

酸枣仁汤加味对抑郁大鼠海马谷氨酸受体表达的影响

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

(1. 河南中医药大学, 郑州 450046;
2. 河南省仲景方药现代研究重点实验室, 郑州 450046)

[摘要] 目的: 观察酸枣仁汤加味对慢性束缚应激抑郁大鼠海马谷氨酸受体表达的影响, 探讨其基于谷氨酸受体的抗抑郁机制。方法: 将60只SD大鼠随机分为正常组、模型组、酸枣仁汤加味低、中、高剂量组、氯胺酮组, 每组10只。除正常组外, 其余各组采用慢性束缚应激(CRS)制备大鼠抑郁模型, 酸枣仁汤加味低、中、高剂量组分别灌胃酸枣仁汤加味6, 12, 24 g·kg⁻¹, 氯胺酮组腹腔注射氯胺酮15 mg·kg⁻¹, 正常组和模型组灌胃等体积生理盐水, 1次/d, 给药干预21 d。采用Morris水迷宫和新奇摄食实验评价大鼠的抑郁行为; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马组织NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B, GluR1, mGluR1, CaMK II α 和CaMK II β 蛋白表达水平。结果: 与正常组比较, 模型组新奇摄食时间及逃避潜伏期显著延长($P < 0.01$), 空间探索时间显著缩短($P < 0.01$); 模型组大鼠海马组织NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B, mGluR1和CaMK II β 表达水平均显著升高($P < 0.01$); 而GluR1, CaMK II α 水平均显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较, 酸枣仁汤加味中、高剂量组新奇摄食时间、逃避潜伏期显著缩短($P < 0.01$), 空间探索时间显著延长($P < 0.01$); 酸枣仁汤加味中、高剂量组NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B, mGluR1和CaMK II β 蛋白表达水平均显著降低($P < 0.01$); 而GluR1, CaMK II α 蛋白表达显著增高($P < 0.01$)。结论: 酸枣仁汤加味可显著改善慢性抑郁大鼠行为学, 其机制可能与下调NMDAR2A, NMDAR2B, mGluR1和CaMK II β 表达水平, 上调GluR1和CaMK II α 表达有关。

[关键词] 抑郁症; 酸枣仁汤; 海马; 谷氨酸; 兴奋性氨基酸受体

[中图分类号] R2-0; R289; R246.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)23-0020-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202336

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200925.1628.004.html>

[网络出版日期] 2020-9-25 16:51

Effect of Modified Suanzaoren Tang on Expression of Glutamate Receptor in Hippocampus of Chronic Restraint Stress Depression Model Rat

SHANG Li-zhi^{1,2}, MAO Meng-di^{1,2}, XU Er-ping^{1,2*}, LIU Bao-guang^{1,2*}, CHEN Xiao-hui¹, LI Yao-yang¹,
WANG Bao-ying^{1,2}, BAI Ming^{1,2}, LI Yu-cheng^{1,2}

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

2. Henan Key Laboratory for Modern Research of Zhongjing Compound Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of modified Suanzaoren Tang on the expression of excitatory amino acids receptor (EAARs) in hippocampus of rats with chronic depression, and to explore the anti-depressant mechanism of modified Suanzaoren Tang based on excitatory amino acids receptor. **Method:** Sixty

[收稿日期] 20200604(006)

[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, 21A630020); 河南省医学科技攻关计划项目(201702203); 河南省中医药科学研究专项(2019JDZX2121, 2019ZY3048)

[第一作者] 尚立芝, 硕士, 教授, 从事中医药作用机制研究, E-mail: lzshang2014@163.com

[通信作者] * 许二平, 博士, 教授, 博士生导师, 从事仲景方药现代研究, E-mail: xuerping@sina.com;

