

小柴胡汤加味对慢性束缚抑郁模型大鼠海马谷氨酸转运体EAATs, VGLUTs表达的影响

许二平^{1,2}, 毛梦迪^{2,3}, 尚立芝^{1,2*}, 王国强^{1*}, 刘保光^{1,2}, 李耀洋⁴, 白明^{1,2}, 栗俞程^{1,2},
汪保英^{1,2}, 陈晓辉¹

(1. 河南中医药大学 中医药科学院, 郑州 450046; 2. 河南省仲景方药现代研究重点实验室, 郑州 450046; 3. 河南中医药大学 基础医学院, 郑州 450046; 4. 河南中医药大学 第一临床医学院, 郑州 450006)

[摘要] 目的: 观察小柴胡汤加味对慢性束缚抑郁模型大鼠海马谷氨酸膜转运体(EAATs)及囊泡转运体(VGLUTs)表达的影响, 探讨小柴胡汤加味基于谷氨酸转运的抗抑郁机制。方法: 120只SD大鼠随机分为正常组、模型组、小柴胡汤加味组低、中、高剂量组、利鲁唑组, 每组20只。除正常组外, 其余各组采用束缚应激制备大鼠抑郁模型, 小柴胡汤加味低、中、高剂量组分别灌胃(ig)小柴胡汤加味6.5, 13, 26 g·kg⁻¹; 利鲁唑组腹腔注射利鲁唑20 mg·kg⁻¹; 正常组和模型组ig等量生理盐水; 1次/d, 共干预21 d。采用强迫游泳实验(FST)和悬尾实验(TST)评价大鼠的抑郁行为; 采用高效液相色谱法(HPLC)检测海马组织中谷氨酸含量; 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测大鼠海马中EAAT1, EAAT2和EAAT3 mRNA表达; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马组织EAAT1, EAAT2, EAAT3, VGLUT1, VGLUT2蛋白表达; 用尼氏染色法观察大鼠海马神经元形态, 免疫组化(IHC)检测海马CA1区EAAT1, EAAT2和NeuN蛋白在神经细胞中的定位表达。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠悬尾和强迫游泳不动时间均显著延长($P < 0.01$), 海马内EAAT1, EAAT2, EAAT3 mRNA和蛋白表达均显著下降($P < 0.01$), VGLUT1和NeuN蛋白表达均显著降低($P < 0.01$); 而谷氨酸水平和VGLUT2表达均显著增高($P < 0.01$)。与模型组比较, 小柴胡汤加味中、高剂量组大鼠悬尾和强迫游泳不动时间明显缩短($P < 0.05$, $P < 0.01$), 海马内EAAT1, EAAT2和EAAT3 mRNA和蛋白表达量均显著增加($P < 0.01$), VGLUT1和NeuN蛋白表达均显著增强($P < 0.01$), 谷氨酸水平和VGLUT2表达显著回降($P < 0.01$), 海马神经元结构明显复原。结论: 小柴胡汤加味有明显的抗抑郁作用, 其机制可能与其上调大鼠海马内EAAT1, EAAT2, EAAT3基因和VGLUT1蛋白表达。

[关键词] 抑郁症; 小柴胡汤; 酸枣仁汤; 兴奋性氨基酸转运体(EAATs); 谷氨酸囊泡转运体(VGLUTs)

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)23-0027-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202202

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20200916.1601.002.html>

[网络出版日期] 2020-9-17 08:38

Effect of Modified Xiao Chaihutang on Expression of EAATs and VGLUTs in Hippocampus of Chronic Restraint Stress Depression Model Rat

XU Er-ping^{1,2}, MAO Meng-di^{2,3}, SHANG Li-zhi^{1,2*}, WANG Guo-qiang^{1*}, LIU Bao-guang^{1,2}, LI Yao-yang⁴,
BAI Ming^{1,2}, LI Yu-cheng^{1,2}, WANG Bao-ying^{1,2}, CHEN Xiao-hui¹

(1. Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Henan Key Laboratory for Modern Research of Zhongjing Compound Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 3. School of Basic Medical Science, Henan University of

[收稿日期] 20200521(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81973739); 河南省高等学校重点科研项目(20B360011, 21A360020); 河南省教育科学“十三五”规划一般课题([2019]-JKGHYB-0101, [2019]-JKGHYB-0114); 河南省中医药科学研究专项(2019JDZX2121, 2019ZY3048)

[第一作者] 许二平, 博士, 教授, 博士生导师, 从事仲景方药现代研究, Tel: 0371-65680003, E-mail: xuerping@sina.com

[通信作者] * 尚立芝, 硕士, 教授, 硕士生导师, 从事中医药作用机制研究, Tel: 0371-86253082, E-mail: lzshang2014@163.com;

* 王国强, 博士, 助理研究员, 从事中医药免疫药理研究, E-mail: biowgq@126.com

Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 4. The First Clinical School of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of modified Xiao Chaihutang on the expressions of excitatory amino acid transporters (EAATs) and vesicle glutamate transporters (VGLUTs) in hippocampus of rats with chronic depression, in order to explore the anti-depressant mechanism of modified Xiao Chaihutang based on glutamate transport. **Method:** A total of 120 SD rats were randomly divided into normal group, model group, and low, middle and high-dose modified Xiaochaihutang groups ($6.5, 13, 26 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and riluzole group, with 20 rats in each group. Except normal group, the depression model of rats was prepared through Chronic restraint stress (CRS). The normal group and the model group were intragastrically (*ig*) given normal saline. The modified Xiao Chaihutang groups were intragastrically given corresponding herbal drugs ($6.5, 13, 26 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and the Riluzole group was given Riluzole $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ through intraoeritoneal injection for 21 days, once a day. Then the depressive behaviors of rats were observed by forced swimming test (FST) and tail suspension test (TST). The level of glutamic acid (Glu) in rats hippocampus was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The mRNA expressions of EAAT1, EAAT2 and EAAT3 in hippocampus were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) method. Western blot was used to detect the protein expressions of EAAT1, EAAT2, EAAT3, VGLUT1 and VGLUT2 in rat hippocampus tissue. Nissl staining was used to observe the morphology of hippocampal neurons in rats. Immunohistochemical (IHC) S-P method were used to detect the location expressions of EAAT1, EAAT2 and NeuN proteins in rat hippocampal CA1 region tissue. **Result:** The immobility times in FST and TST were increased significantly ($P < 0.01$), the mRNA and protein expressions of EAAT1, EAAT2, EAAT3 were decreased significantly ($P < 0.01$), and as well as the expressions of VGLUT1 and NeuN were decreased significantly ($P < 0.01$), while the level of Glutamate and the expression of VGLUT2 were increased significantly ($P < 0.01$) in model group, compared with normal group. Compared with model group, the immobility times in FST and TST were decreased significantly ($P < 0.05, P < 0.01$), mRNA and protein expressions of EAAT1, EAAT2, EAAT3 were increased significantly ($P < 0.01$), and expressions of VGLUT1 and NeuN were increased significantly ($P < 0.01$). However, the level of Glutamate and the expression of VGLUT2 were decreased significantly ($P < 0.01$), and the damage of hippocampal neurons in rats was mild in middle and high-dose modified Xiao Chaihutang groups. **Conclusion:** Modified Xiao Chaihutang has an anti-depressive effect. Its mechanism may be related to its up-regulation of expressions of EAAT1, EAAT2, EAAT3 genes and VGLUT1 protein in the hippocampus of depression model rats.

