

舒郁胶囊含药血清对大鼠海马神经元 γ 氨基丁酸 B₂ 受体蛋白表达的影响

姜英凤¹, 高杰², 魏盛¹, 薛玲^{1*}, 葛庆芳¹

(1. 山东中医药大学中医药经典理论教育部重点实验室, 济南 250355;

2. 山东中医药大学基础医学院, 济南 250355)

[摘要] 目的: 观察抑郁情绪大鼠模型给药血清对离体海马神经元 γ 氨基丁酸 B₂ 受体(GABA_BR2)蛋白表达的影响, 初步探讨舒郁胶囊及其君药柴胡对抑郁情绪的干预作用和机制。方法: 35 只 Wistar 大鼠随机分为 5 组: 正常组、模型组、舒郁组(0.51 g·kg⁻¹)、柴胡组(0.4 g·kg⁻¹)和氟西汀组(0.002 g·kg⁻¹), 采用 28 d 慢性温和刺激(CMS)制备抑郁情绪大鼠模型, 治疗组造模的同时灌胃给药, 通过大鼠体重、糖水摄入量、旷场实验对模型进行评价, 评定模型复制成功后, 制备各组大鼠血清, 采用血清药理学方法, 通过抑郁情绪模型大鼠各组血清干预大鼠原代海马神经元, 应用蛋白免疫印迹技术, 检测海马神经元 GABA_BR2 的蛋白表达。结果: 与正常组大鼠相比, 模型组体质量、糖水实验的糖水摄入、旷场实验总分均显著减少($P < 0.01$); 而造模并分别给予舒郁、柴胡和氟西汀的大鼠较模型组大鼠体质量、糖水实验的糖水摄入、旷场实验总分显著增加($P < 0.05, P < 0.01$)。蛋白免疫印迹结果显示, 与正常组血清干预的海马神经元相比, 模型血清组海马神经元 GABA_BR2 蛋白表达显著升高($P < 0.01$); 造模并给予舒郁胶囊血清组和氟西汀血清组干预的大鼠海马神经元 GABA_BR2 蛋白表达较模型血清组显著降低($P < 0.05$), 柴胡组有改善的趋势, 但无显著性差异。结论: 抑郁情绪模型大鼠血清可诱导大鼠海马神经元 GABA_BR2 蛋白表达上调, 舒郁胶囊可能是通过降低海马神经元 GABA_BR2 蛋白表达发挥抗抑郁作用。

[关键词] 抑郁情绪; 舒郁胶囊; γ 氨基丁酸 B₂ 受体; 血清药理学

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0165-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120704.1743.029.html>

[网络出版时间] 2012-07-04 17:43

[收稿日期] 20120214(011)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)课题(2011CB505102); 国家自然科学基金重点项目(30930110); 山东省科技发展计划项目(2010GSF10290)

[第一作者] 姜英凤, 硕士在读, 从事中药调肝方药药理研究, Tel: 13791121072, E-mail: jiangyingfeng20@163.com

[通讯作者] * 薛玲, 教授, 硕士生导师, 从事中药调肝方药药理研究, Tel: 0531-89628596, E-mail: xxueling@163.com

实验结果进一步揭示和证实中药大黄炮制的核心是使中药饮片药性发生了改变, 而究其本质则是炮制后其内在物质基础发生相应的变化, 但大黄炮制品各组分之间化学成分组成和含量与其生物学机制之间的内在联系尚有待深入研究。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(精选本)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998: 355.
- [2] 刘沛, 佟继铭, 刘喜纲, 等. 大黄总蒽醌结肠定位微球的生物黏附性及泻下作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 165.

- [3] 吴连英, 江文君, 毛淑杰, 等. 中药大黄炮制 II——炮制对大黄泻下作用与泻下成分的影响[J]. 中药通报, 1983, 8(2): 20.
- [4] 高晓山, 王旭华. 配伍对大黄止泻作用的影响[J]. 冶金医学情报, 1999, 7(3): 113.
- [5] 李燕, 隋峰, 刘亮亮, 等. 大黄各炮制品提取物泻下作用的比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 151.
- [6] 王家葵, 李傲, 王慧, 等. 正品大黄不同品种间泻下效价强度比较研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1987.