* 刘保光, 博士, 讲师, 从事仲景方药作用机制研究, E-mail: liubaoguang83@sina.com

SD rats were randomly divided into normal group, model group, and low, middle and high-dose modified Suanzaoren Tang groups, and ketamine group, with 10 rats in each group. Except normal group, the depression model of rats was prepared by using chronic restraint stress (CRS). The normal group and model group were intragastrically (*ig*) given normal saline. The modified Suanzaoren Tang groups were intragastrically given corresponding herbal drugs 6, 12, 24 g·kg⁻¹, ketamine group group were given ketamine 0.015 g·kg⁻¹ through intraoeritoneal injection, for 21 days, once a day. Then the depressive behaviors of rats were observed by Morris water maze and novelty feeding experiment. Western blot was used to detect the levels of DAR1, NMDAR2A, NMDAR2B, GluR1, mGluR1, CaMK II α and CaMK II β protein expression in rat hippocampus tissue. **Result:** Compared with normal group, the time of novel ingestion and escape latency were prolonged significantly ($P < 0.01$), and the time of space exploration was shortened significantly ($P < 0.01$). The levels of NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B, mGluR1 and CaMK II β expression were increased significantly ($P < 0.01$), while the levels of GluR1 and CaMK II α expression were decreased significantly ($P < 0.01$) in model group. Compared with model group, the time of novel ingestion and escape latency were shortened significantly ($P < 0.01$), and the time of space exploration was prolonged significantly ($P < 0.01$). The levels of NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B, mGluR1 and CaMK II β protein expression were decreased significantly ($P < 0.01$), but the levels of GluR1 and CaMK II α expression were increased decreased significantly ($P < 0.01$) in middle and high-dose modified Suanzaoren Tang groups. **Conclusion:** Modified Suanzaoren Tang can improve the behavior of chronic depression rats effectly. Its mechanism may be related with reduction the expression of NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B, mGluR1 and CaMK II β protein, increase the expression of GluR1 and CaMK II α protein.

[Key words] depression; Suanzaoren Tang; hippocampus; glutamic acid; excitatory amino acid receptor (EAARs)

抑郁症是一种以显著而持久的心境低落为主要特征的精神疾病。该病高患病率、高复发率,高疾病负担,严重影响患者的生存质量^[1-2]。目前抑郁症的发病机制尚未完全明确,临床上常用针对单胺类神经递质的抗抑郁药,虽能提高部分患者单胺类递质的浓度。但此类抗抑郁药存在起效慢,缓解率低,复发率高、需长期服药等不足^[3-4]。单胺类递质假说难以解释抑郁症的其他发病学机制。新近研究表明,谷氨酸及其受体作用的研究越来越受到关注^[5]。谷氨酸(Glu)是中枢内的兴奋性氨基酸(EAA)递质,海马神经元上的谷氨酸受体分为离子型和代谢型两类:离子型受体(iGluRs)中的N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)有NMDAR1, NMDAR2(A~D), NMDAR3(A和B)7个亚基, NMDAR1是NMDAR必备的核心亚基,参与学习记忆、突触可塑性^[6];谷氨酸离子型受体中的 α -氨基羟甲基恶唑丙酸受体(AMPA)有4个亚基(GluR1~GluR4), GluR1是AMPA参与突触可塑性的重要亚基。NMDAR1介导Ca²⁺内流,通过钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II(CaMK II)调节GluR1,参与突触可塑性的调控^[7]。代谢型谷氨酸受体(mGluRs)有8个亚基(mGluR1~mGluR8), mGluR1参与调控海马CA1区

神经信号的传递及神经元突触可塑性^[8]。研究发现,谷氨酸受体异常会损害突触可塑性及学习记忆功能,引发抑郁行为,近年应激导致海马谷氨酸及其受体的异常是抑郁发病机制研究的热点^[9]。

抑郁症属于中医“郁证”范畴。酸枣仁汤是临床治疗“郁证”的常用经方。酸枣仁汤出自《金匮要略·血痹虚劳病脉证并治第六》,该方有养血安神,清热除烦之功,主治虚热内扰、心肝阴血虚证。临床常用该方加减,邪气得解,少阳得和,共奏疏肝解郁、清热除烦、宁心安神之效^[10-11]。但因药理机制不清,限制其临床应用。本实验采用慢性束缚应激和隔离孤养复制抑郁大鼠模型,观测酸枣仁汤加味对抑郁模型大鼠海马NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B, GluR1, mGluR1,以及CaMK II α 和CaMK II β 蛋白表达的影响,旨在探究酸枣仁汤加味基于谷氨酸受体的抗抑郁机制。

1 材料

1.1 动物 雄性健康SD大鼠, SPF级, 6周龄, 体重(200±20)g, 购自河南省实验动物中心, 合格证号SCXK(豫)2017-0001, 动物质量合格证编号NO.41003100006058。动物饲料购自河南省实验动物中心, 河南省实验动物饲料A级, 动物饲料质量

