

越鞠丸合甘麦大枣汤加减对谷氨酸诱导的 HT22 细胞损伤模型的神经保护作用

葛渴敏, 王薇, 薛文达, 陈刚, 王福顺*

(南京中医药大学 医学与生命科学学院, 医学心理学院, 基础医学院, 南京 210023)

[摘要] 目的:探讨越鞠丸合甘麦大枣汤加减(YJGZ)对谷氨酸诱导的小鼠海马神经元细胞系(HT22)细胞损伤的神经保护作用。方法:HT22 细胞系无菌培养,以高浓度谷氨酸建立细胞损伤模型,并制备 YJGZ 水提液和含药血清,分为正常组,模型组,YJGZ 含药血清组(1%,5%,10%),YJGZ 水提液组(166 mg·L⁻¹),尼莫地平组(100 μmol·L⁻¹)。噻唑蓝(MTT)比色法检测各组细胞存活率;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测乳酸脱氢酶(LDH)释放率及细胞内活性氧自由基(ROS)的含量;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马 N-甲基-D-天冬氨酸受体亚单位 2B 蛋白(NR2B),环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB),磷酸化 CREB(p-CREB),细胞外调节蛋白激酶(ERK),磷酸化 ERK(p-ERK)的蛋白表达水平。结果:与正常组比较,模型组细胞存活率显著下降($P < 0.01$),乳酸脱氢酶(LDH)释放率明显增加($P < 0.05$),细胞内活性氧(ROS)水平明显增加($P < 0.05$),NR2B 蛋白的表达明显升高($P < 0.05$),CREB,p-CREB,ERK,p-ERK 蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,YJGZ 水提液组和尼莫地平组均能显著提高谷氨酸模型条件下 HT22 细胞的存活率($P < 0.01$),减少细胞损伤,减少 LDH 的释放率,降低细胞内 ROS 水平($P < 0.05$, $P < 0.01$),降低 NR2B 蛋白的表达水平($P < 0.05$),增加 CREB,p-CREB,ERK,p-ERK 蛋白的表达($P < 0.05$);YJGZ 含药血清组与模型组比较,HT22 细胞存活率并没有提高。结论:YJGZ 水提液对谷氨酸诱导的 HT22 细胞损伤具有显著的保护作用。

[关键词] 越鞠丸;甘麦大枣汤;海马神经元细胞系(HT22);谷氨酸;神经保护

[中图分类号] R289;R322.8;R246.6;R749.4+1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)12-0022-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190836

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190102.1026.003.html>

[网络出版时间] 2019-01-04 15:32

Neuroprotective Effect of Modified Yuejuwan and Ganmai Dazao Tang on Glutamate-induced HT22 Cell Injury Model

GE Ke-min, WANG Wei, XUE Wen-da, CHEN Gang, WANG Fu-shun*

(School of Medicine and Life Sciences, School of Psychology, School of
Basic Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the neuroprotective effect of modified Yuejuwan and Ganmai Dazao Tang (YJGZ) on glutamate-induced cell injury of mouse hippocampal neuron cell line (HT22). **Method:** The HT22 cell was cultured aseptically, and the cell injury model was established with high concentration of glutamate acid, YJGZ aqueous extract and drug-containing serum were prepared. Then experiment was divided into normal group, model group, YJGZ drug-containing serum groups (1%, 5%, 10%), YJGZ aqueous extract group (166 mg·L⁻¹), and nimodipine group (100 μmol·L⁻¹). Methylene thiazolye tetrazolium (MTT) was used to detect the cell survival rate of each group, the level of lactate dehydrogenase (LDH) release and intracellular reactive oxygen

[收稿日期] 20181023(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81603497);江苏省自然科学基金项目(BK20151565)

