

· 经典名方 ·

## 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

田真真, 徐义勇, 朱金华, 叶喜德, 高源, 万红娇\*  
(江西中医药大学, 南昌 330004)

**[摘要]** 目的:探讨温胆汤对环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB) mRNA 沉默海马细胞活性、凋亡及海马脑源性神经营养因子/原肌球蛋白相关受体激酶/CREB(BDNF/TrkB/CREB)信号通路作用的影响。方法:制备温胆汤含药血清,将SD雄性大鼠随机分为温胆汤高、中、低剂量组、氯氮平组、正常生理盐水组,每组10只,其中每组15只。正常组予20 mL·kg<sup>-1</sup>生理盐水灌胃,氯氮平组给予0.02 g·kg<sup>-1</sup>氯氮平原药灌胃,温胆汤高、中、低剂量组分别予质量浓度为2,1,0.5 g·mL<sup>-1</sup>的等量温胆汤浓缩生药灌胃,1次/d,连续灌胃8 d后,股动脉取血,5 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min,倾取上清液,灭活,-80 °C保存,备用。通过脂质体转染至海马细胞中,构建 CREB mRNA 沉默海马神经元细胞系,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)验证小分子干扰核糖核酸(siRNA)转录后效果。检测海马细胞周期和凋亡,正常海马细胞和 CREB 基因沉默海马细胞内 BDNF, TrkB, CREB, 钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (CaMK II) mRNA 表达水平。结果:对于细胞凋亡,与正常大鼠血清组比较,各组别在24,48 h时,细胞凋亡显著降低( $P<0.01$ );与正常大鼠血清-siRNA组比较,各给药组细胞凋亡显著降低( $P<0.01$ )。对于 BDNF, TrkB, CREB, CaMK II mRNA 表达,与正常大鼠血清组比较,基因沉默正常组 CREB, BDNF mRNA 表达均显著下降( $P<0.01$ );与正常大鼠血清-siRNA组比较,各给药组可显著提高 BDNF mRNA 表达( $P<0.01$ ),其中 TrkB, CaMK II 各组间差异无明显统计学意义。结论:温胆汤含药血清可提高 BDNF mRNA 表达,通过调控 BDNF/TrkB/CREB 信号通路,以保护海马神经元,达到防治精神分裂症认知障碍的目的。

**[关键词]** 温胆汤含药血清; CREB 基因沉默; 海马细胞; 脑源性神经营养因子/原肌球蛋白相关受体激酶/环磷腺苷效应元件结合蛋白(BDNF/TrkB/CREB)信号通路

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2020)22-0001-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201867

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200724.1830.024.html>

[网络出版日期] 2020-7-25 09:38

### Effect of Wendantang-containing Serum on CREB Gene Silencing Hippocampal Neuron Apoptosis and BDNF/TrkB/CREB Signaling Pathway

TIAN Zhen-zhen, XU Yi-yong, ZHU Jin-hua, YE Xi-de, GAO Yuan, WAN Hong-jiao\*  
(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Wendantang on cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-response element binding protein (CREB) gene silencing hippocampal cell activity, apoptosis and signal pathway of brain-derived neurotrophic factor/protomyosin related receptor kinase B/adenosine cyclophosphate effector binding protein (BDNF/TrkB/CREB). **Method:** Wendantang-containing serum was

[收稿日期] 20200306(001)

[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(20192BAB20509 6);江西省教育厅科技计划项目(GJJ170741);江西省卫计委中医药科研课题项目(2017A235);江西中医药大学博士科研启动基金课题项目(2018WBZR020)

