

六味地黄汤干预抑郁大鼠学习记忆的作用机制

薛岱榆¹, 包文健¹, 梁幼雅¹, 程骁², 徐碧云^{2*}

(1. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006;

2. 广州中医药大学 第二附属医院 (广东省中医院), 广州 510120)

[摘要] **目的:** 探讨六味地黄汤对慢性抑郁大鼠记忆障碍的改善作用,并探讨其可能的作用机制。**方法:** Wistar 雌性大鼠随机分为正常组(生理盐水)、慢性不可预见性温和应激(CUMS)模型组(生理盐水)、六味地黄汤低、中、高剂量组(2.60, 7.81, 23.50 g·kg⁻¹·d⁻¹)。除正常组外,其余各组造成 CUMS 模型。每周称体质量,观察其行为学指标变化;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测其海马 G 蛋白偶联雌激素受体(GPR30),胞内磷脂酰肌醇激酶(PI3K),环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB),脑源性神经营养因子(BDNF) mRNA 的表达;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清中雌激素含量。**结果:** 与正常组比较,模型组体质量、活动能力、兴趣等明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,六味地黄汤 2.60, 7.81, 23.50 g·kg⁻¹可明显提高 CUMS 大鼠糖水偏好度($P < 0.01$)和旷场实验的站立次数($P < 0.01$);7.81, 23.50 g·kg⁻¹明显提高旷场实验的总距离($P < 0.05$, $P < 0.01$);2.60, 7.81 g·kg⁻¹可缩短水迷宫实验寻台潜伏期($P < 0.01$);7.81 g·kg⁻¹可增加血清中雌激素含量($P < 0.05$);CUMS 模型组大鼠海马组织内的 GPR30, PI3K, CREB, BDNF mRNA 表达明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),六味地黄汤 2.60 g·kg⁻¹显著增加海马组织内的 GPR30, CREB mRNA 表达($P < 0.05$, $P < 0.01$), 7.81 g·kg⁻¹明显增加海马组织内的 GPR30, PI3K, CREB, BDNF mRNA 表达量($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:** 六味地黄汤具有抗抑郁作用,逆转 CUMS 大鼠抑郁样行为及学习记忆障碍,其中中剂量组药效最显著。其作用机制可能与增加血清中雌激素和提高大鼠海马 GPR30, PI3K, CREB, BDNF mRNA 表达有关。

[关键词] 六味地黄汤; 慢性抑郁; 学习记忆; 雌激素; 脑源性神经营养因子

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)09-0008-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200503

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191119.1032.003.html>

[网络出版时间] 2019-11-19 13:02

Mechanism of Liuwei Dihuangtang on Learning and Memory in Depressive Rats

XUE Dai-yu¹, BAO Wen-jian¹, LIANG You-ya¹, CHENG Xiao², XU Bi-yun^{2*}

(1. School of Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. The Second Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine (Guangdong Province Hospital of Chinese Medicine), Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and possible mechanism of Liuwei Dihuangtang on memory impairment in rats with chronic depression. **Method:** Female Wistar rats were randomly divided into normal group (normal saline), chronic unpredictable mild stress (CUMS) model group (normal saline), and low, medium and high-dose Liuwei Dihuangtang groups (2.60, 7.81, 23.50 g·kg⁻¹·d⁻¹). Except for the normal group, all of the other groups were included in the chronic unpredictable mild stress model. Weight were measured every week, changes in their behavioral indicators were observed. The mRNA expressions of G protein-coupled estrogen receptor (GPR30), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), cyclic adenosine monophosphate response element binding

[收稿日期] 20190823(021)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81603551)

