

柴胡越鞠汤对CUMS诱导的抑郁症模型大鼠 治疗作用及其机制

凌志峰, 罗洪斌*, 谢枫枫, 鲜慈英, 赵倩, 杨梦, 黄斌, 詹杰
(湖北民族大学神经精神共患病研究所, 科技学院, 湖北恩施 445000)

[摘要] 目的:根据柴胡越鞠汤对慢性不可预测轻度应激(CUMS)诱导的抑郁症模型大鼠具有治疗作用,探讨其作用机制。方法:将60只SD大鼠随机分为正常组、模型组、柴胡越鞠汤低、中、高剂量(0.3, 0.6, 1.2 g·kg⁻¹)组及盐酸氟西汀组(0.2 mg·kg⁻¹)。通过CUMS造模5周,再以柴胡越鞠汤和盐酸氟西汀连续灌胃给药3周。灌胃最后1周时行水迷宫训练及测试,最后1 d灌胃后检测糖水偏好及其他行为学实验;糖水偏好实验检测大鼠用药前后快感缺乏程度;旷场试验检测大鼠用药前后抑郁情况;水迷宫测试大鼠用药前后空间学习记忆能力;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组海马中肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 5-羟色胺受体1A(5-HT1A), 细胞外信号调节激酶(ERK)及突触相关蛋白表达情况;高尔基和尼氏染色观察海马CA3区神经元中树突棘和尼氏小体变化情况。结果:与正常组比较,模型组体重、糖水偏好率、水平运动和垂直运动得分明显下降($P<0.05$),不动时间明显延长($P<0.05$),学习记忆能力明显下降($P<0.05$);Western blot结果显示其海马组织中TNF- α 蛋白明显增高($P<0.05$), 5-HT1A, p-ERK, 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB), p-CREB, 突触素-1(Synapsin-1), 突触囊泡蛋白(Synaptophysin), 谷氨酸受体亚型-1(GluR-1)和突触后膜蛋白-95(PSD-95)蛋白相对表达量明显降低($P<0.05$),高尔基染色显示其树突棘密度降低,其尼氏体着色变浅,神经元受损明显;与模型组比较,盐酸氟西汀组、柴胡越鞠汤中、高剂量组大鼠体重、糖水偏好率、水平运动和垂直运动得分明显增加($P<0.05$),不动时间明显缩短($P<0.05$),海马组织中Synaptophysin, GluR-1和PSD-95蛋白表达明显升高($P<0.05$),柴胡越鞠汤高剂量组大鼠海马组织中TNF- α 降低更明显($P<0.05$), 5-HT1A, p-ERK, CREB, p-CREB, Synapsin-1蛋白表达升高更加明显($P<0.05$),且树突棘密度明显增高($P<0.05$),尼氏小体数量明显增多($P<0.05$),着色变深,并呈剂量依赖性。结论:柴胡越鞠汤能增加抑郁症模型大鼠体重,改善其抑郁绝望程度以及自主活动和学习记忆能力,其作用机制与该方能降低海马炎症反应,提高5-HT1A, ERK和突触相关蛋白表达水平,最终激活5-HT/CREB和ERK/CREB信号通路,增加海马神经元树突棘数量,修复受损神经元有关。

[关键词] 抑郁症;柴胡越鞠汤;行为学;环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB);突触相关蛋白

[中图分类号] R2-0;R289;R322.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)21-0068-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202139

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200826.1819.003.html>

[网络出版日期] 2020-8-27 09:50

Effect and Mechanism of Chaihu Yueju Decoction on Depression Model Rats Induced by CUMS

LING Zhi-feng, LUO Hong-bin*, XIE Feng-feng, XIAN Ci-ying, ZHAO Qian, YANG Meng,
HUANG Bin, ZHAN Jie

(*Institute of Neurological and Psychiatric Comorbidity, Science and Technology College,
Hubei Minzhu University, Enshi 445000, China*)

[Abstract] **Objective:** To explore the therapeutic effect and mechanism of Chaihu Yueju decoction on

[收稿日期] 20200331(022)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260172, 81660223);湖北省自然科学基金面上项目(2017CFB451);2017年恩施州科技计划项目(E20170005)

