

逍遥散对 LPS 所致大鼠神经损伤的保护作用机制

石博宇, 刘蓉, 饶志粒, 刘小波, 罗杰, 纪雅菲, 刘淇, 曾南*

(成都中医药大学, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

[摘要] **目的:**探讨逍遥散对脂多糖(LPS)所致大鼠神经损伤的保护作用,探讨其机制。**方法:**56只SD大鼠随机分为空白组,假手术组,模型组,阿米替林组($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),氟西汀组($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),逍遥散高、低剂量组($30, 15\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),采用侧脑室注射LPS诱导建立神经损伤大鼠模型,连续预防灌胃给药14d,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测大鼠血清脑源性神经营养因子(BDNF)和 β -神经生长因子(β -NGF)水平,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)与蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠海马和皮层部位BDNF,神经生长因子(NGF),原肌球蛋白受体激酶B(TrkB),原肌球蛋白受体激酶A(TrkA),cAMP反应元件结合蛋白(CREB),突触后密度蛋白95(PSD95),突触小泡蛋白(SYP)mRNA或蛋白表达水平。**结果:**与空白组比较,模型组大鼠血清BDNF, β -NGF含量显著下降($P < 0.01$),皮层、海马BDNF,NGF,TrkB,TrkA,CREB mRNA明显下调($P < 0.05, P < 0.01$),BDNF,TrkB,CREB,磷酸化cAMP反应元件结合蛋白(p-CREB),PSD95,SYP蛋白表达水平明显下调($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,逍遥散高、低剂量组大鼠血清BDNF, β -NGF含量明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),皮层、海马BDNF,NGF,TrkB,TrkA,CREB mRNA表达水平明显上调($P < 0.05, P < 0.01$),BDNF,TrkB,CREB,p-CREB,PSD95,SYP蛋白表达水平明显上调($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**逍遥散对侧脑室注射LPS诱导的大鼠神经损伤有一定保护作用,作用发挥与活化BDNF/NGF-TrkB/TrkA-CREB通路及上调突触蛋白表达有关。

[关键词] 逍遥散; 脂多糖(LPS); 抑郁症; 神经保护; 机制

[中图分类号] R289;R246.6;R459.1;B845.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)05-0050-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190536

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181119.1102.008.html>

[网络出版时间] 2018-11-21 09:53

Neuroprotective Effect and Mechanism of Xiaoyaosan on Lipopolysaccharide-induced Nerve Injury in Rat

SHI Bo-yu, LIU Rong, RAO Zhi-li, LIU Xiao-bo, LUO Jie, JI Ya-fei, LIU Qi, ZENG Nan*

(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, the Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine; Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province—Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and MOST, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of Xiaoyaosan on lipopolysaccharide (LPS)-induced nerve injury. **Method:** The 56 rats were randomly divided into control group, sham group, model group, amitriptyline group ($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), fluoxetine group ($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), Xiaoyaosan group high and low-dose ($30, 15\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The nerve injury model rat were established by LPS injection into lateral ventricle, rats were administrated for 14 days by gavage. The levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and β -nerve growth factor (β -NGF) in serum were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and the expressions of BDNF, nerve growth factor (NGF), tropomyosin receptor kinase B (TrkB), tropomyosin receptor

[收稿日期] 20180925(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81503277,81473399);四川省自然科学基金项目(16ZB0116);成都中医药大学科研基金项目(ZRQN1643)

[第一作者] 石博宇,在读硕士,从事中药神经精神药理学研究,E-mail:spring729477@126.com

[通信作者] *曾南,教授,博士生导师,从事中药药理与毒理学研究,E-mail:zengnan966@126.com

kinase A (TrkA), cAMP response element-binding protein (CREB) mRNA in hippocampus and cortex were detected by Real-time PCR. Protein expression of BDNF, TrkB, CREB, p-CREB, postsynaptic density protein 95 (PSD95), synaptophysin (SYP) in hippocampus and cortex were detected by Western blot. **Result:** Compared with control group, LPS decreased the level of BDNF and β -NGF in serum ($P < 0.01$), reduced the expression of BDNF, NGF, TrkB, TrkA, CREB mRNA and the expression of BDNF, TrkB, CREB, Phospho-CREB (p-CREB), PSD95, SYP in hippocampus and cortex ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with model group, levels of BDNF and β -NGF in serum in Xiaoyaosan high and low-dose group were increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and expressions of BDNF, NGF, TrkB, TrkA, CREB, PSD95, SYP in hippocampus and cortex were increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Xiaoyaosan has a certain antagonistic effect on LPS induced nerve injury, which suggests that the effect is related to activate BDNF/NGF-TrkB/TrkA-CREB pathway and upregulated the expression of synaptic protein.

