

## 酸枣仁-合欢花对抑郁模型大鼠行为学及内质网应激 PERK/ATF4/CHOP通路的影响

曹智怡<sup>1</sup>, 李玲<sup>1</sup>, 范丽丽<sup>1</sup>, 王明杰<sup>2</sup>, 郭超峰<sup>1</sup>, 施学丽<sup>1\*</sup>

(1. 广西中医药大学, 南宁 530200; 2. 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023)

**[摘要]** **目的:**研究酸枣仁-合欢花对抑郁模型大鼠行为学及内质网应激蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)/活化的转录因子4(ATF4)/CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)通路的影响,并探讨其抗抑郁作用的机制。**方法:**将雄性SD大鼠按随机数字表法分为正常组,模型组,盐酸文拉法辛组(0.008 g·kg<sup>-1</sup>),酸枣仁-合欢花高、中、低剂量组(16, 8, 4 g·kg<sup>-1</sup>),每组15只。除正常组外,其余5组采用慢性不可预见性温和应激(CUMS)结合孤养的方式建立抑郁模型,造模的同时给予正常组和模型组大鼠等体积的蒸馏水灌胃,各给药组大鼠予相应剂量的药物灌胃,连续21 d。于实验的第1天和第21天进行旷场实验和糖水消耗实验观察各组大鼠行为学变化;采用透射电镜观察大鼠海马神经元超微结构变化;采用原位末端标记(TUNEL)法检测大鼠海马区神经元凋亡情况;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)技术检测大鼠海马组织PERK, CHOP, B淋巴细胞瘤-2相关X蛋白(Bax), 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白表达情况。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠旷场实验得分、糖水消耗率显著下降( $P<0.01$ );与模型组大鼠比较,酸枣仁-合欢花各剂量组及盐酸文拉法辛组大鼠旷场实验得分、糖水消耗率均显著升高( $P<0.01$ );透射电镜显示,与正常组比较,模型组大鼠海马区神经元损伤明显,与模型组比较,酸枣仁-合欢花各剂量组及盐酸文拉法辛组大鼠海马区神经元损伤减轻;TUNEL显示,与正常组比较,模型组大鼠海马区神经元凋亡数量增加( $P<0.01$ ),与模型组比较,酸枣仁-合欢花各剂量组及盐酸文拉法辛组大鼠海马区神经元凋亡数量减少( $P<0.01$ )。Western blot结果显示,与正常组大鼠比较,模型组大鼠海马PERK, CHOP, Bax, Caspase-3蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组大鼠比较,盐酸文拉法辛组和酸枣仁-合欢花各剂量组大鼠海马PERK, CHOP, Bax, Caspase-3蛋白表达水平均降低( $P<0.05, P<0.01$ )。**结论:**酸枣仁-合欢花可能通过调节内质网应激PERK/ATF4/CHOP通路而发挥抗抑郁作用。

**[关键词]** 酸枣仁-合欢花; 抑郁症; 内质网应激蛋白激酶R样内质网激酶(PERK); CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)07-0066-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210205

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20210121.1625.007.html>

[网络出版日期] 2021-1-22 8:13

### Effects of Ziziphi Spinosa Semen and Albiziae Flos on Behavior and Endoplasmic Reticulum Stress PERK/ATF4/CHOP Pathway in Depression Model Rats

CAO Zhi-yi<sup>1</sup>, LI Ling<sup>1</sup>, FAN Li-li<sup>1</sup>, WANG Ming-jie<sup>2</sup>, GUO Chao-feng<sup>1</sup>, SHI Xue-li<sup>1\*</sup>

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Ziziphi Spinosa Semen (ZSS) and Albiziae Flos (AF) on behavior and endoplasmic reticulum stress endoplasmic reticulum stress protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)/activated transcription factor 4 (ATF4)/CCAAT enhancer binding protein

[收稿日期] 20201117(008)

[基金项目] 广西省自然科学基金项目(2016JJA140739);广西一流学科建设开放课题(2019XK050);广西中医药大学岐黄工程高层次人才团队培育项目(2018001)

