

· 药理 ·

抑郁症模型大鼠皮质、海马 cAMP 通路的信号表达 及颐脑解郁方的干预作用

田青, 唐启盛*, 赵瑞珍, 李小黎

(北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029)

[摘要] 目的: 观察抑郁大鼠模型脑内环磷酸腺苷(cAMP)通路的表达及中药颐脑解郁方的干预作用。方法: Wistar 大鼠分为正常组、模型组、中药颐脑解郁方组、西药氟西汀组。模型组、中药颐脑解郁方组、西药氟西汀组在 21 d 内采用慢性不可预见的温和性应激加孤养法(method of chronic unpredictable mild stress with isolated support)建立抑郁状态大鼠模型, 模型组 ig 双蒸水, 中药治疗组、西药对照组分别 ig 中药颐脑解郁方($6.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、西药氟西汀(剂量 $2.33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 采用 RT-PCR 实验方法, 测定 PDE4(3',5'-cyclic-nucleotide phosphodiesterase)、CREB(cAMP response element binding protein)在抑郁模型大鼠脑内左前额叶皮质、海马的表达。结果: 模型组大鼠大脑额叶皮质及海马 PDE4 表达增强($P < 0.05$), CREB 表达明显低于正常组($P < 0.05, P < 0.01$); 中药颐脑解郁方及西药氟西汀干预后, 额叶前侧皮质及海马 PDE4 的表达较模型组有明显的降低($P < 0.05, P < 0.01$)。CREB 表达明显增高($P < 0.05, P < 0.01$)。结论: 中药颐脑解郁方干预后可明显调节 PDE4 及 CREB 在抑郁大鼠脑内的表达, 提示中药颐脑解郁方的抗抑郁作用可能与调节 cAMP 信号转导通路有关。

[关键词] 抑郁症; 动物模型; 环磷酸腺苷通路; 颐脑解郁方

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)03-0121-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20111202.1024.004 **[网络出版时间]** 2011-12-02 10:24

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20111202.1024.004.html>

Effect of Yinao Jieyu Prescription on cAMP Signaling Pathway in Cortex and Hippocampus of Rats with Depression

TIAN Qing, TANG Qi-sheng*, ZHAO Rui-zhen, LI Xiao-li

(Beijing University of Traditional Chinese Medicine Third Hospital, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To study expression of brain cyclic adenosine monophosphate(cAMP) pathway and intervention by Chinese medicine Yinao Jieyu prescription in depression rat model. **Method:** Depression model was established by method of Chronic unpredictable mild stress with isolated support, the expression of PDE4(3',5'-cyclic-nucleotide phosphodiesterase) and cAMP response element binding protein(CREB) was assayed by (PCR), in the rat brain model of depression left frontal cortex, hippocampus of the brain. **Result:** The hippocampus, prefrontal cortex and PDE4 were significantly higher than the normal group ($P < 0.05, P < 0.01$), CREB expression was significantly lower than normal group ($P < 0.05, P < 0.01$). Chinese side Yinao Jieyu significantly after intervention in the brain regulated the expression of PDE4 and CREB ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** Yinao Jieyu prescription can regulate the expression of PDE4 and CREB in rat depression model, which may be related to regulating cAMP pathway.

[Key words] depression; animal model; cyclic adenosine monophosphate pathway; Yinao Jieyu prescription

[收稿日期] 20110504(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973740);北京中医药大学自主选题项目(JYBZZ-JS077)

[第一作者] 田青, 主治医师, 医学博士, 从事神经系统疾病的临床及研究, Tel:010-52075438, E-mail:tianqing010@sina.com

[通讯作者] * 唐启盛, 医学博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 从事中医脑病的临床及研究, E-mail:tangqisheng@263.net