[Key words] depression; Xiao Chaihutang; Suanzaoren tang; excitatory amino acid transporters (EAATs); vesicle glutamate transporters (VGLUTs)

抑郁症是以显著、持久的心境低落,兴趣丧失,睡眠紊乱,食欲下降等为特征的慢性精神障碍类疾病,长期持续的抑郁可导致严重的认知和运动功能障碍,位居失能性疾病首位^[1]。但目前抑郁症的病因和发病机制不清。临床广泛应用的主要针对单胺类神经递质的药物存在起效慢,有效率不足70%,停药后复发等问题^[2],可能还存在其他抑郁的机制。神经元合成的谷氨酸,经囊泡谷氨酸转运体(VGLUTs)转入并贮存于囊泡中,突触前膜释放的谷氨酸(Glu),通过Glu受体发挥作用后,被位于神

经细胞膜的兴奋性氨基酸转运体(EAATs)摄取,灭活,避免发生兴奋性氨基酸毒性^[3]。研究发现Glu系统异常与抑郁症发病有一定的关系^[4]。

抑郁症属于中医“郁证”范畴。小柴胡汤加味是在《伤寒论》中小柴胡汤原方和《金匱要略》中酸枣仁汤的基础上加减组合而成。抑郁症临床表现为烦躁、失眠、焦虑、恶心、食欲不佳等症状,契合小柴胡汤证之“嘿嘿不欲饮食”“心烦喜呕”及酸枣仁汤证之“虚劳虚烦不得眠”^[5]。本研究兼采小柴胡汤与酸枣仁汤之长,加减而成小柴胡汤加味。该方诸

药合用,邪气得解,少阳得和,共奏疏肝解郁,清热除烦,宁心安神之效^[6-7]。但其药理机制不清。

本实验旨在观察小柴胡汤加味对慢性束缚应激抑郁模型大鼠海马 Glu 及其膜转运体 1(EAAT1), EAAT2, EAAT3 mRNA 表达,以及囊泡转运体 1(VGLUT1),VGLUT2 蛋白表达的影响,探讨小柴胡汤加味基于 Glu 转运的抗抑郁机制。

1 材料

1.1 动物 健康 SD 雄性大鼠,SPF 级,体质量(200±20)g,6 周龄,购自购自河南省实验动物中心,实验动物生产合格证号 SCXK(豫)2017-0001,动物质量合格证号 NO.41003100006058。动物饲料 A 级,购自河南省实验动物中心,质量合格证号 NO.41000100004370,生产合格证号 SCXK(豫)2015-0005。实验动物使用许可证号 SYXK(豫)2015-0005,经河南中医药大学实验动物伦理委员会审核实验动物伦理审查批准编号 DWLL2017010032。

1.2 药物及试剂 小柴胡汤加味由北柴胡(批号 18051111)30 g,黄芩(批号 18081431),人参片(批号 1701120),清半夏(批号 18032321),炙甘草(批号 18062091),生姜(批号 18021811)各 9 g,大枣 10 g,酸枣仁(批号 18031151)15 g,茯苓(批号 18041411)6 g,知母(批号 1710039)6 g,川芎(批号 18041331)6 g 等组成,以上均为江阴天江药业有限公司生产的中药配方颗粒。利鲁唑片(每片含利鲁唑 50 mg,江

苏恩华药业股份有限公司,批号 20180119);Glu 对照品,苏木素(美国 Sigma 公司,批号分别为 20181012, H9627);兔抗 EAAT1, EAAT2, EAAT3, VGLUT1, VGLUT2 和 NeuN 多克隆抗体(美国 Thermo Scientific 公司,批号分别为 UF2796539, UH2830003, VB2945584, TI275038, RJ2268071, TA2514052C);兔抗大鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(上海康成生物工程有限公司,批号 1202);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 二抗(美国 Abnova 公司,批号 301005);RIPA 裂解液,BCA 蛋白定量试剂盒,超敏 ECL 发光试剂盒,彩色预染蛋白质相对分子质量 Maker(上海威奥生物科技有限公司,批号分别为 WB0101, WB0125, WB2164, WB0173);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国 Millipore 公司,批号 IPVH00010);即用型 SABC, DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为 10L18B, K163323C);伊红(国药集团化学试剂有限公司,批号 71014544);尼氏染色试剂盒(亚甲蓝法,北京索莱宝生物科技有限公司,批号 20170715);总 RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号 DP419];反转录试剂盒和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司,批号分别为 RR037A, RR037A];EAAT1, EAAT2, EAAT3, GAPDH 的 PCR 引物由生工生物工程(上海)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	长度/bp
EAAT1	上游 5'-GC-CATCATGAGATTGGTAGCGGT-3'	187
	下游 5'-GGAAGTAGAGGAGAGGCAGGACGA-3'	
EAAT2	上游 5'-TGGCTGCTGGATAGAATGAC-3'	161
	下游 5'-TCGTCATAAATGGACTGCGT-3'	
EAAT3	上游 5'-ACCGCGTGTATTATTCGCAACTGAATTCAAGA-3'	132
	下游 5'-GATTCAGTTGCGCAATAAACACGCTTTTTTG-3'	
GAPDH	上游 5'-CAACTCCCTCAAGATTGTGTCAGCAA-3'	128
	下游 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'	