[第一作者] 葛渴敏,在读硕士,从事抑郁症中医研究,E-mail:1543803120@qq.com

[通信作者] *王福顺,博士,教授,从事神经生物学分子机制研究,E-mail:13814541138@163.com

species (ROS) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blot was used to detect the protein expression of hippocampal *N*-methyl-*D*-aspartate receptor subunit 2B protein (NR2B), cyclic adenosine response element binding protein (CREB), phosphorylated cyclic adenosine response element binding protein (p-CREB), extracellular regulated protein kinase (ERK), and phosphorylated extracellular regulated protein kinase (p-ERK). **Result:** As compared with normal group, the cell survival rate was significantly decreased in model group ($P < 0.01$), LDH release rate was significantly increased ($P < 0.05$), intracellular reactive oxygen species (ROS) level was increased ($P < 0.05$), expression of NR2B protein was increased ($P < 0.05$), and the protein expression levels of CREB, p-CREB, ERK and p-ERK were decreased ($P < 0.05$). As compared with model group, YJGZ aqueous extract group and nimodipine group can significantly improve the survival rate of HT22 cells under glutamate model conditions ($P < 0.01$), reduce cell damage, reduce LDH release rate and intracellular ROS levels ($P < 0.05$, $P < 0.01$), decrease the expression level of NR2B protein ($P < 0.05$), and increase the protein expression levels of CREB, p-CREB, ERK and p-ERK ($P < 0.05$). However, the survival rate of HT22 cells was not increased in the YJGZ-containing serum group as compared with model group. **Conclusion:** YJGZ aqueous extract has a significant protective effect on glutamate-induced HT22 cell injury.

[Key words] Yuejuwan; Ganmai Dazao Tang; hippocampal neuron cell line (HT22); glutamate; neuroprotection

抑郁症是一种常见的精神障碍疾病,严重危害人类的生命健康。在世界范围内抑郁症的蔓延可能导致数亿人需要接受治疗,而对于大约 2/3 的抑郁症患者来说,治疗却不能充分发挥作用^[1]。临床上几种治疗抑郁症的药物,如选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRIs),三环类抗抑郁药(TCAs)和单胺类药物选择性可逆抑制剂氧化酶 A(RIMAs)等,尽管这些药物在治疗抑郁症方面取得了重大进展,但也存在一定的副作用^[2]。近年来,越来越多的研究表明,天然中草药的多种成分具有抗抑郁作用,传统中药能够预防和治疗抑郁症,学者对中草药用于预防和治疗的兴趣也日益增加。

越鞠丸合甘麦大枣汤加减(YJGZ)是由越鞠丸和甘麦大枣汤加减而来。越鞠丸和甘麦大枣汤都具有抗抑郁作用,并得到众多临床研究证实^[3-6]。吴如燕等^[7-9]报道越鞠甘麦大枣汤能快速治疗产后抑郁症及抑郁子代的抑郁行为,并能改善小鼠海马蛋白激酶 B(Akt)和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的表达。谷氨酸是中枢神经系统(CNS)中重要的神经递质之一,对神经细胞兼有兴奋和毒性作用^[10],谷氨酸系统在抑郁症有关的生理和病理 2 个方面均发挥重要作用,有研究证实抑郁症患者的血浆和脑脊液中谷氨酸水平明显升高^[11],亦有研究报道谷氨酸相关基因变异与抑郁症关系密切^[12]。尼莫地平是一种 L 型钙通道拮抗剂,可以减少病理状态下过量的钙涌入,发挥其神经保护特性^[13]。本

实验通过研究 YJGZ 对谷氨酸诱导的小鼠海马神经元细胞系(HT22)细胞损伤模型的神经保护作用,探讨中药复方抗抑郁的相关机制,为其临床应用提供依据。

1 材料

1.1 细胞及药物 HT22 细胞系由南京中医药大学中药方剂重点实验室提供;YJGZ 由苍术 10 g,香附 10 g,神曲 10 g,栀子 10 g,川芎 10 g,炙甘草 12.5 g,淮小麦 25 g,大枣 37.5 g 组成,以上饮片均购自南京中医药大学国医堂门诊部,经南京中医药大学药学院杨连云教授鉴定为正品。