当前抑郁症已成为危害人类精神健康的杀手,其发病率呈明显上升趋势,中医学理论很早就注意到情志异常可导致精神疾病的发生,并对之有着丰富的治疗经验和理论。本课题组运用中医理论,提出抑郁症的发病主要中医病机是肾虚肝郁,并创立颞脑解郁方治疗抑郁症,在临床实践中收到了较好的疗效^[1]。为了能够好的阐明该方的作用机制,并使之有更广泛的临床运用,研究了抑郁症动物模型大鼠内神经元细胞 cAMP 信号通路的表达,研究颞脑解郁方对抑郁症大鼠模型脑内 cAMP 通路的治疗干预作用。

1 材料

1.1 动物 健康 Wistar 雄性大鼠,二级,5~6 月龄,40 只,体重(200±20)g。购于维通利华动物试验中心,许可证号 SCXK(京)2004-0003。整个实验过程中动物自由摄食和饮水(应激过程中禁食、禁水除外),室温 20~22℃(冷、热应激除外),相对湿度为 60%~70%,光照周期 12 h(7:00~19:00 光照,19:00~7:00 黑暗)。

1.2 中药组成及西药对照药品制备 颞脑解郁方的药物组成为北刺五加 20 g,五味子 20 g,郁金 20 g,合欢皮 15 g,柴胡 12 g,栀子 15 g,白芍 12 g,生甘草 6 g。(由北京中医药大学中药鉴定教研室鉴定)。常规水煎并浓缩药液为生药 0.62 g·mL⁻¹,贮存于 4℃冰箱中备用,用前加热。盐酸氟西汀胶囊 20 mg/粒(Eli Lilly and Company Limited,生产批号 A019602)按照成人用量的 7 倍计算大鼠用量为 2.33 mg·kg⁻¹·d⁻¹,溶于蒸馏水中,质量浓度为 0.233 g·L⁻¹。

1.3 仪器及试剂 游泳用水箱,恒温加热器,HZQ-C 型空气振荡浴(哈尔滨市东明医疗仪器厂),自制夹尾器等用于慢性应激的各不同方法;水浴锅,组织匀浆器,超声装置,HP-960 型紫外-可见分光光度计(美国),电泳仪(BIO-RAD 美国),高速冷冻离心机(美国 Sigema 公司);紫外分光光度计(Unicam 公司);PCR 仪(德国 MJ 公司);图像摄录分析系统(法国 Ampharmacia 公司)。RT-PCR 用试剂:Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司),逆转录酶、PCR 试剂(Promega 公司),琼脂糖(Sigma),PCR 引物(北京奥科生物技术有限公司合成)。

2 方法

2.1 造模及取材 大鼠适应性喂养 1 周后,进行敞箱(Open-field)测试,根据结果随机分组,为正常组、模型组、中药治疗组、西药对照组共 4 组。各组动物

均为 16 只。参照文献报道方法^[2]采用慢性不可预见的温和性应激加孤养法(method of Chronic unpredictable mild stress with isolated support)复制抑郁状态大鼠模型,即在 21 d 内随机对实验大鼠安排以下 7 种应激方法:夹尾 1 min,禁水 24 h,禁食 24 h,45℃环境 5 min,昼夜颠倒 24 h,水平震荡 30 min,4℃冰水游泳 5 min。每天随机选取 1 种。孤养法:动物单笼饲养。中药治疗组、西药对照组处理同上。慢性应激结束后,模型组 ig 双蒸水,中药治疗组、西药对照组分别 ig 中药颞脑解郁方(6.2 g·kg⁻¹·d⁻¹)、西药氟西汀(2.33 mg·kg⁻¹·d⁻¹),ig 体积均为 10 mL·kg⁻¹,连续 6 周,正常组不予任何处理,正常饮用食水。ig 结束后再次进行行为学测定,之后各组大鼠统一进行断头取脑,冰盘上分离左侧前额叶皮质、左侧海马组织,保留 80 mg(LibrorL-1690D 天平称取,精确度 0.01 mg),放入 EP 管,标明各不同分组,迅速投入液氮中,置于-80℃冰箱保存备用。