1.3 仪器 zk-gd1 型大鼠固定器(河南智科弘润环保科技有限公司);LW211 型 Morris 水迷宫(中国医学科学院药物所);DU640 型紫外分光光度计(美国 Beckman 公司);U-3000 型高效液相色谱仪(德国 Thermo Fisher Scientific 公司);Powerwave XS 型波长扫描酶标仪(美国 BioTek 公司);272007028 型

Real-time PCR 仪(美国 Applied biosystems 公司);Powerpac Universal 通用型电泳仪(美国伯乐公司);Leica EG1150 ST5020 型自动包埋机和 LEICA RM 2265 型全自动轮转切片仪(德国 Leica 公司);20486 型显微摄像仪(日本 Tokyo 公司);BX51 型荧光显微镜及病理图像分析系统(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 模型制备与分组 慢性束缚刺激(CRS)制备抑郁大鼠模型^[8],大鼠适应性饲养5 d后,先随机选取20只大鼠为正常组;其余100只用于造模。除正常组外,将造模大鼠置于大鼠束缚固定器内,每天给予束缚应激1次,每次6 h禁食,禁水,于9:00~15:00进行,应激结束后,将大鼠放回笼中孤养,自由进食和饮水,连续21 d造模完成。将100只造模大鼠随机平均分为模型组,小柴胡汤加味低、中、高剂量组和利鲁唑组,每组20只。

2.2 给药 从实验第22~42天,每天束缚应激30 min后,小柴胡汤加味低、中、高组分别灌胃(*ig*)6.5, 13, 26 g·kg⁻¹;利鲁唑组腹腔注射20 mg·kg⁻¹[9];正常组和模型组等体积生理盐水*ig*, 1次/d。

2.3 行为学检测 每组随机抽取10只大鼠,于给药21 d进行行为学检测。

2.3.1 强迫游泳实验(FST) 正式实验前1 d先预实验训练游泳,将大鼠置于高约70 cm,直径30 cm的透明玻璃圆桶中,水深为40 cm,水温(25±5) °C,使大鼠上不能跳出水槽,下直立不能触及底部。正式强迫游泳实验用摄像机记录其6 min游泳过程,并对最后4 min内的不动(漂浮,上身不动,下肢踩水算作不动)的时间进行统计。

2.3.2 悬尾实验(TST) 用透明胶带在离尾部尾端约1 cm处将大鼠尾巴黏附悬挂在固定铁架上,头向下倒立。大鼠头部距底面约20 cm。录像6 min,计算最后4 min内大鼠不动的时间。

2.4 标本制备 实验第43天取材。每组先随机选取10只大鼠用于形态学观察,10%水合氯醛腹腔注射麻醉,开胸,从心尖至升主动脉插入灌注针头,灌注多聚甲醛至大鼠全身僵直,无菌断头取脑,剥离海马,4%多聚甲醛溶液中固定24 h,常规石蜡包埋,切片厚8 μm,用于苏木素-伊红(HE)染色,尼氏染色及免疫组化。每组余下10只大鼠用于分子生物学检测,腹腔麻醉,腹主动脉取血后,断头取全脑,在超净台冰面上迅速分离海马,放入提前标记,预冷的1.5 mL灭菌冻存管中,快速液氮冷冻,-80 °C冰箱储存备用,用于海马组织中Glu含量测定,Real-time PCR及蛋白免疫印迹法(Western blot)等检测。

2.5 高效液相色谱(HPLC)检测海马组织匀浆中Glu含量 取冷冻保存的海马组织20 mg,加预冷的生理盐水置匀浆器中,加90%乙醇适量,冷冻环境下制成10%组织匀浆,4 °C,12 000 r·min⁻¹离心15 min,取上清液,在80 °C水浴中蒸干除去乙醇,经

0.22 μm滤膜过滤。采用HPLC测定海马组织Glu水平。按照说明书配制Glu对照品溶液做对照。HPLC检测条件为Quattro 3 C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相0.05 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液-甲醇(80:20);流速1.0 mL·min⁻¹;进样量20 μL;柱温30 °C。紫外检测波长360 nm,梯度洗脱。以峰面积为纵坐标Y,进样质量浓度(mg·L⁻¹)为横坐标X,绘制标准曲线,检测线性范围,进行线性回归。用仪器自带软件,计算各组Glu质量浓度(mg·L⁻¹),并根据海马组织质量换算为μg·g⁻¹(prot)。

2.6 Real-time PCR检测海马匀浆中EAAT1, EAAT2和EAAT3 mRNA表达 trizol抽提总RNA,紫外分光光度计测得吸光度A_{260 nm/280 nm}在1.8~2.0,检测RNA的浓度与纯度值。将RNA反转录成cDNA,按逆转录试剂盒说明书配制cDNA合成所需的反应体系,普通PCR仪中合成cDNA:25 °C 5 min,42 °C 60 min;4 °C 10 min。取所得的cDNA 2 μL,用20 μL反应体系中PCR扩增,反应条件95 °C预变性1 min;95 °C变性15 s,60 °C退火延伸30 s,40个循环。采用仪器自带软件,对扩增曲线,溶解曲线进行数据分析,获取C_t值。计算各实验组2^{-ΔΔC_t}值,求得目的基因相对于GAPDH mRNA表达量。

2.7 Western blot检测海马组织VGLUT1和VGLUT1蛋白表达 取大鼠海马组织,称质量,放入匀浆器中,按比例加入组织蛋白裂解液,超声破碎仪匀浆,4 °C,1万r·min⁻¹离心10 min,提取上清液。用BCA蛋白浓度检测试剂盒测定总蛋白浓度,计算出所需的蛋白量。以GAPDH为内参进行电泳。提取蛋白按比例加4次×上样缓冲液,煮沸10 min后,进行聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳。电泳后,蛋白转至PVDF膜,用5%脱脂牛奶4 °C过夜,封闭PVDF膜。兔抗大鼠EAAT1(1:1 000),EAAT2(1:1 000),EAAT3(1:250)抗体,兔抗大鼠VGLUT1(1:500)和VGLUT1(1:500)单克隆抗体及兔抗大鼠GAPDH多克隆抗体(1:2 000),4 °C孵育过夜。TBS液洗涤PVDF膜3次×10 min,而后分别滴加山羊抗兔HRP酶标记的IgG(1:5 000),室温孵育2 h。TBS液洗膜,ECL显影,Image-ProPlus 6.0软件分析蛋白条带灰度值,进行蛋白半定量分析。