[第一作者] 薛岱榆,在读硕士,从事中药抗衰老和调节内分泌临床与实验研究, E-mail: 564361827@qq.com

[通信作者] * 徐碧云, 硕士, 主治医师, 从事中医睡眠医学和心理学研究, Tel:020-81499399-8486, E-mail: cloudbxy@163.com

protein (CREB) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the rat hippocampus were determined by real-time fluorescence quantification polymerase chain reaction (Real-time PCR). The concentration of serum estrogen was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. **Result:** Compared with normal group, model group showed decreases in weight, activity and interest. Liuwei Dihuangtang (2.60, 7.81, 23.50 g·kg⁻¹) significantly increased the sucrose preference of CUMS rats ($P < 0.01$) and standing times in the open field test ($P < 0.01$), doses of 7.81, 23.50 g·kg⁻¹ significantly increased the total distance of the open field test ($P < 0.05, P < 0.01$), doses of 2.60, 7.81 g·kg⁻¹ shortened the latency of water maze experiment ($P < 0.01$), and dose of 7.81 g·kg⁻¹ increased serum estrogen concentration ($P < 0.05$). The mRNA expressions of GPR30, PI3K, CREB and BDNF in hippocampus of CUMS model group decreased significantly ($P < 0.05, P < 0.01$), but the mRNA expression levels of GPR30, CREB in hippocampus of 2.60 g·kg⁻¹ dose Liuwei Dihuangtang group increased significantly ($P < 0.05, P < 0.01$), and the mRNA expression levels of GPR30, PI3K, CREB, BDNF in hippocampus of 7.81 g·kg⁻¹ dose group increased significantly as well ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** Liuwei Dihuangtang has effect in resisting depression, and reversing depression-like behavior and learning and memory impairment in CUMS rats, with the best effect in the medium-dose Liuwei Dihuangtang group. Its mechanism may be related to increase of serum estrogen and mRNA expressions of GPR30, PI3K, CREB and BDNF in rat hippocampus.

[Key words] Liuwei Dihuangtang; chronic depression; learning and memory; estrogen; brain-derived neurotrophic factor

抑郁症是一种以情绪低落、兴趣减退、思维迟缓、认知功能损害为主要特征的情感障碍性疾病。记忆障碍为认知功能损伤的临床表现之一,记忆障碍即抑郁症患者记忆力明显减退,具体表现为短时记忆和瞬间记忆能力下降,自由联想、粗质回忆和再认的困难。研究发现,抑郁症会对患者的记忆造成影响,导致其难以区分相似的记忆^[1],抑郁症患者在治疗后记忆能力都有所改善,但是不能恢复到正常水平^[2-3]。记忆受损是影响抑郁症预后重要因素,机制不明确,缺乏有效药物。

六味地黄丸(汤)是中医滋补肾阴的代表方剂,该方出自宋代钱乙所著的《小儿药证直诀》,临床上常被用于治疗更年期综合征和阿尔茨海默病(AD),研究表明六味地黄汤可调节雌激素水平治疗绝经前后诸证^[4],还能促进 AD 大鼠认知功能恢复^[5]。雌激素与抑郁症的发病有关,并伴有脑源性神经营养因子(BDNF)上调^[6-7]。而直接作用于环磷腺苷反应元件结合蛋白(CREB)/BDNF 相关信号通路的药物,能加速抑郁症临床症状的缓解,提高疗效^[8-10]。因此推测,六味地黄汤可提高体内雌激素水平,雌激素可能通过雌激素膜受体(GPR30)介导的快速通路激活 CREB/BDNF 增加突触可塑性参与抑郁症记忆受损机制。同时,观察六味地黄汤对慢性不可预见性温和应激(CUMS)损伤模型的抗抑郁作用及学习记忆改善作用,并对其作用机制进行初

步研究,为明确抑郁症记忆受损机制对于完善和补充抑郁症发病机制及突破抗抑郁药药理有重要意义。

1 材料

1.1 动物 雌性 Wistar 大鼠,SPF 级,体质量 180 ~ 220 g,由南方医科大学实验动物中心提供,许可证号 SYXK(粤)2018-0094。动物使用许可证号 SYXK(粤)2016-0041。动物自由进食进水,室内温度 23 ~ 25 ℃,相对湿度(55 ± 10)%。维持 12 h 光照/12 h 黑暗的昼夜节律。动物适应环境 1 周进行实验。本研究获得广东省中医院实验动物伦理委员会批准(编号 2018017),所有实验研究均符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。