2.2 总 RNA 提取 按照 Trizol 试剂说明,采用一步法提取组织总 RNA。取 10 μL RNA 产物上样于 0.9% 琼脂糖凝胶中电泳,紫外灯下观察可见 18 s, 28 s 2 条清晰的条带,28 s 和 18 s 2 条带之比约为 2:1,表明无 RNA 降解。在紫外分光光度计上测总 RNA A₂₆₀ 和 A₂₈₀,A₂₆₀/A₂₈₀ 介于 118~210,说明所提取的总 RNA 有较好的纯度。

2.3 RT-PCR 实验 RT-PCR 反应体系:反应总体积 25 μL,含 PCR Mix 12.5 μL,RT 样品 3 μL,无 RNA 酶水 7.5 μL,目的基因引物(上游与下游引物按 1:1 混合)各 1 μL。

2.3.1 RT-PCR 循环参数 逆转录 50℃,30 min,94℃,2 min,开始 PCR 循环:变性 94℃,30 s,退火 57℃,30 s,延伸 72℃,1 min,共 27 个循环,最后 1 个循环于 72℃继续反应 8 min。

2.3.2 RT-PCR 产物的检测 取 8 μL PCR 产物上样于 1.2% 琼脂糖凝胶中作电泳。电泳结束后取出凝胶,根据相对分子质量标准判定扩增产物。用 ImageMasterVDS 图像摄录分析系统进行 DNA 电泳条带吸光度(A)扫描,测出各扩增带面积的 A。

2.4 统计学处理 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用统计软件 SPSS 11.5 进行统计分析,组间比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 造模 采用慢性不可预见温和应激结合孤养法所制备的模型大鼠表现出快感、兴趣、水平活动、

学习和记忆能力均有下降,与正常组比差异有统计学意义。

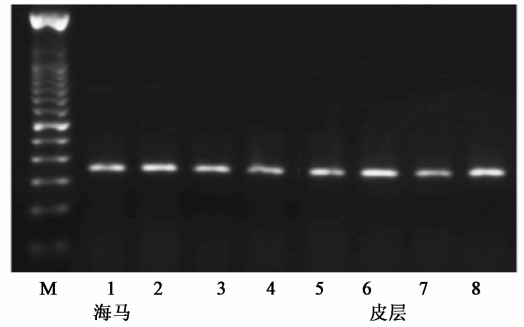
3.2 模型大鼠脑内 PDE4 表达及中药的调节作用
扩增产物电泳后显示,在 310 bp 处有一条带,为 PDE4 mRNA 的扩增产物,未见其他扩增产物。

模型组大鼠大脑额叶皮质及海马 PDE4 表达增强($P < 0.05$),中药颞脑解郁方及西药氟西汀干预后,额叶前侧皮质及海马 PDE4 的表达较模型组有明显的降低($P < 0.05, P < 0.01$)。(图 1,表 1)。

3.3 抑郁症模型大鼠脑内 CREB 表达及中药调节作用
扩增产物电泳后显示,在 410 bp 处有一条带,为 CREB mRNA 扩增产物,未见其他扩增产物。模型组大鼠额叶前皮质及海马 CREB 的表达显著降低($P < 0.01$),中药及西药干预后,额叶前侧皮质及海马 CREB 的表达较模型组有明显的增强($P < 0.05, P < 0.01$)。(图 2,表 1)。

4 讨论

当前抑郁症的病因机制没有完全阐明,其中神经递质和细胞内信号传导是目前研究的热点,cAMP 是最早发现的第二信使,Wachtel^[3]将信息传递理论与抑郁症的病因相结合,提出了“第二信使



M. Marker; 1~4. 海马; 5~8. 皮质;
1,5. 正常组;2,6. 模型组;3,7. 氟西汀 $2.33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组;
4,8. 颞脑解郁方 $6.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组(图 2 同)