2.8 尼氏染色法观察海马神经元的形态 将海马组织蜡块切片厚6~8 μm,二甲苯脱脂,于甲苯胺蓝(1%)溶液中室温浸染20 min,蒸馏水浸洗5 min,梯度乙醇浸泡脱水(依次为70%乙醇,2 min;95%乙

醇, 5 min; 无水乙醇, 3 min。), 二甲苯透明剂2次, 5 min/次, 中性树胶封片。400倍光镜下观察海马CA1区神经元。

2.9 HE染色观察海马CA1区组织病理形态学改变 将海马CA1区组织置于4%多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇脱水, 苏木素染色, 水洗, 盐酸乙醇分化, 水洗蓝化, 伊红染色, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 显微镜观察。

2.10 免疫组化检测海马CA1区EAAT1, EAAT2表达 常规二甲苯脱蜡至水化, 3% H_2O_2 封闭, 微波修复抗原, 加兔抗大鼠EAAT1, EAAT2一抗, 4℃过夜, 加生物素化山羊抗兔二抗, 加SABC工作液, DAB显色, 苏木素复染, 烤片, 封片。以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照, 以已知阳性片作阳性对照。以棕黄色颗粒为阳性表达, 每张切片选取海马CA1区10个不重叠高倍视野($\times 400$), 采用显微图像分析系统, 计算每张切片阳性着色积分吸光度IA。

2.11 统计学处理 应用统计软件SPSS 25.0统计分析, 定量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对抑郁大鼠TST和FST的影响 与正常组比较, 模型组TST和FST不动时间显著延长($P < 0.01$); 与模型组比较, 利鲁唑和小柴胡汤加味高、中、低剂量组TST和FST不动时间明显缩短($P < 0.05$, $P <$

0.01)。见表2。

表2 小柴胡汤加味对抑郁大鼠TST和FST的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)
Table 2 Effect of modified Xiao Chaihutang on TST and FST experiment behaviour result of each group rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	TST	FST
正常	-	101.38 \pm 21.31	81.51 \pm 20.32
模型	-	189.21 \pm 25.76 ¹⁾	151.91 \pm 23.31 ¹⁾
小柴胡汤加味	6.50	158.32 \pm 27.63 ²⁾	131.76 \pm 24.37 ²⁾
	13.00	142.54 \pm 23.72 ³⁾	120.45 \pm 21.34 ²⁾
	26.00	132.56 \pm 25.43 ³⁾	98.82 \pm 23.41 ³⁾
利鲁唑	0.02	131.78 \pm 22.71 ³⁾	111.54 \pm 14.30 ³⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (表3~5同)。

3.2 对抑郁大鼠海马组织中Glu含量的影响 与正常组比较, 模型组海马Glu含量显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 小柴胡汤加味高、中、低剂量组Glu含量明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 差异有明显统计学意义。见表3。

3.3 对抑郁大鼠海马组织中EAAT1, EAAT2和EAAT3 mRNA表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠海马内EAAT1, EAAT2和EAAT3 mRNA表达均显著降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 小柴胡汤加味中、高剂量组, 利鲁唑组大鼠海马EAAT1, EAAT2和EAAT3 mRNA表达均显著提高($P < 0.01$)。见表3。

表3 小柴胡汤加味对抑郁大鼠海马组织Glu含量, EAAT1, EAAT2和EAAT3 mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of modified Xiao Chaihutang on glutamic acid content, expression of AAT1, EAAT2 and EAAT3 mRNA in hippocampus of depression rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	Glu/ $\mu g \cdot g^{-1}$	EAAT1 mRNA	EAAT2 mRNA	EAAT3 mRNA
正常	-	203.23 \pm 29.35	1.45 \pm 0.13	1.59 \pm 0.15	0.55 \pm 0.13
模型	-	281.25 \pm 31.27 ¹⁾	0.81 \pm 0.05 ¹⁾	1.01 \pm 0.11 ¹⁾	0.12 \pm 0.01 ¹⁾
小柴胡汤加味	6.50	262.43 \pm 34.25 ²⁾	0.94 \pm 0.03	1.11 \pm 0.12	0.13 \pm 0.02
	13.00	243.18 \pm 24.51 ³⁾	1.22 \pm 0.12 ³⁾	1.38 \pm 0.12 ³⁾	0.26 \pm 0.03 ³⁾
	26.00	244.23 \pm 23.47 ³⁾	1.32 \pm 0.14 ³⁾	1.41 \pm 0.13 ³⁾	0.30 \pm 0.02 ³⁾
利鲁唑	0.02	245.23 \pm 22.31 ³⁾	1.08 \pm 0.11 ³⁾	1.21 \pm 0.13 ³⁾	0.32 \pm 0.02 ³⁾

3.4 对抑郁大鼠海马EAAT1, EAAT2, EAAT3, VGLUT1和VGLUT1蛋白表达水平的影响 与正常组比较, 模型组大鼠海马内EAAT1, EAAT2, EAAT3, VGLUT1和VGLUT1蛋白表达均显著降低($P < 0.01$), VGLUT2表达显著升高($P < 0.01$)。与模

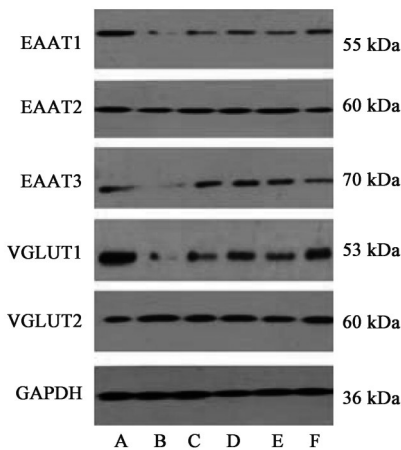
型组比较, 小柴胡汤加味中、高剂量组大鼠海马内EAAT1, EAAT2, EAAT3和VGLUT1蛋白表达量均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表4, 图1。