[**Key words**] Xiaoyaosan; lipopolysaccharide (LPS); nerve injury; neuro protection; mechanism

抑郁症是一种大脑发生功能性或器质性病变的疾病,临床表现为显著性的持久情绪低落、思维迟缓、消极,患病率和自杀率均较高。现代研究表明,抑郁症患者海马常有萎缩表现,海马体积的选择性丧失可能是重度抑郁症的诱导因素之一^[1],提示神经元的损伤与抑郁症的病理生理机制密切相关^[2],抗抑郁药物对神经元的保护作用可能是其发挥抗抑郁作用的机制之一。研究发现,脂多糖(LPS)可引起大鼠海马齿状回 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)阳性细胞数明显减少,抑制海马神经生长,如减少细胞增殖和降低新生细胞存活率,且在神经炎症状态下,海马神经细胞增殖的减少与动物抑郁样行为指标显著相关,表明神经炎症-海马神经损伤-抑郁症发生三者之间密切相关,提示影响海马神经生长是治疗炎症诱导的抑郁症的生物学机制之一^[3]。临床上抗抑郁药亦能通过促进神经发生发挥抗抑郁作用^[4],Encinas 等^[5]发现选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂氟西汀不影响齿状回干细胞的分裂,但能增加早期祖细胞类的对称分裂,提示氟西汀引起的新神经元增加是由于该类细胞的扩大而产生的。Hitoshi 等^[6]发现心理社会应激可抑制齿状回细胞增殖,抗抑郁药物氟西汀与丙咪嗪治疗后可逆转该表现。

逍遥散作为中医调治情志活动异常的经典名方,现代药理研究及临床应用均表明逍遥散具有一定的抗抑郁作用,作用机制与调节神经递质水平和功能、影响激素分泌水平、提高脑源性神经营养因子(BDNF)水平等有关^[7]。基于上述炎神经症反应与神经损伤、抑郁症的关系,以及临床抗抑郁药物对神经元的保护作用研究现状,结合实验室前期研究发现逍遥散具有一定抗炎作用,且对 LPS 诱导的大鼠抑郁样行为有对抗作用的表现,本研究采用侧脑室

注射 LPS 诱导的大鼠神经损伤模型,从神经营养及生长角度观察逍遥散的影响作用,以期揭示逍遥散对炎性神经损伤的保护作用,拓展其神经药理作用研究范畴,同时可为阐释其抗抑郁作用的发挥提供新的科学依据。

1 材料

1.1 药物 逍遥散中当归、白芍、白术、茯苓、薄荷、生姜、甘草片等饮片均购自成都太极大药房,柴胡购自河北一仁药业有限公司。经成都中医药大学药教研室严铸云教授鉴定,柴胡是伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* 的干燥根,当归是伞形科植物当归 *Angelica sinensis* 的干燥根,白芍是毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* 的干燥根,茯苓是多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* 的干燥菌核,白术是菊科植物白术的 *Atractylodes macrocephala* 的干燥根茎,甘草是豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的干燥根及根茎,薄荷是唇形科植物薄荷 *Mentha haplocalyx* 的干燥地上部分,符合 2015 年版《中国药典》收载要求。盐酸氟西汀胶囊(法国 Patheon France 公司,批号 6607A);阿米替林(美国 Sigma 公司,批号 BCBQ4634V)。

1.2 动物 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 56 只,体质量 180 ~ 220 g,成都达硕生物科技有限公司提供,合格证号 SCXK(川)2015-030。饲养于成都中医药大学药学院实验动物观察室,许可证号 SYXK(川)2014-0124。饲养房间温度 20 ~ 25 °C,湿度 45% ~ 55%,动物可自由摄食和饮水。本研究动物实验经成都中医药大学伦理委员会批准,实验动物伦理审查编号为 2016-11。

1.3 材料与试剂 LPS(Sigma 公司,批号 L2880);大鼠 BDNF 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒

(Excell Bio 公司,批号 21H012);大鼠 β -神经生长因子(β -NGF)ELISA 试剂盒(北京四正柏生物科技有限公司,批号 20180111);AxyPrep 总 RNA 小量制备试剂盒(Axygen 公司,批号 15417KD1);Fast Quant RT Kit (WitngDNase) 100rxn 反转录试剂盒, SuperRealPreMix Plus (SYBR Green) 荧光定量检测试剂盒(Tiangen 公司,批号分别为 R6308, Q5407);BDNF 兔单克隆抗体(Abcam 公司,批号 ab182199);原肌球蛋白受体激酶 B(TrkB)兔单克隆抗体,cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)兔单克隆抗体,磷酸化 cAMP 反应元件结合蛋白(p-CREB)兔单克隆抗体, β -微管蛋白(β -tubulin)兔单克隆抗体(Cell Signaling 公司,批号分别为 4603, 9197S, 9198S, 2128);突触后密度蛋白 95(PSD95)兔多克隆抗体,突触小泡蛋白(SYP)兔多克隆抗体(Proteintech 公司,批号分别为 20665-1-AP, 17785-1-AP);兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(Servicebio 公司,批号分别为 GB11002, GB23303)。