合格证号NO.41000100004370。实验单位使用许可证号SYXK(豫)2015-0005,该实验动物经河南中医药大学实验动物伦理委员会审核批准,编号DWLL17010032。

1.2 药物及试剂 酸枣仁汤加味由酸枣仁15 g(批号18031151),茯苓、知母、川芎各9 g(批号分别为18041411, 1710039, 18041331),生甘草3 g(批号18062091),北柴胡30 g(批号18051111),黄芩、人参片、清半夏各10 g(批号分别为18081431, 1701120, 18032321)等组成,以上中药均为江阴天江药业有限公司生产的中药配方颗粒;氯胺酮(福建古田制药厂,批号180709);兔抗大鼠NMDAR1单克隆抗体,兔抗大鼠NMDAR2A多抗,兔抗NMDAR2B多抗,兔抗mGluR1多抗,兔抗CaMK II α 单抗,兔抗CaMK II β 多抗(美国Thermo Fisher公司,批号分别为RF224533, 73508903A1, TD2553151, QL2128831, UI2850145, RE2206402);兔抗GluR1单抗(英国Abcam公司,批号ab109450);兔抗大鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Sigma-Aldrich公司,批号G8795);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白(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(上海威奥生物科技有限公司,批号分别为WB0101, WB0125, WB2164);PVDF膜(美国Millipore公司,批号IPVH00010)。

1.3 仪器 7500型实时荧光定量PCR(Real-time PCR)仪(美国ABI公司),Micro 21R型低温高速离心机(美国Thermo Fisher公司),Tanon 1600/1600RJC07-WFH-103数码凝胶成像分析系统(北京北信未来电子仪器有限公司),BioPhotometerD30型紫外核酸蛋白测定仪(德国Eppendorf公司),50 I Nikon eclipse型显微镜(日本Nikon公司),Morris水迷宫视频跟踪系统(西班牙Panlab公司),zk-gd1型大鼠固定器(河南智科弘润环保科技有限公司),Experion全自动电泳系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 造模、分组与给药 将60只SD大鼠随机选取10只作为正常组;剩余50只用于慢性束缚刺激(CRS)造模^[12-13],单只大鼠置于大鼠束缚固定器内,每天给予大鼠束缚应激1次,每次6 h,9:00~15:00进行,束缚期间禁食、禁水。应激结束后,将大鼠放回笼中孤养,自由进食和饮水,连续应激21 d。再将造模的50只大鼠随机分为模型组,酸枣仁汤加味低、中、高剂量组,氯胺酮组,每组10只。以Morris

水迷宫、新奇摄食行为学检测作为评价模型成功的依据。给药第21~42天,对造模的大鼠继续追加造模,每次束缚结束30 min后给药,酸枣仁汤加味低、中、高剂量组分别灌胃6, 12, 24 g·kg⁻¹酸枣仁汤溶液,氯胺酮组腹腔注射0.015 g·kg⁻¹氯胺酮;正常组和模型组灌胃等体积生理盐水。1次/d,共给药21 d。

2.2 行为学检测

2.2.1 Morris水迷宫实验 ①定位航行实验 提前连续训练4 d后,从入水点将大鼠面向池壁放入水中,自由寻找高出水面2 cm的平台,若1 min内未找到平台,则牵引其至平台停留10 s。训练完成后,连续3 d将大鼠从背对平台方向放入水中,记录大鼠爬上平台所用时间,即为大鼠的逃避潜伏期时间。②空间探索实验,撤去平台,记录大鼠1 min内在原平台所在象限停留时间,即为大鼠的目标象限记忆时间。

2.2.2 新奇摄食实验 大鼠禁食不禁水24 h后,将大鼠面向箱壁从同一位置放入实验箱中,实验箱规格为75 cm×75 cm×75 cm,箱中心放入适量等体积食物,适应30 s后,观察并记录大鼠5 min内首次咀嚼食物的时间。实验在无明显光源的环境中进行,观察完毕擦拭箱内壁及底面,以免上次动物余留的信息影响下次测试结果。