[第一作者] 凌志峰,在读硕士,从事传统医药学对神经退行性疾病防治研究, E-mail: lzf30125@163.com

[通信作者] *罗洪斌,博士,教授,从事神经退行性疾病的发病机制及防治研究, E-mail: luohongbin6809@126.com

model rats induced by chronic unpredictable mild stress (CUMS). **Method:** The 60 SD rats were randomly divided into normal group, model group, Chaihu Yueju decoction low, medium and high-dose groups (0.3, 0.6, 1.2 g·kg⁻¹) and fluoxetine hydrochloride group (0.2 mg·kg⁻¹), 10 for each group. The model rats was established by chronic unpredictable mild stress for 5 weeks, and then Chaihu Yueju decoction and fluoxetine hydrochloride were given to the corresponding treatment group by gavage for 3 weeks. In the last week of gavage, Morris water maze training and testing were conducted. After the last day of gavage, sugar water preference and other behavioral experiment were tested. The sugar water preference test was used to detect the degree of pleasure deficiency in rats before and after treatment, the open field test was used to detect the depression of rats before and after treatment, the spatial memory ability was tested by Morris water maze. Western blot was used to detect the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), 5-hydroxytryptamine receptor 1A (5-HT1A), extracellular signal-regulated kinase (ERK) and synapse associated protein in hippocampus of each group, Gloji and Nissl staining was used to observe the changes of dendritic spines and Nissl bodies in the hippocampus CA3. **Result:** Compared with normal group, the weight, sugar water preference rate, the scores of horizontal and vertical movement were significantly reduced ($P<0.05$), and the immobility time was significantly prolonged in model group ($P<0.05$). Meanwhile, the ability of learning and memory in model group decreased ($P<0.05$). Western blot results showed that the levels of TNF- α was significantly increased ($P<0.05$), and the levels of 5-HT1A, p-ERK, cyclic adenosine phosphate reactive element binding protein (CREB), p-CREB, Synapsin-1, Synaptophysin, glutamate receptor subtype-1 (GluR-1) and postsynaptic membrane protein-95 (PSD-95) in model group were significantly decreased ($P<0.05$). Gloji and Nissl staining results showed that the density of dendritic spines and the number of Nissl body in the hippocampal CA3 of the model group was obviously attenuate ($P<0.05$). The results show that the neurons were evidently damaged. Compared with model group, the weight, sugar water preference rate, the scores of horizontal and vertical movement were clearly increased ($P<0.05$) and the immobility time was significantly shortened in fluoxetine hydrochloride group, middle dose and high dose Chaihu Yueju decoction group ($P<0.05$). Western blot results showed that the levels of synaptophysin, GluR-1 and PSD-95 were significantly increased in fluoxetine hydrochloride group, middle dose and high dose Chaihu Yueju decoction group. The level of TNF- α was significantly decreased ($P<0.05$), the levels of 5-HT1A, p-ERK, CREB, p-CREB and Synapsin-1 were remarkably increased ($P<0.05$), especially the high dose group of Chaihu Yueju decoction. Gloji and Nissl staining results showed that the density of dendritic spines and the number of Nissl body in the hippocampal CA3 of high dose group were similarly increased in a dose-dependent manner. **Conclusion:** Chaihu Yueju decoction could improves the weight, the depressive despair, autonomous activity ability and learning and memory ability of DP model rats. Its mechanism is closely related to attenuating the inflammatory reaction and enhancing the levels of 5-HT1A receptor protein, ERK and synapse related protein, then activating 5-HT/CREB and ERK/CREB signaling pathways, increasing the number and distribution of dendritic spines and repairing damaged neurons in the DP model rat's hippocampus.

[**Key words**] depression; Chaihu Yueju decoction; ethology; cAMP responsive element binding protein(CREB); synapse associated protein

抑郁症(DP)是一种常见的、情绪、心境障碍综合征,发病率高,主要临床表现为显著而持久的心境低落,对一切事物不感兴趣,思维、应答及动作迟缓,认知功能、意志活动呈显著持久抑制状态,严重威胁人类健康^[1]。但发病机制及原因复杂。众多研究者从遗传、单胺类神经递质系统、神经营养物质、

神经内分泌及神经免疫系统等方面深入研究其发病机制,结果发现其与患者血和脑脊液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1(IL-1)等促炎细胞因子含量升高密切相关^[2]。同时还发现该病与患者脑脊液中5-羟色胺(5-HT),多巴胺(DA)等神经递质及其受体表达下降密切相关^[3]。也有证据表明该病

患者脑内谷氨酸受体亚型-1(GluR-1),突触素-1(Synapsin-1),突触囊泡蛋白(Synaptophysin),突触后膜蛋白-95(PSD-95)等突触相关蛋白表达明显下降^[4-5]。有研究还证明脑海马及皮层是抑郁症重要活动脑区且其环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB)明显减少,而该蛋白也是多种抗抑郁药有效治疗的交汇点^[6]。可见神经递质释放异常、过度炎症反应、脑神经元突触结构与功能障碍均参与了DP的发生发展。

柴胡越鞠汤是国医大师张志远在长期的临床实践中用于治疗抑郁类疾患的有效方剂,临床疗效好且应用广泛^[7]。该方是在经典方剂越鞠丸基础上加柴胡而成,并将丸剂改作汤剂,由苍术、香附、川芎、神曲、炒栀子、柴胡等组成。越鞠丸始载于元代著名医家朱丹溪的《丹溪心法》^[7],具行气开郁、疏肝理脾而治气郁功效,主治六郁证。《神农本草经》记载柴胡药性辛行苦泄,有条达肝气、疏肝解郁之效^[7]。现代医学研究发现柴胡既逆转由皮质酮损伤导致的小鼠抑郁样行为及学习记忆障碍,还能改善利血平诱导的抑郁小鼠体征变化和行为学改变^[8],故由经方越鞠丸加柴胡组成该方其临床疗效更佳,但更深入的作用机制尚不清楚,有待进一步研究。由于人类DP大多为慢性DP,而慢性不可预测轻度应激(CUMS)诱导的DP与社会人患DP最为接近且稳定^[9]。故笔者拟采用DP大鼠模型探讨柴胡越鞠汤对DP的治疗作用及其机制,为临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠80只,体质量(200±20)g,购于湖北省实验动物研究中心,实验动物质量合格证编号No.42000600030693,动物合格证号SCXK(鄂)2015-0018。本实验获得湖北民族大学动物伦理委员会批准,批号(2019)040号。

1.2 药物与试剂 柴胡越鞠汤组成:柴胡12g(浙江景岳堂药业有限公司,产地河北,批号180130),苍术9g(浙江景岳堂药业有限公司,产地河北,批号180717),香附9g(江西齐仁堂中药饮片有限公司,产地江西,批号20180202),川芎9g(江西齐仁堂中药饮片有限公司,产地四川,批号20180701),栀子9g(江西百仁中药饮片有限公司,产地江西,批号180102),神曲9g(四川千方中药饮片有限公司,产地江西,批号18030168),以上药材经湖北民族大学医学部中药学教研室文德鉴副教授鉴定为正品;盐酸氟西汀(礼来苏州制药有限公司,批号7741AC);

