ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), up-regulated contents of 5-HT, NE and cAMP in hippocampus ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and up-regulated protein expressions of PKA, BDNF and CREB and mRNA expressions of BDNF and CREB ( $P<0.01$ ). HE staining and Nissl staining showed that CLMT significantly improved the neuronal structure in rat hippocampus. **Conclusion:** CLMT alleviates the anxiety and depression of rats. These effects may be mediated by regulating monoamine neurotransmitters 5-HT and NE in hippocampus of depressed rats, activating cAMP/PKA/CREB/BDNF signaling pathway, up-regulating the expression of BDNF and protecting hippocampal structure and function.

**[Keywords]** Chaihu and Longgu Mulitang; depression; cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA)/cAMP-response element-binding protein (CREB)/brain-derived neurotrophic factor (BDNF) signaling pathway

抑郁症又称抑郁障碍,是一种常见的以显著而持久的心境低落为主要特征的精神障碍性疾病。抑郁症患者常出现情绪低落、躯体障碍、睡眠障碍、认知和思维迟缓、意志减退、快感缺失及自杀倾向和行为等症状<sup>[1]</sup>。抑郁症有诊断率低,发病率、复发率、死亡率、自杀率、致残率高,疾病负担重等特点<sup>[2-3]</sup>。目前,抑郁症发病原因尚不明确,抑郁症的发病机制有多种假说,如神经递质假说、表观遗传学假说、神经营养因子假说、神经适应性与可塑性假说、氧化应激假说、炎症假说、肠道菌群假说等<sup>[4-5]</sup>。脑源性神经营养因子(BDNF)作为一种重要的神经营养因子,广泛存在于中枢神经系统,参与

神经元功能的维持、发育及神经元损伤后的修复<sup>[6]</sup>。BDNF水平与抑郁的发病密切相关。目前治疗抑郁症的西药种类繁多,不同的药物针对不同发病机制通过不同途径起效<sup>[7-8]</sup>。但西药治疗抑郁症,存在一定的局限性,如起效慢、不良反应多、患者服药依从性差等<sup>[9]</sup>。中医药多途径、多靶点起效,在治疗抑郁症方面具有丰富的临床实践经验和凸显的优势<sup>[10]</sup>。柴胡加龙骨牡蛎汤出自张仲景《伤寒论》:“伤寒八九日,下之,胸满烦惊,小便不利,谵语,一身尽重,不可转侧者,柴胡加龙骨牡蛎汤主之。”文献报道,柴胡加龙骨牡蛎汤有和解少阳、镇惊安神之功,可用来治疗抑郁症<sup>[11]</sup>。该方是经方中治疗抑郁症的

经典名方,抗抑郁效果显著,研究其抗抑郁的作用机制,对推广和临床应用柴胡加龙骨牡蛎汤,发挥中医药治疗抑郁症的独特优势有重要意义。

本实验选用柴胡加龙骨牡蛎汤干预慢性不可预见性温和应激(CUMS)建立的抑郁模型,旷场实验和强迫游泳实验观察大鼠行为学的变化;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)、环磷酸腺苷(cAMP)水平;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测蛋白激酶A(PKA)、cAMP反应元件结合蛋白(CREB)、BDNF mRNA的表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测PKA、BDNF蛋白的表达;免疫组化法(IHC)检测大鼠海马CREB定位表达;苏木素-伊红(HE)染色和尼氏染色观察海马组织形态学的变化。本研究探讨柴胡加龙骨牡蛎汤方通过上调单胺类神经递质5-HT、NE水平,激活cAMP/PKA/CREB/BDNF信号通路发挥对抑郁大鼠海马神经元结构和功能的保护作用。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级雄性SD大鼠60只,体质量180~210 g,6~8周龄,于郑州惠济区华兴实验动物养殖场购买,动物质量合格证编号410981211100019345,实验单位使用许可证号SYXK(豫)2020-0004。本次实验研究经河南中医药大学实验动物伦理委员会审批,实验动物伦理审查批准编号DWLL202107001。动物饲料由北京科澳协力饲料有限公司提供,合格证号SCXK(京)2019-0003。

**1.2 药物与试剂** 生姜(批号21011381)、桂枝(批号21010531)、柴胡(批号20122261)、黄芩(批号20111011)、人参(批号21021121)、茯苓(批号21040461)、清半夏(批号20100311)、牡蛎(批号21030071)、龙骨(批号21030641)、大黄(批号20120701),以上均为江阴天江药业有限公司生产的中药颗粒剂,柴胡加龙骨牡蛎汤生药量为生姜4.5 g、桂枝4.5 g、柴胡12 g、黄芩4.5 g、人参4.5 g、茯苓4.5 g、清半夏6 g、牡蛎4.5 g、龙骨4.5 g、大黄6 g,每千克大鼠折算后的用药剂量设置为中剂量组,剂量为 $5.78 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,低剂量组为 $2.89 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,高剂量组为 $11.56 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;盐酸氟西汀胶囊(上海上药中西制药有限公司,批号210160);4%多聚甲醛(Biosharp公司,批号BL539A);大鼠cAMP、5-HT、NE ELISA试剂盒(江苏酶免实业有限公司,批号分别为MM-0549R1、MM-0442R1、220302R); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗

兔、HRP标记山羊抗鼠、BDNF一抗、PKA一抗、正常兔血清、CREB一抗、HE染液套装、甲苯胺蓝染液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为GB15003、GB23303、GB23301、GB11559、GB11598、G1209、GB11539、G1003、G1032);中性树胶、二甲苯(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为10004160、10023418)。PCR引物由武汉赛维尔生物科技有限公司设计合成,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游 GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	
PKA	上游 CCGAACTTGGACCTGTGTGG	189
	下游 CGCACCTTCCCAGAGACGATT	
BDNF	上游 GTGTGACAGTATTAGCGAGTGGG	221
	下游 ACGATTGGGTAGTTCCGGCATT	
CREB	上游 CATTGCCCTGGAGTTGTTAT	113
	下游 CTCTTGCTGCTCCCTGTTCTT	

**1.3 仪器** JT502N型电子天平(上海精天电子仪器有限公司);SA215型旷场装置(江苏赛昂斯生物科技有限公司);D3024R型离心机(DragonLab公司);RM2016型病理切片机(上海徠卡仪器有限公司);Nikon Eclipse E100型正置光学显微镜(日本尼康公司);JT-12J型脱水机(武汉俊杰电子有限公司);RT-6100型酶标仪(Rayto公司);CFX型Real-time PCR仪(美国Bio-Rad公司);BV-2型垂直电泳仪、BT-2型转印电泳仪(武汉赛维尔生物科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 实验分组、造模与给药** 60只SPF级SD雄性大鼠饲养于有通风系统、12 h光照/黑暗循环、室温为20~26℃的动物房内。适应性喂养1周,随机数字表法将60只大鼠分为正常组、模型组、柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组(中药低、中、高剂量组)、氟西汀组,每组10只。除正常组外,其他各组大鼠采用CUMS法制备抑郁模型<sup>[12]</sup>。本次实验采用的CUMS刺激方法有禁水(24 h)、夹尾(距尾根1 cm, 3 min)、冷水游泳(4℃, 5 min)、束缚(3 h)、热刺激(45℃,持续5 min)、禁食(24 h)、昼夜颠倒(白天给予黑暗环境,夜晚给予光照)、潮湿垫料(24 h)等。除正常组外,其他5组每天随机选择2种不同刺激方法,相邻2 d刺激方法不重复使用,刺激49 d。实

验步骤均遵循有关实验动物伦理委员会的规定进行规范操作。第29天开始给药。采取灌胃给药的方法,给药剂量按照动物与人体每千克体质量剂量折算系数计算得出。柴胡加龙骨牡蛎汤组低、中、高剂量组分别给予柴胡龙骨牡蛎汤颗粒剂2.89、5.78、11.56 g·kg<sup>-1</sup>,阳性药组给予盐酸氟西汀2.06 mg·kg<sup>-1</sup>,正常组和模型组给予等体积的生理盐水,灌胃均为每天1次<sup>[13]</sup>。

## 2.2 行为学检测

**2.2.1 强迫游泳实验** 在安静的环境中,将大鼠置于直径40 cm、高62 cm的圆形盛水水桶中,水深约为30 cm,水温22~25℃,使大鼠头部露出水面时后肢无法触及水桶底部。计时6 min,观察并记录大鼠在后4 min内的不动时间。在实验期间及时清理大鼠粪便并更换水。

**2.2.2 旷场实验** 在安静的环境中,将大鼠放入长、宽各100 cm,高为40 cm的黑色立方体敞箱中。将敞箱底部划分为25个大小相等正方形格子,以中间的9个格子为中央区,以周围的16个格子为周围区。轻轻将大鼠放入最中间的格子,观察记录大鼠5 min中爬行的情况。

**2.3 取材与制备** 以3%戊巴比妥钠麻醉大鼠,给药剂量为1 mg·kg<sup>-1</sup>,每组6只大鼠冰上取全脑,左右脑分开,分离海马,将海马放入离心管,置于液氮转至-80℃冰箱保存,进行分子生物学检测;每组其余大鼠冰上取全脑后将全脑置于4%多聚甲醛溶液中固定,脱水,浸蜡,包埋,用于形态学观察。

**2.4 ELISA测定各组大鼠海马组织5-HT、NE、cAMP水平** 取适量冻存的海马组织加PBS(pH7.4)匀浆,4℃、3 000 r·min<sup>-1</sup>离心20 min(离心半径8.5 cm,下同),取上清。严格按照ELISA试剂盒说明书进行操作。提前30 min将试剂盒内所有试剂置于室温环境。

**2.5 Real-time PCR检测各组大鼠海马组织PKA、CREB、BDNF mRNA表达** 提取海马总RNA,反转录成cDNA,之后进行Real-time PCR检测。PCR扩增反应条件为95℃预变性10 min;95℃变性15 s,40个循环;60℃退火/延伸60 s,2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>计算方法进行数据处理分析。

**2.6 Western blot检测海马组织PKA、BDNF蛋白表达水平** 将海马剪碎,加裂解液(10倍组织体积)、PMSF、以及钢珠,进行匀浆。之后放于冰上充分裂解。4℃、12 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,取上清。加样电泳,转膜封闭,加一抗(TBST稀释一抗,PKA

1:1 000;BDNF 1:1 000;β-actin 1:3 000),4℃孵育过夜。洗膜,加HRP标记的二抗(1:5 000),孵育30 min,洗膜。进行显影和定影,图像分析。