[第一作者] 田真真,在读博士,讲师,从事中医基础理论与诊治规律研究工作,E-mail:27939115@qq.com

[通信作者] \*万红娇,博士,教授,从事中医基础理论与诊治规律研究工作,E-mail:635056254@qq.com

prepared. Animal grouping: SD male rats were randomly divided into high, medium, low-dose groups, clozapine group and normal saline group, with 10 rats in each group, while 15 rats for the normal group. Dosage: 20 mL·kg<sup>-1</sup> normal saline was given to normal group N, clozapine 0.02 g·kg<sup>-1</sup> was given to dozapine group X, while high, medium and low-dose Wendantang groups were respectively given the same amount of Wendantang concentrated crude drug, with concentrations of 2, 1 and 0.5 g·mL<sup>-1</sup> respectively once a day for 8 days continuously, and then blood was taken from femoral artery, and centrifuged for 15 min at 5 000 r·min<sup>-1</sup>. Supernatant was taken, inactivated, stored at -80 °C for standby. The CREB gene silenced hippocampal neuron cell line was constructed through transfection of liposomes into hippocampal cells, and Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to verify the effect of small interfering RNA (siRNA) transcription. The mRNA expressions of BDNF, TrkB, CREB and CaMK II in normal hippocampal cells and CREB gene silenced hippocampal cells were measured. **Result:** Compared with normal group, the apoptosis of the normal gene silencing group was significantly increased ( $P<0.01$ ), compared with the normal gene silencing group, the apoptosis of each group was significantly reduced ( $P<0.01$ ). As for the mRNA expressions of BDNF, TrkB, CREB and CaMK II, compared with the normal group, the mRNA expression of CREB, BDNF in the normal gene silencing group was significantly decreased ( $P<0.01$ ). Compared with the normal gene silencing group, the mRNA expression of BDNF in each administration group was highly increased ( $P<0.01$ ), but with no statistically significant difference between TrkB and CaMK II groups. **Conclusion:** The Wendantang-containing serum could improve the mRNA expression of BDNF, protect hippocampal neurons and prevent cognitive impairment of schizophrenia by regulating BDNF/TrkB/CREB signal pathway.

**[Key words]** Wendantang-containing serum; cyclic adenosine monophosphate (cAMP) -response element binding protein (CREB) gene silencing; hippocampal cells; brain-derived neurotrophic factor/protomyosin-related receptor kinase B/CREB(BDNF/TrkB/CREB) signal pathway

温胆汤是经典的祛痰名方,由法半夏、枳实、陈皮、竹茹、生姜、炙甘草等6味药组成,至宋代陈无择在《三因极一病证方论》中,增加了茯苓、大枣2味,并沿用至今。具化痰、和胃、安神之功,临床可用治痰湿阻滞气机致精神、情志异常等疾病,诸如精神分裂症、认知功能障碍、抑郁症等,疗效显著<sup>[1-3]</sup>。精神分裂症(SCZ),是我国疾病防治和研究的重大疾病之一。认知障碍作为SCZ首发症状,贯穿于疾病的全过程。海马脑源性神经营养因子/原肌球蛋白相关受体激酶/环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(BDNF/TrkB/CREB)信号传导通路对SCZ认知功能起到关键作用。该通路对认知功能紧密相关<sup>[4-5]</sup>,其中BDNF是神经营养因子,其成分为碱性蛋白质<sup>[6]</sup>,在海马组织中表达量最为丰富,并参与了神经元生长发育、分化再生,对激活神经元生理功能等起着重要调节作用<sup>[7-11]</sup>,对记忆功能的促进作用尤为明显<sup>[12-13]</sup>。TrkB是BDNF高亲和力受体,结合后可激活神经细胞内下游级联信号,并与记忆形成和记忆巩固有关<sup>[14-15]</sup>。本研究拟通过脂质体转染构建CREB基因沉默海马神经元细胞系模型,观察其活性及温胆汤含药血清干预下其细胞凋亡情况,考察

其对正常海马细胞和CREB基因沉默海马细胞内BDNF,TrkB,CREB,CAMK II mRNA表达,观察温胆汤是否通过干预BDNF/TrkB/CREB信号通路来改善精神分裂症认知障碍,为深入研究温胆汤含药血清对BDNF/TrkB/CREB信号通路的调控机制奠定基础。

## 1 材料

**1.1 动物** SD雄性大鼠55只,SPF级,体质量(250±20)g,8~10周龄,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,合格证号SCXK(湘)2016-0002。经江西中医药大学实验动物伦理委员会审查(批准号jzllsc2017-1010)。

**1.2 仪器** UV-2450型紫外光度仪(日本Shimadzu公司);Veriti 96型普通梯度聚合酶链式反应(PCR)仪,7500 Fast型实时荧光定量PCR(Real-time PCR)循环仪(美国ABI公司);170-4150型Trans-Blot Turbo全能型蛋白转印系统(美国Bio-Rad公司);BOXChemXR5型凝胶成像系统(英国Syngene公司);THZ-312型台式恒温振荡器(中国上海精宏实验设备有限公司)。