1.2 动物 SPF 级 ICR 小鼠 60 只,雄性,体质量 20 ~ 22 g,由南京市江宁区青龙山动物繁殖场提供,合格证号 SCXK(苏)2017-0001。动物饲养环境为恒温 25 ℃,湿度 45%,昼夜交替 12 h,动物自由进食饮水。动物操作均符合南京中医药大学动物伦理委员会规定。

1.3 材料 胎牛血清(FBS),胰蛋白酶(美国 Gibco 公司,批号分别为 10270-106,25200-056);高糖培养基(DMEM,美国 HyClone 公司,批号 SH30022.01);噻唑蓝(MTT),青霉素-链霉素(中国 Biosharp 公司,批号分别为 BL505A, M-2128);磷酸盐缓冲液(PBS)粉末,谷氨酸(美国 Solarbio 公司,批号分别为 P1010, G0010);二甲基亚砜(DMSO,上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号 D103272);乳酸脱氢酶(LDH),活性氧自由基(ROS)酶联免疫吸附测定

(ELISA)试剂盒(南京金益柏生物科技有限公司,批号分别为 3582,3287);兔抗小鼠 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体亚单位 2B 蛋白(NR2B),环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB),磷酸化 CREB(p-CREB),细胞外调节蛋白激酶(ERK),磷酸化 ERK(p-ERK),微管蛋白(tubulin)一抗,辣根过氧化物标记羊抗兔二抗(美国 CST 公司,批号分别为 4212,9197,9198,4370,5683,2148,7054)。

1.4 仪器 SC06AD-2 型恒温二氧化碳(CO₂)培养箱,CX31 型荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司);Multiskan FC 型全自动酶标比色仪(美国 Thermo Scientific 公司);SL 16R 型低温超速离心机,Nexpower 1000 型超纯水器,SW-CJ-2F 型双人双面超净台(苏州净化设备有限公司);TY-80S 型脱色摇床(普阳科学仪器研究所);Power Pac 型蛋白电泳系统,Mini Trans-blot 型转膜系统(美国 Bio-Rad 公司);2500 系列凝胶成像及分析系统(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 HT22 细胞复苏后用含有 10% 胎牛血清,1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基,于 5% CO₂ 37 °C 三气培养箱中培养,每 1~2 d 换液 1 次,细胞传至 5 代开始用于实验。

2.2 YJGZ 水提液的制备 YJGZ 由苍术 10 g,香附 10 g,神曲 10 g,栀子 10 g,川芎 10 g,炙甘草 12.5 g,淮小麦 25 g,大枣 37.5 g 组成。上述药物加 8 倍量水浸泡 0.5 h,煮沸后小火煎煮 1 h 后过滤,加 6 倍量水按同样方法煎煮过滤,将 2 次过滤得到的药液混合 65 °C 减压旋蒸浓缩,将药物浓缩至含生药浓度为 8.3 g·kg⁻¹,分装并与 -20 °C 冷冻保存^[14]。

2.3 YJGZ 含药血清的制备 称小鼠体质量并记录,将 YJGZ 水提液以 0.01 mL·g⁻¹ 灌胃给药(相当于每 1 g 小鼠给予 YJGZ 生药 0.083 g),根据李仪奎等^[15]对大量已知中药药动学的研究提出的中药血清药理研究的给药通法:每日 2 次,连续 3 d,在末次给药 1 h 后眼球取血。1 200 r·min⁻¹ 离心 10 min,取血清,于 56 °C 水浴锅内灭活 30 min,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后无菌分装并与 -20 °C 冰箱冷冻保存。

2.4 HT22 细胞谷氨酸模型建立 将谷氨酸溶于 PBS 中制备母液,用培养基稀释。取对数生长期的 HT22 细胞,以 1 × 10⁵ 个/mL 的密度用含有 5% 胎牛血清,1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基接种于 96 孔培养板,每孔 100 μL,置于 5% CO₂ 37 °C 的培养箱