1.2 药物及试剂 六味地黄汤(熟地黄 24 g,山萸肉 12 g,山药 12 g,泽泻 9 g,茯苓 9 g,牡丹皮 9 g),以上各味药购置于康美药业股份有限公司,各药材由广东省中医院药师梁绮雯鉴定为正品;大鼠雌激素酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉华美生物有限公司,批号 C0110020111);trizol(美国 Ambion 公司,批号 191012);Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix(gDNA digester plus),Hieff UNICON™ PCR SYBR Green Master Mix(抗体法, No Rox)(上海翊圣生物科技有限公司,批号分别为 H1816441, H7901060);聚合酶链式反应(PCR)引物甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)[生工生物工程(上

海)股份有限公司,批号 EB08KA0132];其他 PCR 引物序列由广州万山生物科技有限公司合成,序列如下:PI3K 上游 5'-TCTGGACCTGTGCCTTCTGC-3',下游 5'-CGTGTT ACCCACCGTGCTCT-3',引物长度均为 20 bp;BDNF 上游 5'-ATAAGGACGCGGACTTGTAC-3',下游 5'-GTTTGCGGCATCCAGGTAAT-3',引物长度均为 20 bp;CREB 上游 5'-AGCAGACAACCAGCAGAGTGG-3',下游 5'-CCTGGGCTAATGTGGCAATC-3',引物长度分别为上游 21 bp,下游 20 bp;GPR30 上游 5'-GTCTTTCCGTCATGCCTAC-3',下游 5'-ATACAGCC TGAGCTTGTC-3',引物长度均为 19 bp。

1.3 仪器 Mini6k 型微型离心机(珠海黑马医学仪器有限公司);Vortex-Genie2 型漩涡混合器(美国 Scientific Industries 公司);EonC 型全波长酶标仪(美国 Gene 公司);T100™ Thermal Cycler 型梯度 PCR 仪,CFX96 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)仪(美国 Bio-Rad 公司);ZH-ZFT 型旷场视频分析系统(淮北正华生物仪器设备有限公司);ZH-Morris 型水迷宫视频分析系统(淮北正华生物仪器设备有限公司)。

2 方法

2.1 药物制备 六味地黄汤(《小儿药证直诀》),1 日 2 次。将各方药按传统方法水煎 2 次,混合 2 次药汁,过滤,浓缩制备成含生药质量浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液。制作低、中、高(2.60, 7.81, 23.50 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 3 种剂量组灌胃所用药液。冰箱中 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 备药。

2.2 造模方法 通过慢性不可预见性温和应激建立慢性抑郁及学习障碍模型^[11-12],同时参照 WINNER 等^[13]的方法加以改进:建模大鼠单笼饲养,在建模的 28 d 内,将日夜颠倒 24 h,鼠笼倾斜 45 度 24 h, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰水游泳 5 min, $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 热水游泳 5 min,禁水 24 h,禁食 24 h,拥挤饲养、空水瓶、潮湿垫料 24 h 等,多种刺激每天随机选择 2 种。应激前进行糖水偏好实验和旷场实验,应激 28 d 后,进行糖水偏好实验、旷场实验和水迷宫实验。

2.3 动物分组及干预方法 60 只 Wistar 雌性大鼠按照随机数分为正常组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、六味地黄汤低、中、高剂量组(2.60, 7.81, 23.50 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),每组 10 只,给药剂量按 60 kg 成人的体表面积换算,中剂量组相当于 60 kg 体质量人体表面积临床等效剂量。连续 28 d 每日灌胃 2 次。

2.4 糖水偏好实验 每组大鼠饲养笼内放置糖水

100 mL 和纯水各 1 瓶,尽量保证每笼水瓶摆放的位置、间距、高度一致,并且 12 h 后将 2 只饮水瓶位置互换 1 次以防止动物产生位置适应。给予大鼠等量糖水纯水后,记录 24 h 内糖水和纯水的消耗量,计算糖水偏好比(糖水偏好比 = 糖水消耗量/糖水纯水总消耗量)。

2.5 旷场实验 采用立方敞箱(100 cm × 100 cm × 50 cm),周壁、底面为黑色,底面由面积相等的 25 块组成,用白线划分。将大鼠置于旷场中心,观察 5 min 内的自发活动。实验采用动物旷场视频分析跟踪系统,记录动物的运动路程、总距离和站立次数。