图 1 各组大鼠不同部位的 PDE4 mRNA 的表达

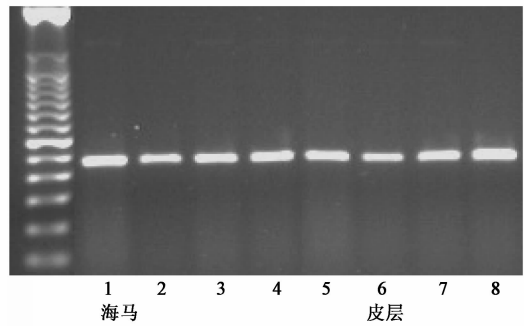


图 2 各组大鼠不同部位的 CREBmRNA 的表达

表 1 颞脑解郁方对大鼠 PDE4, CREB 表达的相对量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 $/\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	PDE4		CREB	
		海马	皮质	海马	皮质
正常	-	2.07 ± 0.10^2	$3.95 \pm 0.66^{1)}$	7.10 ± 0.43^2	$5.60 \pm 1.131^{1)}$
模型	-	4.56 ± 0.36	6.57 ± 1.05	3.24 ± 0.43	2.45 ± 0.15
颞脑解郁方	620	$2.49 \pm 0.32^2)$	$4.28 \pm 0.63^{1)}$	$6.00 \pm 0.18^2)$	$4.79 \pm 0.87^{1)}$
氟西汀胶囊	2.33	$2.42 \pm 0.34^2)$	$5.51 \pm 1.75^{1)}$	$5.64 \pm 0.35^2)$	$4.85 \pm 0.45^{1)}$

注:与模型组相比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

失衡”假说,认为情感障碍发病,与 cAMP 的失衡相关。cAMP 系统功能减退导致抑郁,反之则导致躁狂。CREB 是 cAMP 应答元件结合蛋白(cAMP response element binding protein)的简称。研究表明,与抑郁相关的信号通路及转录因子的调节是抗抑郁药长期作用的一个中心环节,而 CERB 是这些相关信号通路中的一个交汇点,对胞内的生化过程有着重要的影响^[4]。细胞内 cAMP 水平的调控主要由腺苷酸环化酶(AC)的合成和磷酸二酯酶(PDE)的水解作用来实现^[5]。PDEs 是一个超级酶家族,目前对 PDE4 的研究最为广泛。cAMP 信号的灭活主要是由 PDE4 决定的^[6]。

本实验研究结果显示,抑郁症模型组大鼠额叶前皮质及海马 cAMP 通路上 CREB 的表达较正常对

照组有显著降低,而 PDE4 表达增强,给予中药颞脑解郁方及西药氟西汀治疗干预后,治疗组大鼠额叶前侧皮质及海马 CREB 的表达较模型组有明显的增强,PDE4 的表达较模型组有明显的降低,且中药治疗组与氟西汀治疗组无明显统计学差异。盐酸氟西汀的药理作用是通过抑制脑内神经递质 5-TH 的再摄取而达到抗抑郁作用。本研究提示颞脑解郁方能通过调节脑内的 cAMP 信号转导通路上 PDE4, CREB 的表达而发挥与氟西汀类似抗抑郁的作用。这从分子水平表明颞脑解郁方是通过调节神经递质、信号转导通路等多因素、多靶点、多种机制的综合作用而达到抗抑郁作用,其中对 cAMP 信号通路的调节可能是重要作用机制之一。

