

· 药理 ·

舒郁胶囊对原代大鼠海马神经元 5-HT_{3A/3B} 受体表达的影响

葛庆芳¹, 姜英凤¹, 张惠云¹, 高杰^{2*}

(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:** 观察抑郁情绪模型组和模型治疗组大鼠血清对原代培养的大鼠海马神经元 5-HT_{3A/3B} 受体(5-HT_{3A/3BR})蛋白水平表达的影响, 探索复方舒郁胶囊治疗抑郁情绪的微观作用机制。**方法:** 大鼠随机分为 5 组: 正常组、模型组、舒郁胶囊治疗组(0.51 g·kg⁻¹)、柴胡治疗组(0.4 g·kg⁻¹)和氟西汀治疗组(0.002 g·kg⁻¹), 采用孤养结合 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, 收集各组大鼠血清灭活除菌, 干预神经元 24 h 后利用蛋白印迹技术(Western blot)和细胞免疫荧光技术(immunofluorescence, IF)分别测定神经元胞内 5-HT_{3A/3BR} 蛋白表达。**结果:** 与正常血清组相比, 模型组血清海马神经元 5-HT_{3A/3BR} 表达水平均显著升高($P < 0.01$, $P < 0.05$); 与模型组比较, 治疗组均显著下调 5-HT_{3AR} 的异常升高状态($P < 0.01$), 但对 5-HT_{3BR} 表达无明显改变。**结论:** 大鼠海马神经元内 5-HT_{3R} 表达与抑郁情绪关系密切, 5-HT_{3A/3BR} 的表达变化可能是导致抑郁情绪的重要病因之一。舒郁胶囊及其君药柴胡含药血清对以上 2 种蛋白表达的调节趋势与氟西汀一致, 对该病症的疗效显著, 作用机制可能是调节海马神经元内 5-HT_{3AR} 的异常表达。

[关键词] 海马神经元; 舒郁胶囊; 5-HT₃ 受体

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0136-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120711.1156.002.html>

[网络出版时间] 2012-7-11 11:56

Effect of Shuyu Capsule on Expression of 5-HT₃ Receptor in Primarily Cultured Rat Hippocampus Neurons

GE Qing-fang¹, JIANG Ying-feng¹, ZHANG Hui-yun¹, GAO Jie^{2*}

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression levels of Serotonin 3A/B receptor (5-HT_{3A/BR}) in primarily cultured rat hippocampus neurons stimulated with serum respectively from depressive rats and different drugs treated depressive rats for exploring mechanisms of Shuyu Capsule. **Method:** The rats were divided randomly into five groups including normal control, model with depression, treatment groups treated with Shuyu capsule (0.51 g·kg⁻¹), saikosaponin (0.4 g·kg⁻¹) and fluoxetine (0.002 g·kg⁻¹), respectively. The depression emotion model was set up by the methods of isolated breed and chronic mild stress for 28 days. Serum of rats in every group was collected, inactivated and sterilized. After serum contained hippocampus neurons treatment in every group respectively for 24 hours, Western blot and immunofluorescence were separately used to detect the expression levels of 5-HT_{3A} and 5-HT_{3B} receptor protein in neurons. **Result:** The expression of 5-HT_{3A} and

[收稿日期] 20120321(004)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助课题(2011CB505102); 国家自然科学基金重点项目(30930110); 国家自然科学基金面上项目(81072721); 山东省科技发展计划项目(2010GSF10290)

[第一作者] 葛庆芳, 硕士在读, 从事中药调肝方药药理研究, Tel: 15964534677, E-mail: geqingfang123@163.com

[通讯作者] * 高杰, 副教授, 硕士生导师, 从事中药调肝方药药理研究, Tel: 15966629967, E-mail: jiegaosdutcm@163.com

5-HT3B receptor in neurons incubating with serum of rats in model group increased obviously ($P < 0.01$, $P < 0.05$) compared with those in the serum from normal control rat treated neurons. Comparing with the neurons treated with model rats serum, the expression of 5-HT3A receptor in neurons incubated with serum of drug treatment rats were significantly improved ($P < 0.01$), but the expression of 5-HT3B receptor was no statistical difference. **Conclusion:** The expression of 5-HT3 receptor in neurons was closely related with depression, and the differential expression of 5-HT3AR and 5-HT3BR may play important roles in depression emotion. Shuyu, saikosaponin and fluoxetine showed the same tendency on these two proteins expression of neurons, indicating that Shuyu capsule and saikosaponin have notable effect on depression therapy by improving the 5-HT3AR protein expression levels in hippocampus neurons.