2.6 水迷宫实验 采用 Morris 水迷宫行为检测空间记忆能力,Morris 水迷宫的水池直径 130 cm,高 60 cm,水温控制在 $22 \sim 24 \text{ }^{\circ}\text{C}$,可分为 4 个象限。平台直径 7 cm,高 30 cm,随机放置在一个象限的中央。水池中注水,高出平台约 1 cm。实验进行 4 d。

2.6.1 隐蔽站台实验 每天开始时,将鼠任意从 4 个象限之一面向池壁放入水中,站台放置于东南象限,每次实验鼠共游泳 60 s 来寻找隐藏的站台。如果成功地找到站台,鼠可以得到在站台上的 10 ~ 30 s 休息时间;如果 60 s 内未能成功的找到站台,就将大鼠置于站台上,且同样给予 10 ~ 30 s 的休息时间。隐蔽站台实验持续 3 d。每天记录大鼠分别在 4 个象限入水的寻台潜伏期。

2.6.2 空间探索实验 隐蔽站台实验结束 24 h 后,撤除站台。然后任选一相同入水点将鼠放入水中,记录鼠在 60 s 内的游泳路径,记录实验动物总的运动路程、寻台潜伏期、穿越平台次数及平台所在象限停留时间。

2.7 ELISA 检测血清中雌激素的含量 行为学实验完成后,10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠后腹主动脉采血,腹主动脉取血 2 mL,血液静置 40 min 后,3 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,分离血清,置于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。按试剂盒操作说明进行操作,将各种试剂移至室温平衡至少 30 min,酶标板设一个空白孔,每个标准点一次各设 2 孔,每孔加入相应标准品 50 μL ;其余每个检测孔直接加待测标本 50 μL 。每孔加入酶结合物 50 μL 充分混匀,贴上不干胶封片,置 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h。洗板机洗板 3 次,拍干。每孔加显色剂 A 液 50 μL ,显色剂 B 液 50 μL ,震荡摇匀后, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光显色 15 min,每孔加入终止液 50 μL 。用酶标仪在 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度 A,在反应终止后 10 min 内进行检测。

2.8 Real-time PCR 检测各组大鼠海马组织 GPR30, PI3K, CREB, BDNF mRNA 的表达水平 大鼠取完腹主动脉血后,开颅取脑并且分离出海马组织, -80 °C 保存。将准备好的海马组织取出, trizol 法提取大鼠海马组织 RNA, 按照 SuperMix 试剂盒说明书反转换成 cDNA, PCR 反应按照 Master Mix (抗体法, No Rox) 试剂盒说明书所示构建。反应条件为预变性 95 °C 30 s, 变性 95 °C 10 s, 退火 55 ~ 60 °C 20 s, 延伸 72 °C 20 s, 扩增 40 个循环; 最后溶解曲线阶段由仪器默认设置。上述循环结束后, 使用仪器

配套软件对数据进行分析得到每个样本的循环阈值 (C_t 值), 并通过相对定量法, 以 GAPDH 为内参采用 (Livak) $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 的相对表达量。

2.9 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件分析处理, 计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠体质量的影响 造模给药 28 d 后, 与正常组比较, 模型组及 3 个给药组大鼠体质量显著降低 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 六味地黄汤对 CUMS 大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Liuwei Dihuangtang on weight in CUMS rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
正常	10	-	232.20 ± 4.80	241.60 ± 3.79	245.40 ± 3.11	248.40 ± 3.23
模型	10	-	234.20 ± 3.90	234.20 ± 3.21	235.90 ± 3.42	225.00 ± 4.48 ²⁾
六味地黄汤	9	2.60	230.11 ± 4.55	231.33 ± 4.71	237.89 ± 5.32	225.00 ± 5.91 ²⁾
	10	7.81	235.10 ± 6.37	231.70 ± 5.10	237.20 ± 5.23	226.50 ± 4.41 ²⁾
	9	23.50	238.33 ± 4.79	231.78 ± 3.11	234.78 ± 3.49	226.44 ± 4.05 ²⁾

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 ~ 7 同)。

3.2 对 CUMS 大鼠行为学的影响

3.2.1 对 CUMS 大鼠糖水偏好比的影响 造模给药前各组大鼠糖水偏好比无差异, 造模给药 28 d 后, 与正常组比较, 在相同时间点, 模型组糖水偏好比显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 六味地黄汤低、中、高剂量组糖水偏好比均显著升高 ($P < 0.01$)。见表 2。