中培养,在倒置显微镜下观察待细胞完全贴壁后,吸弃培养液,本实验设定谷氨酸浓度梯度为 5,10,15,20,30 mmol·L⁻¹,继续培养 24 h^[16],每组设 6 个复孔,正常组不含谷氨酸,其余条件相同。调零组不含谷氨酸,不接种细胞只含相同培养液,以消除培养基颜色对吸光度 *A* 的影响。实验重复 3 次,并确定对细胞生长的抑制率接近 50% 的最佳造模浓度。

2.5 YJGZ 水提液直接给药浓度的确定 将 YJGZ 母液(830 g·L⁻¹)分别稀释为 415,166,118.6,92.2 mg·L⁻¹ 与谷氨酸模型组共培养,MTT 比色法检测各组存活率。选取存活率在 80% 左右的 YJGZ 水提液作为后续实验的浓度,HT22 细胞存活率的计算方法同 2.4 项。

2.6 实验分组 本实验参阅文献[17]和[18]的用药原则,经过预实验后选择 1%,5%,10% 的含药血清进行实验。实验分为 7 组:正常组(不含谷氨酸的正常细胞组),模型组(15 mmol·L⁻¹ 谷氨酸),1%,5%,10% YJGZ 含药血清组(YJGZ 含药血清 + 15 mmol·L⁻¹ 谷氨酸),YJGZ 水提液组(166 mg·L⁻¹ YJGZ 水提液 + 15 mmol·L⁻¹ 谷氨酸),尼莫地平组(100 μmol·L⁻¹ 尼莫地平 + 15 mmol·L⁻¹ 谷氨酸)。

2.7 MTT 比色法检测细胞存活率 各组细胞均处理 24 h 后每孔加入 5 g·L⁻¹ MTT 20 μL 继续置于培养箱中孵育 4 h,然后吸弃上清液,每孔加入 DMSO 150 μL,置于摇床上慢摇 20 min 后,酶标仪 490 nm 处检测各孔 *A* 并计算各组细胞存活率,重复实验 3 次。

2.8 ELISA 检测 ROS 含量及 LDH 释放率 按试剂盒说明书测定实验各组细胞内 ROS 含量,并取各组神经元培养液上清,分别测定细胞内和上清中 LDH 含量,按以下公式计算 LDH 释放率。

$$\text{LDH 释放率} = \frac{\text{细胞上清中 LDH 含量}}{\text{总体 LDH 含量}} \times 100\%$$

2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定细胞内 NR2B,CREB,p-CREB,ERK,p-ERK 蛋白表达水平

将 HT22 细胞以 1 × 10⁶ 个/mL 接种于 6 孔板中,按照 2.6 项下方法,因 YJGZ 含药血清 1%,5%,10% 组与模型组比较细胞存活率均没有提高,故只将正常组,模型组,YJGZ 水提液组,尼莫地平组用不同浓度药物处理细胞 24 h 后,吸弃培养液,胰酶消化收集细胞,加 RIPA 裂解液裂解细胞并收集蛋白 BCA,测定各蛋白浓度,蛋白浓度稀释 5 倍,调整上样量后采用聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,敷抗体, NR2B, CREB, p-CREB, ERK, p-ERK, tubulin 一抗,

稀释倍数均为 1:1 000,二抗稀释倍数为 1:2 000,显色并曝光,最后用 Quantity One 软件进行数据分析。

2.10 统计学方法 所有数据均采用 SPSS 19.0 统计分析软件进行分析整理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较用 *t* 检验,多组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 谷氨酸对 HT22 细胞存活率的影响 与正常组比较,不同浓度谷氨酸组 HT22 细胞存活率均显著降低($P < 0.01$),谷氨酸 $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组作用 24 h 后细胞存活率接近 50%,故选择 $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酸作为后续实验的模型浓度。见表 1。