BCA蛋白测定试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号40408); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国SAB公司,批号21227);TNF- α , Synapsin-1, PSD-95抗体(美国Proteintech公司,批号分别为60291, 2493928, 20665);Synaptophysin, GluR-1抗体(美国Millipore公司,批号分别为2477007, 2462885);5-HT1A抗体(美国Abcam公司,批号3195266-12);细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2),磷酸化(p)-ERK1/2, CREB, p-CREB抗体(美国Cell Signaling公司,批号分别为6, 17, 17, 14);重铬酸钾(天津科密欧化学试剂有限公司,批号20180522);尼氏染色液(上海碧云天生物技术有限公司,批号C0117)。

1.3 仪器 099 CK5424型电自动匀浆仪(美国Glas-Col公司);VT1200S型振荡切片机(德国Leica公司);Morris水迷宫系统(中国医学科学院);Odyssey型双色红外扫描仪(美国Gene公司);Mini-PROTEAN 3 Dodeca型电泳槽,VE 186型转移电泳槽(美国Bio-Rad公司);E200型三目显微镜(日本Nikon公司)。

2 方法

2.1 药物制备 水煎液制备方法为以大鼠每天灌胃10 mL·kg⁻¹为例,称取柴胡越鞠汤114g,加适量水煎煮1h,煎煮2次,合并药液,浓缩定量至95 mL,得到质量浓度为1.2 g·mL⁻¹溶液,此浓度为高浓度组,中质量浓度组为0.6 g·mL⁻¹,低质量浓度组为0.3 g·mL⁻¹;盐酸氟西汀质量浓度为0.2 g·L⁻¹,保存于4℃冰箱备用。

2.2 动物分组 SD大鼠自由饮食饮水,适应性喂养1周后,随机分为6组:空白组、模型组、柴胡越鞠汤低、中、高剂量组和盐酸氟西汀组,每组12只,剩余8只备用。

2.3 抑郁症模型建立 选用CUMS诱导进行模型制备,造模参考文献[9]方法操作,每天给予大鼠1~2种不同刺激,每天刺激方式不同,3d内不重复且无规律,使大鼠无法预测某种刺激。具体刺激方式包括夹尾10 min,禁食24 h,禁水24 h,昼夜颠倒和震荡摇笼15 min,潮湿垫料12 h,束缚3 h,足部电击和悬尾15 min,闪频光照和10℃冷水游泳10 min。造模时间持续5周,在造模之前需称取大鼠体质量并做好糖水偏好及行为学实验记录。造模后大鼠出现体质量减轻,对糖水偏好度下降,快感消失,自发活动及探索行为减弱,强迫游泳中呈绝望程度且认知功能出现障碍表明造模成功^[9-10]。

2.4 给药及Morris水迷宫训练 各组大鼠均按体

质量给药,并根据动物和人体间的等效剂量换算公式进行换算,柴胡越鞠汤换算成大鼠每天给药低、中、高剂量分别为0.3,0.6,1.2 g·kg⁻¹,盐酸氟西汀按成人每天用药20 mg计算大鼠用药量为0.2 g·kg⁻¹。正常组和模型组双蒸水灌胃3周,同样治疗组分别各按计算量给药3周。灌胃最后1周同时进行水迷宫训练^[11],连续训练5 d后休息1 d,隔天在最后1次给药后立即进行水迷宫测试。

2.5 糖水偏好、旷场实验、强迫游泳等行为学实验检测大鼠抑郁样行为 依据文献[9]方法在造模前进行糖水嗜好训练,每只鼠笼放置2个相同规格饮水瓶。第1天两瓶均为1%糖水,第2天置换成1%糖水和双蒸水各一瓶,隔1 h交换二者位置,第3天禁食禁水,24 h后进行糖水偏好测试;旷场试验:用高50 cm,长100 cm木板围成一密闭空间,保持室内安静,光线暗淡,并将空间底部划分25格,大鼠每移动1格计水平得分1分,前两脚离地1次计垂直得分1分,记录大鼠在5 min内水平得分和垂直得分;强迫游泳实验:将大鼠放入高50 cm,直径30 cm透明容器内使其无法逃离,观察大鼠6 min内求生欲望,前2 min不计时,记录后4 min内不动时间。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测脑海马突触相关蛋白, TNF- α , 5-HT1A, ERK, CREB蛋白及其磷酸化的表达 先匀浆提取脑海马组织蛋白,用BCA法检测蛋白浓度,制备目的蛋白、溴酚蓝混合物和MARKER,取目的蛋白30 μ g加入到浓缩胶样孔中跑电泳分离蛋白,约2 h后转膜90 min至NC膜上,再用5%脱脂奶在摇床上封闭1 h,再用清水和双蒸水各洗涤3次,敷一抗(Synapsin-1, PSD-95, Synaptophysin, 5-HT1A, ERK1/2, p-ERK1/2, 稀

释比均为1:1 000; TNF- α , GluR-1, CREB, p-CREB 稀释放比均为1:500),静置过夜,第2天敷二抗(1:1万),再用清水和双蒸水各洗涤3次。Odyssey 双色红外扫描显影成像,Image J计算各条带灰度值。

2.7 高尔基(Golgi)染色观察海马组织树突棘缺失情况 水迷宫测试结束后给大鼠腹腔注射20%乌拉坦,麻醉后固定。将输液管针头从心尖穿过心脏至主动脉,并依次使用冲洗液、固定液和媒染液进行灌流,结束后取脑并切分前后脑和左右半脑,进行媒染3 d,再用1%的硝酸银溶液镀银3 d,放置2周后可进行脑组织切片并梯度脱水,二甲苯透明,封片。