**2.7 IHC测CREB定位表达** 石蜡切片脱蜡至水,抗原修复,滴加3%BSA,封闭加一抗CREB兔多克隆抗体(1:100),孵育过夜,加HRP标记的山羊抗兔二抗(1:200),孵育,DAB显色,复染,脱水封片,显微镜下观察,进行图像采集分析。

**2.8 HE染色观察脑组织海马CA1区病理变化** 将脑组织进行冠状切片,之后脱蜡至水,苏木素染色,伊红染色,脱水封片,400倍光镜下观察。

**2.9 尼氏染色观察脑组织海马CA1区神经元变化** 石蜡切片脱蜡至水,尼氏染色,透明封片,400倍光镜下观察。

**2.10 统计学分析** 采用SPSS 25.0统计学软件处理实验结果,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,符合正态分布的计量资料采用单因素方差分析(one-way ANOVA),符合方差齐性的数据组间两两比较选择最小显著性差异法(LSD)检验,不符合方差齐性的选择Dunnett's T3检验。不符合正态分布的计量资料采用Kruskal-Wallis秩和检验,以 $\alpha=0.05$ 作为检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 大鼠一般状况** 实验过程中,共死亡2只大鼠,模型组大鼠死亡1只,高剂量组大鼠死亡1只。实验结束时,正常组大鼠饮食、饮水正常,反应灵敏,活动自如,与其他组大鼠比较,体型偏胖。模型组大鼠饮食、饮水减少,精神状态较差,与其它各组大鼠比较,体型瘦弱。柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组和氟西汀组在药物干预后,与模型组比较,饮食、饮水、精神状态、体质量等均有好转。后续结果中动物均使用8只做统计学分析。

### 3.2 柴胡加龙骨牡蛎汤对大鼠行为学的影响

**3.2.1 对抑郁大鼠强迫游泳实验中不动时间的影响** 造模28 d后,与正常组比较,各造模组(模型组,中药低、中、高剂量组和氟西汀组)大鼠强迫游泳不动时间均显著增加( $P<0.01$ );给药21 d后,与模型组比较,中药中、高剂量组和氟西汀组大鼠强迫游泳不动时间均显著降低( $P<0.01$ )。见表2。

**3.2.2 对造模28 d后和给药21 d后抑郁大鼠旷场实验结果的影响** 造模28 d后,与正常组比较,各造模组大鼠运动总距离、中央区停留时间、中央区进入总次数、中央区运动距离均显著降低( $P<0.01$ )。见表3。给药21 d后,与模型组比较,中药中、高剂

表2 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠强迫游泳实验中不动时间的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 2 Effect of Chaihu and Longgu Mulitang on immobility time in forced swimming experiment of depressed rats ( $\bar{x}\pm s, n=8$ ) s

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	造模 28 d	给药 21 d
正常组		42.70±4.70	39.46±2.81
模型组		77.00±9.81 <sup>2)</sup>	105.19±4.45 <sup>2)</sup>
中药低剂量组	2.89	72.24±10.42 <sup>2)</sup>	69.84±9.55
中药中剂量组	5.78	78.98±4.35 <sup>2)</sup>	45.95±4.08 <sup>4)</sup>
中药高剂量组	11.56	81.50±6.59 <sup>2)</sup>	54.59±2.30 <sup>4)</sup>
氟西汀组	0.002 06	82.71±4.88 <sup>2)</sup>	49.68±4.14 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表3-表8同)

量组和氟西汀组大鼠运动总距离显著增加( $P<0.01$ ),中药中、高剂量组和氟西汀组大鼠中央区停留时间明显增加( $P<0.05, P<0.01$ ),中药中、高剂量组和氟西汀组大鼠中央区运动距离明显增加( $P<0.05, P<0.01$ ),中药低、中、高剂量组和氟西汀组大鼠中央区进入次数明显增加( $P<0.05, P<0.01$ )。见表4。

**3.3 对抑郁大鼠海马5-HT、NE、cAMP含量的影响**  
与正常组比较,模型组大鼠海马5-HT含量显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,中药低、中、高剂量组和

氟西汀组大鼠海马5-HT含量显著增高( $P<0.01$ )。与正常组比较,模型组大鼠海马NE含量显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,中药中剂量组和氟西汀组大鼠海马NE含量明显增高( $P<0.05$ )。与正常组比较,模型组大鼠海马cAMP含量显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,中药低剂量组和氟西汀组大鼠海马cAMP含量显著增高( $P<0.01$ )。见表5。

**3.4 对抑郁大鼠海马PKA、CREB、BDNF mRNA表达的影响**  
与正常组比较,模型组大鼠海马PKA mRNA表达呈降低趋势,但差异无统计学意义;与模型组比较,中药中、高剂量组和氟西汀组大鼠海马PKA mRNA呈升高趋势,但差异无统计学意义。与正常组比较,模型组大鼠海马CREB mRNA显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,中药低、中、高剂量组和氟西汀组大鼠海马CERB mRNA显著增加( $P<0.01$ )。与正常组比较,模型组大鼠海马BDNF mRNA显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,中药低、中、高剂量组和氟西汀组大鼠海马BDNF mRNA显著增加( $P<0.01$ )。见表6。

**3.5 对抑郁大鼠海马PKA、BDNF蛋白表达的影响**  
与正常组比较,模型组大鼠海马PKA蛋白表达显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,中药中、高剂量组和氟西汀组大鼠海马PKA蛋白表达显著增加( $P<$