表 1 谷氨酸对 HT22 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effect of glutamate acid on survival rate of HT22 cells ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	存活率/%
正常	-	1
谷氨酸	5	$0.77 \pm 0.06^{1)}$
	10	$0.54 \pm 0.06^{1)}$
	15	$0.48 \pm 0.05^{1)}$
	20	$0.39 \pm 0.03^{1)}$
	30	$0.15 \pm 0.09^{1)}$

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 YJGZ 水提液对 HT22 细胞存活率的影响 与正常组比较,模型组 HT22 细胞存活率显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,YJGZ 水提液各质量浓度组 HT22 细胞存活率显著提高($P < 0.01$),且随着浓度的减少存活率呈现依次递减的趋势,故选择存活率在 80% 左右的 YJGZ 水提液 $166 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组作为后续实验的质量浓度。见表 2。

表 2 YJGZ 水提液对 HT22 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effect of aqueous extracts of YJGZ on survival rate of HT22 cells ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	存活率/%
正常	-	1
模型	-	$0.54 \pm 0.04^{1)}$
YJGZ 水提液	415	$0.91 \pm 0.07^{2)}$
	166	$0.70 \pm 0.06^{2)}$
	118.6	$0.65 \pm 0.06^{2)}$
	92.2	$0.62 \pm 0.06^{2)}$

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.3 YJGZ 水提液及含药血清对谷氨酸损伤的 HT22 细胞存活率的影响 与正常组比较,模型组细胞存活率显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,YJGZ 含药血清各组细胞存活率未见提高,YJGZ 水提液组和尼莫地平组细胞存活率均显著提高($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 YJGZ 水提液和含药血清对 HT22 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 3 Effect of the aqueous extracts and drug-containing serum of YJGZ on survival rate of HT22 cells ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	体积分数/%	存活率/%
正常	-	1
模型	-	$0.46 \pm 0.07^{1)}$
YJGZ 含药血清	1	0.38 ± 0.09
	5	0.32 ± 0.07
	10	0.35 ± 0.08
YJGZ 水提液	$166^{3)}$	$0.94 \pm 0.10^{2)}$
尼莫地平	$0.1^{4)}$	$1.08 \pm 0.2^{2)}$

注:³⁾表示单位为 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;⁴⁾表示单位为 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.4 YJGZ 水提液及含药血清对谷氨酸损伤 HT22 细胞中 ROS 含量和 LDH 释放率的影响 与正常组比较,模型组细胞内 ROS 含量和 LDH 释放率均明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,YJGZ 水提液各组与尼莫地平组细胞内 ROS 含量均明显减少($P < 0.05$),LDH 释放率均显著减少($P < 0.01$)。见表 4。

表 4 YJGZ 水提液和含药血清对 HT22 细胞中 ROS 和 LDH 释放率的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 4 Effect of aqueous extracts and drug-containing serum of YJGZ on release rate of ROS and LDH in HT22 cells ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	体积分数/%	ROS/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	LDH 释放率/%
正常	-	301.05 ± 18.56	0.12 ± 0.01
模型	-	$322.92 \pm 26.00^{1)}$	$0.13 \pm 0.02^{1)}$
YJGZ 含药血清	1	311.11 ± 28.33	$0.12 \pm 0.01^{2)}$
	5	300.44 ± 21.94	$0.11 \pm 0.01^{2)}$
	10	311.74 ± 46.43	$0.11 \pm 0.01^{2)}$
YJGZ 水提液	$166^{4)}$	$291.93 \pm 25.35^{2)}$	$0.12 \pm 0.01^{3)}$
尼莫地平	$0.1^{5)}$	$291.86 \pm 32.76^{2)}$	$0.11 \pm 0.01^{3)}$