[**Key words**] hippocampus neuron; Shuyu capsule; 5-HT3R

抑郁情绪是抑郁症的核心症状,是典型的情志病症,大致属于“郁证”的范畴^[1]。舒郁胶囊是全国名老中医张珍玉教授根据多年临床经验研发的治疗抑郁症的经验方,具有疏肝解郁、调畅情志的作用,针对肝脏气机的调节治疗郁症,临床疗效显著,具体机制尚未完全明确。目前关于抑郁情绪的产生机制主要停留在单胺类神经递质的释放和传递层面,研究表明^[2-4],5-HT3受体(5-HT3R)表达异常可以影响脑组织中神经递质(如5-HT、DA、GABA)的代谢,从而影响人体正常情绪、记忆和精神健康水平。其中5-HT3A/3B受体(5-HT3A/3BR)是5-HT3R最主要的两个受体亚基^[5],广泛分布于中枢和外周神经系统,并且在啮齿类动物中枢神经系统的表达以海马为主,故本实验将大鼠海马神经元内5-HT3A/3BR作为研究对象,设舒郁胶囊、柴胡和阳性对照氟西汀进行药物干预,初步探讨舒郁胶囊治疗抑郁情绪的微观作用机制。

1 材料

1.1 药物 舒郁胶囊(新药临床批件号2008L11169);柴胡提取物,实验室提取分离干燥;氟西汀(礼来苏州制药有限公司,批号H20050463)。

1.2 动物 健康雄性Wistar大鼠,180~220 g,SPF级,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;新生24 h Wistar大鼠购自山东中医药大学实验动物中心,生产许可证号SCXK(鲁)20050015。

1.3 试剂 Neurobasal培养基(Gibco,12348),B27(Gibco,17504),L-glutamine(Gibco,25030-081),fetal bovine serum(Hyclone,30087),Poly-D-lysine(Sigma,P6407),trypsin(Amresco,9002),兔抗大鼠5-HT3A多克隆抗体(Santa Cruz,SC-28958),5-HT3A二抗(Abcam,ab-16248),小鼠抗大鼠 β -actin

单克隆抗体(Sigma,A1978), β -actin二抗(Santa Cruz,SC-2005),预染蛋白Marker(Pierce,26681),丙烯酰胺(Acr),甲叉双丙烯酰胺(Bic),三羟甲基氨基甲烷(Tris,BIO BASIC INC公司),TEMED(Sigma),过硫酸铵(AP,北京索莱宝公司),脱脂奶粉(碧迪医疗器械有限公司),Beyo ECL Plus(碧云天生物技术有限公司),羊抗大鼠5-HT3B多克隆抗体(Santa Cruz,SC-51198),FITC标记山羊抗兔IgG(北京中杉生物技术有限公司,ZF-0314),封闭用正常兔血清工作液(北京中杉生物技术有限公司,ZLI-9022)。

1.4 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),PowerPac 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),共聚焦激光扫描显微镜(LSM510),Image-pro plus6.0图像分析软件。

2 方法

2.1 含药血清制备 动物购回后单笼饲养于光线及温度可控房间,温度(20±4)℃,光照自8:00至20:00,自由进食水。应激操作前,称量体重,结合糖水偏好系数,随机分为正常组、模型组、舒郁治疗组、柴胡治疗组、氟西汀治疗组,10只/组,单笼饲养。

