

# $\beta$ -细辛醚对抑郁模型大鼠行为 及海马 MKP-1, MSK-1, CREB 和 Bcl-2 的影响

赵春明, 张晓杰, 董海影, 李姗姗, 孙玉荣\*  
(齐齐哈尔医学院病理学系, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**[摘要]** 目的:探讨  $\beta$ -细辛醚对抑郁模型大鼠行为学及丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶-1(MKP-1), 增强有丝分裂原和应激活化蛋白激酶-1(MSK-1), cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)和 B 细胞淋巴瘤/白血病因子-2(Bcl-2)表达的影响。方法:60 只 2~3 月龄 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组、氟西汀组和  $\beta$ -细辛醚组, 每组 15 只。采用慢性轻度不可预见性应激加孤养复制抑郁模型, 造模第 2 天开始, 氟西汀组和  $\beta$ -细辛醚组灌胃给药, 1 次/d (氟西汀  $1.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,  $\beta$ -细辛醚  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )。于实验第 1, 7, 14, 21 天, 分别进行体重、糖水消耗量检测和敞箱实验, 对大鼠行为学改变进行评定。采用免疫组织化学染色检测 MKP-1 和 Bcl-2 蛋白表达, 实时定量 PCR 对 MKP-1, MSK-1, CREB 和 Bcl-2 进行定量分析。结果:与模型组比较, 氟西汀组和  $\beta$ -细辛醚组大鼠行为学指标显著改善, 海马区 MKP-1 表达减弱, MSK-1, CREB 和 Bcl-2 表达增强, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论: $\beta$ -细辛醚可有效改善抑郁模型大鼠的抑郁症状, 其机制可能与减少海马区 MKP-1, 增强 MSK-1, CREB 和 Bcl-2 蛋白表达有关。

**[关键词]**  $\beta$ -细辛醚; 抑郁; 丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶-1; 有丝分裂原和应激活化蛋白激酶-1; cAMP 反应元件结合蛋白; B 细胞淋巴瘤/白血病因子-2

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0272-06

**[doi]** 10.11653/syjf2013160272

## Effects of Beta-asarone on the Behavior and Expressions of MKP-1, MSK-1, CREB and Bcl-2 in the Hippocampus in Rat Model of Depression

ZHAO Chun-ming, ZHANG Xiao-jie, DONG Hai-ying, LI Shan-shan, SUN Yu-rong\*  
(Institute of Pathology, Qiqihaer Medical University, Qiqihaer 161006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of beta-asarone on the behavior and the expressions of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1), extracellular signal-regulated kinase (ERK), mitogen and stress activated protein kinase-1 (MSK-1), cAMP response element binding protein (CREB), B cell Lymphomal/Leukemia-2 (Bcl-2) in the hippocampus of depression model rats. **Method:** Sixty adult Sprague-Dawley rats were randomly divided into 4 groups: the normal control group (NC), the model control group (MC), the  $\beta$ -asarone group (A), the fluoxetine control group (FC), 15 in each one. Except those in the NC, the rest rats were singly housed and exposed on an unpredicted sequence of mild stressor. From the second day, A and FC group rats were administered with corresponding medicinal liquid everyday ( $1.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  to the FC group,  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  to the A group) by gastro-gavage for 21 days. The rats' body weight, sucrose consumption volume in the sucrose preference test, and times of grooming in the Open-field-test were detected on the 1, 7, 14, 21th day, respectively. The protein expressions of MKP-1 and Bcl-2 in the hippocampus were detected by immunohistochemical assay, while Real-time PCR for quantitative analysis of MKP-1, MSK-1, CREB and Bcl-2.

**[收稿日期]** 20130507(130)

**[基金项目]** 黑龙江省教育厅科学技术研究面上项目(12521638)

**[第一作者]** 赵春明, 硕士, 助教, 从事病理学研究及管理工作, Tel:18604620817, E-mail:chunmingxinxiang@163.com

**[通讯作者]** \* 孙玉荣, 硕士, 讲师, 从事病理学教学与研究, Tel:13314527981, E-mail:343190863@qq.com

**Result:** Compared with the MC group, the scores of A group and FC group in the open field test increased; the protein expressions of MKP-1 in the hippocampus decreased while MSK-1, CREB and Bcl-2 increased with statistical significance ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Beta-asarone could obviously improve the depressive state of the model rats. Its mechanism might be correlated with decreasing the protein expressions of MKP-1, increasing MSK-1, CREB and Bcl-2 in the hippocampus.