1.4 仪器 DW-5 型脑立体定位仪,CD-200 型动物颅骨钻(成都泰盟科技有限公司);3001 型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);CFX96TM 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 操作系统,ChemiDoc XRS + 化学发光成像系统,Mini PROTEAN Tetra Cell 型转膜仪,Image Lab 凝胶分析系统(美国 Bio-Rad 公司);DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂)。

2 方法

2.1 药物制备 逍遥散水煎液制备,按方剂组成要求^[8]分别称取适量的相应药材饮片,以药材总量的 8 倍水浸泡 30 min,加热沸腾后再文火煎煮 60 min,趁热滤去药渣;同上加 6 倍量水分别煎煮 40, 30 min;合并 3 次滤液,在 60 °C 条件下减压浓缩到所需质量浓度(分别为含生药 1.5, 0.75 g·mL⁻¹)。逍遥散给药剂量分别为含生药 30, 15 g·mL⁻¹。盐酸氟西汀胶囊用蒸馏水配制成质量浓度为 0.5 g·L⁻¹;阿米替林,用蒸馏水配制成质量浓度为 0.5 g·L⁻¹ 的药液,大鼠剂量均为 0.01 g·kg⁻¹。除逍遥散低剂量组(15 g·kg⁻¹)外,以上药物所有剂量是根据成人与大鼠体表面积折算的等效剂量的 5 倍换算而来^[7]。

2.2 动物分组与模型制备 取健康雄性 SD 大鼠,体质量 180 ~ 220 g,适应性饲养 3 d 后,按体质量分层随机分为 7 组,即空白组,模型组,假手术组,阿米

替林组(10 mg·kg⁻¹),氟西汀组(10 mg·kg⁻¹),逍遥散高、低剂量组(30, 15 g·kg⁻¹)。经前期预实验发现预防给药可减轻对手术后大鼠的损伤,因此各组大鼠以 20 mL·kg⁻¹连续灌胃给予相应药物 14 d,每日 1 次,空白组和模型组给予等剂量的蒸馏水。末次给药 1 h 后进行造模,除空白组大鼠外其余各组大鼠腹腔注射 20% 乌拉坦(10 mL·kg⁻¹)进行麻醉,将动物固定于脑立体定位仪上。切开大鼠颅顶皮肤,使前囟点(Bregma)和后囟点(Lambda)清楚暴露,测量两点之间的距离。根据 Anne 定位方法和大鼠大脑图谱,以前囟点为原点进行定位、钻孔,除假手术组外其余各组手术大鼠进行侧脑室注射 LPS (100 mg·L⁻¹),每只大鼠每次 300 ng,假手术组注射等量生理盐水^[3]。手术完成后,大鼠自行恢复,因侧脑室注射使动物头部有开放性损伤,因此大鼠进行单笼饲养,自由饮食,在 24 h 明暗周期的环境中饲养,光照时间为 7:00 ~ 19:00,饲养环境温度(20 ± 2) °C。

2.3 ELISA 检测大鼠血清 β -NGF 和 BDNF 水平

大鼠自行恢复 1 周后,各组大鼠 20% 乌拉坦(10 mL·kg⁻¹)麻醉,腹主动脉取血,室温静置凝血,以 3 500 r·min⁻¹离心 10 min,分离血清,按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清 β -NGF 和 BDNF 水平。

2.4 Real-time PCR 检测 BDNF, NGF, TrkB, 原肌球蛋白受体激酶 A(TrkA), CREB mRNA 的表达 于冰上剖取大鼠大脑皮层和海马组织,采用 AxyPrep 总 RNA 小量制备试剂盒提取大鼠海马、皮层组织总 RNA, FastQuant RT Kit (WitngDNase) 反转录为 cDNA, 反转录条件以 30 μ L 体系进行。确定引物后,以 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参, Real-time PCR 反应条件为 95 °C 预变性 15 min, 95 °C 变性 10 s, 61.2 °C 退火延伸 30 s, 40 个循环;采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法进行相对定量分析,通过差异值反映逍遥散对大鼠海马、皮层组织各指标 mRNA 表达的影响。所有引物由上海 Invitrogen 公司设计合成。引物序列见表 1。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠脑组织 BDNF, CREB, p-CREB, TrkB, PSD95, SYP 蛋白表达情况 于冰上剖取大鼠大脑皮层和海马组织, RIPA 裂解液充分裂解后, 4 °C, 9 457 r·min⁻¹离心 5 min, 取上清液, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定样本总蛋白含量, 将所有样本总蛋白调至等浓度。按照蛋白样本-5 × SDS 上样缓冲液 4:1 在蛋白样本中加入 5 × SDS 上样缓冲液, 充分混匀沸水浴 95 °C