贝加灵喷雾剂对大鼠局灶性脑缺血损伤的保护作用

施俊辉¹, 史亚军^{1,2}, 刘剑云¹, 唐梅¹, 熊永爱¹, 杨明^{1,3*}

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 陕西中医学院药学院, 陕西 咸阳 712046; 3. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 研究贝加灵喷雾剂对大鼠局灶性脑缺血损伤的保护作用, 并初步探讨其作用机制。方法: SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、贝加灵高、中、低剂量组、尼莫地平组、空白乳剂组。贝加灵高、中、低剂量组(2.66, 1.33, 0.66 mg·kg⁻¹)鼻腔给药, 尼莫地平组(0.4 mg·kg⁻¹)尾静脉注射给药, 5 d 后, 采用血管内栓线阻断法建立大鼠局灶性脑缺血模型, 继续给药 2 d, 观察大鼠神经功能缺损情况, 测定各组大鼠脑组织含水量, 利用紫外分光光度法测定大鼠局灶性缺血脑损伤血清中超氧化物歧化酶(SOD)活力、脑组织中 Ca²⁺-ATP 酶含量。结果: 与模型组比较, 贝加灵高、中、低剂量组神经功能评分(1.06 ± 0.80), (1.00 ± 0.84), (0.89 ± 0.94)分, 极显著性降低($P < 0.01$); 高、中剂量组脑组织含水量(79.33 ± 1.46)%, (79.34 ± 1.01)%, 极显著性降低($P < 0.01$), 低剂量组含水量(79.72 ± 1.87)% 显著性降低($P < 0.05$); 血清中 SOD 活力(177.622 ± 5.224), (160.350 ± 41.139), (167.279 ± 6.450) U·mL⁻¹, 脑组织 Ca²⁺-ATP 酶含量(3.444 ± 3.730), (3.192 ± 1.298), (2.866 ± 0.156) U·mg⁻¹, 均显著性降低($P < 0.05$)。结论: 贝加灵喷雾剂对大鼠局灶性脑缺血损伤有一定修复保护作用, 可能通过抗自由基和改善能量代谢发挥这一作用。

[关键词] 贝加灵喷雾剂; 局灶性脑缺血; 抗自由基; 改善能量代谢

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)03-0124-04

Protective Effect of Baicalin Spray on Focal Cerebral Ischemia in Rats

SHI Jun-hui¹, SHI Ya-jun^{1,2}, LIU Jian-yun¹, TANG Mei¹, XIONG Yong-ai¹, YANG Ming^{1,3*}

(1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China;
2. College of Pharmacy, Shanxi University of TCM, Xianyang 712046, China; 3. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Jiangxi University of TCM, Ministry of Education, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of baicalin spray on focal cerebral ischemia in rats,

[收稿日期] 20110713(007)

[基金项目] 国家创新药物科技专项(2009ZX09103-353)

[第一作者] 施俊辉, 在读硕士生, 从事中药新制剂研究工作, Tel: 028-61800127, E-mail: shijunhui1986@163.com

[通讯作者] * 杨明, 博士, 博士生导师, 教授, 从事中药新制剂、新剂型、新技术研究, E-mail: yangming16@126.com

[参考文献]

- [1] 赵晶, 唐启盛, 裴清华, 等. 颞颥解郁方治疗抑郁症肾虚肝郁型的临床疗效观察[J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(1): 61.
- [2] 唐启盛, 裴清华, 侯秀娟. 脑卒中后抑郁状态动物模型的建立[J]. 北京中医药大学学报, 2004, 27(3): 33.
- [3] Wachtel H. The second-messenger dysbalance hypothesis of affective disorders[J]. Pharmacopsychiatry, 1990, 23(1): 27.
- [4] Whitaker C M, Wei H. An alternate cAMP pathway Epac promotes hippocampal long-term depression[J]. Physiol,

- 2009, 587(Pt 13): 3067.
- [5] Wong M L, Whelan F, Deloukas P, et al. Phosphodiesterase genes are associated with susceptibility to major depression and antidepressant treatment response[J]. Proc Natl Acad Sci, 2006, 103(41): 15124.
- [6] Navakkode S, Sajikumar S, Frey J U. Mitogen-activated protein kinase mediated reinforcement of hippocampal early long-term depression by the type IV-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram and its effect on synaptic tagging[J]. Neurosci, 2005, 25(46): 10664.

[责任编辑] 聂淑琴