2.8 尼氏(Nissl)染色观察脑海马神经元功能变化 尼氏染色取材方法同高尔基染色取材相同,给予药物麻醉后用生理盐水进行灌流,再用4%多聚甲醛固定,取出整脑后将其放入4%多聚甲醛溶液中再固定。用振荡切片切脑后将脑片放入16孔板中,挑选合适的脑片移至载玻片,自然风干后行尼氏染色,最后用双蒸水漂洗,梯度脱水,二甲苯透明,封片,镜下观察拍片保存。

2.9 统计学分析 实验数据采用SPSS 26.0软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对DP大鼠体质量的影响 与正常组比较,模型组大鼠体质量明显减轻($P<0.05$);与模型组比较,给药3周后,柴胡越鞠汤中、高剂量组及盐酸氟西汀组体质量均增加明显,差异具有统计学意义($P<0.05$),同时柴胡越鞠汤高剂量组体质量增加最为明显。见表1。

表1 柴胡越鞠汤对DP模型大鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Chaihu Yueju decoction on body weight of DP model rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	造模前	造模后	给药后
正常	-	208.63±8.23	236.63±5.71	268.38±8.70
模型	-	206.92±10.75	220.22±13.88 ¹⁾	234.00±13.10 ¹⁾
柴胡越鞠汤	0.3	201.00±11.26	217.30±8.22 ¹⁾	240.70±7.32
	0.6	203.75±9.71	218.75±4.83 ¹⁾	256.50±9.46 ²⁾
	1.2	207.75±9.25	221.00±10.85 ¹⁾	260.13±6.03 ²⁾
盐酸氟西汀	0.000 2	208.00±10.76	224.25±7.27 ¹⁾	252.63±9.07 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$ (表1~9同)。

3.2 对DP大鼠糖水偏好及行为学的影响

3.2.1 对DP大鼠糖水偏好的影响 与正常组比较,模型组大鼠对糖水偏好度明显下降($P<0.05$);与

模型组比较,给药3周后,柴胡越鞠汤中、高剂量组及盐酸氟西汀组大鼠对糖水偏好明显提升($P<0.05$),大鼠的快感缺失度明显改善。见表2。

表2 柴胡越鞠汤对DP模型大鼠糖水偏好的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Chaihu Yueju decoction on sugar preference of DP model rats($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	糖水偏好度/%		
		造模前	造模后	给药后
正常	-	88.34±3.32	91.32±2.59	86.92±2.78
模型	-	86.19±12.88	65.41±13.57 ¹⁾	62.64±13.71 ¹⁾
柴胡越鞠汤	0.3	91.69±11.96	68.33±14.32 ¹⁾	67.73±10.15
	0.6	90.67±4.64	64.31±12.79 ¹⁾	79.47±7.48 ²⁾
	1.2	87.61±12.78	66.14±17.28 ¹⁾	74.60±8.28 ²⁾
盐酸氟西汀	0.000 2	86.99±6.95	61.02±10.40 ¹⁾	75.20±3.45 ²⁾

3.2.2 对DP大鼠在旷场实验中自主活动的影响
与正常组比较,模型组大鼠的水平得分和垂直得分均明显减少($P<0.05$);与模型组比较,柴胡越鞠汤

中、高剂量及盐酸氟西汀组的水平得分和垂直得分明显提高($P<0.05$),改善了大鼠的自主行为活动。见表3,4。

表3 柴胡越鞠汤对DP模型大鼠水平运动的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Chaihu Yueju decoction on horizontal movement of DP model rats($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	水平得分/分		
		造模前	造模后	给药后
正常	-	102.00±10.14	86.38±15.34	84.88±16.81
模型	-	103.67±20.15	27.67±17.33 ¹⁾	39.67±16.87 ¹⁾
柴胡越鞠汤	0.3	98.58±26.92	28.10±20.91 ¹⁾	53.60±23.28
	0.6	105.67±18.20	22.40±21.03 ¹⁾	69.70±20.97 ²⁾
	1.2	99.08±27.74	20.60±20.39 ¹⁾	72.10±21.08 ²⁾
盐酸氟西汀	0.000 2	104.63±32.03	23.88±19.16 ¹⁾	73.63±17.39 ²⁾

表4 柴胡越鞠汤对DP模型大鼠垂直运动的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Chaihu Yueju decoction on vertical movement of DP model rats($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	垂直得分/分		
		造模前	造模后	给药后
正常	-	23.50±4.87	18.50±3.74	17.13±4.70
模型	-	22.42±5.14	4.17±2.17 ¹⁾	4.83±2.16 ¹⁾
柴胡越鞠汤	0.3	21.50±5.50	5.50±3.41 ¹⁾	7.70±3.53
	0.6	24.75±4.92	5.90±4.28 ¹⁾	14.30±5.62 ²⁾
	1.2	25.33±5.65	6.20±5.16 ¹⁾	12.30±4.11 ²⁾
盐酸氟西汀	0.000 2	21.13±5.59	6.00±6.44 ¹⁾	13.13±4.49 ²⁾

3.2.3 对DP大鼠在强迫游泳中绝望程度的影响
与正常组比较,模型组大鼠在强迫游泳时表现出更加绝望行为,其不动时间均明显延长($P<0.05$);与模型组比较,给药后柴胡越鞠汤中、高剂量及盐酸氟西汀组大鼠挣扎时间更久,其不动时间明显缩短($P<0.05$),提升了大鼠的求生欲望并改善其抑郁样绝望程度。见表5。