2.2 模型制备与给药 利用孤养结合28 d慢性温和刺激(CMS)制造抑郁情绪模型^[6-7],造模期间不同组分别ig给药。①正常组:不给予任何刺激,给予一定剂量的生理盐水。②模型组:造模同时给予与正常组相同剂量的生理盐水。③舒郁治疗组:造模同时给予舒郁胶囊(剂量为0.51 g·kg⁻¹,相当人临床8倍剂量)。④柴胡治疗组:造模同时给予柴胡提取物(剂量为0.4 g·kg⁻¹,相当人临床8倍剂

量)。⑤氟西汀治疗组:造模同时给予氟西汀(剂量为 $0.002 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 相当人临床 6 倍剂量)。

末次给药 2 h(血药浓度出现峰值时间)^[8]后,腹主动脉取血,分离血清, $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 密封保存。用前 $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌, $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 min 灭活。

2.3 海马神经元分组 根据文献报道^[9-10]稍加改进,采用无血清培养技术原代培养大鼠海马神经元,成熟海马神经元随机分为以下几组:①空白组(不加血清干预);②正常血清组(加入正常组大鼠血清);③模型血清组(加入抑郁情绪模型大鼠血清);④柴胡血清组(加入柴胡治疗组大鼠血清);⑤舒郁血清组(加入舒郁治疗组大鼠血清);⑥氟西汀血清组(加入氟西汀治疗组大鼠血清)。②~⑥加入血清组,使血清最终体积分数为 10%。

2.4 检测 5-HT3AR 蛋白水平 分组裂解血清干预 24 h 后的细胞,提取蛋白样品, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存;BCA 法测定样品蛋白含量;以 $30 \text{ }\mu\text{g}/\text{泳道}$ 上样,经 SDS-PAGE 电泳分离后,湿法转移至 NC 膜上,5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液室温封闭,分别与 5-HT3A(1:200)和 $\beta\text{-actin}$ (1:2000)抗体 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜(抗体均用 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液稀释),TBST 洗膜 3 次,再与 HRP 标记的相应二抗室温孵育 1 h,ECL 化学发光试剂检测杂交信号,显影于 X 射线片,对光片扫描和图像分析。5-HT3A 与 $\beta\text{-actin}$ 内参做灰度比值,以此作为检测样品中蛋白的相对表达量。

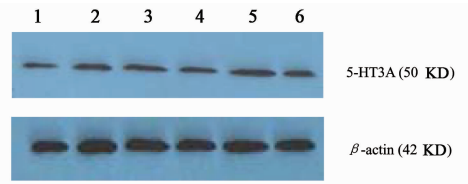
2.5 测定 5-HT3BR 蛋白相对含量 细胞同 2.4, $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 液洗涤细胞,4% 多聚甲醛室温固定后 PBS 洗涤;然后 3% 双氧水封闭内源性过氧化物酶;正常兔血清室温封闭,甩去多余液体后加入 5-HT3B 一抗稀释液(1:50) $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜;避光滴加 FITC 标记的二抗(1:50), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h。激光共聚焦扫描显微镜下观察(激发波长 488 nm,发射波长 530 nm),采用 LSM-Image-Browser 软件计算细胞相对荧光强度值(MFI)。

2.6 统计方法 用 Graphpad Prism 5.0 统计软件(GPW5-384305-RAG-5235, Graphpad software, Inc)进行单因变量多因素方差分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著性水平为 $P < 0.05$ 。

3 结果

3.1 海马神经元中 5-HT3A 和 $\beta\text{-actin}$ 受体蛋白表达 如图 1 所示,与正常血清组相比,模型血清组海马神经元中 5-HT3A 表达极显著性升高($P < 0.01$);较之模型血清组,模型给药血清组海马神经元内 5-HT3A 受体蛋白水平的表达程度均明显降低

($P < 0.01$),舒郁血清组、柴胡血清组和氟西汀血清组之间则无显著性差异,见表 1。



1. 空白组;2. 正常血清组;3. 模型血清组;
4. 舒郁 $0.51 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 血清组;5. 柴胡 $0.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 血清组;
6. 氟西汀 $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 血清组