**[Key words]** beta-asarone; depression; mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1); extracellular signal-regulated kinase (ERK); mitogen and stress activated protein kinase-1 (MSK-1); cAMP response element binding protein (CREB); B cell Lymphomal/Leukemia-2 (Bcl-2)

抑郁症 (depression) 是一种常见的心境障碍性精神神经疾病,以显著而持久的心境低落为主要临床症状。患者具有额叶损害的特征性表现:情绪障碍,认知功能障碍,执行功能障碍等<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明,石菖蒲醒脑开窍,是治疗脑病的常用中药,具有较好的抗抑郁作用<sup>[2-3]</sup>。根茎中主要成分为挥发油,其中含量较多的是  $\beta$ -细辛醚 (0.705% ~ 1.530%) 和  $\alpha$ -细辛醚 (0.035% ~ 0.258%)<sup>[4-5]</sup>。前期研究结果显示, $\beta$ -细辛醚有抗抑郁作用<sup>[6]</sup>,本实验在前期实验的基础上,继续探讨  $\beta$ -细辛醚在抑郁症治疗中的作用。研究其对丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶-1 (mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, MKP-1) 的影响,以及对细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 1/2 通路下游信号——有丝分裂原和应激活化蛋白激酶-1 (mitogen and stress activated protein kinase-1, MSK-1) 和 cAMP 反应元件结合蛋白 (cAMP response element binding protein, CREB) 的调节。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** 雄性 SD 大鼠,清洁级,2~3 月龄,体重 180~200 g,由大连医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(辽)2008-0002。

**1.2 药品及试剂**  $\beta$ -细辛醚标准品(天津一方科技有限公司,批号 00011017-T9k),盐酸氟西汀胶囊(苏州俞氏药业有限公司,批号 100201),均用去离子双蒸水配制成浓度  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  药物混悬液待用。免疫组化染色:一抗 (Abcam 公司,MPK-1 批号 360415,MSK-1 批号 #B1711,CREB 批号 05-2011, Bcl-2 批号 GR4427-1),免疫组化 SP 试剂盒、DAB 显色剂、PBS 缓冲液(购于福州迈新生物技术开发有限公司,批号分别为 1210229710, 1208300031, 12090701)。逆转录试剂盒 SYBR<sup>®</sup> ExScript<sup>™</sup> RT-PCR Kit (Perfect Real Time 批号 BK3601)、PCR 试剂盒 RNAiso Reagent(宝生物工程有限公司,批号 BK 1906)。

**1.3 仪器** PCR System 扩增仪 2700 (Applied Biosystems 公司),荧光定量 PCR 仪 ABI 7300 (ABI 公司)。光学显微镜 CX31R BSF (Olympus),图像分析系统 DP801 (Alphamiager 公司)。

## 1.4 方法

**1.4.1 动物分组** 成年 SD 雄性大鼠,2~3 月龄,体重 180~200 g,自由进食进水,适应性喂养 1 周。保持环境安静、温度保持在 18~20 °C、自然光线、通风良好、无噪音。进行 Open-field-test<sup>[6]</sup> 评分后选取评分相近的大鼠 60 只,按随机数字表法分为 4 组:正常对照组、模型组、氟西汀组(治疗对照组)、 $\beta$ -细辛醚组,每组 15 只。