3.3 对DP大鼠空间学习记忆能力的影响 与正常

组比较,模型组大鼠逃避潜伏期明显延长($P<0.05$);与模型组比较,柴胡越鞠汤低、中、高剂量组及盐酸氟西汀组大鼠潜伏期明显缩短($P<0.05$);同时在测试中发现柴胡越鞠汤中、高剂量组及盐酸氟西汀组大鼠对第3象限目的性强,提示柴胡越鞠汤中、高剂量能有效改善DP大鼠空间学习记忆能力,尤以高剂量的柴胡越鞠汤最为显著。见表6。

3.4 对DP大鼠脑海马树突棘的影响 与正常组比较,模型组大鼠脑海马CA1区神经元树突分支较单一,树突棘明显减少,发育不成熟,而正常组大鼠脑海马CA1区神经元树突二、三级分支较多,树突棘密度较大,复杂度高,树突棘发育成熟;与模型组比较,柴胡越鞠汤中、高剂量组及盐酸氟西汀组则能逆转该趋势,使神经元树突分支及复杂性增加,树突棘发育更加成熟,以柴胡越鞠汤高剂量组更能使神经元发育成短柱状、蕈状型或蘑菇型的成熟样树突棘。见图1。

3.5 对DP大鼠脑海马神经元细胞的影响 与正常组比较,模型组脑海马CA3区神经元细胞形态不规则,数量明显减少,排列不齐且稀疏,间距增大,呈

表5 柴胡越鞠汤对DP模型大鼠强迫游泳的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 5 Effect of Chaihu Yueju decoction on forced swimming of DP model rats($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	不动时间/s		
		造模前	造模后	给药后
正常	-	24.50±7.69	27.28±10.35	30.13±6.81
模型	-	27.08±9.22	66.67±18.59 ¹⁾	62.25±14.56 ¹⁾
柴胡越鞠汤	0.3	25.17±8.32	63.90±19.33 ¹⁾	52.20±13.70
	0.6	29.08±9.30	71.80±24.07 ¹⁾	36.10±16.91 ²⁾
	1.2	25.92±8.31	68.80±20.80 ¹⁾	35.60±12.22 ²⁾
盐酸氟西汀	0.000 2	26.25±7.40	70.38±19.58 ¹⁾	33.50±9.53 ²⁾

表6 柴胡越鞠汤对DP模型大鼠空间学习能力的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 6 Effect of Chaihu Yueju decoction on spatial learning and memory ability of DP model rats($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	逃避潜伏期/s	穿越平台数/次
正常	-	14.13±2.03	5.63±1.06
模型	-	42.20±6.86 ¹⁾	2.30±1.57 ¹⁾
柴胡越鞠汤	0.3	31.10±5.13 ²⁾	3.00±1.63
	0.6	21.90±4.09 ²⁾	4.10±0.99 ²⁾
	1.2	16.90±4.22 ²⁾	4.60±1.08 ²⁾
盐酸氟西汀	0.000 2	20.38±4.10 ²⁾	3.88±0.64 ²⁾

有序,形态规则,尼氏体丰富,染色均匀且深;与模型组比较,各治疗组脑海马CA3区神经元细胞数量增多,排列紧密,尼氏体着色变深,以柴胡越鞠汤高剂量组最为明显。见图2。

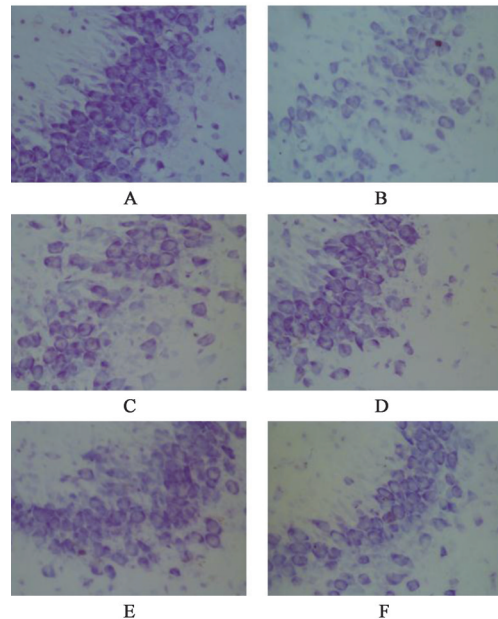
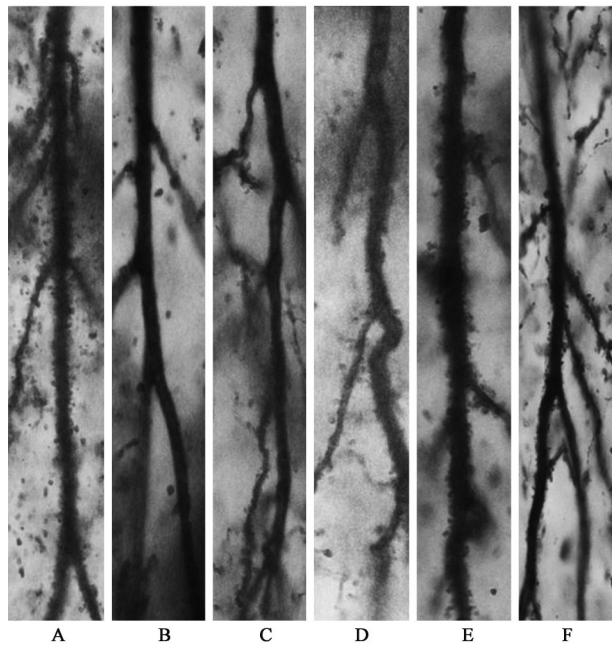


图2 柴胡越鞠汤对DP模型大鼠海马组织形态的影响(Nissl, ×1 000)

Fig. 2 Effect of Chaihu Yueju decoction in hippocampal morphology of DP model rats (Nissl, ×1 000)