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β -actin	上游 CACCCGCGAGTACAACCTTC	207
	下游 CCCATACCCACCATCACACC	
BDNF	上游 TAGGCAGAATGAGCAATGTC	178
	下游 CCCAAGAGGTTAAAGTGTAGAAG	
NGF	上游 TGGAGATAAGACCACAGCCA	197
	下游 TGACAAAGGTGTGAGTCGTG	
TrkB	上游 TGCTCAAGTTGGCGAGACAT	151
	下游 GTCCCAGGAGTTCAGCTCAC	
TrkA	上游 CCCTCTGATGTCTACGCCA	139
	下游 CTCCTAGCCCAGAACGTCCA	
CREB	上游 AGCCGGGTACTACCATT	244
	下游 GCTGCTCCCTGTTCTTC	

5 min使蛋白变性,迅速至于冰水混合物中冷却制得蛋白电泳上样液,然后制备 SDS-PAGE 胶,上样,电泳,转膜,封闭,BDNF 兔单克隆抗体,TrkB 兔单克隆抗体,CREB 兔单克隆抗体,p-CREB 兔单克隆抗体, β -tubulin 兔单克隆抗体,PSD95 兔多克隆抗体,SYP 兔多克隆抗体,兔抗 GAPDH 抗体(1:1 000) 4 °C 孵育过夜,完毕后,将 PVDF 膜取出转移至装有适量 TBST 的孵育盒中,置恒温振荡器中缓慢摇动,漂洗 3 次,每次 5 min,后置于 37 °C 恒温振荡器中封闭孵育 HRP 标记山羊抗兔 IgG(1:1 000) 1.5 h, TBST 漂洗 3 次,每次 10 min,ECL 显色液,将 PVDF 膜置于 ChemiDoc™ XRS + Imaging System 凝胶扫描成像仪中扫描成像,运用 Imade Lab 图像分析系统分析条带灰度值。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,所有实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据符合正态分布,采用 One-way ANOVA 分析或 *t* 检验,不符合正态分布者采用非参数检验秩和法分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 逍遥散对 LPS 致神经损伤大鼠神经生长因子通路的影响

3.1.1 对大鼠血清 BDNF, β -NGF 含量的影响 与空白组和假手术组比较,模型组大鼠血清 BDNF, β -NGF 含量显著减少($P < 0.01$);与模型组比较,逍遥散高、低剂量组能明显增加大鼠血清中 β -NGF 含量($P < 0.05$),逍遥散低剂量组能显著增加 BDNF 含量($P < 0.01$)。见表 2。

3.1.2 对大脑皮层和海马 BDNF,NGF mRNA 表达的影响 与空白组和假手术组比较,模型组大鼠

表 2 逍遥散对 LPS 致神经损伤大鼠血清 BDNF, β -NGF 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of Xiaoyaosan on levels of BDNF and β -NGF in serum in LPS-induced nerve damaged rat($\bar{x} \pm s, n = 8$) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	BDNF	β -NGF
空白	-	516.18 \pm 56.72	124.38 \pm 3.12
假手术	-	646.87 \pm 168.63	126.26 \pm 7.85
模型	-	390.22 \pm 98.45 ^{1,2)}	95.09 \pm 6.37 ^{1,2)}
氟西汀	0.01	500.09 \pm 53.09 ³⁾	110.98 \pm 13.71 ³⁾
阿米替林	0.01	501.31 \pm 79.87 ³⁾	107.01 \pm 12.62 ³⁾
逍遥散	15	544.99 \pm 76.77 ⁴⁾	108.60 \pm 14.74 ³⁾
	30	544.17 \pm 210.29	110.02 \pm 16.61 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与假手术组比较²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

皮层和海马 NGF mRNA 表达明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$),皮层 BDNF mRNA 表达显著减少($P < 0.01$);与假手术组比较,模型组大鼠海马 BDNF mRNA 表达明显下调($P < 0.05$);与模型组比较,逍遥散低、高剂量组均能明显上调大鼠大脑皮层中 BDNF,NGF mRNA 和海马 NGF mRNA 表达水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 3。

3.1.3 对大鼠皮层和海马部位 TrkB,TrkA,CREB mRNA 表达水平的影响 与空白组和假手术组比较,模型组大鼠皮层和海马 TrkB,CREB mRNA 表达明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$),皮层 TrkA mRNA 表达明显减少($P < 0.05$);与假手术组比较,模型大鼠海马 TrkA mRNA 表达明显下调($P < 0.05$);与模型组比较,逍遥散高、低剂量组均能明显上调大鼠大脑皮层和海马部位 TrkB,TrkA mRNA 及皮层 CREB mRNA 表达水平($P < 0.05$, $P < 0.01$),逍遥散高剂量组能明显上调海马 CREB mRNA 表达($P < 0.05$)。见表 4。