**1.4.2 造模及给药** 正常对照组每笼 5 只饲养,正常饮水摄食,不给予任何刺激。模型组、氟西汀组和  $\beta$ -细辛醚组每笼饲养 1 只,接受慢性轻度不可预见性应激刺激 (Chronic unpredictable mild stress stimulation, CUMS):每天给予一种随机应激刺激,共 21 d,刺激方法根据 Katz 法<sup>[8]</sup> 改进。具体方法如下<sup>[8]</sup>:电击足底(电流强度 1 mA,电压 45 mV,10 s/次,间隔 1 min,共 30 次)、冰水游泳(4 °C,5 min)、摇晃(1 次/s,15 min)、夹尾(3 min)、热应激(45 °C,5 min)、禁食(24 h)、禁水(24 h)、昼夜颠倒、束缚(8 h)、倾斜鼠笼与潮湿垫料(100 g 垫料中加入 200 mL 水)。每天随机给予一种刺激,使大鼠不能预料刺激的发生,以避免产生适应。造模开始计为第 1 天、第 2 天起,氟西汀组按  $1.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃给予氟西汀混悬液 ( $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), $\beta$ -细辛醚组按  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃给予  $\beta$ -细辛醚组混悬液 ( $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )。模型组给予等量生理盐水,每天灌胃给药 1 次,直至造模结束。造模与饲养不在同一个实验室内,以保证正常对照组不受影响。

**1.4.3 体重测定** 实验第 1、7、14、21 天,各组大鼠进行称重。

**1.4.4 大鼠行为学评价** 于实验第 1、7、14、21 天进行 Open-field-test 行为学评分,具体方法如下:将

大鼠置于高 40 cm、底边长 80 cm、周壁涂黑、底板为白色的无盖方箱内,底板用黑线划成 16 cm × 16 cm 的 25 个方格。大鼠 4 肢完全进入一个分区计水平活动得分 1 分、双前肢完全抬离地面至放下计垂直活动得分 1 分,同时计数大鼠的修饰(理毛)次数和大便颗粒数。每只动物仅进行一次测定,每次观察 3 min。两只动物之间用体积分数为 10% 的乙醇清洗方箱周壁及底板。

**1.4.5 糖水消耗实验** 每次 Open-field-test 后进行,各组大鼠分别给予 1% 蔗糖水溶液 200 mL、纯水 200 mL,测定 1 h 动物饮用 1% 蔗糖水量和纯水量。

$$\text{糖水偏爱度} = \frac{1\% \text{蔗糖水消耗量}}{(1\% \text{蔗糖水消耗量} + \text{纯水消耗量})} \times 100\%$$

计算出各组大鼠糖水偏爱度。

**1.4.6 检测大鼠海马组织 MKP-1, Bcl-2 蛋白表达**

第 21 天行为学测试完成后,每组各取 6 只大鼠,用乙醚吸入麻醉后开胸,左心室插管,右心耳下开右心房,快速灌注生理盐水约 200 mL,进行全身灌注。断头处死大鼠,立即在冰台上开颅,迅速分离出海马。一侧海马经固定、脱水、包埋、切片等步骤制作成切片,进行免疫组织化学染色,另一侧 -80 °C 冻存储备用。采用免疫组化 SP 检测法,当细胞膜上出现适当的阳性颗粒时,及时双蒸水冲洗终止显色。苏木素复染、水洗、盐酸乙醇稍分化后返蓝,常规脱水、透明、中性树脂封片。Olympus 显微镜、DP801 形态分析软件进行图像采集和处理,测量 MKP-1, Bcl-2 蛋白抗原表达的总面积、阳性细胞数和平均吸光度 A(每个海马做 3 张切片,每张切片按照 Ca1-Ca4 区,齿状回区分 5 区,每个分区测 5 个视野),计算积分吸光度(IA)。

**1.4.7 检测 MKP-1, MSK-1, CREB, Bcl-2 的表达** 取冻存海马组织 4 °C 解冻后,分别放入 DEPC 处理的 EP 管中,用眼科剪于冰上将其剪碎,加入 1 mL Trizol 匀浆。

**抽提总 RNA:**按 RNAiso Reagent 试剂盒操作说明提取大鼠一侧海马组织总 RNA,紫外分光光度计及琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的纯度、浓度及完整性。

**逆转录反应:**按 SYBR® ExScript™ 实时定量 PCR Kit 反转录反应试剂盒方法操作,反应参数如下:反转录反应 42 °C, 15 min,反转录酶失活反应 95 °C, 2 min。

**PCR 反应:**采用 SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) kit 试剂盒推荐反应体系,总体积 25 μL。

引物序列如下:

- MKP-1:Forward, 5'-CGTGAAGCAGAGCGGAGTA-3'
- Reverse, 5'-AGGGAAGTTGAAGACCGTTGTAG-3'
- MSK-1:Forward, 5'-ATAACTGTGGATCATTCGGACC-3'
- Reverse, 5'-GAGTTCTCTGAGCATAGGTGTG-3'
- CREB:Forward:5'-ACAGATTGCCACATTAGC-3'
- Reverse:5'-CTCCTCCCTGGTAATGG-3'
- Bcl-2:Forward, 5'-AAGCACATCCAATAAAAAGCGC-3'
- Reverse, 5'-GTTATCATACCCTGTTCTCCCG-3'
- GAPDH:Forward, 5'-TCCAGTATGACTCTACCCAGC-3'
- Reverse, 5'-CACGACATACTCAGCACCAG-3'

分别扩增 MKP-1, MSK-1, CREB, Bcl-2, GAPDH,每样本 3 复孔,得到阈循环值(Ct)平均值并按照下述公式计算 ΔΔCt 值:

$$\Delta C_T(\text{test}) = C_T(\text{target, test}) - C_T(\text{ref, test})$$

$$\Delta C_T(\text{calibrator}) = C_T(\text{target, cal}) - C_T(\text{ref, cal})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{test}) - \Delta C_T(\text{calibrator})$$

各个指标 mRNA 表达水平以 2<sup>-ΔΔCt</sup> 表示。

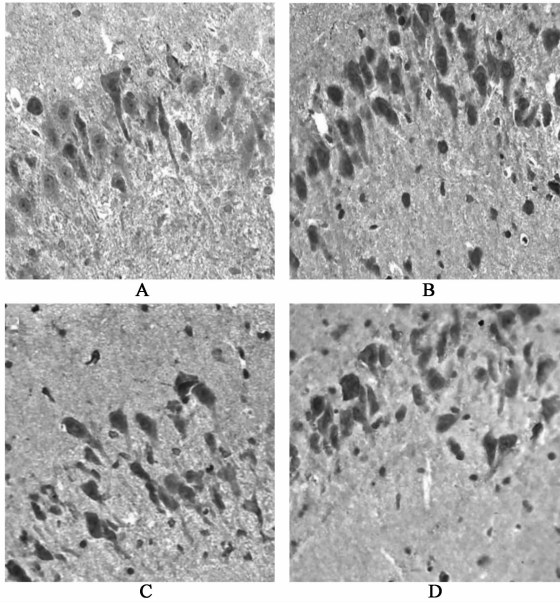
**1.4.8 统计学方法** 运用 SPSS 13.0 软件包,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较用 LSD 检验, P < 0.05 为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠行为学评价** Open-field-test 检测大鼠行为学改变。实验第 1 天,各组大鼠行为评分无差异。第 7 天,模型组较正常对照组水平运动与垂直运动得分降低,差异有统计学意义(P < 0.05),糖水偏爱度与体重增长稍有降低趋势但无显著性差异;与模型组相比,氟西汀组和 β-细辛醚组水平、垂直运动得分均升高(P < 0.05),体重与糖水偏爱度均无显著性差异。第 14 天,模型组较之正常对照组的水平、垂直运动得分、体重与糖水偏爱度均显著降低(P < 0.05);与模型组比较,氟西汀组和 β-细辛醚组水平、垂直运动得分与糖水偏爱度均明显升高,体重升高但差异不显著。第 21 天,与正常对照组相比,模型组水平、垂直运动得分、体重和糖水偏爱度继续降低(P < 0.05);与模型组比较,氟西汀组和 β-细辛醚组水平、垂直运动得分、糖水偏爱度及体重均明显升高(P < 0.05)。

**2.2 各组大鼠海马区 MKP-1, Bcl-2 蛋白表达** 模型组大鼠海马区 MKP-1 表达明显强于正常组,经图像分析系统测得的(IA)值较正常组上调(P < 0.05);β-细辛醚组和氟西汀组的 MKP-1 表达均较正常组强且较模型组弱,两者(IA)值与模型组有差异(P < 0.05),但两者之间差异无统计学意义。Bcl-

2 的蛋白表达趋势与 MKP-1 正好相反,正常组显示较强的染色,而模型组染色较弱,两者(IA)值差别有统计学意义( $P < 0.05$ ); $\beta$ -细辛醚组和氟西汀组蛋白表达强度介于两者之间,其(IA)值与模型组有统计学差异( $P < 0.05$ ),两者间差异无统计学意义。各组大鼠海马区 MKP-1 蛋白表达见图 1, Bcl-2 蛋白表达见图 2。