A. 正常组; B. 模型组; C. 柴胡越鞠汤低剂量组; D. 柴胡越鞠汤中剂量组; E. 柴胡越鞠汤高剂量组; F. 盐酸氟西汀组(图2~5同)

图1 柴胡越鞠汤对DP模型大鼠海马组织形态的影响(Golgi, ×1 000)

Fig. 1 Effect of Chaihu Yueju decoction in hippocampal morphology of DP model rats (Golgi, ×1 000)

散落状,尼氏小体着色变浅,而正常组大鼠脑海马CA3区神经元细胞大而圆,层数为3~5层,排列紧密

3.6 对DP大鼠脑海马5-HT1A, TNF- α 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组脑海马5-HT1A受体表达明显降低($P<0.05$), TNF- α 蛋白表达明显升高($P<0.05$);与模型组比较,柴胡越鞠汤高剂量组及盐酸氟西汀组5-HT1A蛋白表达明显增加($P<0.05$), TNF- α 蛋白表达明显降低($P<0.05$)。见图3,表7。

3.7 对DP大鼠脑海马ERK1/2-CREB信号通路的影响 与正常组比较,模型组脑海马ERK1/2蛋白的磷酸化水平明显降低($P<0.05$), CREB蛋白及其磷酸化水平均明显降低($P<0.05$);与模型组比较,柴

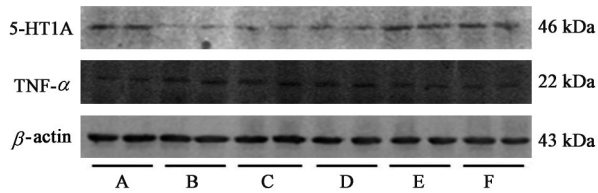


图3 DP模型大鼠5-HT1A, TNF- α 蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoretic of 5-HT1A and TNF- α proteins in DP model rats

表7 柴胡越鞠汤对DP模型大鼠海马中5-HT1A, TNF- α 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 7 Effect of Chaihu Yueju decoction on protein expressions of 5-HT1A and TNF- α in hippocampus of DP model rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	5-HT1A/ β -actin	TNF- α / β -actin
正常	-	0.78±0.05	0.62±0.03
模型	-	0.50±0.03 ¹⁾	0.82±0.02 ¹⁾
柴胡越鞠汤	0.3	0.55±0.03	0.78±0.02
	0.6	0.55±0.05	0.84±0.02
	1.2	0.72±0.06 ²⁾	0.64±0.01 ²⁾
盐酸氟西汀	0.000 2	0.80±0.08 ²⁾	0.61±0.02 ²⁾

胡越鞠汤高剂量组及盐酸氟西汀组海马ERK1/2

表8 柴胡越鞠汤对DP模型大鼠海马组织中ERK1/2-CREB信号通路的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 8 Effect of Chaihu Yueju decoction on ERK1/2-CREB signaling pathway in hippocampus of DP model rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ERK1/2/ β -actin	p-ERK1/2/ β -actin	CREB/ β -actin	p-CREB/ β -actin
正常	-	0.62±0.11	0.68±0.12	1.20±0.07	1.60±0.15
模型	-	0.61±0.04	0.44±0.03 ¹⁾	0.83±0.02 ¹⁾	1.04±0.02 ¹⁾
柴胡越鞠汤	0.3	0.59±0.08	0.48±0.09	1.05±0.03 ²⁾	1.11±0.03
	0.6	0.62±0.04	0.53±0.06	0.92±0.06	1.22±0.05
	1.2	0.63±0.01	0.64±0.01 ²⁾	1.06±0.05 ²⁾	1.36±0.12 ²⁾
盐酸氟西汀	0.000 2	0.64±0.04	0.66±0.06 ²⁾	0.97±0.15	1.35±0.05 ²⁾

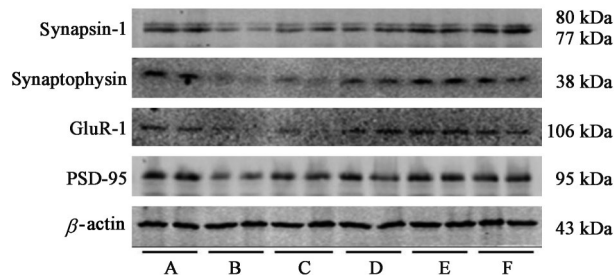


图5 DP模型大鼠海马组织中突触相关蛋白表达电泳
Fig. 5 Electrophoretic of synaptic associated expression in hippocampus of DP model rats

4 讨论

DP是一种发病率较高且对社会和家庭带来较大负担的神经精神共患病,因此对其开展有效防治

蛋白的磷酸化水平明显提高($P<0.05$), CREB蛋白及磷酸化水平也明显提高($P<0.05$)。见图4,表8。

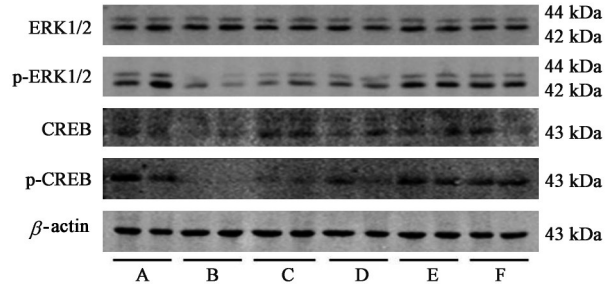


图4 DP模型大鼠海马中ERK/CREB信号通路蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoretic of ERK/CREB signaling pathway protein in hippocampus of DP model rats