[责任编辑 李玉洁]

Effect of Shuyu Capsule Contained Serum on the Expression of γ -aminobutyric Acid B₂ Receptor in Primary Cultured Rat Hippocampus Neurons

JIANG Ying-feng¹, GAO Jie², WEI Sheng¹, XUE Ling^{1*}, GE Qing-fang¹

(1. Key Laboratory for Classical Theory of Traditional Chinese Medicine (TCM) of Education Ministry, Shandong University of TCM, Ji'nan 250355, China; 2. School of Basic Medicine, Shandong University of TCM, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** Our aim was to investigate the protein changes of the expression of γ -aminobutyric acid B₂ (GABA_BR2) receptor in primary cultured rat hippocampus neurons, to explore the intervention mechanism of Shuyu capsule for treating depression emotion preliminarily. **Method:** We used the chronic mild stress (CMS) to establish the depression emotion (DE) model in rats, and then the rats were evaluated by sucrose intake, the body weight and open-field from beginning to the end for the model. Serum of rats in each group was collected and then added into the medium of *vitro* cultured hippocampus primary neurons. At last the expression of γ -aminobutyric acid B₂ receptor was detected with Western blot respectively. **Result:** Compared with the normal group, the weight, the total score of open field test and the sucrose intake of preference test of rats in depression emotion model group lessened significantly ($P < 0.01$). On the other hand, compared with the depression emotion model group, the weight, the total score of open field test and the sucrose intake of preference test of rats in Shuyu capsule, bupleurum and fluoxetine treatment groups increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Western blot demonstrated that the serum of model group rats obviously increased the protein levels of GABA_BR2 ($P < 0.01$), compared with the normal control group. While serum of the Shuyu capsule and fluoxetine treatment groups markedly decreased the protein levels of GABA_BR2 ($P < 0.05$), the bupleurum group had no difference with the model group, but the trend had improved. **Conclusion:** The serum of rats with depression emotion could induce the high expression of GABA_BR2, the Shuyu capsule may play antidepressants by reducing the expression of GABA_BR2 in primary cultured rat hippocampus neurons. The bupleurum also has a good antidepressant effect, but the effect is less than Shuyu capsule.

[Key words] depression emotion; Shuyu capsule; γ -aminobutyric acid B₂ receptor; serum pharmacology

抑郁情绪是一类典型的情志病的核心症状表现^[1],是一种以显著而持久的心境低落为主要特征的情绪反应。舒郁胶囊是全国名老中医张珍玉教授根据多年诊治经验研发的治疗抑郁经验方,临床疗效显著,机制尚未完全明确。 γ 氨基丁酸 B 受体 (GABA_BR) 存在于神经元的突触前及突触后部位,介导慢的抑制性效应,抑郁、焦虑、紧张、失眠等神经系统疾病有密切的关系。本研究首先采用慢性温和应激法 (chronic mild stress, CMS) 复制抑郁情绪大鼠模型,制备抑郁情绪大鼠模型血清,利用蛋白印迹技术 (Western blot) 检测海马神经元内 γ 氨基丁酸 B₂ 受体 (GABA_BR2) 蛋白表达的变化,以期在离体细胞水平上研究抑郁情绪致病的中枢机制,并初步探讨中药舒郁胶囊及其君药柴胡纠正抑郁情绪的作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 Wistar 大鼠, SPF 级, 130 ~ 150 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证号 SCXK (京) 2002-0003。