图 1 大鼠海马神经元中 5-HT3AR 和 $\beta\text{-actin}$ 受体蛋白表达

表 1 大鼠海马神经元中 5-HT3A/3BR 蛋白表达($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 $/\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	5-HT3AR 相对吸光度	5-HT3BR 相对 荧光强度
空白	-	0.4672 ± 0.050	0.0656 ± 0.010
正常血清	-	0.4342 ± 0.046	0.0924 ± 0.019
模型血清	-	$0.8673 \pm 0.078^{1)}$	$0.3047 \pm 0.014^{1)}$
舒郁治疗	0.51	$0.3850 \pm 0.051^{2)}$	0.2957 ± 0.022
柴胡治疗	0.4	$0.4046 \pm 0.057^{2)}$	0.3055 ± 0.014
氟西汀治疗	0.002	$0.3994 \pm 0.036^{2)}$	0.2940 ± 0.017

注:与正常组相比¹⁾ $P < 0.01$;与模型组相比²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 海马神经元中 5-HT3B 受体蛋白表达 与正常血清组相比,模型血清组大鼠海马神经元中 5-HT3BR 免疫荧光强度(MFI)显著升高($P < 0.01$);但模型给药血清各组较模型血清组胞内 5-HT3BR MFI 却无明显降低,见表 1,图 2。

4 讨论

前期研究工作中,通过采集模型大鼠海马组织,利用基因组芯片杂交技术,以正常大鼠对照,确定 5-HT3 受体为调控情绪的差异表达基因之一,其中 5-HT3A/3B 基因位于 11 号染色体的 $q23^{[5]}$, 5-HT3AR 是功能性受体,其表达很广泛,占 DRG 神经元总数的 $70.0\% \pm 2.8\%$,但 5-HT3BR 表达则相对较低^[11],预试用 Western blot 方法未检测到条带,故选用免疫荧光方法进行检测。

本研究旨在探讨舒郁胶囊是否可以通过调节海马神经元 5-HT3A/3BR 表达而发挥抗抑郁作用,Western blot 和免疫荧光结果显示,模型大鼠血清处理的神经元内 5-HT3A/3BR 蛋白表达均明显升高,证实该受体与抑郁情绪的密切相关性,与已有的报道相吻合^[12-13]。与模型组比较,用药治疗组血清处理的神经元 5-HT3AR 表达显著性降低,均趋于正常水平,且舒郁胶囊、柴胡和氟西汀组间无显著性差异,其作用趋势的相似性表明舒郁胶囊及其君药柴胡在治疗抑郁情绪方面效果显著,均可显著下调抑郁情绪导致的 5-HT3A 异常升高状态;但 5-HT3BR

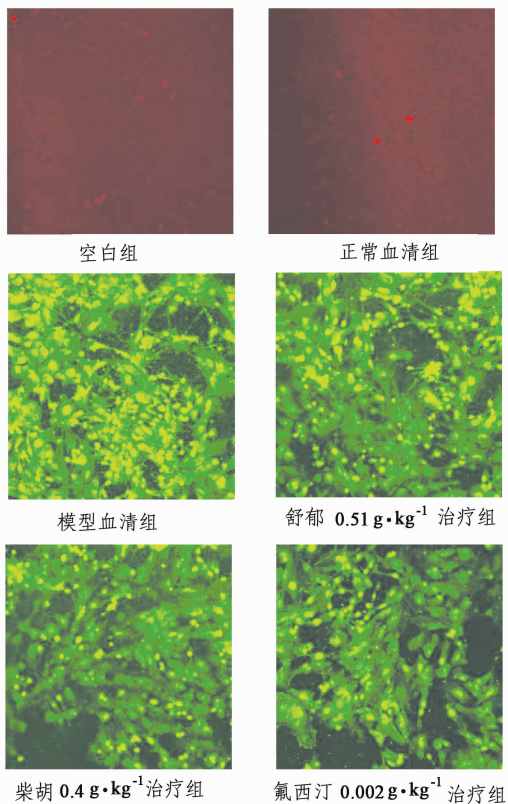


图2 海马神经元加入抑郁模型血清或药物血清孵育 24 h 后大鼠海马神经元中 5-HT3B 受体蛋白表达(免疫荧光检测, $\times 400$)