2.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马组织NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B, GluR1, mGluR1, CaMK II α 和CaMK II β 蛋白表达 腹腔注射0.5%戊巴比妥50 mg·kg⁻¹麻醉,断头并分离完整大脑。于干冰上精细分离双侧海马组织,称质量后放入匀浆器中,按比例加入组织蛋白裂解液,低温匀浆。4 °C, 12 000 r·min⁻¹离心15 min,提取上清液。采用BCA蛋白浓度检测试剂盒测定总蛋白浓度。电泳后,蛋白转印至PVDF膜,采用5%脱脂牛奶,4 °C过夜,封闭PVDF膜。加兔抗大鼠NMDAR1单克隆抗体,兔抗大鼠NMDAR2A抗体,兔抗NMDAR2B抗体,兔抗mGluR1抗体,兔抗CaMK II α 抗体,兔抗CaMK II β 抗体,兔抗大鼠GluR1抗体,稀释倍数均为1:1 000,兔抗大鼠GAPDH多克隆抗体,稀释倍数1:2 000,室温孵育2 h。TBS液洗涤PVDF膜,分别滴加结合山羊抗兔IgG(1:500),室温孵育1 h。TBS液洗膜,采用ECL试剂显影,采用Experion全自动电泳系统完成成像、条带检测、定量及数据分析。

2.4 统计学处理 应用SPSS 25.0软件进行统计

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, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 造模21 d大鼠水迷宫及新奇摄食行为评价
应激刺激21 d后,与正常组比较,模型组新奇摄食时间、逃避潜伏期均显著延长($P<0.01$),空间探索时间显著缩短($P<0.01$);各给药组新奇摄食时间、逃避潜伏期与模型组比较差异无统计学意义。见表1。

3.2 对抑郁大鼠水迷宫及新奇摄食行为的影响
给药21 d后,与正常组比较,模型组新奇摄食时间、逃避潜伏期均显著延长($P<0.01$),空间探索时间显著缩短($P<0.01$);与模型组比较,酸枣仁汤加味中、高剂量组新奇摄食时间、逃避潜伏期显著缩短($P<0.01$),

表1 造模21 d大鼠水迷宫及新奇摄食行为的评价($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Evaluation of water maze experiment and novel feeding behaviors result of each group of rats, after 21 days ($\bar{x}\pm s, n=10$) s

组别	逃避潜伏期	空间探索时间	新奇摄食时间
正常	11.21±2.21	23.51±3.41	121.32±24.16
模型	25.22±2.65 ²⁾	14.37±3.59 ²⁾	245.21±23.35 ²⁾
酸枣仁汤加味	25.13±3.15	14.37±4.13	246.24±24.16
	24.65±2.42	15.83±3.26	248.31±24.37
	25.10±3.21	15.20±3.33	247.43±24.51
氯胺酮	24.67±2.58	14.72±3.42	249.41±28.57

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2~4同)。

空间探索时间显著延长($P<0.01$)。见表2。

表2 酸枣仁汤加味对抑郁大鼠水迷宫及新奇摄食行为的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of modified Suanzaoren Tang on Morris water maze experiment and novel feeding behaviour result of each group of rats ($\bar{x}\pm s, n=10$) s

组别	剂量/g·kg ⁻¹	逃避潜伏期	空间探索时间	新奇摄食时间
正常	-	10.24±3.76	33.23±3.43	126.43±24.74
模型	-	24.45±4.02 ²⁾	17.41±3.46 ²⁾	226.32±33.29 ²⁾
酸枣仁汤加味	6.00	21.41±4.16	19.17±3.16	210.12±32.17
	12.00	16.34±2.14 ⁴⁾	28.51±3.75 ⁴⁾	144.21±22.41 ⁴⁾
	24.00	14.87±3.12 ⁴⁾	29.85±4.21 ⁴⁾	142.32±35.21 ⁴⁾
氯胺酮	0.015	13.52±4.33 ⁴⁾	29.34±3.64 ⁴⁾	141.31±31.59 ⁴⁾

3.3 对大鼠海马NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B, GluR1, mGluR1, CaMK II α 和 CaMK II β 蛋白表达的影响
与正常组比较,模型组大鼠海马内NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B, mGluR1 和 CaMK II β 蛋白表达水平均显著升高($P<0.01$),而

GluR1, CaMK II α 表达均显著降低($P<0.01$);与模型组比较,酸枣仁汤加味中、高剂量组NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B, mGluR1 和 CaMK II β 蛋白表达均显著降低($P<0.01$),而 GluR1, CaMK II α 表达显著增高($P<0.01$)。见表3,图1。

表3 酸枣仁汤加味对抑郁大鼠大脑海马组织NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B, GluR1, mGluR1, CaMK II α 和 CaMK II β 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