模型组旷场实验运动总距离和站立次数明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与模型组比较, 六味地黄汤低、中、高剂量组旷场实验站立次数均显著升高 ($P < 0.01$), 而六味地黄汤中、高剂量组旷场实验运动总距离均有明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

表 2 六味地黄汤对 CUMS 大鼠糖水偏好比的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Liuwei Dihuangtang on sucrose preference in CUMS rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	造模后第 0 天	造模后第 28 天
正常	8	-	0.81 ± 0.02	0.89 ± 0.02
模型	8	-	0.78 ± 0.03	0.82 ± 0.03 ²⁾
六味地黄汤	9	2.60	0.81 ± 0.02	0.89 ± 0.01 ⁴⁾
	8	7.81	0.76 ± 0.01	0.90 ± 0.01 ⁴⁾
	8	23.50	0.80 ± 0.03	0.89 ± 0.01 ⁴⁾

3.2.3 对 CUMS 大鼠水迷宫实验的影响 与正常组比较, 至第 4 天时, 模型组寻台潜伏期延长 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 六味地黄汤低、中剂量组寻台潜伏期明显降低 ($P < 0.01$)。各组第 4 天穿越平台次数和平台所在现象停留时间均无显著差异次数。见表 4, 5。

3.3 对 CUMS 大鼠血清中雌激素含量的影响 与正常组比较, 模型组雌激素含量明显下降 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 六味地黄汤中剂量组雌激素含量明显增加 ($P < 0.05$), 见表 6。

3.2.2 对 CUMS 大鼠旷场实验的影响 造模给药前各组大鼠旷场实验运动总距离和站立次数无差异。造模给药 28 d 后, 与正常组比较, 在相同时点,

3.4 对 CUMS 大鼠海马中 GPR30, PI3K, CREB, BDNF mRNA 表达量的影响 与正常组比较, 模型组 GPR30, PI3K, CREB, BDNF mRNA 表达量均明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与模型组比较, 六味地黄汤中剂量组 PI3K, BDNF, GPR30, CREB mRNA 表达量

表 3 六味地黄汤对 CUMS 大鼠旷场总距离和站立次数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Liuwei Dihuangtang on total distance and raring times of open field test in CUMS rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	旷场总距离/cm			旷场站立数/次		
		n	造模后第 0 天	造模后第 28 天	n	造模后第 0 天	造模后第 28 天
正常	-	10	56.60 ± 2.06	50.59 ± 2.69	9	14.56 ± 0.94	16.67 ± 2.03
模型	-	9	54.98 ± 2.30	35.01 ± 4.18 ¹⁾	10	14.40 ± 1.02	6.60 ± 0.96 ²⁾
六味地黄汤	2.60	9	60.69 ± 4.47	45.41 ± 5.40	10	15.20 ± 0.80	14.50 ± 1.85 ⁴⁾
	7.81	10	54.16 ± 3.39	50.71 ± 3.92 ⁴⁾	9	13.44 ± 1.50	15.89 ± 1.65 ⁴⁾
	23.50	8	59.15 ± 6.10	49.90 ± 4.70 ³⁾	9	16.67 ± 2.17	17.33 ± 1.00 ⁴⁾

表 4 六味地黄汤对 CUMS 大鼠水迷宫穿越平台次数及平台所在象限时间的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of Liuwei Dihuangtang on times across platform and time during platform quadrant of water maze experiment in CUMS rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	平台所在 象限时间/s	穿越平台数 /次
正常	9	-	19.71 ± 2.12	2.44 ± 0.41
模型	10	-	19.58 ± 1.57	1.50 ± 0.31
六味地黄汤	9	2.60	21.03 ± 1.96	2.22 ± 0.36
	10	7.81	21.58 ± 2.87	2.20 ± 0.42
	8	23.50	16.44 ± 1.58	1.88 ± 0.48