**1.3 药物及试剂** 枳实6g,竹茹6g,法半夏6g,陈

皮9 g,茯苓4.5 g,炙甘草3 g,由江西中医药大学附属医院中药房提供,由江西中医药大学叶喜德副教授鉴定合格。trizol(美国Invitrogen公司,批号15596-026);三氯甲烷,异丙醇(南京化学试剂有限公司);70%乙醇(DEPC处理)(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号KGDN6);0.1%焦碳酸二乙酯(DEPC)水(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号KGDN4500);cDNA第一链合成试剂盒,One Step TB Green™ PrimeScript™ RT-PCR Kit II(日本TaKaRa公司,批号分别为RR036B,RR086B);全蛋白抽提试剂盒,BCA蛋白含量试剂盒,SDS-PAGE凝胶配制试剂盒,预染蛋白分子量Marker(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号分别为KGP250, KGA902, KGP113, KGP441)。

## 2 方法

**2.1 动物分组与给药** 将SD雄性大鼠随机分为温胆汤高、中、低剂量组、氯氮平组、正常组,每组10只,其中正常组15只。适应性饲养6 d后,正常组予20 mL·kg<sup>-1</sup>生理盐水灌胃,氯氮平组予0.02 g·kg<sup>-1</sup>氯氮平原药灌胃,温胆汤高、中、低剂量组分别予质量浓度为2, 1, 0.5 g·mL<sup>-1</sup>的等量温胆汤浓缩生药灌胃,换算为动物给药量为40, 20, 10 g·kg<sup>-1</sup>灌胃, 1次/d,连续灌胃8 d。将大鼠海马细胞分为正常组(无转染海马神经元细胞),正常大鼠血清组,氯氮平组,温胆汤高、中、低剂量组,siRNA组,正常大鼠血清-siRNA组,氯氮平-siRNA组,温胆汤-siRNA高、中、低剂量组。除正常组,siRNA组加胎牛血清

200 μL培养外,其余各组均使用大鼠正常及含药血清培养(200 μL)。

**2.2 温胆汤含药血清制备** 法半夏6 g,枳实6 g,陈皮9 g,竹茹6 g,茯苓4.5 g,炙甘草3 g,生姜5片,大枣1枚。冷水浸泡20 min,第1,2次分别加8倍,6倍量水煎煮,合并2次水煎液,浓缩为2, 1, 0.5 g·mL<sup>-1</sup>生药,4 °C条件下存储,灌胃时需加热至20 °C。第8天给药结束2 h后,各组受试大鼠活体股动脉取血并处死,取血后置于10 mL离心管中,静置2 h,5 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min,倾取上清液,过滤除菌,灭活后4 mL离心管分装,-80 °C保存,备用。

**2.3 大鼠海马神经元细胞系提取及培养** 取乳鼠10只,乙醇擦洗消毒,剥离头皮及颅骨,钝性分离海马组织,预冷磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗3次;木瓜酶消化20~30 min,培养基终止消化;反复吹打以分散细胞;200目滤网过滤,取滤液,离心;加入neurobasal+B27+谷氨酰胺培养基分散细胞,转移至多聚赖氨酸包被的细胞培养瓶中培养;第2天加入5 μmol·L<sup>-1</sup>的阿糖胞苷,采用无血清培养基培养;每隔3 d换液1次,培养20 d。

**2.4 构建稳定CREB mRNA沉默海马神经元细胞系** 通过金斯瑞科技股份有限公司设计3组siRNA序列,引物序列见表1,不同siRNA序列脂质体lip3000转染海马神经元细胞,通过Real-time PCR检测转染后海马神经元细胞CREB mRNA表达的情况,最终确定哪组siRNA序列作为脂质体包裹转染寡聚核苷酸。

表1 siRNA序列

Table 1 Sequence of siRNA

Primer名称	序列(5'-3')	碱基数	合成总量/nmol	纯化方式
siRNA-1	CGUAGAAAGAAGAAAGAAUTT	21	5	HPLC
	AUUCUUUCUUCUUUCUACGTT	21	5	HPLC
siRNA-2	CUGAAGAAGCAGCAGCAAATT	21	5	HPLC
	UUUCGUGCUGCUUCUUCAGTT	21	5	HPLC
siRNA-3	GCAAGAGAAUGUCGUAAGAATT	21	5	HPLC
	UUCUACGACAUUCUCUUGCTT	21	5	HPLC