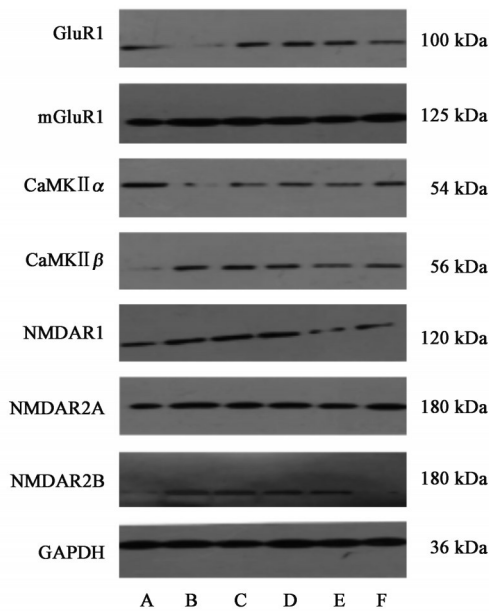
Table 3 Effect of modified Suanzaoren Tang on expression of NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B, GluR1, mGluR1, CaMK II α and CaMK II β protein in hippocampus of depression rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NMDAR1 /GAPDH	NMDAR2A /GAPDH	NMDAR2B /GAPDH	GluR1 /GAPDH	mGluR1 /GAPDH	CaMK II α /GAPDH	CaMK II β /GAPDH
正常	-	0.54±0.01	0.45±0.12	0.32±0.12	0.89±0.12	0.61±0.01	0.96±0.11	0.46±0.12
模型	-	0.97±0.02 ²⁾	1.44±0.15 ²⁾	1.41±0.21 ²⁾	0.33±0.03 ²⁾	1.43±0.13 ²⁾	0.31±0.01 ²⁾	1.36±0.14 ²⁾
酸枣仁汤加味	6.00	0.81±0.02 ⁴⁾	1.28±0.13 ⁴⁾	1.22±0.23	0.41±0.04	1.06±0.12 ⁴⁾	0.34±0.06	0.92±0.12 ⁴⁾
	12.00	0.78±0.12 ⁴⁾	0.55±0.11 ⁴⁾	0.69±0.11 ⁴⁾	0.71±0.12 ⁴⁾	0.81±0.11 ⁴⁾	0.82±0.13 ⁴⁾	0.55±0.12 ⁴⁾
	24.00	0.63±0.13 ⁴⁾	0.49±0.11 ⁴⁾	0.62±0.13 ⁴⁾	0.72±0.12 ⁴⁾	0.72±0.11 ⁴⁾	0.85±0.11 ⁴⁾	0.61±0.12 ⁴⁾
氯胺酮	0.015	0.65±0.11 ⁴⁾	0.89±0.12 ⁴⁾	0.34±0.12 ⁴⁾	0.43±0.12	1.23±0.15	0.59±0.13 ³⁾	0.57±0.13 ⁴⁾

4 讨论

抑郁症以持久的心境低落、睡眠紊乱等为主要特征,属中医的“郁证”,临床研究表明酸枣仁汤

治疗抑郁症的疗效确切^[11]。酸枣仁汤加味由酸枣仁、川芎、知母、茯苓、生甘草组成,方中酸枣仁安神敛汗,养心益肝,《神农本草经》载其“久服安五脏,



A. 正常组; B. 模型组; C. 酸枣仁汤加味 6 g·kg⁻¹组; D. 酸枣仁汤加味 12 g·kg⁻¹组; E. 酸枣仁汤加味 24 g·kg⁻¹组; F. 氯胺酮组

图1 各组大鼠海马组织中GluR1, mGluR1, CaMK II α , CaMK II β , NMDAR1, NMDAR2A和NMDAR2B蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of GluR1, mGluR1, CaMK II α , CaMK II β , NMDAR1, NMDAR2A and NMDAR2B protein in hippocampus of each group rats

轻身延年”;茯苓利水渗湿,健脾宁心;川芎行气开郁,活血止痛;知母清热泻火,滋阴润燥;生甘草清热解毒,补脾益气。该方主治虚热内扰、心肝阴虚证,临床常见症状为失眠、头晕目眩、口渴咽干、舌红少苔等。在酸枣仁汤基础上加味北柴胡、黄芩、清半夏、人参片。其中柴胡长于疏肝解郁;黄芩善利少阳之气机;半夏能行郁导滞;人参功在健脾,诸药合用,共奏疏肝解郁、清热除烦、宁心安神之效,治疗抑郁症的疗效显著^[11,14]。虽有报道酸枣仁汤抗抑郁作用可能与增加脑内单胺类神经递质含量有关^[15],谷氨酸及其受体异常在抑郁症病理生理学过程发挥重要的作用^[9]。但基于谷氨酸受体之酸枣仁汤加味抗抑郁机制的研究,目前报道较少。