A: 正常对照组; B: 模型组;

C:  $\beta$ -细辛醚 1.2 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 组; D: 氟西汀 25 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 组

图 1 大鼠海马区 MKP-1 蛋白表达 4 000(图 2 同)

**2.3 大鼠海马区 MKP-1, MSK-1, CREB 和 Bcl-2 的 mRNA 含量** 模型组 MKP-1 的  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值明显高于正常组、氟西汀组和  $\beta$ -细辛醚组,其差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ ); $\beta$ -细辛醚组、氟西汀组的  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值略高于正常组,但与正常组相比较无统计学差异;

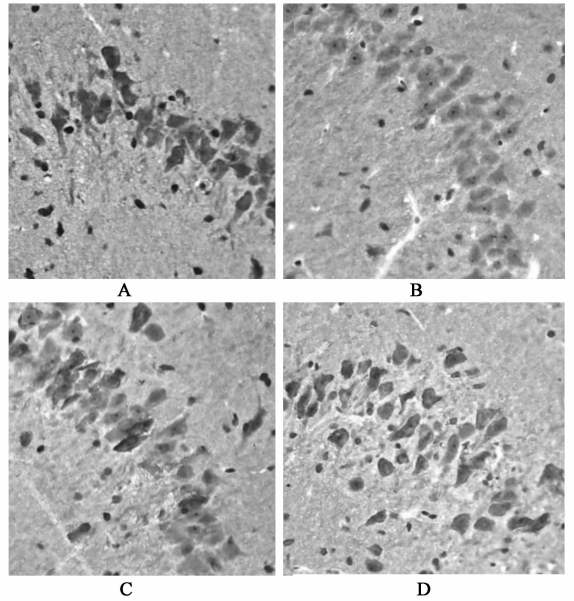


图 2 大鼠海马区 Bcl-2 蛋白表达(4 000)

$\beta$ -细辛醚组和氟西汀组间无统计学差异。模型组 MSK-1 的  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值低于正常组、氟西汀组和  $\beta$ -细辛醚组,其差异均具有显著性( $P < 0.05$ ); $\beta$ -细辛醚组和氟西汀组之间差异无统计学意义。模型组 CREB mRNA 较正常组呈下调趋势,其  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); $\beta$ -细辛醚组和氟西汀组 CREB mRNA 含量介于前两者之间,与模型组有统计学差异( $P < 0.05$ ),而与正常组差异不显著; $\beta$ -细辛醚组和氟西汀组之间差异不具有显著性。模型组 Bcl-2 mRNA 较正常组呈下降趋势,其  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值低于正常组、氟西汀组和  $\beta$ -细辛醚组,与这 3 组相比较差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ ); $\beta$ -细辛醚组和氟西汀组之间差异不具有显著性。各组大鼠海马区 MKP-1, MSK-1, CREB 和 Bcl-2 的 mRNA 含量分别见表 1~4。

表 1 大鼠海马区 MKP-1 mRNA 表达( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	$C_T$ MKP-1	$C_T$ GAPDH	$\Delta C_T$ MKP-1 ( $C_{TMKP-1} - C_{TMKP-1 \text{ blank}}$ )	$\Delta C_T$ GAPDH ( $C_{TGAPDH} - C_{TGAPDH \text{ blank}}$ )	$\Delta\Delta C_T$ ( $\Delta C_{TMKP-1} - \Delta C_{TGAPDH}$ )	MKP-1 相对表达量
正常	-	18.81 ± 0.49	14.12 ± 0.11	-12.69 ± 0.49	-17.3 ± 0.11	4.61 ± 0.38	0.04
模型	-	17.87 ± 0.18	14.09 ± 0.12	-13.63 ± 0.18	-17.33 ± 0.12	3.7 ± 0.06	0.08
氟西汀	1.2	18.10 ± 0.32	14.07 ± 0.05	-13.4 ± 0.32	-17.35 ± 0.05	3.95 ± 0.27	0.06
$\beta$ -细辛醚	25	18.36 ± 0.30	14.04 ± 0.05	-13.06 ± 0.30	-17.38 ± 0.05	4.32 ± 0.25	0.05