3.5 对抑郁大鼠海马CA1区组织结构的影响 正常组海马CA1区神经元结构完整, 极性明显, 可见

表 4 小柴胡汤加味对抑郁大鼠海马组织 EAAT1, EAAT2, EAAT3, VGLUT1 和 VGLUT2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab. 4 Effect of modified Xiao Chaihutang on expression of EAAT1, EAAT2, EAAT3, VGLUT1 and VGLUT2 protein in hippocampus of depression rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	EAAT1/GAPDH	EAAT2/GAPDH	EAAT3/GAPDH	VGLUT1/GAPDH	VGLUT2/GAPDH
正常	-	0.94±0.03	1.32±0.11	0.41±0.01	2.14±0.31	0.45±0.02
模型	-	0.51±0.02 ¹⁾	0.82±0.15 ¹⁾	0.11±0.01 ¹⁾	0.51±0.12 ¹⁾	2.14±0.23 ¹⁾
小柴胡汤加味	6.50	0.55±0.04	0.87±0.16	0.12±0.02	0.64±0.14	1.75±0.31 ²⁾
	13.00	0.68±0.12 ²⁾	1.08±0.12 ³⁾	0.21±0.02 ³⁾	1.25±0.23 ³⁾	1.02±0.21 ³⁾
	26.00	0.71±0.11 ²⁾	1.14±0.13 ³⁾	0.31±0.04 ³⁾	1.65±0.18 ³⁾	1.01±0.23 ³⁾
利鲁唑	0.02	0.62±0.12	1.06±0.13 ³⁾	0.15±0.03 ³⁾	1.75±0.21 ³⁾	1.05±0.34 ³⁾



A. 正常组; B. 模型组; C. 小柴胡汤加味低剂量组; D. 小柴胡汤加味中剂量组; E. 小柴胡汤加味高剂量组; F. 利鲁唑组(图 2~6 同)

图 1 大鼠海马组织 EAAT1, EAAT2, EAAT3, VGLUT1 和 VGLUT2 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of EAAT1, EAAT2, EAAT3, VGLUT1 and VGLUT2 protein expression in hippocampus of depression rats

细胞排列整齐致密, 细胞形态规则, 细胞间隙均匀, 核仁清晰。与正常组比较, 模型组海马 CA1 区神经元有的萎缩, 部分肿胀接近球形, 肿胀的神经元胞浆浅染呈空泡状, 细胞核呈固缩, 碎裂或溶解, 神经元坏死较多, 细胞层数减少, 排列疏松。与模型组比较, 小柴胡汤加味中、高剂量组和利鲁唑组海马 CA1 区神经元的数量均增加, 细胞排列较紧密, 细胞层数增多。见图 2。

3.6 对抑郁大鼠海马 CA1 区神经元尼氏染色的影响 正常组海马 CA1 区锥体细胞排列整齐密集, 细胞大小比较均匀, 细胞结构完整, 胞质染色较深, 细胞核饱满, 核大而圆, 核膜边界明显, 核仁清晰, 胞质内可见丰富的尼氏小体。与正常组比较, 模型组海马 CA1 区体神经元层数明显减少, 密度显著下降, 细胞排列松散紊乱, 大部分神经元胞体肿胀, 胞质中尼氏小体少, 胞质着色变浅, 呈空泡状, 少数细

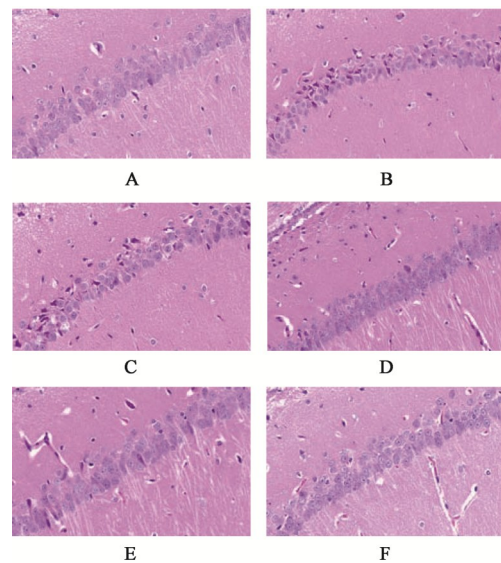


图 2 小柴胡汤加味对抑郁大鼠海马 CA1 区组织病理学的影响 (HE, × 400)

Fig. 2 Effect of modified Xiao Chaihutang on histopathology of hippocampus CA1 in depression rats (HE, × 400)

胞皱缩, 有核固缩, 核碎裂, 核溶解现象。小柴胡汤加味中、高剂量组和利鲁唑组海马 CA1 区神经元密度均显著升高, 胞体形状, 大小恢复较好, 胞质着色较模型组深, 核圆, 可见较多尼氏小体。见图 3。

3.7 对抑郁大鼠海马组织 CA1 区 EAAT1, EAAT2 和 NeuN 蛋白定位表达的影响 EAAT1, EAAT2 和 NeuN 蛋白阳性信号呈黄色, EAAT1, EAAT2 阳性表达于海马 CA1 区神经元, 神经胶质细胞膜及胞质中(图 4~5), NeuN 阳性表达于大鼠海马 CA1 区神经元胞质及胞核, 呈棕黄色或者黄色颗粒(图 6)。与正常组比较, 模型组大鼠海马组织中 EAAT1, EAAT2 和 NeuN 蛋白的表达均显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 小柴胡汤加味各组 and 利鲁唑组 EAAT2 和 NeuN 蛋白的表达均显著增强 ($P < 0.01$)。见表 5。