慢性束缚应激抑郁模型,模拟人类挫折、孤独、心理压力等应激及其导致心身性疾病过程,广泛运用于动物抑郁模型制备和抗抑郁药物的初步筛选^[16]。本实验采用慢性束缚应激21 d,制备大鼠抑郁模型,行为学检测选用水迷宫及新奇摄食实验, Morris水迷宫被广泛用于研究与空间学习记忆相关的脑区功能评价,新奇摄食实验是通过观察大鼠的自发性探索行为评价大鼠的活动能力。本实验结果显示,与正常组比较,模型组新奇摄食时间、逃避潜伏期显著延长,空间探索时间显著缩短,说明

模型组大鼠表现出学习记忆功能明显下降,自主活动能力降低,兴趣丧失、食欲下降、活动减少等典型的抑郁行为,提示造模成功。与模型组比较,酸枣仁汤加味中、高剂量组新奇摄食时间、逃避潜伏期显著缩短,空间探索时间显著延长。提示酸枣仁汤加味可显著改善抑郁行为。

酸枣仁汤加味可能通过调节谷氨酸NMDA受体,发挥抗抑郁作用。实验和临床研究发现,海马中谷氨酸的含量、或受体表达异常会损害海马突触的可塑性及学习记忆功能^[17]。生理状态下,谷氨酸短暂激活NMDAR调节Ca²⁺进入神经元,维持神经元生存与可塑性,调控学习与记忆。但是抑郁状态下,集聚过多的谷氨酸,使NMDAR过度激活或过表达,以兴奋性神经毒性反应,引起海马神经细胞损伤,诱发抑郁行为^[18]。氯胺酮是NMDAR的阻断剂,具有快速抗抑郁作用,其抗抑郁主要靶点可能是NMDAR2B亚基^[18-19]。氯胺酮虽可显著改善抑郁患者的症状。但同时也使患者出现短暂的知觉和认知障碍,出现幻觉、兴奋及血压升高等副作用^[20]。所以亟需研究抗抑郁的有效治疗靶点,研发能够增强抗抑郁功效而且副作用少的抗抑郁药物。本实验显示,与正常组比较,模型组大鼠海马内NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B表达均显著升高,与文献报道一致^[21]。可能应激状态下过高的谷氨酸诱导NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B表达增加。与模型组比较,酸枣仁汤加味中、高剂量组,氯胺酮组NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B均显著降低。氯胺酮通过拮抗NMDAR显著改善抑郁患者的症状^[18-19]。酸枣仁汤加味可能通过拮抗、或抑制NMDAR表达,减少Ca²⁺内流,避免海马神经细胞内Ca²⁺超载,保护神经细胞,起到抗抑郁作用。

酸枣仁汤加味可能通过调节谷氨酸GluR1, mGluR1,提高突触可塑性。抑郁症的核心病理机制是神经元损伤和突触可塑性的改变,突触可塑性包括结构和功能的可塑性,突触功能可塑性是记忆形成和认知的基础,主要包括长时程增强(LTP)和长时程抑制(LTD)^[22]。钙/CaMK II是多功能蛋白激酶, CaMK II由12个亚基组成,其中CaMK II α 和CaMK II β 亚基与抑郁症关系密切,抑制CaMK II α 磷酸化会显著降低小鼠海马CA1~CA3区LTP,导致学习记忆受损^[22-23]。而使用抗抑郁药噻奈普汀可能通过上调CaMK II α 起到抗抑郁作用, CaMK II α 增多能增强突触可塑性,而CaMK II β 增多则降低突触的可塑性^[7,22-23]。海马Glu R1是AMPA的重要