1.2 药物及试剂 舒郁胶囊, 由柴胡、白芍、香附、甘草等组成 (新药临床批件号 2008L11169), 氟西汀 (礼来苏州制药有限公司, 批号 H20050463), GABA_BR2 一抗 (G9920, Sigma), GABA_BR2 二抗 donkey anti-rabbit IgG (Ab16284, Abcam), β -actin 一抗 (Sc-47778, Santa cruz), β -actin 二抗 goat anti-mouse IgG-HRP (Sc-2005, Santa cruz), 预染蛋白 marker (26681, Pierce), PMSF (P7626, Sigma), BeyoECL Plus (P0018, 碧云天生物技术研究所), 丙烯酰胺 (Acr)、甲叉双丙烯酰胺 (Bic)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、甘氨酸 (上海生工生物工程技术服务

有限公司),脱脂奶粉(美国 BD)。

1.3 仪器 XDS-1B 倒置显微镜(中国重庆光电有限公司),解剖显微镜(Olympus 公司),超净工作台(中国苏净集团),CO₂ 培养箱(上海力新有限公司),Power Pac Basic 电源、Bio-Rad 电泳仪、转印仪(美国伯乐公司),CT15RT 台式高速冷冻离心机(上海生美生化仪器设备工程有限公司)。

2 方法

2.1 造模^[2-3]、分组与给药 雄性大鼠 35 只,单笼饲养,自由饮食饮水,温度(21 ± 2) °C,光照自 8:00 至 20:00,适应环境 1 周,应激操作开始前,记录糖水摄入量,进行旷场试验并称量大鼠体重,根据体重,糖水与旷场实验基线期数据随机分为 5 组,每组 7 只。即正常对照组、抑郁情绪模型组、舒郁胶囊模型给药组、柴胡提取物模型给药组、氟西汀胶囊模型给药组(以下简称正常组、模型组、舒郁组、柴胡组、氟西汀组)。除正常组外各组共接受 4 周不同刺激,应激源包括:剥夺饮食饮水;倾斜鼠笼;持续光照;弄脏鼠笼(100 mL 水倾倒在垫料上);频闪光照刺激(100 次/min);间断式白噪声刺激(85 dB);气味刺激;鼠笼内放置陌生物品;限制进食刺激(每日 3 片饲料);空瓶刺激;夹尾刺激。

采取灌胃给药方法,给药条件:①正常组:不给予任何刺激,放入鼠笼内,每天给予相同体积的灭菌水。②模型组:造模同时给予与正常组相同体积的灭菌水。③舒郁组:造模同时给予舒郁胶囊(较佳给药剂量为 0.51 g·kg⁻¹)。④柴胡组:造模同时给予柴胡提取物(给药剂量按照舒郁胶囊复方的配比,0.4 g·kg⁻¹)。⑤氟西汀:造模同时给予氟西汀胶囊(较佳给药剂量为 0.002 g·kg⁻¹,相当于人临床 6 倍剂量)。

2.2 行为学评价 造模刺激 4 周后,再次称量大鼠体重,旷场实验和糖水偏好实验对模型组进行评价。

旷场实验:旷场实验箱 100 cm × 100 cm × 50 cm,周壁底面为黑色,底面用白线划为面积相等的 25 块,沿墙格称外周格,其余为中央格;分别记录大鼠水平得分和垂直得分。每只动物造模结束后进行 1 次测定,3 min/次,行为评定采用盲法。旷场实验得分 = 水平得分 + 垂直得分。

糖水偏好实验:实验中向大鼠提供 2 瓶水,使其 24 h 内自由选择。1 瓶含 0.8% 蔗糖水溶液,1 瓶则为自来水。为避免大鼠喜好饮一侧水,2 个瓶子位置 12 h 倒换 1 次。实验前大鼠自由饮食,自来水和糖水消耗通过测量瓶子质量测得。糖水偏好用消耗

糖水占整个液体消耗百分比表示。

2.3 血清的制备 末次给药 1.5 h^[4],1% 戊巴比妥钠溶液 ip 麻醉,下腔静脉取血 5 mL,3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取血清,各组血清合并,分装, -20 °C 密封保存。用前 56 °C 30 min 灭活,0.45 μm 微孔滤膜滤菌。