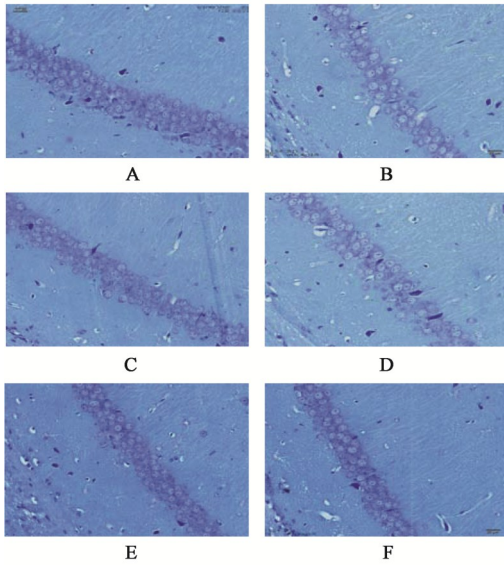


图3 小柴胡汤加味对抑郁大鼠海马CA1区神经元尼氏染色的影响(尼氏, ×400)

Fig. 3 Effect of modified Xiao Chaihutang on Nissl staining in hippocampal CA1 area in depression rats(Nissl, ×400)

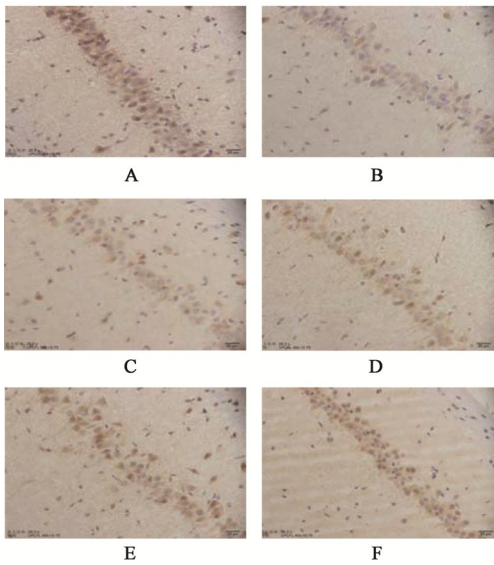


图4 小柴胡汤加味对CUMS大鼠海马CA1区EAAT1蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 4 Effect of modified Xiao Chaihutang on expression of EAAT1 protein in hippocampus tissue of depression rats (IHC, ×400)

4 讨论

慢性束缚应激诱导抑郁模型的行为学评价。本实验采用慢性束缚应激21 d^[8],强迫游泳实验和悬尾实验检测抑郁行为^[10-11],结果显示,与正常组相比,模型大鼠悬尾,强迫游泳不动时间显著延长,其行为能力下降,精神消沉,表现出典型的抑郁样“绝望”行为,提示造模成功。慢性束缚应激以非损伤性刺激方式,较好的模拟人类心理压力,挫折,孤

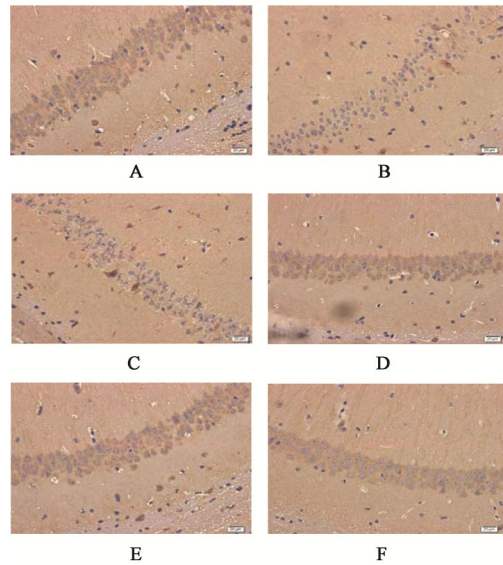


图5 小柴胡汤加味对抑郁大鼠海马CA1区EAAT2蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 5 Effect of modified Xiao Chaihutang on expression of EAAT2 protein in hippocampus tissue of depression rats (IHC, ×400)

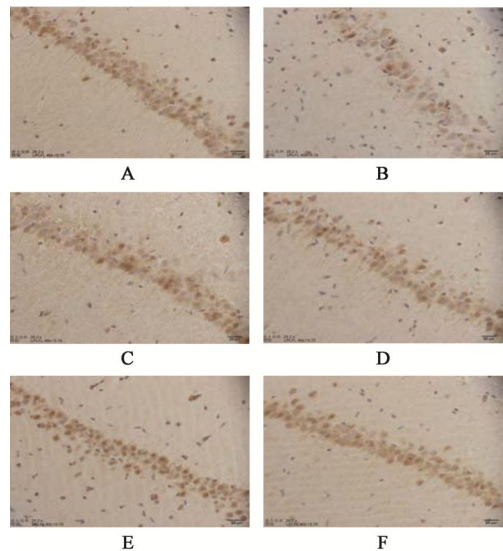


图6 小柴胡汤加味对抑郁大鼠海马CA1区NeuN蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 6 Effect of modified Xiao Chaihutang on expression of NeuN protein in hippocampus tissue of depression rats(IHC, ×400)

独等不利的生活处境,与应激导致的持境久心低落,兴趣丧失,活动减少等抑郁特征相似。

慢性束缚应激抑郁模型大鼠海马的结构明显损伤。光镜下发现,模型组大鼠海马CA1区体神经元密度显著下降,细胞排列松散紊乱,细胞由多极形状因肿胀近于球形。胞质中尼氏体减少甚至消失,胞质着色浅,呈空泡状,说明神经元发生细胞水肿。少数细胞皱缩,有核固缩,核碎裂,核溶解等细

表 5 小柴胡汤加味对抑郁大鼠海马 CA1 区 EAAT1, EAAT2 和 NeuN 蛋白定位表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 5 Effect of modified Xiao Chaihutang on expression of EAAT1, EAAT2 and NeuN protein in hippocampal CA1 tissue of depression rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	EAAT1	EAAT2	NeuN
正常	-	71.51±15.15	83.71±15.21	49.50±3.22
模型	-	43.56±12.05 ²¹	45.76±12.14 ¹⁾	10.23±1.42 ¹⁾
小柴胡汤加味	6.50	46.23±13.26	50.22±13.14 ²⁾	17.35±1.37 ²⁾
	13.00	50.73±15.17	64.58±11.11 ³⁾	32.22±1.45 ³⁾
	26.00	51.57±12.36	65.17±12.34 ³⁾	33.25±1.36 ³⁾
利鲁唑	0.02	52.43±13.02	61.24±12.17 ²⁾	45.41±1.25 ³⁾