组成部分,是正常的突触可塑性、快突触传递、空间记忆所必需的^[24]。小鼠海马CA1~CA3区锥体细胞的GluR1基因敲除,出现空间记忆障碍,呈现抑郁行为^[25]。电针通过上调AMPA的表达,保护CUMS大鼠的神经可塑性^[26]。当NMDA受体适当激活,引起Ca²⁺内流,使CaMK II α 磷酸化,激活CaMK II与NMDAR2B的位点结合。活化的CaMK II α 使突触后膜上CaMK II α 的底物GluR1磷酸化,增强GluR1介导的突触传递,通过级联反应,增强突触后电位变化,提高突触可塑性,起到抗抑郁作用。当CaMK II α 的磷酸化降低,突触后膜上CaMK II的关键底物GluR1磷酸化也降低,从而影响海马突触可塑性LTP和空间学习能力^[27]。相反,CaMK II β 亚基过表达可能降低AMPA的活性,介导神经损伤^[28]。抑制CaMK II β 活性或下调CaMK II β 表达,增强AMPA的活性,可逆转大鼠的抑郁行为^[7]。mGluR1广泛存在于海马CA1区,参与调控神经信息的传递及神经元突触可塑性,mGluR1拮抗剂显示抗抑郁行为^[29]。本实验发现,与正常组比较,模型组大鼠海马mGluR1和CaMK II β 表达水平均显著升高,而GluR1,CaMK II α 表达均显著降低。提示抑郁模型中CaMK II α 低表达,CaMK II β 高表达,可能抑制GluR1的活化,使突触可塑性降低。抗抑郁药瑞波西汀能增加GluR1蛋白的表达,激活GluR1,活化神经营养通路,增加脑源性神经营养因子的表达,使神经产生适应性变化,改善抑郁症状^[30]。本实验与模型组比较,酸枣仁汤加味中、高剂量组mGluR1和CaMK II β 表达均显著降低,而GluR1,CaMK II α 表达显著增高。提示酸枣仁汤加味通过上调CaMK II α 表达,而增加GluR1蛋白的表达,同时抑制mGluR1和CaMK II β 表达,从而增强突触可塑性,进而逆转抑郁行为。

综上,酸枣仁汤加味有抗抑郁作用,其机制可能与抑制NMDAR1,NMDAR2A,NMDAR2B,mGluR1和CaMK II β 表达,降低兴奋性神经毒性而避免海马的损伤,并增强GluR1和CaMK II α 表达,提高突触的可塑性有关。

[参考文献]

[1] KESSLER R C, BIRNBAUM H G, SHAHLY V, et al. Age differences in the prevalence and comorbidity of DSM-IV major depressive episodes: results from the WHO World Mental Health Survey Initiative [J]. *Depress Anxiety*, 2010, 27(4): 351-364.

[2] BODE K, VOGEL R, WALKER J. Health care costs of borderline personality disorder and matched controls with major depressive disorder: a comparative study based on anonymized claims data [J]. *Eur J Health Econ*, 2017, 18(9): 1125-1135.

[3] NAM S Y, KIM H Y, LEE H E, et al. Functions of the signal transducer and activator of transcription 6 in a behavioral animal model of depression [J]. *Pharmacology*, 2018, 101(5/6): 285-289.

[4] GERHARD D M, WOHLEBE S, DUMAN R S. Emerging treatment mechanisms for depression: focus on glutamate and synaptic plasticity [J]. *Drug Discov Today*, 2016, 21(3): 454-464.

[5] SITGES M, CHIU L M, REED R C. Effects of levetiracetam, carbamazepine, phenytoin, valproate, lamotrigine, oxcarbazepine, topiramate, vinpocetine and sertraline on presynaptic hippocampal Na⁺ and Ca²⁺ channels permeability [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(4): 758-769.

[6] LI Y L, ZHANG X Z, WANG Y, et al. Clonidine preconditioning alleviated focal cerebral ischemic insult in rats via up-regulating p-NMDAR1 and down-regulating NMDAR2A/p-NMDAR2B [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 793: 89-94.

[7] LI K, ZHOU T, LIAO L J, et al. β CaMK II in lateral habenula mediates core symptoms of depression [J]. *Science*, 2013, 341(6149): 1016-1020.

[8] NARUSHIMA M. Comparison of the role of metabotropic glutamate receptor subtype 1 in developmental refinement of neuronal connectivity between the cerebellum and the sensory thalamus [J]. *Neurosci Res*, 2018, 129: 24-31.

[9] YANG Y, CUI Y H, SANG K N, et al. Ketamine blocks bursting in the lateral habenula to rapidly relieve depression [J]. *Nature*, 2018, 554 (7692): 317-322.