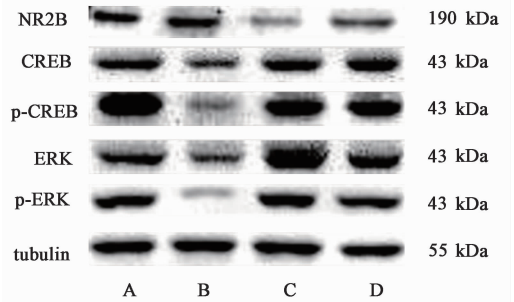
注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$;⁴⁾表示单位为 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;⁵⁾表示单位为 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.5 YJGZ 水提液和含药血清对 HT22 细胞 NR2B, CREB, p-CREB, ERK, p-ERK 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组细胞内 NR2B 蛋白表达明显升高($P < 0.05$),CREB, p-CREB, ERK, p-ERK 蛋白

表达明显下降 ($P < 0.05$); 与模型组比较, YJGZ 水提液组和尼莫地平组 NR2B 蛋白表达明显下降 ($P < 0.05$), CREB, p-CREB, ERK, p-ERK 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.05$)。见图 1, 表 5。

4 讨论

谷氨酸是 CNS 中主要的兴奋性神经递质, 通过作用于受体引发神经细胞兴奋性中毒和非受体介导的氧化应激, 从而诱导神经元细胞死亡, *N*-甲基-*D*-天冬氨酸 (NMDA) 型谷氨酸受体介导 CNS 神经元中的营养性和兴奋性毒性信号传导^[19]。HT22 细胞是一种永生化的小鼠海马细胞系, 是研究神经疾病, 如神经退行性疾病和抑郁症病理机制的理想细胞



A. 正常组; B. 模型组; C. YJGZ 水提液组; D. 尼莫地平组

图 1 NR2B, CREB, p-CREB, ERK, p-ERK 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of NR2B, CREB, p-CREB, ERK, p-ERK proteins

表 5 YJGZ 水提液对 NR2B, CREB, p-CREB, ERK, p-ERK 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 5 Effect of aqueous extracts of YJGZ on expression of NR2B, CREB, p-CREB, ERK, p-ERK proteins ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	NR2B/tubulin	CREB/tubulin	p-CREB/tubulin	ERB/tubulin	p-ERB/tubulin
模型	-	1.42 ± 0.32 ¹⁾	0.61 ± 0.14 ¹⁾	0.67 ± 0.17 ¹⁾	0.68 ± 0.08 ¹⁾	0.52 ± 0.25 ¹⁾
YJGZ 水提液	166 ³⁾	0.88 ± 0.26 ²⁾	0.99 ± 0.17 ²⁾	1.00 ± 0.13 ²⁾	1.04 ± 0.21 ²⁾	1.07 ± 0.26 ²⁾
尼莫地平	0.1	0.98 ± 0.32 ²⁾	0.96 ± 0.11 ²⁾	1.01 ± 0.16 ²⁾	1.00 ± 0.32 ²⁾	0.98 ± 0.18 ²⁾

注: 设定正常组各蛋白相对表达量为 1; 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$; ³⁾ 表示单位为 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

系, 来自缺乏功能性离子型谷氨酸受体的小鼠海马, 经常用于暴露于高浓度的谷氨酸环境中来形成氧化应激模型, 进行神经元细胞死亡的分析^[20]。ROS 是在众多生物过程进行调节的一个重要的信号分子, 细胞内 ROS 的过度累积可造成氧化应激, 破坏细胞的稳态, 导致线粒体功能障碍, 被广泛认为是衰老死亡的一个致病因素^[21]。LDH 是一种细胞质酶, 可迅速释放到细胞培养基中, 培养基中的 LDH 泄漏是检测细胞毒性的证据之一^[22]。