胞坏死的标志性改变。形态学改变证明了应激导致的抑郁状态下的神经细胞不同程度的变性, 坏死^[12]。NeuN 是中枢神经系统成熟神经元的标志物, 表达于大部分神经元, 以其表达强度评判神经元损伤的程度^[5]。本实验模型组 NeuN 表达较正常组显著减弱, 说明模型组成熟神经元大量丢失。

慢性束缚应激抑郁模型海马 Glu 含量及其转运异常。Glu 是中枢神经系统中重要的兴奋性神经递质, 细胞质中合成的 Glu 主要依赖 VGLUT1 特异性地转入囊泡, 储存于突触囊泡中。囊泡中的 Glu 主要由囊泡膜上的 VGLUT2 以胞吐的形式释放到突触间隙与 Glu 受体结合发挥生理作用^[13]。突触间隙内缺乏降解 Glu 的酶, 释放到突触间隙的 Glu, 迅速被邻近神经胶质细胞膜的 EAAT1, EAAT2 摄取, 在谷氨酰胺合成酶作用下, 生成谷氨酰胺而使 Glu 失去活性^[14]。突触前神经元由 EAAT2, 突触后神经元由 EAAT3 再摄取 Glu, 在胞内谷氨酰胺再脱氨生成的 Glu 经 VGLUT1 重新装入囊泡中, 完成 Glu 循环。Glu 正常的循环对于维持突触的可塑性, 思维, 学习与记忆等功能具有重要意义^[15]。应激, 免疫系统激活, 炎症等使脑内 Glu 含量异常增多, 或再摄取受抑制, 释放与再摄取的平衡被打破, 高浓度的 Glu 过度激动 Glu 受体, 导致 Ca²⁺ 内流激增, 大量钙盐沉积于线粒体, 造成呼吸链中断, 启动细胞凋亡; 钙超载激活对 Ca²⁺ 敏感的各种酶类, 产生氧自由基, 溶酶体损害, 破坏细胞膜及其超微结构, 使神经元变性乃至死亡, 即产生兴奋神经毒性作用^[14], 造成学习记忆障碍, 从而导致抑郁。本研究经 Real-time PCR, Western blot 和免疫组化检测发现, 与正常组比较, 模型组大鼠海马组织中 VGLUT1, EAAT1, EAAT2 和 EAAT3 蛋白的表达均显著减弱, 与文献报道一致^[16-20]。模型组 Glu 含量显著高于正常组, 这可能因慢性束缚应激刺激模型组 Glu 转运体 VGLUT1 低表达, 使胞质的 Glu 转入囊泡减少; 而 EAAT1,

EAAT2 和 EAAT3 表达减弱, 也削弱了对突触间隙 Glu 的摄取, 清除, 致使海马内 Glu 蓄积, 神经元变性甚至坏死, 导致学习和记忆能力下降, 抑郁行为明显, 行为学检测显示模型组强迫游泳, 悬尾不动时间较正常组均显著延长予以佐证。但模型组 VGLUT2 蛋白表达显著高于正常组, 与文献报道一致^[21]。可能模型组高表达的 VGLUT2 促进细胞内的 Glu 以胞吐的形式释放到突触间隙, 提高了胞外 Glu 的水平。至于模型组神经细胞在受损状态下, 为何出现 VGLUT2 高表达, 解释不清, 可能抑郁模型大鼠海马发生 Glu 转运体表达紊乱。

临床多以小柴胡汤加酸枣仁汤治疗抑郁症, 但其药理机制目前不清。抑郁症属于中医的郁证, 郁证基本病机为情志不遂导致的肝郁气滞。肝主调达疏泄, 情志不遂致肝失疏泄, “愁忧者, 气闭塞而不行”, 气机紊乱, 肝气郁结, 小柴胡汤主之。木郁克土可导致脾胃虚弱, 虚烦虚劳不得眠, 酸枣仁汤主之。“见肝之病, 知肝传脾”, 以肝克脾, 脾脏损伤, 清气不升, 营血失养, 致心血不足, 易惊失眠等, 治宜疏肝健脾, 养血安神^[22], 多以小柴胡汤加酸枣仁汤治疗^[7, 23]。小柴胡汤加味是在《伤寒论》中小柴胡汤原方和《金匱要略》中酸枣仁汤的基础上加减组合而成, 有北柴胡、黄芩、人参片、清半夏、炙甘草、大枣、生姜、酸枣仁、茯苓, 知母共 10 味药。方中柴胡为君药, 味苦微寒, 归肝经, 能直入少阳, 解郁疏肝, 调达气机之壅滞; 黄芩可去肝胆之火, 清泻邪热; 清半夏味辛温, 可助君药柴胡疏达经气; 生姜、大枣和胃气, 调营卫; 人参片、甘草片扶正气以驱邪气; 酸枣仁甘酸质润, 宁心安神, 养血补肝; 知母滋阴润燥, 清热除烦; 茯苓健脾宁心, 善治惊悸失眠。诸药合用, 邪气得解, 少阳得和, 共奏疏肝解郁, 清热除烦, 宁心安神之效抑郁症在临床上的表现与小柴胡汤证及酸枣仁汤证一致, 故本研究兼采小柴胡汤与酸枣仁汤之长, 加减而成小柴胡汤加味方。但

目前涉及小柴胡汤,酸枣仁汤对Glu系统的研究较少。

小柴胡汤加味通过促进Glu的转运与清除,发挥对海马神经元结构与功能的保护作用。本实验发现,与模型组比较,利鲁唑组Glu水平显著降低,而EAAT1,EAAT2 mRNA表达显著增高,EAAT2,VGLUT1蛋白表达显著增高。利鲁唑抑制海马CA1区Glu的释放,并通过增加星形胶质细胞EAAT2的表达而加快Glu的转运^[24-26]。小柴胡汤加味中、高剂量组海马匀浆中Glu水平减低,而EAAT1,EAAT2,EAAT3 mRNA和蛋白的表达均显著高于模型组,VGLUT1蛋白表达亦显著高于模型组,VGLUT2蛋白表达较模型组显著回落。提示小柴胡汤加味通过上调EAAT1,EAAT2,EAAT3 mRNA表达,增强VGLUT1蛋白表达,提升对胞外Glu的转运,同时加强胞内对Glu的代谢清除,致使Glu水平降低,避免神经兴奋毒性,保护海马神经元的结构。HE,尼氏染色证实,利鲁唑组,小柴胡汤加味组中、高剂量组海马CA1区神经元密度均明显升高,胞体形状,大小恢复较好,胞质着色较模型组深,核圆,可见较多尼氏小体。免疫组化显示,小柴胡汤加味各组NeuN表达显著高于模型组,提示小柴胡汤加味可促进神经元的分化与成熟。小柴胡汤加味组抑郁行为显著减轻,佐证了小柴胡汤加味对海马神经元的功能的保护作用。