表3 柴胡加龙骨牡蛎汤对造模28 d后抑郁大鼠旷场实验结果的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 3 Effect of Chaihu and Longgu Mulitang on open field experiment results of depressed rats in 28 days after modeling ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	造模 28 d			
		运动总距离/m	中央区停留时间/s	中央区运动距离/m	中央区进入数/次
正常组		22.19±0.88	55.59±3.05	6.50±0.40	19.88±1.49
模型组		8.56±1.49 <sup>2)</sup>	8.44±2.73 <sup>2)</sup>	1.01±0.25 <sup>2)</sup>	4.38±1.19 <sup>2)</sup>
中药低剂量组	2.89	11.98±1.81 <sup>2)</sup>	6.21±1.04 <sup>2)</sup>	0.91±0.17 <sup>2)</sup>	2.75±0.49 <sup>2)</sup>
中药中剂量组	5.78	13.07±1.62 <sup>2)</sup>	6.08±1.74 <sup>2)</sup>	1.06±0.33 <sup>2)</sup>	4.13±0.83 <sup>2)</sup>
中药高剂量组	11.56	13.38±3.42 <sup>2)</sup>	11.04±1.63 <sup>2)</sup>	1.69±0.39 <sup>2)</sup>	7.13±1.14 <sup>2)</sup>
氟西汀组	0.002 06	10.42±1.54 <sup>2)</sup>	12.24±3.67 <sup>2)</sup>	1.15±0.32 <sup>2)</sup>	4.50±1.25 <sup>2)</sup>

表4 柴胡加龙骨牡蛎汤对给药21 d后抑郁大鼠旷场实验结果的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 4 Effect of Chaihu and Longgu Mulitang on open field test results of depressed rats in 21 days after administration ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	给药 21 d			
		运动总距离/m	中央区停留时间/s	中央区运动距离/m	中央区进入数/次
正常组		27.35±1.00	48.46±2.97	6.93±0.46	17.75±1.42
模型组		12.22±1.79 <sup>2)</sup>	5.76±2.03 <sup>2)</sup>	0.55±0.22 <sup>2)</sup>	4.00±1.24 <sup>2)</sup>
中药低剂量组	2.89	16.68±2.21	23.75±3.46	2.40±0.50	9.88±1.01 <sup>3)</sup>
中药中剂量组	5.78	23.30±1.67 <sup>4)</sup>	37.16±3.38 <sup>3)</sup>	4.84±0.37 <sup>4)</sup>	13.38±0.63 <sup>4)</sup>
中药高剂量组	11.56	26.40±2.35 <sup>4)</sup>	36.34±1.54 <sup>3)</sup>	5.08±0.99 <sup>3)</sup>	16.25±2.01 <sup>4)</sup>
氟西汀组	0.002 06	20.76±1.37 <sup>4)</sup>	40.95±3.50 <sup>4)</sup>	4.36±0.62 <sup>3)</sup>	12.25±0.45 <sup>4)</sup>

表5 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠海马5-HT、NE、cAMP含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 5 Effect of Chaihu and Longgu Mulitang on contents of 5-HT, NE and cAMP in hippocampus of depressed rats ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	5-HT /μg·L <sup>-1</sup>	NE /μg·L <sup>-1</sup>	cAMP /nmol·L <sup>-1</sup>
正常组		14.99±1.45	5.25±0.35	11.27±0.57
模型组		7.26±0.55 <sup>2)</sup>	2.87±0.37 <sup>2)</sup>	8.37±0.28 <sup>2)</sup>
中药低剂量组	2.89	12.89±1.54 <sup>4)</sup>	2.59±0.27	9.88±0.19 <sup>4)</sup>
中药中剂量组	5.78	13.93±1.08 <sup>4)</sup>	4.08±0.19 <sup>3)</sup>	9.33±0.25
中药高剂量组	11.56	12.37±0.94 <sup>4)</sup>	3.91±0.56	8.48±0.42
氟西汀组	0.002 06	14.17±0.76 <sup>4)</sup>	4.14±0.37 <sup>3)</sup>	10.94±0.30 <sup>4)</sup>

表6 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠海马PKA、CERB、BDNF mRNA表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of Chaihu and Longgu Mulitang on mRNA expression of PKA, CERB and BDNF in depressed rat hippocampus ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	PKA	CREB	BDNF
正常组		1.08±0.11	0.96±0.02	1.04±0.02
模型组		0.87±0.02	0.65±0.04 <sup>2)</sup>	0.70±0.02 <sup>2)</sup>
中药低剂量组	2.89	0.80±0.10	0.98±0.05 <sup>4)</sup>	0.81±0.03 <sup>4)</sup>
中药中剂量组	5.78	0.96±0.07	1.00±0.02 <sup>4)</sup>	0.93±0.04 <sup>4)</sup>
中药高剂量组	11.56	1.11±0.05	0.96±0.15 <sup>4)</sup>	0.83±0.02 <sup>4)</sup>
氟西汀组	0.002 06	1.02±0.16	1.19±0.05 <sup>4)</sup>	0.89±0.01 <sup>4)</sup>

0.01)。与正常组比较,模型组大鼠海马BDNF蛋白表达显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,中药低、中、高剂量组和氟西汀组大鼠海马BDNF蛋白表达显著增加( $P<0.01$ )。见表7、图1、图2。