### 3 讨论

鼠与人类均属群居动物,孤养模拟人类失去社会和家庭支持的孤独状态,CMUS 复制人类抑郁症中慢性、低水平的应激源导致的抑郁症发生。CMUS 模拟了抑郁症的核心症状:快感缺乏、社会活

动和探索行为能力下降,其引起的行为改变能够持续数周至数月,抗抑郁药的长期应用可以改善上述行为改变,常用于抑郁症发病机制的探索和抗抑郁药物的筛选<sup>[9-10]</sup>。本实验采取正常对照组大鼠 5 只/笼,保证其良好生活环境和群居氛围;模型组、氟

表 2 大鼠海马区 MSK-1 mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	C <sub>T</sub> MSK-1	C <sub>T</sub> GAPDH	$\Delta C_{T \text{ MSK-1}}$ (C <sub>T MSK-1</sub> - C <sub>T MSK-1 blank</sub> )	$\Delta C_{T \text{ GAPDH}}$ (C <sub>T GAPDH</sub> - C <sub>T GAPDH blank</sub> )	$\Delta \Delta C_T$ ( $\Delta C_{T \text{ MSK-1}}$ - $\Delta C_{T \text{ GAPDH}}$ )	MSK-1 相对表达量
正常	-	17.48 ± 0.14	14.12 ± 0.11	-14.12 ± 0.14	-17.3 ± 0.11	3.18 ± 0.03	0.11
模型	-	18.39 ± 0.24	14.09 ± 0.12	-13.21 ± 0.24	-17.33 ± 0.12	4.12 ± 0.12	0.06
氟西汀	1.2	17.89 ± 0.16	14.07 ± 0.05	-13.71 ± 0.16	-17.35 ± 0.05	3.64 ± 0.11	0.08
β-细辛醚	25	17.94 ± 0.10	14.04 ± 0.05	-13.66 ± 0.10	-17.38 ± 0.05	3.72 ± 0.05	0.08

表 3 大鼠海马区 Bcl-2 mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	C <sub>T</sub> Bcl-2	C <sub>T</sub> GAPDH	$\Delta C_{T \text{ Bcl-2}}$ (C <sub>T Bcl-2</sub> - C <sub>T Bcl-2 blank</sub> )	$\Delta C_{T \text{ GAPDH}}$ (C <sub>T GAPDH</sub> - C <sub>T GAPDH blank</sub> )	$\Delta \Delta C_T$ ( $\Delta C_{T \text{ Bcl-2}}$ - $\Delta C_{T \text{ GAPDH}}$ )	Bcl-2 相对表达量
正常	-	17.97 ± 0.30	14.09 ± 0.12	-13.73 ± 0.30	-17.33 ± 0.12	3.57 ± 0.19	0.08
模型	-	19.17 ± 0.37	14.12 ± 0.11	-12.53 ± 0.37	-17.3 ± 0.11	4.8 ± 0.25	0.04
氟西汀	1.2	18.22 ± 0.21	14.07 ± 0.05	-13.48 ± 0.21	-17.35 ± 0.05	3.87 ± 0.16	0.06
β-细辛醚	25	17.96 ± 0.27	14.04 ± 0.05	-13.74 ± 0.27	-17.38 ± 0.05	3.64 ± 0.22	0.08

表 4 大鼠海马区 CREB mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	C <sub>T</sub> CREB	C <sub>T</sub> GAPDH	$\Delta C_{T \text{ CREB}}$ (C <sub>T CREB</sub> - C <sub>T CREB blank</sub> )	$\Delta C_{T \text{ GAPDH}}$ (C <sub>T GAPDH</sub> - C <sub>T GAPDH blank</sub> )	$\Delta \Delta C_T$ ( $\Delta C_{T \text{ CREB}}$ - $\Delta C_{T \text{ GAPDH}}$ )	CREB 相对表达量
正常	-	18.09 ± 0.44	14.09 ± 0.12	-13.49 ± 0.44	-17.33 ± 0.12	3.84 ± 0.32	0.07
模型	-	19.29 ± 0.31	14.12 ± 0.11	-12.29 ± 0.31	-17.3 ± 0.11	5.01 ± 0.20	0.03
氟西汀	1.2	18.78 ± 0.24	14.07 ± 0.05	-12.8 ± 0.24	-17.35 ± 0.05	4.55 ± 0.19	0.04
β-细辛醚	25	18.70 ± 0.30	14.04 ± 0.05	-12.88 ± 0.30	-17.38 ± 0.05	4.5 ± 0.25	0.04