YJGZ 功用疏肝健脾, 养血安神, 能够调理心, 肝, 脾, 对肝脾郁滞, 对心神不宁的焦虑、抑郁等具有很好的临床疗效。据研究报道 NR2A 和 NR2B 在 CNS 中发挥不同的作用, NMDA 受体 (NMDAR) 是广泛分布于 CNS 的谷氨酸敏感离子通道受体, 它不仅通过调节钙离子内流, 保持神经元正常的生理功能, 而且与 CNS 的发育、学习和记忆功能密切相关, NR2B 亚单位在学习和记忆的形成等认知过程、痛觉信息的传递感受过程、神经损伤及一些神经退行性疾病的病理过程中发挥重要的作用, 研究发现, NR2B 与抑郁症的关系最为密切^[16]。NR2B 能够促进生存和死亡信号传导, 在病理生理条件下, 例如缺血和/或缺氧, 或神经变性, NR2B 亚基触发细胞破坏性途径, 额外突触 NR2B 持续激活, 导致兴奋性毒性^[23-24]。

本实验结果显示, 谷氨酸模型组能明显降低 HT22 细胞的存活率; 并增加模型组细胞内 ROS 的形成和 LDH 的释放率; 谷氨酸模型组细胞内 NR2B 被激活, CREB, p-CREB, ERK, p-ERK 蛋白表达下降。而在此基础上 YJGZ 水提液和尼莫地平组均能显著改善 HT22 细胞的存活率; 减少损伤细胞内 ROS 的形成和 LDH 的释放率; 降低 NR2B 蛋白的表达水平, 使 NMDAR 亲和力下降, 降低兴奋, 减少 Ca^{2+} 的内流, 保护神经细胞, 从而改善抑郁症状; 并升高 CREB, p-CREB, ERK, p-ERK 蛋白的表达水平。这些结果显示谷氨酸诱导的 HT22 细胞损伤能被 YJGZ 水提液和尼莫地平逆转, YJGZ 水提液对谷氨酸损伤的 HT22 细胞具有显著的保护作用, 其作用机制可能是通过逆转细胞内 ROS 的形成和 LDH 的释放率, 降低 NR2B 蛋白的表达并升高 CREB, p-CREB, ERK, p-ERK 蛋白的表达这一机制实现的。不同浓度的 YJGZ 含药血清组与模型组比较减少了 LDH 的释放率, 对各组细胞存活率均未见提高, 对细胞内 ROS 的含量也无影响。血清药理虽然能较为真实的反映药物在体内产生效应的过程, 但由于中药复方成分复杂, 其原有成分或转化为活性成分, 或代谢后失去活性, 或通过不同的作用机制间接起作用, 且多数含药血清中药物浓度并非随着给药剂量加大而增加, 导致血清中含药量并不能达到临床

给药剂量^[17],故 YJGZ 含药血清对 HT22 细胞谷氨酸模型的作用机制以及与 YJGZ 水提液作用机制的异同点有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Papakostas G I, Ionescu D F. Towards new mechanisms: an update on therapeutics for treatment-resistant major depressive disorder[J]. *Mol Psychiatry*, 2015, 20(10): 1142-1150.

[2] ZHANG H L, ZHOU Z L, CHEN Z M, et al. Ginsenoside Rg3 exerts anti-depressive effect on an NMDA-treated cell model and a chronic mild stress animal model[J]. *J Pharmacol Sci*, 2017, 134(1): 45-54.

[3] 任荔. PACAP 介导的越鞠丸快速起效抗抑郁机制及相关物质基础研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.

[4] 任荔, 吴颢昕, 陈刚. 越鞠丸抗抑郁研究进展[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2016, 22(10): 1429-1431.

[5] 谭赛, 黄世敬. 甘麦大枣汤抗抑郁研究[J]. *世界中医药*, 2017, 12(3): 712-715.

[6] 田景平, 温泽淮, 李艳, 等. 甘麦大枣汤治疗抑郁症疗效与安全性的系统评价[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(21): 202-207.