[10] 裘黎明.《伤寒论》小柴胡汤功用探微[J]. *新中医*, 2016, 48(11): 201-203.

[11] 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.

[12] MELIA K R, RYABININ A E, SCHROEDER R, 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.

[13] WANG Y, JIANG H L, MENG H, et al. Genome-wide transcriptome analysis of hippocampus in rats indicated that TLR/NLR signaling pathway was involved in the pathogenesis of depressive disorder

- induced by chronic restraint stress[J]. *Brain Res Bull*, 2017, 134: 195-204.
- [14] 李鹏英, 吴婷婷, 龙飞虎, 等. 小柴胡汤拆方对慢性束缚抑郁模型大鼠脑组织神经递质的影响[J]. *世界中医药*, 2016, 11(8): 1566-1964.
- [15] 杨新年, 张业, 李霏. 小柴胡汤合酸枣仁汤对抑郁模型大鼠行为学和脑组织单胺类神经递质的影响[J]. *河南中医学报*, 2007, 22(4): 1-7.
- [16] 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.
- [17] LI X L, AN Y, JIN Q H, et al. Changes of some amino acid concentrations in the medial vestibular nucleus of conscious rats following acute hypotension [J]. *Neurosci Lett*, 2010, 477(1): 11-14.
- [18] YEO M, BERGLUND K, HANNA M, et al. Bisphenol A delays the perinatal chloride shift in cortical neurons by epigenetic effects on the *Kcc2* promoter [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(11): 4315-4320.
- [19] HENTER I D, DE SOUSA R T, ZARATE J R C A. Glutamatergic modulators in depression [J]. *Harv Rev Psychiatry*, 2018, 26(6): 307-319.
- [20] SILVER H, GOODMAN C, ISAKOV V, et al. A double-blind, cross-over comparison of the effects of amantadine or placebo on visuomotor and cognitive function in medicated schizophrenia patients [J]. *Int Clin Psychopharmacol*, 2005, 20(6): 319-326.
- [21] ALIM, M A, GRUJIC M, ACKERMAN P W, et al. Glutamate triggers the expression of functional ionotropic and metabotropic glutamate receptors in mast cells [J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, doi: 10. 1038/s41423-020-0421-z.
- [22] SONG I, HUGANIR R L. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity [J]. *Trends Neurosci*, 2002, 25(11): 578-588.
- [23] GOH J J, MANAHAN-VAUGHAN D. Role of inhibitory autophosphorylation of calcium / calmodulin-dependent kinase II ($\text{CaMK II } \alpha$) in persistent (>24 h) hippocampal LTP and in LTD facilitated by novel object-place learning and recognition in mice [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 285: 79-88.
- [24] REISEL, BANNERMAN D M, SCHMITT W B, et al. Spatial memory dissociations in mice lacking *GluR1* [J]. *Nat Neurosci*, 2002, 5(9): 868-873.
- [25] CHOURBAJI S, VOGT M A, FUMAGALLI F, et al. AMPA receptor subunit 1 (*GluR-A*) knockout mice model the glutamate hypothesis of depression [J]. *FASEB J*, 2008, 22(9): 3129-3134.
- [26] JIANG L, ZHANG H, ZHOU J H. Involvement of hippocampal AMPA receptors in electroacupuncture attenuating depressive-like behaviors and regulating synaptic proteins in rats Subjected to chronic unpredictable mild stress [J]. *World Neurosurg*, 2020, doi: 10. 1016/j. wneu. 2020. 04. 042.
- [27] ZHOU Y, TAKAHASHI E, LI W, et al. Interactions between the NR2B receptor and CaMK II modulate synaptic plasticity and spatial learning [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(50): 13843-13853.
- [28] 徐浩. $\text{CaMK II } \beta$ 过量表达对小鼠海马齿状回区突触可塑性和学习记忆的影响 [D]. 上海: 华东师范大学, 2011.
- [29] BELOZERTSEVA I V, KOS T, POPIK P, et al. Antidepressant-like effects of mGluR1 and mGluR5 antagonists in the rat forced swim and the mouse tail suspension tests [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2007, 17(3): 172-179.
- [30] DUMAN R S, SHINOHARA R, FOGACA M V. Neurobiology of rapid-acting antidepressants: convergent effects on *GluA1*-synaptic function [J]. *Mol Psychiatry*, 2019, 24(12): 1816-1832.

[责任编辑 孙丛丛]