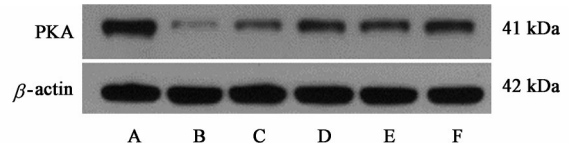
表7 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠海马PKA、BDNF蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 7 Effect of Chaihu and Longgu Mulitang on PKA and BDNF protein expression in depressed rat hippocampus ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	PKA/β-actin	BDNF/β-actin
正常组		1.09±0.01	1.09±0.03
模型组		0.27±0.06 <sup>2)</sup>	0.32±0.06 <sup>2)</sup>
中药低剂量组	2.89	0.43±0.04	0.66±0.03 <sup>4)</sup>
中药中剂量组	5.78	0.86±0.13 <sup>4)</sup>	0.77±0.05 <sup>4)</sup>
中药高剂量组	11.56	0.73±0.07 <sup>4)</sup>	0.52±0.02 <sup>4)</sup>
氟西汀组	0.002 06	1.05±0.14 <sup>4)</sup>	1.03±0.03 <sup>4)</sup>

### 3.6 对抑郁大鼠海马CREB蛋白定位表达的影响

镜下可见CREB阳性表达呈棕黄色或棕褐色,主要表达在海马区神经元细胞核。与正常组比较,模型组大鼠海马区CREB蛋白平均积分吸光度显著降



注:A.正常组;B.模型组;C.中药低剂量组;D.中药中剂量组;E.中药高剂量组;F.氟西汀组(图2-图5同)

图1 各组大鼠海马PKA蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of PKA protein expression in hippocampus of rats in each group

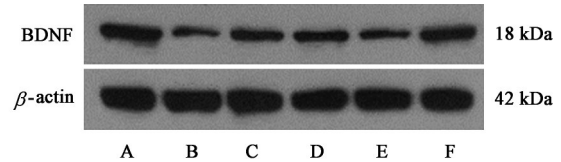


图2 各组大鼠海马BDNF蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of BDNF protein expression in hippocampus of rats in each group

低( $P<0.01$ );与模型组比较,中药低、中、高剂量组和氟西汀组大鼠海马CREB蛋白平均积分吸光度显著增加( $P<0.01$ )。见表8、图3。

表8 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠海马CREB蛋白平均积分吸光度值的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 8 Effect of Chaihu and Longgu Mulitang on average optical density of CREB protein in hippocampus of depressed rats ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	CREB平均积分吸光度
正常组		0.52±0.02
模型组		0.15±0.02 <sup>2)</sup>
中药低剂量组	2.89	0.32±0.05 <sup>4)</sup>
中药中剂量组	5.78	0.44±0.02 <sup>4)</sup>
中药高剂量组	11.56	0.44±0.01 <sup>4)</sup>
氟西汀组	0.002 06	0.45±0.03 <sup>4)</sup>

### 3.7 对抑郁大鼠海马HE染色的影响

HE染色结果显示,正常组大鼠海马CA1区神经元细胞排列整齐、致密,结构完整,细胞形态规则,胞间分布均匀,核仁染色清晰;与正常组比较,模型组大鼠海马CA1区神经元坏死多,排列疏松、混乱,神经元细胞结构异常,出现细胞萎缩或肿胀的现象,细胞核固缩、溶解或碎裂;给药后,与模型组比较,中药中、高剂量组和氟西汀组神经元数量增加,细胞核固缩、溶解或碎裂的现象减少,细胞排列趋于规则,分布均匀。见图4。

### 3.8 对抑郁大鼠海马尼氏染色的影响

尼氏染色结果显示,正常组大鼠海马CA1区神经元细胞排列整齐,细胞大小均匀、结构完整,胞核饱满,核膜清

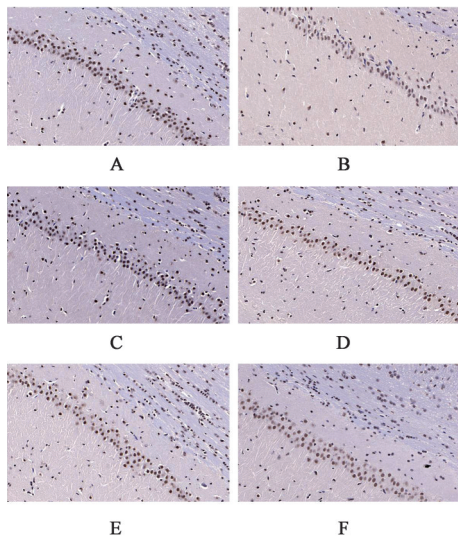


图3 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠海马区 CREB 定位表达的影响 (IHC, ×400)

Fig. 3 Effect of Chaihu and Longgu Mulitang on localization and expression of CREB in depressed rat hippocampus (IHC, ×400)

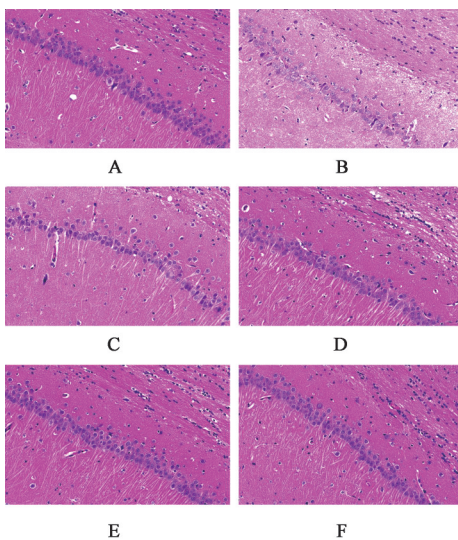


图4 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠海马 CA1 区病理变化的影响 (HE, ×400)