3.1.4 对皮层和海马神经生长因子通路相关蛋白表达的影响 与空白组和假手术组比较,模型组大鼠皮层和海马 BDNF,TrkB,CREB,p-CREB 蛋白表达及海马 p-CREB/CREB 比值明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$);与空白组比较,模型组大鼠皮层 p-CREB/CREB 明显减小($P < 0.05$);与模型组比较,逍遥散高、低剂量组均能明显上调大鼠大脑皮层和海马部位 BDNF,TrkB,CREB,p-CREB 及海马 p-CREB/CREB 蛋白表达($P < 0.05$, $P < 0.01$),逍遥散低剂量组能明显提高皮层 p-CREB/CREB 蛋白表达($P < 0.05$)。见图 1,表 5,6。

3.2 逍遥散对 LPS 致神经损伤大鼠皮层和海马部位突触生长蛋白表达水平的影响 与空白组和

表 3 逍遥散对 LPS 致神经损伤大鼠脑组织 BDNF, NGF mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of Xiaoyaosan on expression of BDNF and NGF mRNA in hippocampus and cortex in LPS-induced nerve damaged rat ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

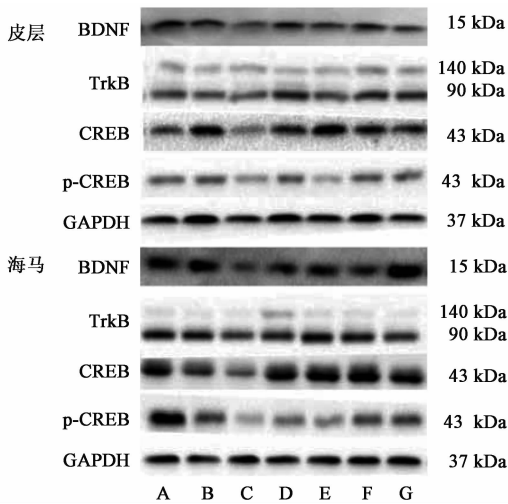
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	皮层		海马	
		BDNF	NGF	BDNF	NGF
空白	-	1.04 ± 0.31	1.07 ± 0.44	1.08 ± 0.47	1.02 ± 0.27
假手术	-	1.27 ± 0.23	0.92 ± 0.33	1.11 ± 0.36	1.09 ± 0.10
模型	-	0.56 ± 0.16 ^{2,4)}	0.55 ± 0.07 ^{1,3)}	0.68 ± 0.07 ³⁾	0.71 ± 0.10 ^{2,4)}
氟西汀	0.01	1.16 ± 0.94	0.82 ± 0.37	1.06 ± 0.26 ⁵⁾	0.95 ± 0.14 ⁵⁾
阿米替林	0.01	1.23 ± 0.73	1.00 ± 0.17 ⁶⁾	1.07 ± 0.34 ⁶⁾	0.91 ± 0.16
逍遥散	15	1.25 ± 0.46 ⁵⁾	1.07 ± 0.20 ⁶⁾	0.93 ± 0.22	1.06 ± 0.24 ⁵⁾
	30	1.14 ± 0.24 ⁶⁾	0.93 ± 0.22 ⁶⁾	1.04 ± 0.22 ¹⁾	1.18 ± 0.17 ⁶⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与假手术组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;与模型组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (表 4~7 同)。

表 4 逍遥散对 LPS 致神经损伤大鼠脑组织 TrkB, TrkA, CREB mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of Xiaoyaosan on expression of TrkB, TrkA and CREB mRNA in hippocampus and cortex in LPS-induced nerve damaged rat ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	皮层			海马		
		TrkB	TrkA	CREB	TrkB	TrkA	CREB
空白	-	1.03 ± 0.25	1.05 ± 0.33	1.04 ± 0.33	1.01 ± 0.19	0.90 ± 0.38	1.00 ± 0.15
假手术	-	0.87 ± 0.20	1.17 ± 0.47	0.95 ± 0.22	1.20 ± 0.37	0.99 ± 0.23	1.24 ± 0.50
模型	-	0.48 ± 0.08 ^{2,4)}	0.56 ± 0.07 ^{1,3)}	0.70 ± 0.15 ^{1,3)}	0.51 ± 0.12 ^{2,4)}	0.57 ± 0.10 ³⁾	0.65 ± 0.17 ^{2,3)}
氟西汀	0.01	0.90 ± 0.50	1.21 ± 0.85	1.06 ± 0.54	0.88 ± 0.39	0.87 ± 0.42	0.87 ± 0.46
阿米替林	0.01	1.05 ± 0.29 ⁶⁾	1.00 ± 0.14 ⁶⁾	1.23 ± 0.54 ⁵⁾	0.89 ± 0.22 ⁶⁾	1.00 ± 0.40 ⁵⁾	0.80 ± 0.20
逍遥散	15	1.35 ± 1.06 ⁶⁾	1.16 ± 0.20 ⁶⁾	1.42 ± 0.50 ⁶⁾	1.16 ± 0.09 ⁶⁾	1.01 ± 0.33 ⁵⁾	0.72 ± 0.11
	30	1.00 ± 0.26 ⁶⁾	0.91 ± 0.17 ⁶⁾	1.14 ± 0.18 ⁶⁾	1.44 ± 0.65 ⁵⁾	1.08 ± 0.27 ⁶⁾	0.96 ± 0.23 ⁵⁾