2.4 海马神经元的培养^[5] 将新生大鼠海马原代神经元培养 7 d 后[培养基:(Neurobasal:澳洲胎牛血清:B27:L-谷氨酰胺 = 90 mL:10 mL:2 mL:1 mL)],随机分为:①空白对照组(无血清培养基);②正常血清孵育组(加入正常组大鼠血清的培养基);③模型血清孵育组(加入含模型组大鼠血清的培养基);④舒郁血清孵育组(加入含舒郁组大鼠血清的培养基);⑤柴胡血清孵育组(加入含柴胡组大鼠血清的培养基);⑥氟西汀血清孵育组(加入含氟西汀组大鼠血清的培养基);使血清最终容积为 10%,继续培养 24 h,收集细胞并抽提总蛋白质,采用 BCA 法测定蛋白含量,其余加入 5 × SDS 上样缓冲液至终浓度为 1 × SDS,变性, -20 °C 密封保存以备电泳上样。

2.5 GABA_B R2 在大鼠海马神经元中的水平 以 30 μg/泳道上样,经 SDS-PAGE 电泳分离后,湿法转移至 NC 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液室温封闭 1 h,分别与 GABA_B R2(1:200,5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液稀释)和 β-actin(1:1500)的抗体室温摇床孵育 2 h,再与相应二抗室温孵育 1 h,ECL 化学发光试剂检测杂交信号,显影于 X 射线片上,用凝胶成像分析仪在可见光透射下对 X 射线片进行扫描和图像分析。以 GABA_B R2 和内参 β-actin 的吸光度比值作为所测样品中相应指标的相对表达量。

2.6 数据统计处理 实验数据用 GraphPad Prism 5 (GPW5-384305-RAG-5235,Graphpad software, Inc.) 统计软件进行单因变量多因素方差分析和 LSD 法检验,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著性水平为 $P < 0.05$ 。

3 结果

3.1 各组大鼠体重、糖水偏好系数比较 造模前各组大鼠体重及糖水偏好系数无显著性差异,经过 4 周慢性应激之后,与正常组相比,模型组大鼠体重下降($P < 0.01$),糖水偏好系数较正常组显著降低($P < 0.01$),与模型组大鼠相比,造模同时给予舒郁胶囊和氟西汀的大鼠,体重增长显著($P < 0.05$),糖水偏好系数明显升高($P < 0.01$)。而柴胡组较模型组则无显著性差异,但柴胡组大鼠体重有明显增加的趋势,见表 1。

表 1 各组大鼠体重、糖水偏好系数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	造模前		造模后	
		体重/g	糖水偏好系数	体重/g	糖水偏好系数
正常	-	176.4 ± 3.5	0.83 ± 0.15	301.1 ± 10.5	0.87 ± 0.08
模型	-	173.0 ± 6.9	0.88 ± 0.18	252.5 ± 6.2 ¹⁾	0.51 ± 0.13 ¹⁾
舒郁	0.51	175.9 ± 7.0	0.88 ± 0.19	292.8 ± 13.4 ²⁾	0.82 ± 0.12 ³⁾
柴胡	0.4	178.7 ± 6.3	0.82 ± 0.15	288.5 ± 13.4	0.78 ± 0.15 ²⁾
氟西汀	0.002	172.1 ± 9.2	0.86 ± 0.20	294.5 ± 14.5 ²⁾	0.86 ± 0.12 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 2~3 同)。

3.2 各组大鼠旷场实验行为学得分比较 造模刺激 4 周后,与正常组相比,模型组大鼠旷场实验总分均有显著性减少 ($P < 0.01$)。与模型组相比,给予舒郁胶囊、柴胡和氟西汀的大鼠旷场实验得分均有显著性增加 ($P < 0.01, P < 0.05$),但给药组与正常血清组之间没有显著性差异。见表 2。