**2.5 Real-time PCR检测转染后CREB mRNA干扰程度** 按实验步骤依次提取总RNA并测定其含量、合成cDNA,PCR扩增,PCR反应条件为95 °C预变性4 min,95 °C变性15 s,60 °C退火20 s,72 °C延伸40 s,共40个循环。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,cDNA为模板扩增,2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法计算mRNA相对表达量,引物由江苏凯基生物技术股份

有限公司合成,引物序列见表2。

**2.6 Annexin-V FITC/PI双染法检测细胞凋亡** 用PBS洗涤细胞2次(离心1 000 r·min<sup>-1</sup>,5 min)收集5×10<sup>5</sup>个细胞;加入Binding Buffer 500 μL悬浮细胞;加入Annexin V-FITC 5 μL混匀后,加入Propidium Iodide 5 μL,混匀;室温、避光、反应5~15 min;用流式细胞仪检测细胞凋亡的情况,凋亡

表2 PCR引物序列

Table 2 Primer sequence of PCR

引物	序列(5'-3')	长度 /bp	退火温 度/°C
CREB	上游 GAGCAGACAACCAGCAGAGT	83	60
	下游 AATCTGTGGCTGGGCTTGAA		
GAPDH	上游 CAAATTCATGGCACCCTCA	109	60
	下游 AGCATCGCCCCACTTGATT		

率=凋亡细胞数(早凋+晚凋)/总细胞数(早凋+晚凋+坏死+正常)×100%。

**2.7 Real-time PCR检测细胞BDNF, TrkB, CREB, CAMK II mRNA的表达** 取适量各组细胞,按实验步骤依次提取总RNA并测定其含量、合成cDNA,PCR扩增,PCR反应条件为95℃预变性5 min,95℃变性15 s,60℃退火20 s,72℃延伸40 s,共40个循环。以GAPDH为内参,cDNA为模板扩增,2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法计算mRNA相对表达量,引物序列由江苏凯基生物技术股份有限公司合成,见表3。

表3 PCR引物序列

Table 3 Primer sequence of PCR

引物	序列(5'-3')	长度 /bp	退火温 度/°C
BDNF	上游 AGCCTTCATGCAACCGAAGT	90	60
	下游 AGACGAGGAAGGGTGTTC		
CAMK II	上游 TTCCAGGGTCGCACATCTTC	81	60
	下游 AGACACCAAAGTGCACAAAC		
CREB	上游 TTCCAGGGTCGCACATCTTC	107	60
	下游 AGACACCAAAGTGCACAAAC		
TrkB	上游 TACCCATCCAGGGGGATCTT	137	60
	下游 GTCTATGCCGTGGTGGTGAT		
GAPDH	上游 CGCTCCTGGAAGATGGTGATGG	81	60
	下游 CGGCAAGTTCAACGGCACAGT		

**2.8 统计学分析** 采用SPSS 20.0版本进行统计分析,多组间比较应用单因素方差分析,两组间应用t检验,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 不同 siRNA 序列转染海马神经元细胞对 CREB mRNA 沉默表达的影响** 与正常组比较, siRNA-1, siRNA-2, siRNA-3 组 CREB mRNA 表达量均明显降低( $P < 0.05$ ),而 siRNA-1 mRNA 表达量相对 siRNA-2, siRNA-3 较低,提示 siRNA-1 沉默效果较为理想。见表4。基于该实验结果,确定

siRNA-1 作为脂质体包裹转染寡核苷酸。

表4 不同 siRNA 序列转染海马神经元细胞对 CREB mRNA 沉默表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 4 Effect of different siRNA sequences transfection on CREB mRNA silencing in hippocampal neurons ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	CREB
空白	1.00±0.03
正常	1.10±0.17
siRNA-1	0.31±0.03 <sup>1)</sup>
siRNA-2	0.52±0.05 <sup>1)</sup>
siRNA-3	0.58±0.05 <sup>1)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ 。

**3.2 温胆汤含药血清对海马细胞凋亡的影响** 与正常大鼠血清组比较,各组别在24,48 h时,细胞凋亡显著降低( $P < 0.01$ )。与正常大鼠血清-siRNA 组比较,24,48 h 氯氮平-siRNA 组、温胆汤-siRNA 高、中、低剂量组细胞凋亡率显著降低( $P < 0.01$ )。其中,24 h 温胆汤-siRNA 低剂量组凋亡率较氯氮平-siRNA 组明显降低( $P < 0.05$ ),48 h 温胆汤高、低剂量组凋亡率明显较氯氮平-siRNA 组显著下降( $P < 0.01$ )。见表5。