A. 空白组; B. 假手术组; C. 模型组; D. 氟西汀组; E. 阿米替林组; F. 逍遥散低剂量组; G. 逍遥散高剂量组 (图 2 同)

图 1 神经损伤大鼠脑组织 BDNF, TrkB, CREB, p-CREB 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of BDNF, TrkB, CREB, p-CREB protein nerve damaged rat

假手术组比较,模型组大鼠皮层和海马 PSD95, SYP 蛋白表达明显减少 ($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组

比较,逍遥散高剂量组大鼠大脑皮层和海马部位 PSD95, SYP 蛋白表达水平明显上调 ($P < 0.05, P < 0.01$),逍遥散低剂量组皮层 PSD95 及海马 SYP 蛋白的表达量明显增加 ($P < 0.05$)。见图 2,表 7。

4 讨论

据世界卫生组织的调查发现全世界每年约有 1.2 亿人患有抑郁症,而其中只有 25% 的患者得到有效的治疗。随着生活、学习和工作压力的增大,抑郁症患病人数正逐年增加,因此世界各国对抑郁症相关基础和临床研究的投入亦逐年加大。目前,研究发现抗抑郁药氟西汀能保护由 LPS 诱导的神经损伤,提高神经元存活率,促进神经发生,从而提高神经保护能力^[9],提示抗抑郁药物的作用机制不再局限于调控单胺类神经递质功能。逍遥散由柴胡、薄荷、白芍、当归、白术、茯苓、生姜、甘草片组成,其中柴胡为君药,白芍、当归为臣药,薄荷、茯苓、生姜、白术为佐药,甘草片同为佐使。功效疏肝解郁、养血健脾,主治肝郁血虚脾弱证,临床观察和实验研究已证实逍遥散具有确切的抗抑郁作用^[10]。

神经营养因子在神经元网络发育中发挥至关

表 5 逍遥散对 LPS 致神经损伤大鼠大脑皮层 BDNF, TrkB, CREB, p-CREB 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 Effect of Xiaoyaosan on expression of BDNF, TrkB, CREB, p-CREB protein in cortex in LPS-induced nerve damaged rat ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ g·kg ⁻¹	BDNF/ GAPDH	TrkB/ GAPDH	CREB/ GAPDH	p-CREB/ GAPDH	p-CREB/ CREB
空白	-	1.61 ± 0.58	2.87 ± 1.23	2.47 ± 0.09	1.33 ± 0.16	0.52 ± 0.11
假手术	-	2.01 ± 0.97	2.34 ± 0.11	2.19 ± 0.43	1.09 ± 0.34	0.50 ± 0.14
模型	-	0.65 ± 0.24 ^{2,4)}	1.27 ± 0.37 ^{2,3)}	1.06 ± 0.03 ^{1,4)}	0.37 ± 0.11 ^{2,4)}	0.35 ± 0.11 ¹⁾
氟西汀	0.01	0.93 ± 0.12 ⁵⁾	2.64 ± 1.10	1.84 ± 0.09 ⁶⁾	1.01 ± 0.17 ⁶⁾	0.52 ± 0.05 ⁵⁾
阿米替林	0.01	0.94 ± 0.17	2.77 ± 1.02 ⁵⁾	1.97 ± 0.89 ⁶⁾	0.85 ± 0.28 ⁵⁾	0.47 ± 0.18
逍遥散	15	1.11 ± 0.38 ⁵⁾	2.59 ± 0.25 ⁶⁾	1.85 ± 0.22 ⁶⁾	0.94 ± 0.21 ⁶⁾	0.50 ± 0.08 ⁵⁾
	30	1.42 ± 0.11 ⁶⁾	2.76 ± 1.24 ⁵⁾	2.21 ± 0.27 ⁶⁾	1.01 ± 0.24 ⁶⁾	0.52 ± 0.14