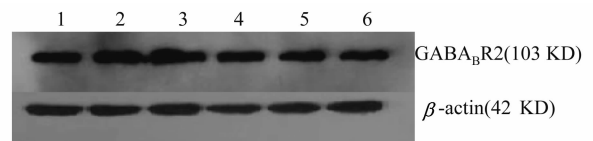
表 2 造模后各组大鼠旷场实验得分比较 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	旷场实验得分
正常	-	79.7 ± 9.6
模型	-	54.2 ± 6.2 ¹⁾
舒郁	0.51	78.5 ± 7.1 ³⁾
柴胡	0.4	73.4 ± 10.6 ²⁾
氟西汀	0.002	79.3 ± 11.3 ³⁾

3.3 抑郁情绪模型血清对大鼠海马神经元 GABA_BR2 蛋白表达变化 以 β -actin 作为内参, GABA_BR2 蛋白表达量的光密度扫描结果显示,与正常组血清干预的海马神经元相比,模型血清组海马神经元 GABA_BR2 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$)。给予舒郁胶囊血清组和氟西汀血清组干预的大鼠海马神经元 GABA_BR2 蛋白表达较模型血清组显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),柴胡组较模型组则无显著性差异,但柴胡组 GABA_BR2 蛋白表达有明显下调的趋势,但给药组与正常血清组之间均没有显著性差异。见图 1,表 3。

4 讨论

本研究采用慢性温和应激法建立抑郁情绪大鼠模型。经过 28 d 的慢性温和应激法后,模型组大鼠体重较正常组显著性降低 ($P < 0.01$),糖水偏好值显著性降低 ($P < 0.01$),旷场得分显著性降低 ($P < 0.01$),吻合临床大部分抑郁情绪患者出现的体重增长缓慢的表现^[6],快感缺乏^[7],行为表现不活跃,



1. 空白组;2. 正常组;3. 模型组;4. 舒郁 0.51 $g \cdot kg^{-1}$ 组;
5. 柴胡 0.4 $g \cdot kg^{-1}$ 组;6. 氟西汀 0.002 $g \cdot kg^{-1}$ 组

图 1 Western blot 检测不同组之间 GABA_BR2/ β -actin 蛋白水平

表 3 各组海马神经元 GABA_BR2/ β -actin 蛋白的相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	GABA _B R2 蛋白相对量
空白	-	1.62 ± 0.08
正常	-	1.61 ± 0.12
模型	-	1.90 ± 0.11 ¹⁾
舒郁	0.51	1.64 ± 0.14 ²⁾
柴胡	0.4	1.70 ± 0.16
氟西汀	0.002	1.61 ± 0.11 ³⁾

精神萎靡,较好模拟了抑郁情绪患者的临床表现,综上所述,CMS 制备抑郁情绪大鼠模型是成功的。

现代研究认为,GABA_BR 在中枢神经系统内主要介导慢性抑制效应,其中作为 GABA_BR 亚型之一的 GABA_BR2 与情绪反应密切相关, Mombereau 等^[8]评价 GABA_BR 对小鼠抑郁和焦虑症状产生的影响,结果表明 GABA_BR2 功能缺乏小鼠在强迫游泳实验(FST)中不动时间明显减少,同时选择性 GABA_BR 拮抗剂 CGP56433A 对正常小鼠亦表现出明显的抗不动作用,提示 FST 中 GABA 及其受体参与了动物抑郁、焦虑症状的产生。由本次实验结果可看到,GABA_BR2 在抑郁情绪模型血清干预后的海马神经元中蛋白表达呈现显著性升高,这与 GABA_BR2 的功能为介导神经元抑制效应相吻合,其表达水平升高则可使神经元抑制性作用增强,即神

神经元兴奋性降低,从而在离体水平上证实了 GABA_BR2 与抑郁情绪密切相关,支持 GABA 及其受体参与了动物抑郁症状的产生^[9]推断,但需要进一步证实。另外 Fordl 等^[10]提出海马结构的改变在抑郁障碍发生病因中起主要作用,所以海马区域与情绪反应密切相关,因此本实验选择观察 GABA_BR2 在海马神经元内的表达。