西汀组和 β-细辛醚组大鼠 1 只/笼,处于孤养状态,结合 CMUS 法制造抑郁模型。

敞箱实验即旷场实验 (Open-field-test),是评价实验动物在新异环境中自主行为、探究行为与紧张度的一种方法。以实验动物在新奇环境之中某些行为的发生频率和持续时间等,反应实验动物在陌生环境中的自主行为与探究行为,观察由此而产生的焦虑和抑郁,Open-field-test 评分降低表示动物抑郁程度上升。糖水消耗量反映动物的奖赏反应程度,糖水消耗百分比降低提示快感缺失,动物处于抑郁状态<sup>[11]</sup>。Open-field-test 和糖水消耗实验是检测模型成功与否的有效客观指标。本实验采用 CMUS 和孤养两种经典模型结合的造模方式,经 21 d,模型组大鼠的 Open-field-test 评分和糖水消耗百分比均显著降低,表现出精神运动迟滞、兴趣丧失、快感缺乏等特征,模型达到预期标准。

海马是人类成年后神经发生的主要结构<sup>[12]</sup>,抑郁症患者大脑中与心境相关的结构,尤其是海马存

在形态学变化<sup>[13]</sup>,主要包括:海马神经发生抑制;海马神经元树突回缩;海马神经元萎缩、衰老、死亡;海马体积减少等。有尸检资料表明,抑郁症患者海马 CA3 区锥体细胞和齿状回颗粒细胞数量减少、CA3 区锥体神经元发生萎缩,海马体积减少<sup>[14]</sup>。经过抗抑郁治疗后上述这些变化可以在某种程度上逆转<sup>[12]</sup>,本实验通过对 HE 染色切片的观察印证了这一结论:正常对照组锥体细胞密集排列,细胞完整,边界清、核清晰;模型组锥体细胞数目减少,排列紊乱,有细胞坏死;氟西汀组和 β-细辛醚组锥体细胞数目较多,形态结构与正常对照组接近。可见成人海马的神经发生在抑郁症的发病过程中起相当关键的作用<sup>[15]</sup>。

氟西汀是选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂,是目前临床用于治疗抑郁症的首选药物。将 β-细辛醚与氟西汀做了横向对比,旨在确定 β-细辛醚抗抑郁作用。在 β-细辛醚的用药剂量上,在预实验中做了 20,25,30 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 3 个剂量的对比。结果显示

20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 组在 Open-field-test 和糖水消耗量上与模型组没有显著性差异,而 30 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 组大鼠出现明显的兴奋多动,25 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 组大鼠的行为学检测结果与模型组有差异,且没有明显兴奋体征,较为理想。

MKP-1 是一个神经营养因子,在抑郁症患者以及抑郁症模型大鼠的海马组织中高度表达,是抑郁症一个重要的负调控基因。MKP-1 可以通过负反馈调控丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAK) 及其级联反应 (neurotrophic factor-MAPK cascade)<sup>[16]</sup>,包括负性调节 ERK, JNK 和 p38<sup>[17]</sup>,并可以抑制细胞凋亡。慢性应激可以激活 MKP-1,通过 ERK 调控 ERK1/2 信号通路,活化后的 ERK1/2 可以激活 MSK 或 RSK,进而激活细胞核内的 CREB,诱导神经元细胞功能下降,促使其萎缩与凋亡<sup>[18]</sup>。