表 6 逍遥散对 LPS 致神经损伤大鼠海马 BDNF, TrkB, CREB, p-CREB 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 6 Effect of Xiaoyaosan on expression of BDNF, TrkB, CREB, p-CREB protein in hippocampus in LPS-induced nerve damaged rat ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ g·kg ⁻¹	BDNF/ GAPDH	TrkB/ GAPDH	CREB/ GAPDH	p-CREB/ GAPDH	p-CREB/ CREB
空白	-	2.57 ± 0.29	5.88 ± 2.28	3.07 ± 0.37	1.74 ± 0.37	0.57 ± 0.13
假手术	-	2.36 ± 0.47	6.39 ± 1.10	3.06 ± 0.78	1.73 ± 0.23	0.59 ± 0.15
模型	-	0.74 ± 0.25 ^{2,4)}	1.98 ± 1.05 ^{2,4)}	1.12 ± 0.32 ^{2,4)}	0.43 ± 0.07 ^{2,4)}	0.41 ± 0.11 ^{1,3)}
氟西汀	0.01	1.70 ± 0.48 ⁶⁾	5.56 ± 1.38 ⁶⁾	2.34 ± 0.58 ⁶⁾	1.29 ± 0.33 ⁶⁾	0.56 ± 0.10 ⁵⁾
阿米替林	0.01	1.45 ± 0.12 ⁶⁾	4.22 ± 1.54 ⁵⁾	2.23 ± 0.66 ⁶⁾	1.20 ± 0.13 ⁶⁾	0.57 ± 0.13 ⁵⁾
逍遥散	15	1.49 ± 0.34 ⁶⁾	5.75 ± 0.99 ⁶⁾	2.20 ± 0.42 ⁶⁾	1.25 ± 0.26 ⁶⁾	0.57 ± 0.10 ⁵⁾
	30	1.97 ± 0.65 ⁶⁾	6.32 ± 1.93 ⁶⁾	2.70 ± 0.36 ⁶⁾	1.48 ± 0.22 ⁶⁾	0.56 ± 0.11 ⁵⁾

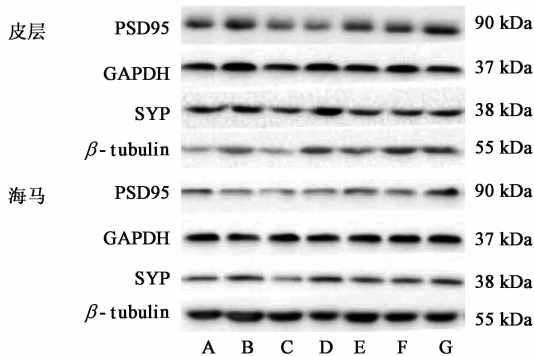


图 2 神经损伤大鼠脑组织 PSD95, SYP 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of PSD95, SYP protein in nerve damaged rat

重要的作用,是一类由神经所支配的组织产生,是神经元存活、生长所必需的蛋白质分子,具有支持神经元生长、发育和功能完整性的作用,包括 BDNF, NGF 等。BDNF 和 NGF 是中枢神经级联信号传递的关键分子,能促进神经突触生长而建立神经元和靶细胞之间的突触联系^[11],与抑郁症的发生密切相关,是抗抑郁药物治疗的重要靶位。大脑皮层、海马、下丘脑等区域均能检测到 BDNF, NGF 蛋白和 mRNA 的表达^[12],而其功能的表达需要酪氨酸蛋白激酶 TrkB 和 TrkA 的参与^[13-14]。中枢神经系统中,

BDNF, NGF 与 TrkB, TrkA 结合可激活 CREB, 促进 CREB 磷酸化,而 CREB 是脑内重要的核转录因子,活化的 CREB 能调控多种与神经细胞生长、存活密切相关的细胞因子的转录水平。Riccio 等^[15]发现成年小鼠前脑中过度表达 CREB 的突变体能诱导神经元变性,表明 CREB 磷酸化活性对哺乳动物脑神经元存活具有重要作用。突触作为神经元传递信息的主要部位,其蛋白标志物主要有 PSD95 和 SYP,可参与调控发育期突触的数目,促进突触的形成,与囊泡的转运和递质的释放、突触可塑性关系紧密^[16-17]。有研究表明,敲除突触小泡蛋白基因的小鼠因突触素的减少会产生新奇对象识别受损以及空间学习减少等行为改变^[18]。小鼠侧脑室注射 β 可诱导小鼠神经炎症,进而导致皮层、海马部位 PSD95 和 SYP 蛋白表达减少^[19],表明 PSD95 和 SYP 在突触形成上具有重要作用。

本研究采用侧脑室注射 LPS 诱发大鼠神经损伤模型,发现模型大鼠血清 BDNF, β -NGF 含量,及皮层和海马部位 BDNF, NGF, TrkB, TrkA, CREB, PSD95, SYP 表达量减少,表明 LPS 可抑制大鼠的神经以及突触的生长与成熟。逍遥散可提高模型动物