表5 温胆汤含药血清对海马细胞凋亡的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 5 Effect of Wendantang-containing serum on apoptosis of hippocampal cells ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	凋亡率/%	
		24 h	48 h
正常	-	7.80±0.09	6.75±0.07
正常大鼠血清	-	9.59±0.12	11.06±0.14
氯氮平	0.02	7.64±0.05 <sup>2)</sup>	9.02±0.10 <sup>2)</sup>
温胆汤	40	7.23±0.03 <sup>2)</sup>	6.82±0.02 <sup>2)</sup>
	20	7.70±0.08 <sup>2)</sup>	7.14±0.06 <sup>2)</sup>
	10	7.86±0.06 <sup>2)</sup>	9.30±0.05 <sup>2)</sup>
siRNA	-	8.12±0.04 <sup>2)</sup>	7.33±0.06 <sup>2)</sup>
正常大鼠血清-siRNA	-	8.32±0.08 <sup>2)</sup>	11.27±0.08 <sup>1)</sup>
氯氮平-siRNA	0.02	7.33±0.02 <sup>2,4)</sup>	7.98±0.01 <sup>2,4)</sup>
温胆汤-siRNA	40	7.26±0.01 <sup>2,4)</sup>	6.25±0.00 <sup>2,4,6)</sup>
	20	7.28±0.05 <sup>2,4)</sup>	8.05±0.09 <sup>2,4)</sup>
	10	7.99±0.03 <sup>2,4,5)</sup>	8.13±0.07 <sup>2,4,6)</sup>

注:与正常大鼠血清组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与正常大鼠血清-siRNA 组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ ;与氯氮平-siRNA 组比较<sup>5)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>6)</sup> $P < 0.01$ (表6同)。

**3.3 温胆汤含药血清对海马细胞(48 h) CREB, BDNF, TrkB, CAMK II mRNA 表达的影响** 与正常大鼠血清组比较,正常大鼠血清-siRNA 组显著降

低海马细胞 CREB mRNA 的表达 ( $P < 0.01$ ), 与正常大鼠血清-siRNA 组比较, 氯氮平-siRNA 组、温胆汤-siRNA 高、中、低剂量组对 CREB mRNA 的影响差异无明显统计学意义; 与正常大鼠血清组比较, 正常大鼠血清-siRNA 组显著降低 BDNF mRNA 的表达 ( $P < 0.01$ ), 与正常大鼠血清-siRNA 组比较, 氯氮平-

siRNA 组明显升高 BDNF mRNA 的表达 ( $P < 0.05$ ), 温胆汤-siRNA 高、中、低剂量组显著升高 BDNF mRNA 的表达 ( $P < 0.01$ ), 与氯氮平-siRNA 组比较, 温胆汤-siRNA 高、中、低剂量组显著升高 BDNF mRNA 的表达 ( $P < 0.01$ ); TrkB, CaMK II mRNA 的表达各组间差异无明显统计学意义。见表 6。

表 6 温胆汤含药血清对海马细胞(48 h) CREB, BDNF, Trkb, CaMK II mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 6 Effect of Wendantang-containing serum on expression of CREB, BDNF, TrkB and CaMK II mRNA in hippocampal cells (48 h) ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	CREB	BDNF	Trkb	CAMK II
正常	-	1.00±0.03	1.00±0.05	1.00±0.09	1.00±0.06
正常大鼠血清	-	0.97±0.07	0.91±0.06	1.00±0.06	0.99±0.06
氯氮平	0.02	1.05±0.08	1.97±0.10 <sup>2)</sup>	1.11±0.11	1.05±0.08
温胆汤	40	1.02±0.04	3.31±0.13 <sup>2)</sup>	1.01±0.09	1.09±0.12
	20	1.03±0.13	2.95±0.14 <sup>2)</sup>	1.03±0.03	1.13±0.08
	10	0.99±0.11	2.25±0.18 <sup>2)</sup>	1.01±0.11	1.02±0.05
siRNA	-	0.22±0.01 <sup>2)</sup>	0.89±0.07	1.04±0.10	1.12±0.09
正常大鼠血清-siRNA	-	0.20±0.02 <sup>2)</sup>	0.77±0.02 <sup>2)</sup>	1.01±0.10	1.05±0.09
氯氮平-siRNA	0.02	0.20±0.01	1.00±0.07 <sup>3)</sup>	1.02±0.07	1.05±0.08
温胆汤-siRNA	40	0.19±0.01	3.05±0.17 <sup>4,6)</sup>	0.99±0.09	1.09±0.07
	20	0.21±0.02	2.16±0.13 <sup>4,6)</sup>	1.04±0.10	0.99±0.08
	10	0.22±0.01	1.61±0.11 <sup>4,6)</sup>	1.05±0.04	1.13±0.04