[第一作者] 曹智怡,在读硕士,从事中医药防治抑郁症的研究工作,E-mail:yi\_332810940@qq.com

[通信作者] \*施学丽,硕士,教授,从事中药新药药效评价工作,E-mail:575794426@qq.com

(CHOP) pathway in depression model rats, and to explore its antidepressant mechanism. **Method:** The male SD rats were divided into normal group, model group, ZSS-AF high dose, middle dose and low dose groups (16, 8, 4 g·kg<sup>-1</sup>) and Venlafaxine group (0.008 g·kg<sup>-1</sup>), *n*=15 in each group. Except the normal group, the depression model was established in the rats of other 5 groups by the method of chronic unpredictable mild stress (CUMS) combined with isolated feeding. The normal group and model group were given with distilled water by gavage when modeling, while other groups received corresponding drug by intragastric administration for 21 days. Behavior changes of rats in each group were observed by the open field test and sugar water consumption test on 1<sup>th</sup> and 21<sup>th</sup> day of the experiment. The protein expressions of PERK, CHOP, B-cell lymphoma-2 associated X protein (Bax) and cysteine-containing aspartate-specific proteases-3 (Caspase-3) were detected by Western blot (WB), the ultrastructural changes of the hippocampus were observed by transmission electron microscope, the apoptosis of hippocampal neurons was observed by terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL) method. **Result:** Compared with the normal group, the scores of open field test and sugar water consumption rate in model group rats decreased (*P*<0.01). Compared with the model group, the scores of open field test and water consumption rate increased (*P*<0.01) in ZSS-AF groups and Venlafaxine group. Transmission electron microscope showed that the changes of neuronal damage in hippocampal were revealed in the model group, whereas those neuronal damages were relieved in ZSS-AF groups and Venlafaxine group. TUNEL method showed that the number of apoptotic neurons in hippocampal increased in the model group (*P*<0.01), but decreased in ZSS-AF groups and Venlafaxine group (*P*<0.01). WB results showed that as compared with the normal group, protein expressions of PERK, CHOP, Bax and Caspase-3 were up-regulated significantly in the model group (*P*<0.01), whereas those were down-regulated in ZSS-AF groups and Venlafaxine group (*P*<0.05, *P*<0.01). **Conclusion:** The antidepressant effect of ZSS-AF herbal pair may be correlated with the regulation of endoplasmic reticulum stress PERK/ATF4/-CHOP pathway.

[**Key words**] Ziziphi Spinosae Semen (ZSS) and Albiziae Flos (AF); depression; protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK); CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP)

抑郁症是当今社会常见的精神疾病,以显著且持久的情绪低落为主要临床症状,患者常伴有反应迟钝、注意力分散、记忆力下降、食欲减退、睡眠质量不佳等表现。根据世界卫生组织2017年数据显示,全球大约有3亿人患有抑郁症,患病率为4.4%<sup>[1]</sup>。截至2019年中国精神卫生调查(CMHS)数据显示,我国大约有超过9500万的抑郁症患者,抑郁症的终身患病率为6.9%<sup>[2]</sup>。每年因抑郁症而产生自杀行为的患者不计其数,抑郁症发病率的逐年升高,也给患者家庭和社会带来了不同程度的危害。当前临床中使用的抗抑郁西药有很多,包括环类抗抑郁药,选择性5-羟色胺(5-HT)再摄取抑制剂,5-HT及去甲肾上腺素再摄取抑制剂、单胺氧化酶抑制剂等,但上述抗抑郁西药大多存在着不良反应多、药效起效时间长、价格昂贵等缺点。因此,寻找不良反应小、疗效佳、适宜长期服用、价格惠民的天然、中药复方(含对药)抗抑郁药物成为了抗抑郁症的研究重点之一。抑郁症的发生与应激关系密切,而海马则是大脑对相关应激做出反应的重要组

成部分之一,海马在长时间的应激下会导致体积降低、神经细胞凋亡、丢失等<sup>[3]</sup>。近年来研究发现内质网(ER)通路能够独立诱导细胞凋亡,该途径的核心内容是内质网应激(ERS)。适度的ERS可提高ER处理未折叠蛋白反应(UPR)的能力,维持细胞的正常功能并使之存活;但应激时间过长、程度过强导致损伤太过严重时,细胞内环境不能及时修复,最终将诱导细胞凋亡。相关实验证实慢性轻度应激所致抑郁模型大鼠海马出现了ERS反应<sup>[4]</sup>,且抑郁症发生时对抗ERS的保护性应答UPR被激活<sup>[5]</sup>。

课题组前期实验研究发现酸枣仁-合欢花能够改善抑郁模型大鼠的抑郁症状,具有抗抑郁功效<sup>[6-8]</sup>。本次实验采用慢性不可预见性温和应激(CUMS)结合孤养方法建立抑郁大鼠模型,通过观察酸枣仁-合欢花对抑郁大鼠海马神经元凋亡情况及内质网应激蛋白激酶R样内质网激酶(PERK),CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP),B淋巴细胞瘤-2相关X蛋白(Bax),半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)蛋白表达的影响,旨在从