表 5 六味地黄汤对 CUMS 大鼠水迷宫寻台潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of Liuwei Dihuangtang on latency of water maze experiment in CUMS rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
正常	8	-	35.17 ± 4.29	17.57 ± 4.09	13.93 ± 3.74	6.35 ± 1.85
模型	10	-	32.74 ± 3.61	17.47 ± 2.44	16.91 ± 2.37	15.40 ± 2.21 ²⁾
六味地黄汤	8	2.60	30.03 ± 2.88	18.68 ± 0.84	9.89 ± 1.33	6.93 ± 1.66 ⁴⁾
	8	7.81	27.88 ± 3.03	22.03 ± 4.48	9.53 ± 1.16	7.07 ± 1.40 ⁴⁾
	8	23.50	30.47 ± 3.77	15.24 ± 2.59	14.76 ± 3.75	16.85 ± 3.60

表 6 六味地黄汤对 CUMS 大鼠血清雌激素含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Effect of Liuwei Dihuangtang on serum estrogen concentration in CUMS rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	雌激素/ng·L ⁻¹
正常	7	-	79.38 ± 17.39
模型	7	-	32.70 ± 4.41 ¹⁾
六味地黄汤	7	2.60	64.03 ± 11.48
	6	7.81	80.66 ± 18.86 ³⁾
	7	23.50	48.35 ± 16.10

明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$), 六味地黄汤低剂量组 GPR30, CREB mRNA 表达量明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 7。

4 讨论

目前, CUMS 抑郁模型大鼠的造模机制类似于持续低强度外来的应激刺激致人类抑郁的机制, 其造模效果相对稳定。CUMS 抑郁模型大鼠可表现为糖水偏好下降, 旷场自主活动减少等抑郁行为表型, 同时也出现学习记忆等认知功能损伤^[14-17]。本研究应用该 CUMS 抑郁模型, 结果显示与正常组比较, CUMS 大鼠体质量明显下降, 且糖水偏好度显著下降, 旷场站立次数及运动总路程显著减少, 水迷宫

质量下降并无改善作用, 但明显改善 CUMS 所致抑郁大鼠的行为学症状。Morris 水迷宫实验评价大鼠学习记忆能力, 结果显示, 六味地黄汤对 CUMS 大鼠学习记忆障碍有一定的治疗作用, 六味地黄汤剂量为 7.81 g·kg⁻¹ 效果最佳。

认知受损是抑郁障碍治疗的一个难点, 研究表明, 多种病理生理机制参与抑郁症及其认知功能损伤。其中, CREB/BDNF 通路广泛参与抑郁症的发生, 作为大脑中分布最为广泛的神经营养因子之一的 BDNF, 对神经元突触传递和重塑起到了非常重要的调节作用, BDNF 是 CREB 的经典下游靶基因^[18]。在慢性不可预期性应激大鼠模型中, 人参皂

潜伏期显著延长, 这与文献报道一致, 说明造模成功。本研究结果表明, 六味地黄汤对 CUMS 大鼠体

表 7 六味地黄汤对 CUMS 海马中 GPR30, PI3K, CREB, BDNF mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effect of Liuwei Dihuangtang on expression levels of GPR30, PI3K, CREB, BDNF mRNA in CUMS rat hippocampus ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	GPR30	PI3K	CREB	BDNF
正常	-	1.19 ± 0.03	1.14 ± 0.02	1.02 ± 0.03	0.98 ± 0.01
模型	-	1.02 ± 0.04 ¹⁾	0.95 ± 0.02 ²⁾	0.90 ± 0.01 ¹⁾	0.74 ± 0.01 ²⁾
六味地黄汤	2.60	1.44 ± 0.11 ³⁾	0.98 ± 0.05	1.10 ± 0.03 ⁴⁾	0.81 ± 0.02
	7.81	1.26 ± 0.03 ⁴⁾	1.27 ± 0.07 ³⁾	1.40 ± 0.08 ⁴⁾	1.01 ± 0.03 ⁴⁾
	23.50	1.14 ± 0.03	0.98 ± 0.04	0.94 ± 0.03	0.90 ± 0.06

昔 R_{g1} 对抑郁样行为的改善似乎是与由 CREB 调节的大鼠杏仁核中 BDNF 表达的增加相关^[8]。并且慢性应激导致的抑郁样行为和学习记忆障碍,可能与海马神经元 cAMP/PKA/CREB/BDNF 信号通路有关^[9-10]。