3.8 对DP大鼠海马突触相关蛋白表达的影响
与正常组比较,模型组海马 Synapsin-1, Synaptophysin, GluR-1, PSD-95蛋白表达明显降低($P<0.05$);与模型组比较,柴胡越鞠汤高剂量组及氟西汀组海马 Synapsin-1蛋白表达明显升高($P<0.05$),柴胡越鞠汤中、高剂量组和盐酸氟西汀组海马 Synaptophysin, GluR-1, PSD-95蛋白表达明显升高($P<0.05$)。见图5,表9。

就显得格外重要。5-HT是单胺类神经递质,通过其受体作用广泛参与食欲、情绪等多种生理活动,其5-HT1A在脑组织含量最丰富并分布广泛。已有文献证明DP与5-HT含量及5-HT1A受体表达下降密切相关^[3],同时5-HT紊乱还可导致强迫症等多种抑郁症相关证候发生^[12]。DP还能导致血中TNF- α , IL等促炎因子显著增多,进而引起海马组织发生炎症反应,导致突触蛋白合成减少及突触结构损伤,进而引起抑郁样行为改变^[3]。而抗抑郁能促进TNF- α 等促炎因子明显下降直至恢复正常,上调海马突触蛋白表达及突触可塑性,恢复突触功能,改善患者临床表现^[13-14]。研究证明CREB是多种抗抑郁药物的关键作用靶点,而DP患者尸检结果也证

表 9 柴胡越鞠汤对 DP 模型大鼠脑海马组织中突触相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 9 Effect of Chaihu Yueju decoction on expression of synaptic associated proteins in hippocampus of DP model rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	Synapsin-1 /β-actin	Synaptophysin /β-actin	GluR-1 /β-actin	PSD-95 /β-actin
正常	-	0.81±0.03	0.61±0.01	0.72±0.02	0.92±0.10
模型	-	0.43±0.01 ¹⁾	0.40±0.03 ¹⁾	0.52±0.05 ¹⁾	0.60±0.04 ¹⁾
柴胡越鞠汤	0.3	0.55±0.01	0.42±0.02	0.59±0.06	0.77±0.05
	0.6	0.57±0.08	0.51±0.03 ²⁾	0.69±0.07 ²⁾	0.78±0.08 ²⁾
	1.2	0.71±0.09 ²⁾	0.59±0.02 ²⁾	0.75±0.03 ²⁾	0.84±0.09 ²⁾
盐酸氟西汀	0.000 2	0.79±0.07 ²⁾	0.54±0.05 ²⁾	0.69±0.04 ²⁾	0.86±0.01 ²⁾

明其脑海马和皮层中 CREB 及其磷酸化水平均明显下降,同时在 DP 患者脑海马中 ERK1/2 蛋白酶活性也同样减少^[6,15]。当使用抗 DP 药物后可有效提高患者脑中 5-HT 含量及海马组织中 5-HT1A 受体表达,降低 ERK1/2 活性,最终增加 CREB 表达及其磷酸化水平,起到治疗作用^[6]。综合以上文献发现,抗抑郁药物主要通过 5-HT1A/CREB 和 ERK/CREB 两条信号通路发挥其治疗作用。

突触是构成神经元的基本结构与功能单位,突触间信息传递和处理依赖突触相关蛋白完成并促进学习记忆发生。临床和动物实验均证明抑郁症患者脑海马组织中突触结构功能均有损伤且数量显著下降,其树突网状分布稀疏,结构单一,树突棘数量和密度下降尤为明显,最终导致海马突触可塑性降低,提示抑郁症发生与海马突触病变密切相关^[13-14]。由于目前治疗抑郁症的临床药物存在不同程度的毒副作用,因此利用毒副作用小的传统中药不失为治疗抑郁症的另外一种选择。

国医大师张志远在长期治疗抑郁症中配伍形成的柴胡越鞠汤疗效甚佳且应用广泛^[7],原越鞠丸是以治气郁为主,故以香附为君药,本方加一味柴胡,与香附相使为君,目的重在疏肝行气解郁,条畅气机以治气郁。川芎为活血药,是血中之气药,可活血行气解血郁;苍术燥湿健脾,以解湿郁;栀子清热泻火,以解火郁;神曲消食和胃,以解食郁;至于内生痰饮而成的痰郁,可能是由于体内气机停滞致湿聚而产生,或因为饮食积于肠胃而导致,也可因体内火邪日久炼液而成。其余四药皆可为佐臣之品,诸药合用,诸郁自解。但其作用机制尚不明确,有待进一步研究。因此,本实验采用 CUMS 诱导 DP 经典模型,再给予柴胡越鞠汤处理,通过研究该模型大鼠脑海马组织中单胺递质受体、炎症信号通路蛋白和突触蛋白等表达情况及组织形态变化,以期掌握该药方详细作用机制,以利进一步开发

应用。

DP 发生被认为是阿尔兹海默病(AD)前驱症状。研究发现抑郁症患者患上 AD 可能性比常人高^[10],且 DP 患者也会出现认知功能障碍,故运用水迷宫实验来测试 DP 大鼠空间学习记忆能力;糖水偏好实验是用来检测大鼠对甜味事物的本能偏好程度而设计的实验方法;旷场试验是用来评价实验大鼠在新的陌生环境下紧张度、探索活动及自主活动能力的一种实验方法^[10,16];强迫游泳试验则是将实验大鼠强迫放置在无法逃避且范围有限的密闭空间中,按其本能会拼命挣扎游动试图逃离,若感到逃脱无望,便会渐渐表现出不再游动和挣扎的绝望行为,强迫游泳试验既可评价抗抑郁药物药效,也可作为 DP 造模方法^[17]。