#### 4 讨论

精神分裂症主要有阳性症状、阴性症状以及认知功能障碍等三大证候群。其中认知功能障碍是 SCZ 核心症状, 并贯穿于疾病的全过程<sup>[16-17]</sup>。因此, 分析研究导致认知功能障碍的致病因素是探讨精神分裂症的关键环节。CREB 是细胞核内调节基因转录的重要因子, 可通过其靶基因 BDNF, 原癌基因 c-fos, c-fun 以及多种神经肽, 调控海马神经元发生、凋亡相关基因的转录及表达, 增加突触可塑性<sup>[18]</sup>。国外文献报道, 增强 CREB 磷酸化可上调 BDNF 表达, BDNF 与 TrkB 结合激活胞内相关信号通路, 从而提高海马神经元突触活性, 促进其神经发生, 减少其凋亡, 改善空间学习和记忆的损伤<sup>[19-20]</sup>。因此, CREB 与精神分裂症认知障碍的发病密切相关, 可作为精神分裂症认知障碍及其治疗的可靠标记物。温胆汤作为中医治痰名方, 临床多有报道用治由“痰”所致精神、情志有关的思维活动功能异常<sup>[21]</sup>。课题组前期研究证实, 温胆汤可明显改善 MK801 诱发的精神分裂症模型鼠学习记忆的损伤, 降低模型鼠海马组织 NRG1, ErbB4 mRNA 的表达, 从而提高海马神经元之间的信号传导和执行功能, 改善精神分裂症认知障碍<sup>[22-24]</sup>。

本研究发现, CREB 基因沉默海马细胞模型构建较稳定, 沉默组细胞模型给予温胆汤含药血清处理 24, 48 h 后, 温胆汤各组可明显改善 2 个时间段 CREB 基因沉默对海马细胞凋亡。但 CREB 基因未沉默组给药各组, 也出现细胞凋亡率下降, 说明温胆汤可提高正常细胞的生物活性。目前文献主要考察了 24 h mRNA 表达变量, 本课题组分别对 24 和 48 h 的基因表达进行了考察, 但时间是否对实验结果产生决定性的影响, 还有待深入研究。通过对 48 h 细胞模型进行 CREB, BDNF, TrkB, CaMK II mRNA 检测发现, 当 CREB 沉默后, 各组 CREB mRNA 表达量明显下降, 但氯氮平-siRNA 组、温胆汤-siRNA 高、中、低剂量组并未明显提高 CREB mRNA 含量, 提示含药血清干预后, 药物作用靶点可能并非在 CREB 基因转录过程中。而 BDNF mRNA 表达量各给药组均显著高于正常大鼠血清组与正常大鼠血清-siRNA, 表明温胆汤含药血清可以通过提高 BDNF mRNA 表达, 来减少海马细胞模型细胞凋亡, 提示药物靶点可能在 BDNF mRNA 转录过程中产生影响, 但作用机制还需进一步验证。另 TrkB, CaMK II mRNA 表达, 在 CREB mRNA 沉默前、后变化不大, 给药各组干预后虽存在差异, 但

不具统计学意义,说明温胆汤含药血清通过改变 TrkB, CaMK II mRNA 表达量,来抑制 CREB 沉默海马细胞模型细胞凋亡率的可能性较小。依照本研究结果,推测温胆汤含药血清通过促进 BDNF mRNA 表达,来提高 BDNF 蛋白含量,当 BDNF 与 TrkB 结合后,能促使 TrkB 磷酸化,进一步激活海马神经细胞内下游级联信号,从而增强长时记忆形成和记忆巩固。但这种作用机制,还需进行相关因子蛋白表达研究加以验证。希望本文能为温胆汤在认知功能方面的应用提供参考。