Fig. 4 Effect of Chaihu and Longgu Mulitang on pathological changes of hippocampal CA1 area of depressed rats (HE, ×400)

晰明显,胞质内有丰富的尼氏小体;与正常组比较,模型组大鼠海马 CA1 区神经元数量减少,细胞排列疏松、紊乱,神经元胞体肿胀,胞质内尼氏小体减少,有核固缩、溶解、碎裂现象;中药中、高剂量组和氟西汀组大鼠海马 CA1 区神经元数量均有所增加,核固缩、溶解、碎裂现象减少,胞质内可见尼氏小体。见图 5。

#### 4 讨论

柴胡加龙骨牡蛎汤记载于张仲景《伤寒论》,是和解少阳的经典柴胡剂,有疏肝理气、通阳泄热、畅

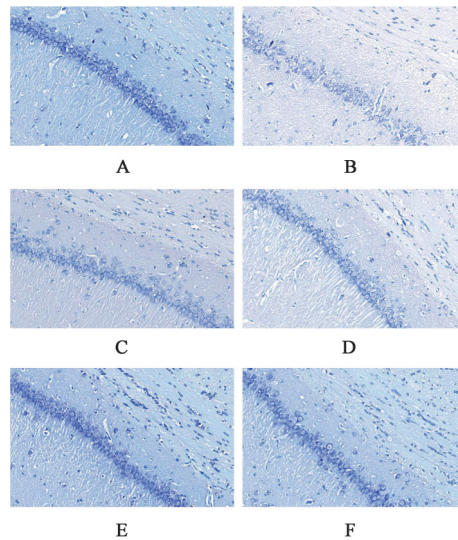


图5 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠海马 CA1 区尼氏染色结果的影响 (尼氏, ×400)

Fig. 5 Effect of Chaihu and Longgu Mulitang on Nissl staining results of hippocampal CA1 area of depressed rats (Nissner, ×400)

达三焦、活血化瘀、化痰解郁、调和气血、镇惊安神之功,是从肝论治抑郁症的良方。柴胡疏肝解郁,和解表里,升阳举陷,退热截疟;桂枝味温通经脉,发汗解肌,助阳化气;黄芩清热燥湿,泻火解毒;半夏燥湿化痰;茯苓利水渗湿健脾;人参补气健脾益肺,生津止渴,安神增智,扶正祛邪;大黄泻热通便,凉血解毒,破血逐瘀;龙骨和牡蛎平肝潜阳,固涩收敛,软坚散结;生姜解表散寒、温中止呕、化痰止咳和胃,调和诸药。现代实验研究表明,柴胡加龙骨牡蛎汤调节下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA) 轴、单胺类神经递质等发挥抗抑郁作用<sup>[14-15]</sup>。

本研究选择 CUMS 抑郁模型,来模拟人类在慢性、低水平、轻度源应激下所导致的抑郁状态,通过在一段时间内给予动物长期、随机、不可预知的温和刺激,诱导动物产生抑郁样行为。旷场实验和强迫游泳实验评估动物的焦虑情绪、紧张情绪、绝望情绪和运动功能<sup>[16-17]</sup>。旷场实验结果显示,模型组大鼠运动总距离、中央区停留时间、中央区进入次数、中央区运动距离减少。强迫游泳实验结果显示,模型组大鼠强迫游泳实验中的不动时间增加,与文献报道一致<sup>[18]</sup>,提示造模成功。给药后,柴胡加龙骨牡蛎汤中、高剂量组大鼠强迫游泳实验中的不动时间减少,柴胡加龙骨牡蛎汤中、高剂量组大鼠的运动总距离、中央区停留时间显著和中央区运动距离都显著增加,柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组大鼠的中央区进入次数显著增加,差异有统计学意义。旷场实验和强迫游泳实验结果提示柴胡

加龙骨牡蛎汤可改善抑郁大鼠探索新环境的能力和在新环境中的活动情况,改善抑郁大鼠的焦虑、紧张、绝望情绪。

神经递质假说是抑郁症发病机制的经典假说。研究较多的有单胺类神经递质5-HT、NE等。5-HT是广泛存在于哺乳动物组织中的一种吲哚衍生物,是抑制性神经递质和血管活性物质,在大脑皮层和神经突触内高表达,在调节情绪状态、学习记忆、活动节律等方面发挥重要作用<sup>[19]</sup>。5-HT通过激活其受体进而调节相关信号通路,发挥生理功能。研究显示,抑郁症患者中枢神经系统5-HT水平降低<sup>[20]</sup>。NE由肾上腺素去掉N甲基形成,在神经末梢突触间发挥作用,影响神经可塑性,调节机体认知、情绪、疼痛等生理功能。抑郁症患者脑内NE水平降低,导致NE系统功能障碍,导致患者的记忆认知功能受损,产生抑郁、焦虑情绪<sup>[21]</sup>。本研究发现,与正常组比较,模型组大鼠海马5-HT和NE水平显著降低,差异有统计学意义,与文献报道一致<sup>[22]</sup>,提示抑郁会造成海马单胺类神经递质5-HT、NE水平降低。与模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组大鼠海马5-HT含量显著增高,柴胡加龙骨牡蛎汤中剂量组大鼠海马NE含量显著增高。提示柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠海马5-HT、NE有调节作用。