本研究显示,DP 模型大鼠体质量减轻并出现明显的抑郁症行为学变化,其脑海马中 5-HT1A 表达下降, TNF-α 表达升高,而 p-ERK1/2, CREB, p-CREB 及突触相关蛋白均明显减少,还伴随突触结构与功能受损,尼氏小体数量明显减少且着色变浅,神经元功能障碍。柴胡越鞠汤处理后,DP 大鼠体质量明显增加,有效改善 DP 大鼠认知功能障碍,其自主行为活动能力、快感缺失度和求生欲望乃至抑郁样绝望程度均有明显改善,说明柴胡越鞠汤在行为学方面能有效改善 DP 大鼠抑郁症表现;同样使用该方后检测模型大鼠海马中 5-HT1A 蛋白, ERK1/2 蛋白磷酸化和 CREB 及其磷酸化水平,结果发现这些蛋白的表达及活性均显著升高,而 TNF-α 表达明显减少,说明该药方能通过 5-HT1A/CREB 和 ERK/CREB 两条信号通路增加脑海马 CREB 表达及其磷酸化水平,同时还能通过抑制炎症反应起到治疗 DP 作用。本实验结果还显示,柴胡越鞠汤能明显增加 DP 大鼠脑海马中 Synapsin-1, Synaptophysin, PSD-95, GluR-1 等突触相关蛋白的表达,显著增加脑海马组织中树突棘数量,同时,尼

氏小体数量也增多且着色明显变深,说明柴胡越鞠汤可逆转DP大鼠脑海马突触蛋白缺失,促进突触中树突棘发育,恢复神经元功能,进而改善认知功能障碍。

本实验也存在不足之处,如仅观察到该药方通过5-HT_{1A}/CREB和ERK/CREB两条信号通路改善相关蛋白表达进而起到治疗DP目的,但未使用两条通路相应的阻滞剂和激动剂来进行正反双向验证,有待在今后的研究中补充完善。

总之,柴胡越鞠汤能有效改善CUMS诱导的DP模型大鼠抑郁症行为学表现和认知功能障碍,降低其脑海马炎症反应,还能通过增加脑海马中5-HT_{1A}受体蛋白表达及ERK1/2活性,最终上调海马组织中CREB及其磷酸化水平,同时还能增加突触相关蛋白表达,改善海马神经元功能。因此该方治疗抑郁症的作用机制明确,可为其进一步的临床应用及作用机制研究提供依据,具有一定的临床参考价值。

[参考文献]

[1] SMITH K. Mental health: a world of depression [J]. Nature, 2014, 515(7526): 180.
[2] 田利萍. 抑郁症患者细胞因子和T细胞免疫功能的研究[D]. 杭州:浙江大学, 2018.
[3] MIQUEL R, MARGALIDA V, EMILIO L N, et al. Cognitive impairments and depression: a critical review [J]. Actas Esp Psiquiatr, 2015, 43 (5): 187-193.
[4] DURIC V, BANASR M, STOCKMEIER C A, et al. Altered expression of synapse and glutamate related genes in post-mortem hippocampus of depressed subjects [J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2013, 16 (1): 69-82.
[5] FEYISSA A M, CHANDRAN A, STOCKMEIER C A, et al. Reduced levels of NR2A and NR2B subunits of NMDA receptor and PSD-95 in the prefrontal cortex in major depression [J]. Prog Neuro-psychoph, 2009, 33 (1): 70-75.
[6] 卢峻, 杨秀岩, 华茜, 等. cAMP反应元件结合蛋白: 抗

抑郁药信号转导通路的交汇点[J]. 生理科学进展, 2008, 39(4): 371-374.

[7] 张志远. 国医大师张志远医论医话[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2017: 148.
[8] 杨久山, 张楠, 宋铭晶, 等. 柴胡总皂苷对小鼠抑郁样行为及学习记忆障碍的改善作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(24): 134-139.
[9] WILLNER P, MITCHELL P J. The validity of animal models of predisposition to depression [J]. Behav Pharmacol, 2002, 13(3): 169-188.
[10] 储江. 慢性应激诱导的抑郁大鼠空间学习记忆能力障碍及机制[D]. 武汉: 华中科技大学, 2015.
[11] LUO H B, SHANG N, XIE W Z, et al. *Trillium tschonoskii* maxim extract attenuates abnormal tau pathologies [J]. Neural Regen Res, 2018, 13 (5): 915-922.
[12] LACASSE J R, LEO J. Serotonin and depression a disconnect between the advertisements and the scientific literature [J]. PLoS Med, 2005, 2(12): e392.
[13] HAAPAKOSKI R, MATHIEU J, EBMEIER K P, et al. Cumulative meta-analysis of interleukins 6 and 1 β , tumour necrosisfactor α and c-reactive orotein in patients with major depressivedisorder [J]. Brain Behav Immun, 2015, 49(10): 206-215.
[14] FILIANO A J, GADANI S P, KIPNIS J. Interactions of innate and adaptive immunity in brain development and function [J]. Brain Res, 2015, 1617(8): 18-27.
[15] DWIVEDI Y, RIZAVI H S, TEPPEN T, et al. Aberrant extracellular signal-regulated kinase (ERK) 5 signaling in hippocampus of suicide subjects [J]. Neuropsychopharmacology, 2007, 32(11): 2338-2350.
[16] BAMBICO F R, BELZUNG C. Novel insights into depression and antidepressants: a synergy between synaptogenesis and neurogenesis? [J]. Curr Top Behav Neurosci, 2013, 15(2): 243-291.
[17] MCEWEN B S, EILAND L, HUNTER R G, et al. Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress [J]. Neuropharmacology, 2012, 62(1): 3-12.

[责任编辑 孙丛丛]