蛋白表达的异常却得不到逆转,说明舒郁胶囊预防治疗抑郁情绪的作用机制可能只与 5-HT3AR 蛋白相关。

从药物成分及作用来看,舒郁胶囊含柴胡、白芍、香附、甘草等,具疏肝解郁、调畅情志的作用。方中柴胡辛开苦降,调理气机,为柴胡类方的君药,常被用来治疗肝郁证;白芍酸收,主入血分,养肝血,二者配伍,一散一收,柴胡得白芍之收,疏肝气不致太过而耗肝阴;香附入肝、三焦经,配合君药柴胡疏肝理气;甘草调和诸药,功兼佐使之用,诸药合用,共奏疏肝解郁,调畅情志之效。现代研究,君药柴胡的主要有效成分柴胡皂苷可使抑郁型大鼠脑中的高香草酸、NE、DA 及 5-HT 的含量升高,对抑郁起到治疗作用^[14]。通过实验比较发现,单味药柴胡提取物的血清药理作用与复方舒郁胶囊没有明显差异,进一步证实舒郁胶囊的有效成分之一可能是柴胡皂苷,是柴胡类复方在抗抑郁作用中发挥药理活性的物质基础。白芍和香附的主要成分分别为芍药苷和香附酮,芍药苷能促进皮层神经元生长,改善神经行为学以及血脑屏障通透性^[15];香附酮的抗抑郁作用却未见报道,故何种有效成分及其具体作用机制的明确,还需进行更深入的研究探讨。

[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] 龙子江,宋建国. 精神药理学[M]. 合肥:安徽大学出版社,2004:76.
- [3] Niesler B. 5-HT (3) receptors: potential of individual isoforms for personalised therapy [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2011, 11(1):81.
- [4] Karen K, Paul A D, Paula L F. High-frequency HTR3B variant associated with major depression dramatically augments the signaling of the human 5-HT3AB receptor [J]. *PNAS*, 2008, 105(2):722.
- [5] Nelson P Barrera, Paul Herbert, Robert M Henderson, et al. Atomic force microscopy reveals the stoichiometry and subunit arrangement of 5-HT3 receptors [J]. *PNAS*, 2005, 30(8):12595.
- [6] 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]. *Behavioural Brain Research*,2009,205(2):518.
- [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 受体分布于表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):137.
- [8] 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):207.
- [9] Chernova T, Nicotera P, Smith A G. Heme deficiency is associated with senescence and causes suppression of *N*-methyl-*D*-faspartate receptor subunits expression in primary cortical neurons [J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 69(3):697.
- [10] 孙美群,陈前芬. 新生大鼠大脑皮层神经元原代培养与鉴定[J]. 蚌埠医学院学报,2008,33(1):19.
- [11] Karen K, Paul A D, Paula L F. High-frequency HTR3B variant associated with major depression dramatically augments the signaling of the human 5-HT3AB receptor [J]. *PNAS*, 2008, 105(2):722.
- [12] Walstab J, Rappold G, Niesler B. 5-HT (3) receptors: role in disease and target of drugs[J]. *Pharmacol Ther*, 2010,128(1):146.
- [13] Niesler B. 5-HT (3) receptors: potential of individual isoforms for personalised therapy [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2011, 11(1):81.
- [14] 戈宏焱,陈博. 柴胡皂苷 A 对抑郁模型大鼠脑中单胺类神经递质及其代谢产物含量的影响[J]. 高等学校化学学报,2008,29(8):1535.
- [15] 孙蓉,吕丽莉,郭守东,等. 芍药苷对局灶性脑缺血模型及血脑屏障的影响[J]. 哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2005,21(4):405.

[责任编辑 聂淑琴]