cAMP信号传导途径参与了神经干细胞的神经发生、记忆和学习能力,据报道,cAMP/PKA/CREB/BDNF信号通路与抑郁症关系密切<sup>[23-24]</sup>。cAMP被称为环磷酸腺苷,由腺苷酸环化酶(AC)催化三磷酸腺苷(ATP)脱去一个焦磷酸形成,被称为生命信息传递的“第二信使”,参与神经节突触传递、细胞内的物质代谢调节和生物学反应。在cAMP/PKA/CREB/BDNF信号通路中,细胞膜上G蛋白耦联受体与单胺类神经递质结合后通过AC激活cAMP,后者激活PKA,PKA的催化亚基解离,进入细胞核后磷酸化CREB,启动靶基因转录<sup>[25]</sup>。据报道,CREB在神经生长、神经发育、细胞修复、突触可塑性、记忆功能中发挥重要作用。CREB参与细胞信号传导,与神经元生长、发育相关,在神经元损伤中起神经保护作用<sup>[26-27]</sup>。BDNF是一种有神经营养作用的蛋白质,是碱性蛋白质。作为神经营养因子家族中的重要成员,BDNF在中枢神经系统中广泛表达,其中BDNF在海马和皮质中大量表达<sup>[28]</sup>。BDNF可维持情绪和认知功能,参与各种学习和记忆功能,促进神经元生长、存活、发育,减轻中枢神经系统神经元的损伤,增加突触可塑性<sup>[29]</sup>。BDNF是CREB

的下游靶点<sup>[30]</sup>。CREB接受BDNF的调控,CREB和BDNF表达水平有相关性<sup>[31]</sup>。研究表明,抑郁大鼠海马内cAMP、PKA、CREB、BDNF表达降低<sup>[32-33]</sup>。本研究结果显示,与正常组比较,模型组大鼠海马cAMP水平,PKA蛋白水平,CREB mRNA和蛋白水平,BDNF mRNA和蛋白水平均显著降低,差异有统计学意义。提示抑郁发生会降低cAMP、PKA、CREB、BDNF等表达,cAMP/PKA/CREB/BDNF信号通路下调是抑郁症的发病机制之一。柴胡加龙骨牡蛎汤干预后,柴胡加龙骨牡蛎汤低剂量组cAMP水平升高,柴胡加龙骨牡蛎汤中、高剂量组PKA蛋白表达升高,柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组大鼠海马CREB mRNA和蛋白、BDNF mRNA和蛋白表达显著增加。实验结果提示柴胡加龙骨牡蛎汤提高海马cAMP、PKA、CREB、BDNF的表达,激活cAMP/PKA/CREB/BDNF信号通路改善抑郁症。HE染色发现,模型组大鼠海马CA1区神经元坏死,出现细胞萎缩或肿胀的现象。给药后神经元数量增多,细胞排列趋于规则。尼氏染色结果显示模型组大鼠海马CA1区神经元数量减少,神经元胞体肿胀,胞质内尼氏小体减少,柴胡加龙骨牡蛎汤干预后,CA1区神经元数量增加,核固缩、溶解、碎裂现象减少。结果提示CUMS造模会造成海马损伤,柴胡加龙骨牡蛎汤可减轻抑郁大鼠海马的损伤。结果显示柴胡加龙骨牡蛎汤与阳性药药氟西汀效果相当,提示该方治疗效果显著,中药治疗辨证施治,注重整体观,在临床药效上副作用小,该实验结果提示中药治疗抑郁症有一定优势。

综上所述,柴胡加龙骨牡蛎汤给药后,提高了抑郁大鼠单胺类海马神经递质5-HT、NE的表达,上调cAMP/PKA/CREB/BDNF信号通路,减轻了海马损伤,改善了抑郁症。可进一步通过细胞实验以及增加靶点抑制剂组作为对照组来验证中药作用于该靶点的分子机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] DAI L, WANG P, DU H, et al. High-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) accelerates onset time of beneficial treating effects and improves clinical symptoms of depression [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2021, doi: 10.2174/1871527320666211104123343.
- [2] VAN BEEK T A, MONTORO P. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts,