[参考文献]

- [1] 张明瑞,秦巧英,陈国华,等. 温胆汤治疗 II 型精神分裂症的临床研究[J]. 中医药导报, 2018, 24(3): 83-85.
- [2] 张德龙. 温胆汤在中医精神内科临床中的运用分析[J]. 当代医学, 2018, 24(2): 96-97.
- [3] 张明瑞,陈国华. 温胆汤在精神科临床中的应用[J]. 中国医药指南, 2018, 16(16): 39-40.
- [4] FIGUROV A, POZZO-MILLER L D, OLAFSSON P. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus[J]. Nature, 1996, 381(6584): 706-709.
- [5] LU B, NAGAPPAN G, LU Y. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction [J]. Neurotrophic Factors, 2014, 220: 223-250.
- [6] BARDE Y A, EDGAR D, THOENEN H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain [J]. EMBO J, 1982, 1(5): 49-53.
- [7] MICHAEL F E, MASAMI K, JOSEPH H C, et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function [J]. Cell, 2003, 2 (112) : 257-269.
- [8] YAMADA K, MIZUNO M, NABESHIMA T. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory[J]. Life Sci, 2002, 70(7): 735-744.
- [9] OCKEL M, LEWIN G R, BARDE Y A. *In vivo* effects of neurotrophin-3 during sensory neurogenesis [J]. Development, 1996, 122(1): 301-307.
- [10] 张志龙, 郜玉钢, 臧埔, 等. 天麻素、对羟基苯甲醇对中枢神经系统作用机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(2): 312-320.
- [11] 石博宇, 饶志粒, 罗杰, 等. 逍遥散对 LPS 所致海马神经元细胞损伤的保护作用及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(4): 781-786.
- [12] LEVINE E S, DREYFUS C F, BLACK I B, et al. Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neurons via postsynaptic tyrosine kinase receptors [J]. Proc Natl Acad Sci, 1995, 92(17): 8074-8077.
- [13] JOVANOVIĆ J N, CZERNIK A J, FIENBERG A A, et al. Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release [J]. Nat Neurosci, 2000, 3 (4) : 323-329.
- [14] MOHAMMADI A, AMOUEIAN V G, RASHIDI E. Dysfunction in brain-derived neurotrophic factor signaling pathway and susceptibility to schizophrenia, parkinson's and Alzheimer's diseases[J]. Current Gene Therapy, 2018, 18(1): 45-63.
- [15] BEKINSCHTEIN P, CAMMAROTA M, IZQUIERDO I, et al. BDNF and memory formation and storage [J]. Neuroscientist, 2008, 14(2): 147-156.
- [16] SHMUKLER A B, GUROVICH I Y, AGIUS M. Long-term trajectories of cognitive deficits in schizophrenia: A critical overview [J]. Eur Psychiatry, 2015, 30(8) : 1002-1010.
- [17] GREEN M F, BEARDEN C E, CANNON T D. Social cognition in schizophrenia, Part 1: performance across phase of illness [J]. Schizophr Bull, 2012, 38 (4) : 854-864.
- [18] IMPEY S, GOODMAN R H. CREB signaling-timing is everything [J]. Science's STKE, 2001, 82(1): 82-85.
- [19] FANG M S, LI X, QIAN H, et al.  $\omega$ -3PUFAs Prevent MK-801-induced cognitive impairment in schizophrenic rats via the CREB/ BDNF /TrkB pathway [J]. J Huazhong Univ Sci Technol, 2017, 37 (4): 491-495.
- [20] LIU H, XUE X H, SHI H J, et al. Oathole upregulates BDNF to enhance adult hippocampal neurogenesis in APP/PS1 transgenic mice [J]. Biol Pharm Bull, 2015, 38(10): 1439-1449.
- [21] 李祖佑. 温胆汤方药分析及临床初探[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(4): 59-61.
- [22] 杨翠萍, 蔡长春, 万红娇, 等. 温胆汤对精神分裂症模型大鼠海马神经元 HFS 反应的影响 [J]. 中药药理与临床, 2011, 27(2): 6-8.
- [23] 朱金华, 田真真, 戎文娟, 等. 温胆汤对精神分裂症大鼠海马组织 NRG1、ErbB4 mRNA 表达及其行为学的影响 [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(3): 2-4.
- [24] 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.

[责任编辑 周冰冰]