PERK/活化的转录因子4(ATF4)/CHOP通路探讨酸枣仁-合欢花的抗抑郁作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级雄性SD大鼠120只,2月龄,体重180~200 g,自湖南斯莱克景达实验动物有限公司购入,合格证号SCXK(湘)2019-0014。本研究获得广西中医药大学实验动物福利伦理委员会批准(批准号DW20191028-75)。

**1.2 药物及试剂** 炒酸枣仁、合欢花(广西仙荣中药科技有限公司,批号分别为20190701,20180801),经广西中医药大学中药鉴定室滕建北副教授鉴定酸枣仁为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* 的成熟种子,合欢花为豆科植物合欢 *Albizia julibrissin* 的花序,经由广西中医药大学药剂室制成浸膏干粉:炒酸枣仁、合欢花各500 g,按1:1比例混合均匀,固液比1:12,用水回流提取,经旋转蒸发仪真空浓缩后冷冻,放置干燥机冻成干粉。临床上酸枣仁、合欢花用量各30 g,酸枣仁-合欢花各组给药剂量按成人临床剂量的8倍折算(经预实验得出)。用时将酸枣仁-合欢花浸膏干粉(按4:2:1比例)分别配成生药含量1.6,0.8,0.4 g·mL<sup>-1</sup>的悬浊液(相当于酸枣仁-合欢花生药量16,8,4 g·kg<sup>-1</sup>)。盐酸文拉法辛缓释片(成都康弘药业集团股份有限公司,批号190507);原位末端标记法(TUNEL)检测试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号XZ203305);PERK, CHOP, Bax, 兔抗Caspase-3多克隆抗体, $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(北京博奥森公司,批号分别为bs-2469R,bs-20669R,bs-0127R,bs-0081R,bs-0061R);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(英国Abcam公司,批号ab6721)。

**1.3 仪器** BW-OF302型旷场实验视频分析系统(上海软隆科技发展有限公司);Tecna G<sup>2</sup>20 TWIN型透射电子显微镜(美国FEI公司);EM UC7型超薄切片机(德国Leica公司);FilterMax F3型多功能酶标仪(美国MD公司);Tanon 5200型凝胶成像系统(上海天能科技发展有限公司);5418R型低温离心机(德国Eppendorf公司);PowerPac Basic电泳仪,Mini Trans-blot Cell型蛋白转印模块(湿转)(美国Bio-Rad公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组及给药** 120只大鼠适应环境喂养1周,行旷场实验<sup>[9]</sup>,剔除3 min内总分低于30分或高于120分的大鼠。取90只大鼠,按照随机数字表

分为6组,每组15只,分别为正常组、模型组、酸枣仁-合欢花高、中、低(16,8,4 g·kg<sup>-1</sup>)剂量组、盐酸文拉法辛组(0.008 g·kg<sup>-1</sup>)。造模同时按10 mL·kg<sup>-1</sup>体重灌胃给药,每日1次,连续21 d,正常组和模型组灌胃等量蒸馏水。

**2.2 CUMS模型建立** 正常组普通喂养,不给予任何刺激。其他组孤养,并结合参考文献[10]制备CUMS抑郁模型。具体应激方式包括24 h禁水,24 h进食,冰水游泳5 min(4℃),烘箱热烘5 min(45℃),通宵照明,高速水平震荡3 min,动脉夹夹尾1 min,空中悬尾1 min,100 V电击足底1 min等9种,在21 d内随机安排,每天选用1种应激方式,同1种应激方式不能连续出现,持续21 d。

**2.3 旷场实验** 应用BW-OF302旷场实验视频分析系统,在实验的第1天和第21天进行行为学测试。实验用敞箱为黑色无盖方箱,在系统中用方格将敞箱底部平均分为九个象限,每个象限均为大小相同的方格。实验过程中保持环境安静,敞箱周围参照物不变。将单只大鼠置于正中心的方格内,开始记录大鼠3 min内的动作行为表现,以大鼠身体50%以上进入一个方格记为水平运动得1分,以大鼠双前肢离开箱底格子作为直立次数得1分。每只大鼠测试完后需用75%乙醇清理干净敞箱并干燥后再进行下一只大鼠的检测。

**2.4 糖水消耗实验<sup>[11]</sup>** 在实验的第1天和第21天进行测试。测试前3 d训练大鼠含糖饮水,每个鼠笼同时放置2个水瓶。训练第1天,2个水瓶均装1%蔗糖水;训练第2天,1瓶装纯水,1瓶装1%蔗糖水;训练第3天,禁食禁水24 h;第4天,测试,给每只大鼠1瓶1%蔗糖水和1瓶纯水,称质量后同时放置于鼠笼处,1 h后取出2瓶水再次称质量,计算糖水偏爱值。糖水偏爱值=1%蔗糖水消耗量/(1%蔗糖水消耗量+纯水消耗量)×100%。