综上所述,小柴胡汤加味对慢性束缚抑郁大鼠有抗抑郁作用,其机制可能上调海马EAAT1,EAAT2,EAAT3 mRNA和VGLUT1蛋白表达,促进Glu的转运与清除,保护海马神经元的结构与功能,进而改善抑郁行为。

[参考文献]

[1] FANG X, ZHANG C, WU Z, et al. The association between somatic symptoms and suicidal ideation in Chinese first-episode major depressive disorder[J]. *J Affect Disord*, 2019, 245(2): 17-21

[2] RUSH A J, TRIVEDI M H, WISNIEWSKI S R, et al. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR-D report[J]. *Am J Psychiatry*, 2006, 163(11): 1905-1917.

[3] LINDSTROM, SARAH H, SUNDBERG, et al. VGLUT1 deficiency impairs visual attention and reduces the dynamic range of short-term plasticity at corticothalamic synapses[J]. *Cereb Cortex*, 2020, 30

(3):1813-1829.

[4] SHEN, ZHIJUN, HARAGOPAL, et al. Zinc modulates synaptic transmission by differentially regulating synaptic glutamate homeostasis in hippocampus[J]. *Eur J Neurosci*, 2020, doi: 10. 1111/ejn. 14749.

[5] 杜林柯,王萌,周永学.《金匱要略》从脏腑论治神志病学术思想探析[J]. *中医学报*, 2020, 35(2): 257-259.

[6] 刘丽军,刘思尧,沙春河,等.柴越汤对抑郁症大鼠HPA轴的调节作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(10):133-138.

[7] 孙永康,杨海燕,王新志.王新志分期论治郁证经验[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2020, 26(1): 132-134.

[8] MELIA K R, RYABININAE SCHROEDERR, et al. Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress[J]. *J Neurosci*, 1994, 14(10): 5929-5938.

[9] BRENNAN B P, HUDSON J I, JENSEN J E, et al. Rapid enhancement of glutamatergic neurotransmission in bipolar depression following treatment with riluzole [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2010, 35(3): 834-846.

[10] 戴若以,顾小红,张云东,等.束缚应激大鼠下丘脑谷氨酸受体变化和行为绝望状态的关系研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2016, 41(1): 38-43.

[11] KANEKAR S, BOGDANOVA O V, OLSON P R, et al. Hypobaric hypoxia induces depression-like behavior in female sprague-dawley rats, but not in males [J]. *High Alt Med Biol*, 2015, 16(1): 52-60.

[12] 顾兵,金建波,李华南,等.神经组织染色方法的研究概况[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(10): 1472-1475.

[13] COULTER D A, EID T. Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy[J]. *Glia*, 2012, 60(8): 1215-1226.

[14] GREWER C, GAMEIRO A, ZHANG Z, et al. Glutamate forward and reverse transport: from molecular mechanism to transporter-mediated release after ischemia [J]. *IUBMB Life*, 2008, 60(9): 609-619.

[15] BALAZS L. Involvement of extrasynaptic glutamate in physiological and pathophysiological changes of neuronal excitability[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(16): 2917-2949.

[16] BANASR M, CHOWDHURY G M, TERWILLIGER R, et al. Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole[J]. *Mol Psychiatry*, 2010, 15

- (5):501-511.
- [17] MIGUEL-HIDALGO J J, WALTZER R, WHITTOM A A, et al. Glial and glutamatergic markers in depression, alcoholism, and their comorbidity[J]. *J Affect Disord*, 2010, 127(1/3):230-240.
- [18] BERNARD R, KERMAN I A, THOMPSON R C, et al. Altered expression of glutamate signaling, growth factor, and glia genes in the locus coeruleus of patients with major depression [J]. *Mol Psychiatry*, 2011, 16(6):634-646.
- [19] MIYAGISHI H, TSUJI M, SAITO A, et al. Inhibitory effect of yokukansan on the decrease in the hippocampal excitatory amino acid transporter EAAT2 in stress-maladaptive mice [J]. *J Tradit Complement Med*, 2017, 7(4):371-374.
- [20] ZINK M, VOLLMAYR B, GEBICKE-HAERTER P J, et al. Reduced expression of glutamate transporters vGluT1, EAAT2 and EAAT4 in learned helpless rats, an animal model of depression [J]. *Neuropharmacology*, 2010, 58(2):465-473.
- [21] 徐雅岚, 赵洪庆, 杜青, 等. 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马区星形胶质细胞谷氨酸转运体的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2016, 39(6):470-475.
- [22] 葛渴敏, 王薇, 薛文达, 等. 越鞠丸合甘麦大枣汤加减对谷氨酸诱导的HT22细胞损伤模型的神经保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(12):22-27.
- [23] 许鹏, 章程鹏. 基于抑郁症发病机制的中药防治规律[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(7):232-238.
- [24] 郭延红, 夏忠玉, 陈江, 等. 人参皂苷Rg₁对慢性应激抑郁模型大鼠谷氨酸及其受体表达的影响[J]. *中国医院药学杂志*, 2019, 39(2):137-141.
- [25] YOSHIZUMI M, EISENACH J C, HAYASHIDA K. Riluzole and gabapentinoids activate glutamate transporters to facilitate glutamate-induced glutamate release from cultured astrocytes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 677(1/3):87-92.
- [26] CARBONE M, DUTY S, RATTRAY M. Riluzole elevates GLT-1 activity and levels in striatal astrocytes [J]. *Neurochem Int*, 2012, 60(1):31-38.

[责任编辑 周冰冰]