本研究结合临床经验,六味地黄汤临床常用于治疗 AD 和更年期综合征,且有研究表明补肾方药主要作用于海马,可以保护海马神经元细胞^[19],提高肾虚质大鼠学习记忆力^[20]。海马是记忆中心,对记忆的形成、存储和提取尤为关键^[21],海马 CA1 区突触可塑性在学习记忆等过程中发挥了重要的作用^[22-23]。研究发现,方药六味地黄汤还能提高体内雌激素水平^[4,24],而雌激素可改善记忆并促进 BDNF 表达^[25]。目前的大量研究表明,GPBR 作为 G 蛋白偶联雌激素受体,通过与雌激素类物质结合,可快速激活细胞内的第二信号系统,其中包括启动 PI3K 的级联反应^[26-27],PI3K 可影响 CREB 的激活^[28],结合 CREB/BDNF 通路广泛参与抑郁症的发生。本研究探讨六味地黄汤是否能通过提高雌激素水平作用于雌激素受体 GPR30 从而启动 PI3K 级联反应,激活 CREB/BDNF 相关信号通路来改善抑郁的学习记忆障碍,提高疗效。

本研究结果表明,给予慢性应激刺激 28 d 后血清雌激素含量及 GPR30, PI3K, CREB 及 BDNF mRNA 表达明显下降。六味地黄汤中剂量组血清雌激素含量较 CUMS 模型组明显上调,六味地黄汤 2.60, 7.81 $g \cdot kg^{-1}$ 上调海马 GPR30 及 CREB mRNA 表达水平,六味地黄汤 7.81 $g \cdot kg^{-1}$ 上调海马 PI3K 及 BDNF mRNA 表达水平,提示慢性应激减少雌激素含量及 GPR30, PI3K, CREB 及 BDNF mRNA 的表达,六味地黄汤对雌激素的上调, GPR30, PI3K, CREB 及 BDNF mRNA 表达具有明显的促进作用,六味地黄汤剂量为 7.81 $g \cdot kg^{-1}$ 效果最佳。

综上,慢性不可预见性温和应激可导致动物抑

郁行为,并表现出学习记忆能力的降低。给予六味地黄汤治疗后能显著改善抑郁模型动物的行为学和学习记忆能力的异常,表现出抗抑郁及改善抑郁造成的认知功能缺损的作用,其中六味地黄汤剂量为 7.81 $g \cdot kg^{-1}$ 效果最佳。其作用机制可能与提高雌激素、海马 GPR30, PI3K, CREB 及 BDNF mRNA 表达水平有关。本研究采用六味地黄汤干预方法,以及其对血清雌激素,海马细胞内的 GPR30, PI3K, CREB, BDNF mRNA 表达量的研究,在治疗抑郁症记忆障碍机制研究中未见报道,这是本课题研究的创新点,同时,也为临床应用提供了一定依据。本研究仅对 GPR30, PI3K, CREB, BDNF mRNA 表达量进行分析,还应该对其蛋白表达量做进一步的检测,以说明六味地黄汤通过雌激素可激活 GPR30/PI3K/CREB/BDNF 通路,参与改善抑郁症状及认知障碍的治疗。

[参考文献]

[1] 美国研究发现抑郁会引发记忆问题[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(54): 29.
 [2] 平军辉, 崔桂梅, 王萍. 抑郁症患者治疗前后神经心理学测验变化分析[J]. 临床心身疾病杂志, 2011, 17(17): 141-142.
 [3] 张璐璐, 郑洪波, 邓悦, 等. 抑郁症患者治疗前后认知功能变化的分析[J]. 神经疾病与精神卫生, 2007, 7(7): 262-265.
 [4] 牛爱琴. 六味地黄汤加减治疗绝经前后诸证 48 例临床研究[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(18): 129-130.
 [5] 易健, 刘柏炎, 蔡光先. 超微六味地黄汤对老年痴呆大鼠认知功能和脑组织碱性成纤维生长因子表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 139-142.
 [6] SU Q, CHENG Y, JIN K, et al. Estrogen therapy increases BDNF expression and improves post-stroke depression in ovariectomy-treated rats [J]. Exp Ther Med, 2016, 12(3): 1843-1848.