- and phytopharmaceuticals [J]. *J Chromatography A*, 2009, 1216(11):2002-2032.
- [ 3 ] 李明泽,童毅,周志焕. 黄连抗抑郁症的应用和研究进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2019, 28(24):2733-2736.
- [ 4 ] 付亚轩,孟宪钰,李明超,等. 天麻抗抑郁药效物质及其作用机制研究进展[J]. *中草药*, 2020, 51(21):5622-5630.
- [ 5 ] 王惠芹,王真真,陈乃宏. 抑郁症发病与受体基因异常研究进展[J]. *药学报*, 2020, 55(3):384-391.
- [ 6 ] MIKOTEIT T, HEMMETER U, ECKERT A, et al. Improved alertness is associated with early increase in serum brain-derived neurotrophic factor and antidepressant treatment outcome in major depression [J]. *Neuropsychobiology*, 2015, 72(1):16-28.
- [ 7 ] 王睿,黄树明. 抑郁症发病机制研究进展[J]. *医学研究生学报*, 2014, 27(12):1332-1336.
- [ 8 ] 杨希成,李炜,邵黎明. 新作用机制抗抑郁药物的研究进展[J]. *中国药物化学杂志*, 2018, 28(3):237-244, 256.
- [ 9 ] 马小雅,丁敏芮,施侠威,等. 中药复方辨证治疗抑郁症的现代数据研究[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2019, 21(7):1418-1423.
- [ 10 ] 王旭东,乔明琦,张樟进,等. 中医药治疗抑郁症的研究进展[J]. *南京中医药大学学报*, 2016, 32(1):93-96.
- [ 11 ] 钱卓磊,李文涛. 止颤汤合柴胡加龙骨牡蛎汤化裁治疗帕金森病合并抑郁的临床疗效[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(22):5683-5685.
- [ 12 ] 王一旭,李媛媛,张碧涛,等. 逍遥散对慢性不可预知温和应激大鼠下丘脑弓状核 JAK/STAT 通路变化的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(21):21-27.
- [ 13 ] 朱艳琴. *医学实验基本操作技能*[M]. 北京:人民卫生出版社, 2015.
- [ 14 ] 胡欣妍. 柴胡龙骨牡蛎汤对心肌梗死合并抑郁大鼠药效学作用的实验研究[J]. *中国中医药科技*, 2019, 26(1):27-30.
- [ 15 ] 王晓滨,许瑞,孔明月,等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对慢性应激抑郁大鼠强迫游泳行为及HPA轴的影响[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2014, 48(3):198-201.
- [ 16 ] 王雪雪,陶柱萍,厉颖,等. 抑郁动物模型的研究进展及在中医药中的应用[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(11):2473-2480.
- [ 17 ] 薛涛,郭丽莎,刘新民,等. 抑郁症动物模型及评价方法研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(3):321-326.
- [ 18 ] 胡俊锋,尚梦娟,韦静,等. 次声对大鼠焦虑抑郁情绪的影响[J]. *神经解剖学杂志*, 2020, 36(3):240-246.
- [ 19 ] 苑杰,姜伟时,刘颖,等. 抗抑郁药的药效学性别异质性研究进展[J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36(11):1443-1447.
- [ 20 ] CAO Y, LI Q. The variation of the 5-hydroxytryptamine system between chronic unpredictable mild stress rats and chronic fatigue syndrome rats induced by forced treadmill running[J]. *Neuroreport*, 2017, 28(11):630-637.
- [ 21 ] 周胜红,吴富东. 针刺对女性更年期抑郁症患者的疗效及其对DA、NE、5-HIAA的影响[J]. *中国针灸*, 2007(5):317-321.
- [ 22 ] 董介正,李秀荣,邱龄山,等. 归脾汤联合氟西汀对抑郁模型大鼠行为学及海马区NE、5-HT及DA的影响研究[J]. *中药材*, 2017, 40(2):457-461.
- [ 23 ] LUO Y, KUANG S, LI H, et al. cAMP/PKA-CREB-BDNF signaling pathway in hippocampus mediates cyclooxygenase 2-induced learning/memory deficits of rats subjected to chronic unpredictable mild stress[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(22):35558-35572.
- [ 24 ] 金光亮,周东丰,郭霞珍,等. 慢性利血平抑郁模型大鼠脑内游离钙离子、钙调素和环核苷酸含量的变化[J]. *中华精神科杂志*, 1997(2):4-6.
- [ 25 ] 余瑞元,王燕峰,徐长法. CREB研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2003(1):39-42, 47.
- [ 26 ] LIAN N, NIU Q, LEI Y, et al. MiR-221 is involved in depression by regulating Wnt2/CREB/BDNF axis in hippocampal neurons[J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(24):2745-2755.
- [ 27 ] 王玉露,芦锰,王月月,等. 蒲郁胶囊对抑郁小鼠行为学、HPA轴及海马CREB-BDNF通路表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(20):4971-4977.
- [ 28 ] 田方泽,畅洪昇,郑俊超,等. 天竺葵对去势大鼠学习记忆的影响及神经营养相关的研究[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(11):5096-5099.
- [ 29 ] 李亚慧,杨斌,高蕊. 天心解郁方对抑郁模型大鼠大脑内CREB、BDNF及神经再生的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(4):2290-2293.
- [ 30 ] 王新茹,卞晶晶,刘肖,等. 大气颗粒物与高脂高糖饮食对雄性大鼠大脑皮质及海马组织中CREB、BDNF、ERK1/2基因表达的影响[J]. *环境与职业医学*, 2019, 36(6):583-588.
- [ 31 ] 刘柳,刘晓芳,蒋超,等. CREB1、BDNF基因多态性与河南汉族老年男性卒中后抑郁的关联性分析[J]. *郑州大学学报:医学版*, 2019, 54(4):575-578.
- [ 32 ] 彭杨芷. 温补肾阳法对抑郁模型大鼠海马AC-cAMP-PKA信号通路及脑组织病理形态的影响[D]. 成都:成都中医药大学, 2017.
- [ 33 ] 赖克道,李冬梅,韦桂宁,等. 基于CREB/BDNF通路探讨鸡血藤总黄酮对抑郁大鼠海马神经可塑性的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(5):55-61.

[责任编辑 周冰冰]