[7] 吴如燕. 产后抑郁子代行为的分子机制及越鞠甘麦大枣汤快速干预的实验研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.

[8] 吴如燕, 陆彩, 陶伟伟, 等. 越鞠甘麦大枣汤对抑郁子代小鼠海马 Akt 及 m-TOR 分子表达的影响[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(7): 1022-1026.

[9] 吴如燕, 张海楼, 薛文达, 等. 越鞠甘麦大枣汤快速治疗产后抑郁子代抑郁症的探索[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(6): 130-133.

[10] 何小燕, 陈建丽, 向欢, 等. 谷氨酸和皮质酮诱导的 PC12 抑郁症细胞模型差异性的¹H NMR 代谢组学研究[J]. *药学学报*, 2017, 52(2): 245-252.

[11] Murrrough J W, Abdallah C G, Mathew S J. Targeting glutamate signalling in depression: progress and prospects[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(7): 472-486.

[12] Smoller J W. The genetics of stress-related disorders: PTSD, depression and anxiety disorders [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2016, doi: 10.1038/npp.2015.266.

[13] HU M, LIU Z J, LV P, et al. Autophagy and Akt/CREB signalling play an important role in the neuroprotective effect of nimodipine in a rat model of vascular dementia [J]. *Behav Brain Res*, 2016, doi: 10.1016/j.

bbr. 2016. 11. 053.

[14] 夏宝妹. 越鞠甘麦大枣汤对产后抑郁模型小鼠的快速抗抑郁作用及机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.

[15] 李仪奎, 吴健宇. 血清药理实验中采血时间的通法方案[J]. *中国药理学通报*, 1999, 15(6): 569-570.

[16] LIU Y M, ZHAO N, LI C C, et al. Longistylone C acts antidepressant *in vivo* and neuroprotection *in vitro* against glutamate-induced cytotoxicity by regulating NMDAR/NR2B-ERK pathway in PC12 cells [J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e183702.

[17] 吴沅崑, 刘维, 赵文甲. 血清药理学方法对药理、药效学和新药研发的贡献[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(24): 3914-3920.

[18] 吴健宇, 穆静, 李仪奎. 血清药理学方法体外实验系统的血清添加量问题[J]. *上海中医药杂志*, 2001, doi: 10.16305/j.1007-1334.2001.09.003.

[19] YANG E J, Kim M, Woo J E, et al. The comparison of neuroprotective effects of isoliquiritigenin and its phase I metabolites against glutamate-induced HT22 cell death [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, doi: 10.1016/j.bmcl.2016.10.072.

[20] Bell K F S, Bent R J, Saira M T, et al. Calmodulin Kinase IV-dependent CREB activation is required for neuroprotection via NMDA receptor-PSD95 disruption [J]. *J Neurochem*, 2013, 126(2): 274-287.

[21] Clement A B, Gimpl G, Behl C. Oxidative stress resistance in hippocampal cells is associated with altered membrane fluidity and enhanced nonamyloidogenic cleavage of endogenous amyloid precursor protein [J]. *Free Radical Bio Med*, 2010, 48(9): 1236-1241.

[22] Akanda M R, Park B Y, et al. Neuroprotective effects of sigesbeckia pubescens extract on glutamate-induced oxidative stress in HT22 cells via downregulation of MAPK/Caspase-3 pathways [J]. *Cell Mol Neurobio*, 2018, 38(2): 497-505.

[23] 郭洋洋, 韩振蕴, 田丹枫, 等. 人参知母赤芍提取物对血管性痴呆大鼠海马神经元的保护作用及机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20190837.

[24] Vizi E S, Kisfali M, Lőrincz T. Role of nonsynaptic GluN2B-containing NMDA receptors in excitotoxicity: evidence that fluoxetine selectively inhibits these receptors and may have neuroprotective effects [J]. *Brain Res Bull*, 2013, doi: 10.1016/j.brainresbull.2012.10.005.

[责任编辑 孙丛丛]