中医普遍认为情志不舒为抑郁致病的重要因素,肝气郁滞为其重要环节。舒郁胶囊是名老中医张珍玉教授研发的治疗抑郁症之肝郁气滞证的经验方。该药具有疏肝解郁、调畅情志的作用,方中君药柴胡具有辛开苦降,调理气机的作用。刘佳莉等^[11]在实验动物行为学方面也证实了柴胡提取组分具有一定的抗抑郁作用。方中白芍为养血柔肝,促进肝主疏泄,维持正常情志活动的要药^[12],另有报道芍药苷具有抗抑郁作用^[13]。本研究采用中药血清药理学的方法更接近药物在体内环境中产生药理效应的真实过程。通过对舒郁组、柴胡组、氟西汀组含药血清干预海马神经元的研究发现,舒郁胶囊可以纠正抑郁情绪模型大鼠血清引起的海马神经元中的 GABA_BR2 蛋白表达异常升高的作用,单味君药柴胡含药血清力度不及中药复方,说明复方组分之间的相互作用有利于药效发挥,对于舒郁胶囊及其柴胡皂苷部分是如何调节 GABA_BR2 信号通路从而引起生物效应还不是很明确,因此在下一步的工作中可以尝试研究该基因的下游信号转导通路等,以做更进一步的探讨。

[参考文献]

[1] 包祖晓,田青,陈宝君,等. 抑郁情绪伴随的常见症状中医用药规律分析[J]. 中医学报,2010,38(5):7.
 [2] Can Yang, Gahua Wang, Huiling Wang, et al. Cytoskeletal alterations in rat hippocampus following chronic unpredictable mild stress and re-exposure to acute and chronic unpredictable mild stress[J]. Behav Brain Res,2009,205(2):518.

[3] Qing-Qiu Mao, Siu-Po Ip, Kam-Ming Ko, et al. Peony glycosides produce antidepressant-like action in mice exposed to chronic unpredictable mild stress: Effects on hypothalamic-pituitary-adrenal function and brain-derived neurotrophic factor [J]. Prog Neuro Psychopharmacol Biol Psychiatry,2009,33(7):1211.
 [4] 苗宇船,李明磊,刘杨,等. 降脂平肝汤含药血清对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):20
 [5] Gregory J Brewer, John R Torricelli. Isolation and culture of adult neurons and neurospheres[J]. Nature Protocols, 2007, 2(6): 1490.
 [6] 许晶,李晓秋. 慢性应激抑郁模型的建立及其评价[J]. 中国行为医学科学,2003,12(1):14.
 [7] 谭倩,张惠云. 舒郁胶囊对抑郁情绪模型大鼠海马和下丘脑内 5-羟色胺 3B 受体分布与表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):137.
 [8] Mombereau C, Kaupmann K, Gassmann M. Altered anxiety and depression-related behaviour in mice lacking GABA_B(2) receptor subunits[J]. Neuroreport, 2005, 28, 16(3):307.
 [9] Serrano A, Haddjeri N, Lacaille J C, et al. GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression [J]. J Neurosci, 2006, 26 (20): 5370.
 [10] Frodl T, Meisenzahl E M, Zetzsche T, et al. Hippocampal changes in patients with a first episode of major depression[J]. Am J Psychiatry,2002,159(7):11.
 [11] 刘佳莉,苑玉和,秦海林,等. 柴胡提取组分抗抑郁作用的研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22 (6):624.
 [12] 王景霞,张建军,苗春平,等. 白芍提取物对嗅球损毁抑郁模型大鼠行为学及下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):155.
 [13] 王景霞,张建军,李伟,等. 白芍提取物治疗抑郁症的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16 (7):183.

[责任编辑 聂淑琴]