- [7] KARISSETTY B C, JOSHI P C, KUMARBC A, et al. Sex differences in the effect of chronic mild stress on mouse prefrontal cortical BDNF levels: a role of major ovarian hormones [J]. *Neuroscience*, 2017, 356: 89-101.
- [8] LIU Z, QI Y, CHENG Z, et al. The effects of ginsenoside Rg₁ on chronic stress induced depression-like behaviors, BDNF expression and the phosphorylation of PKA and CREB in rat [J]. *Neuroscience*, 2016, 322: 358-369.
- [9] LUO Y, KUANG S, LI H, et al. cAMP/PKA-CREB-BDNF signaling pathway in hippocampus mediates cyclooxygenase 2-induced learning/memory deficits of rats subjected to chronic unpredictable mild stress [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(22): 35558-35572.
- [10] WANG C, GUO J, GUO R. Effect of XingPiJieYu decoction on spatial learning and memory and cAMP-PKA-CREB-BDNF pathway in rat model of depression through chronic unpredictable stress [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1):73.
- [11] 李子雯,贾丹,党院霞,等. 百合知母汤总皂苷调节 5-HT 功能治疗抑郁症的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(19): 131-138.
- [12] 金铭,蔡珍珍,韩俊岩,等. 抑郁模型大鼠海马组织中内质网应激调控因子的表达及 β -细辛醚的干预作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(8): 124-129.
- [13] WINNER P, TOWELL A, SAMPSON D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1987, 93(3): 358-364.
- [14] QIBIN C, LI R, SU M, et al. Changes in synaptic plasticity are associated with electroconvulsive shock-induced learning and memory impairment in rats with depression-like behavior [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2018, 14: 1737-1746.
- [15] 朱维煜,冯霞,王瑾,等. 定志小丸对 miR-16 及 5-HT 重摄取的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(17): 3513-3518.
- [16] 牟雄军,明浩,许乐思,等. 疏肝和胃汤抗抑郁作用有效物质部位筛选及其对海马内多种神经递质含量影响的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(3): 526-534.
- [17] LI X Y, QI W W, ZHANG Y X, et al. Helicid ameliorates learning and cognitive ability and activities Camp/Pka/Creb signaling in chronic unpredictable mild stress rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42(7): 1146-1154.
- [18] MARZIEH R, MEHDI M, AYAT K, et al. Effect of crocin carotenoid on BDNF and CREB gene expression in brain ventral tegmental area of morphine treated rats [J]. *Asian Pac J Trop Biochem*, 2018, 8(8): 387-393.
- [19] 朱仲康,张林,柳春,等. 补肾填精法对肾虚阿尔茨海默小鼠海马自噬的干预作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(20): 43-48.
- [20] 孙理军,孙瑜嫣,姜梅,等. 补肾中药对肾虚质大鼠海马区 ERK1 表达的影响 [J]. *现代中医药*, 2018, 38(6): 144-148.
- [21] 沈政,林庶芝. 颞叶皮层的认知功能 [J]. *生理科学进展*, 1993(1): 49-52.
- [22] JONES D G, DEVON R M. An ultrastructural study into the effects of pentobarbitone on synaptic organization [J]. *Brain Res*, 1978, 147(1): 47-63.
- [23] 罗俊,张科楠,肖帅,等. 镇心省睡益智方及其精油对 AD 模型小鼠学习记忆的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(9): 74-81.
- [24] 王莹,杨硕,谢慧慧,等. 二仙汤对去卵巢大鼠认知障碍的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(17): 114-119.
- [25] 唐明山. 雌激素改善大鼠记忆及促进海马 BDNF 蛋白表达上调 [J]. *重庆医学*, 2012, 41(23): 2386-2388, 2391.
- [26] LIN B C, SUZAWA M, BLIND R D, et al. Stimulating the GPR30 estrogen receptor with a novel tamoxifen analogue activates SF-1 and promotes endometrial cell proliferation [J]. *Cancer Res*, 2009, 69: 5415-5423.
- [27] 吴艳,卞慧敏. 雌激素受体信号转导途径和功能 [J]. *安徽医药*, 2012, 16(2): 242-244.
- [28] MALBERG J E, BLENDY J A. Antidepressant action: to the nucleus and beyond [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2005, 26(12): 631-638.

[责任编辑 周冰冰]