本实验结果证实, MKP-1 在抑郁症模型大鼠的海马组织内高度表达, MSK-1, CREB, Bcl-2 在模型组的表达量明显低于正常组。在慢性轻度不可预见性应激加孤养模式下,大鼠处于抑郁状态<sup>[8]</sup>, MKP-1 的表达量也显著升高,随之对 MSK-1 进行负性调节,导致 CREB 降低,诱导神经元凋亡,抑制 Bcl-2 表达。经过 21 d 的造模和  $\beta$ -细辛醚、氟西汀灌胃,模型组与正常对照组、氟西汀组和  $\beta$ -细辛醚组大鼠的行为学改变差异显著;氟西汀组和  $\beta$ -细辛醚组的 MKP-1 表达低于模型组,而 MSK-1, CREB 和 Bcl-2 表达量明显高于模型组。证明  $\beta$ -细辛醚和氟西汀对 MKP-1 具有抑制作用,通过减少 MKP-1 的蛋白表达,解除其对 MSK-1, CREB, Bcl-2 的抑制,从而减少神经元萎缩与凋亡,达到治疗抑郁症的效果。还对氟西汀组和  $\beta$ -细辛醚组的各个指标进行对比分析,两者各个指标间无统计学差异,因此认为  $\beta$ -细辛醚具有明显的抗抑郁作用, $\beta$ -细辛醚可有效改善抑郁模型大鼠的抑郁症状,其机制可能与减少海马区 MKP-1,增强 MSK-1, CREB, Bcl-2 蛋白表达有关。

#### [参考文献]

[1] Fossati P, Ergis A M, Allilaire J F. Executive functioning in unipolar depression: a review [J]. *Encephale*, 2002, 28(2):97.

[2] 李明亚, 李娟好, 季宁东, 等. 石菖蒲几种粗提取物的抗抑郁作用[J]. *广东药学院学报*, 2004, 20(2):141.

[3] 李腾飞, 孙秀萍, 高江晖, 等. 石菖蒲水提物对获得性无助模型的抗抑郁作用[J]. *中国实验方剂学杂*

志, 2012, 18(2):132.

[4] 魏立平, 吴玫涵. 用气相色谱法同时测定石菖蒲挥发油中  $\alpha$ -细辛醚和  $\beta$ -细辛醚的含量[J]. *解放军药学学报*, 2005, 21(1):62.

[5] 柯雪红, 方永奇. RP-HPLC 测定石菖蒲、水菖蒲药材中  $\beta$ -细辛醚,  $\alpha$ -细辛醚的含量[J]. *中国中药杂志*, 2004, 29(3):279.

[6] 孙玉荣, 张晓杰, 姚宏波.  $\beta$ -细辛醚对抑郁症模型大鼠海马区 BDNF 的影响[J]. *中国中医药咨讯*, 2012, 4(3):69.

[7] Shirayama Y, Chen A C, Nakagawa S, et al. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(8):3251.

[8] Han D, Wang E C. Remission from depression: a review of venlafaxine clinical and economic evidence [J]. *Pharmacoeconomics*, 2005, 23(6):567.

[9] 董海影, 兴桂华, 张晓杰. 不同年龄组大鼠抑郁症模型评价[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(10):1796.

[10] 李晓秋, 许晶. 抑郁动物模型的研究进展[J]. *中华精神科杂志*, 2002, 35(3):184.

[11] Lu X Y, Kim C S, Frazer A, et al. Leptin: a potential novel antidepressant [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(5):1593.

[12] Monje M L, Palmer T. Radiation injury and neurogenesis [J]. *Curr Opin Neurol*, 2003, 16(2):129.

[13] 孟盼, 王宇红, 张秀丽. 抑郁症大海马神经可塑性机制研究进展[J]. *世界中西医结合杂志*, 2012, 7(10):914.

[14] Mac Queen G M, Campbell S, McEwen B S, et al. Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(3):1387.

[15] 樊蔚虹, 姚建平, 杨清, 等. 柴胡疏肝散干预卒中后抑郁模型大鼠海马神经细胞凋亡的机制研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(22):216.

[16] Wu J J, Bennett A M. Essential role for mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 in stress-responsive MAP kinase and cell survival signaling [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(16):16461.

[17] Molina J R, Adjei A A. The Ras/Raf/MAPK pathway [J]. *J Thorac Oncol*, 2006, 1(1):7.

[18] Ha S, Redmond L. ERK mediates activity dependent neuronal complexity via sustained activity and CREB-mediated signaling [J]. *Dev Neurobiol*, 2008, 68(14):1565.