表 7 逍遥散对 LPS 致神经损伤大鼠脑组织 PSD95, SYP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 7 Effect of Xiaoyaosan on expression of PSD95, SYP protein in hippocampus and cortex in LPS-induced nerve damaged rat ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	皮层		海马	
		PSD95/GAPDH	SYP/ β -tubulin	PSD95/GAPDH	SYP/ β -tubulin
空白	-	2.05 ± 0.08	2.81 ± 1.20	3.63 ± 1.09	1.77 ± 0.21
假手术	-	2.08 ± 0.23	2.03 ± 0.61	3.12 ± 0.46	1.75 ± 0.33
模型	-	0.98 ± 0.33 ^{2,4)}	1.05 ± 0.33 ^{1,4)}	1.52 ± 0.41 ^{2,4)}	0.71 ± 0.29 ^{2,4)}
氟西汀	0.01	1.50 ± 0.23 ⁵⁾	2.02 ± 0.44 ⁶⁾	2.19 ± 0.58 ⁵⁾	1.34 ± 0.28 ⁶⁾
阿米替林	0.01	1.46 ± 0.51	2.07 ± 0.84 ⁵⁾	2.55 ± 0.70 ⁵⁾	1.50 ± 0.54 ⁵⁾
逍遥散	15	1.92 ± 0.60 ⁵⁾	1.21 ± 0.31	2.51 ± 1.30	1.11 ± 0.11 ⁵⁾
	30	1.79 ± 0.24 ⁶⁾	1.95 ± 0.37 ⁶⁾	2.48 ± 0.67 ⁵⁾	1.51 ± 0.28 ⁶⁾

BDNF, β -NGF 释放量, 上调 BDNF, NGF, TrkB, TrkA, CREB mRNA 及 BDNF, TrkB, CREB, p-CREB, PSD95, SYP 蛋白表达水平, 表明逍遥散可通过激活 BDNF/NGF-TrkB/TrkA-CREB 通路, 上调突触蛋白对抗 LPS 诱导的大鼠神经损伤以及突触形成减少, 发挥神经保护, 促进突触生长。但其具体作用机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] CHEN M C, Hamilton J P, Gotlib I H. Decreased hippocampal volume in healthy girls at risk of depression [J]. Arch Gen Psychiatry, 2010, 67(3):270-276.

[2] Dantzer R, O'Connor J C, Freund G G, et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain [J]. Nat Rev Neurosci, 2008, 9(1):46-56.

[3] TANG M M, LIN W J, PAN Y Q, et al. Hippocampal neurogenesis dysfunction linked to depressive-like behaviors in a neuro inflammation induced model of depression [J]. Physiol Behav, 2016, 161:166-173.

[4] Marlatt M W, Lucassen P J, Van P H. Comparison of neurogenic effects of fluoxetine, duloxetine and running in mice [J]. Brain Res, 2010, 1341(6):93-99.

[5] Encinas J M, Vaahtokari A, Enikolopov G. Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain [J]. P Natl Acad Sci USA, 2006, 103(21):8233-8238.

[6] Hitoshi S, Maruta N, Higashi M, et al. Antidepressant drugs reverse the loss of adult neural stem cells following chronic stress [J]. J Neurosci Res, 2007, 85(16):3574-3585.

[7] 杨靖. 逍遥散及其功能药队抗抑郁效应和分子机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2014.

[8] 段富津. 方剂学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1995.

[9] Chiou S H, CHEN S J, PENG C H, et al. Fluoxetine up-regulation expression of cellular FLICE-inhibitory protein and inhibits LPS-induced apoptosis in hippocampus-derived stem cell [J]. Biochem Bioph Res

Co, 2006, 343(2):391-400.

[10] 王学, 叶晓琳, 刘小波, 等. 逍遥散抗抑郁作用的研究现状 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(16):212-220.

[11] Cohen-Cory S. The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits [J]. Science, 2002, 298(5594):770-776.

[12] Bathina S, Das U N. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications [J]. Arch Med Sci, 2015, 11(6):1164-1178.

[13] Devry J, Vanmierlo T, Martinez-Martinez P, et al. TrkB in the hippocampus and nucleus accumbens differentially modulates depression-like behavior in mice [J]. Behav Brain Res, 2016, 296:15-25.

[14] LU SH, YANG Y, LIU S J. An investigation on the division of neuronal PC12 cells induced by nerve growth factor [J]. Acta Physiol Sinica, 2005, 57(5):552-556.

[15] Riccio A, Alvania R S, Lonze B E, et al. A nitric oxide signaling pathway controls creb-mediated gene expression in neurons [J]. Mol Cell, 2009, 21(2):283-294.

[16] PAN W, HAN S, LIN K, et al. Effects of dihydrotestosterone on synaptic plasticity of the hippocampus in mild cognitive impairment male SAMP8 mice [J]. Exp Ther Med, 2016, 12(3):1455-1463.

[17] XU J Q, Winter F D, Farrokhi C, et al. Neuregulin 1 improves cognitive deficits and neuropathology in an Alzheimer's disease model [J]. Sci Rep, 2016, doi:10.1038/srep31692.

[18] Schmitt U, Tanimoto N, Seeliger M, et al. Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin [J]. Neuroscience, 2009, 162(2):234-243.

[19] WU X, YANG G L, DU Y F, et al. Neuroprotective effects of int-777 against A β 1-42-induced cognitive impairment, neuroinflammation, apoptosis, and synaptic dysfunction in mice [J]. Brain Behav Immun, 2018, doi:10.1016/j.bbi.2018.06.018.

[责任编辑 孙丛丛]