**2.5 透射电镜检测** 行为学测试结束后,每组随机选取5只大鼠,切取大鼠海马组织(1 mm×1 mm×1 mm),4%戊二醛和1%锇酸4℃固定2 h,梯度丙酮逐级脱水,环氧树脂包埋,烤箱68℃固化48 h,乙酸铀及枸橼酸铅染色,透射电镜观察并拍照。

**2.6 TUNEL检测细胞凋亡** 行为学测试结束后,每组随机选取5只大鼠,取海马组织切片后进行脱蜡,乙醇脱水,使用蛋白酶K进行处理,磷酸盐缓冲液(PBS)溶液洗涤2次,滴入TUNEL反应液及复合液,DAB染色显色,细胞核呈棕黄色为阳性细胞,即凋亡细胞。每张切片选取5个视野平均值作为该大

鼠海马区神经元凋亡细胞数, 细胞凋亡率=凋亡细胞数/(凋亡细胞数+正常细胞数)×100%。

**2.7 蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测 PERK, CHOP, Bax, Caspase-3 蛋白表达** 行为学测试结束后, 每组随机选取5只大鼠, 以10%水合氯醛腹腔麻醉大鼠, 断头取脑, 置于冰盘上分离海马组织, 眼科剪剪碎样品(冰上操作), 对组织进行研磨, 加入蛋白裂解液震荡混匀, 12 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min(离心半径13.5 cm), BCA蛋白浓度测定试剂盒操作定量。取相同量的样品, 进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE), 转移至PVDF膜, 封闭3 h。分别加入一抗(1:2 000), 4℃孵育12 h, TBST洗膜15 min, 重复3次, 加入二抗(1:4 000), 37℃孵育1 h, TBST洗膜15 min, 重复3次。加入ECL化学发光试剂显色, 数码相机图像处理系统拍照和统计分析。

**2.8 统计学处理** 采用SPSS 21.0软件包进行数据

统计, 实验数值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 数据齐两两比较采用LSD检验, 数据不齐用Dunnett's *t*检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 对 CUMS 大鼠行为学的影响

**3.1.1 对 CUMS 大鼠旷场实验的影响** 实验第1天各组大鼠3 min内水平运动和直立次数得分均差异无统计学意义。实验第21天, 与正常组大鼠比较, 模型组大鼠水平运动和直立次数得分显著降低( $P < 0.01$ ), 差异有显著统计学意义; 与模型组大鼠比较, 盐酸文拉法辛组和酸枣仁-合欢花各剂量组大鼠水平运动和直立次数得分均显著升高( $P < 0.01$ ), 尤其是盐酸文拉法辛组、酸枣仁-合欢花中剂量组可显著升高大鼠水平运动和直立次数得分( $P < 0.01$ ), 差异有显著统计学意义。见表1。

表1 酸枣仁-合欢花对 CUMS 大鼠旷场行为学得分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=15$ )

Table 1 Effect of Ziziphi Spinosae Semen and Albiziae Flos on open-field behavior scores of CUMS rats ( $\bar{x} \pm s, n=15$ ) 分

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	水平运动		直立次数	
		第1天	第21天	第0天	第21天
正常		77.80±5.60	74.07±2.25	22.53±1.73	22.07±1.83
模型		77.27±4.23	32.80±2.34 <sup>1)</sup>	22.40±2.50	8.87±1.81 <sup>1)</sup>
盐酸文拉法辛	0.008	76.13±5.18	62.80±2.91 <sup>2)</sup>	22.13±2.42	18.07±1.83 <sup>2)</sup>
酸枣仁-合欢花	16	76.07±4.06	45.27±3.35 <sup>2)</sup>	22.07±2.28	14.73±2.71 <sup>2)</sup>
	8	75.27±4.60	58.33±2.35 <sup>2)</sup>	20.87±2.80	17.53±2.34 <sup>2)</sup>
	4	78.53±4.10	45.67±3.96 <sup>2)</sup>	21.47±2.45	13.60±2.50 <sup>2)</sup>

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

**3.1.2 对 CUMS 大鼠糖水消耗率的影响** 实验第1天, 各组大鼠糖水消耗率差异无统计学意义。实验第21天, 与正常组大鼠比较, 模型组大鼠糖水消耗率显著下降( $P < 0.01$ ); 与模型组大鼠比较, 盐酸文拉法辛组及酸枣仁-合欢花各剂量组大鼠糖水消耗率均显著升高( $P < 0.01$ ), 尤其是盐酸文拉法辛、酸枣仁-合欢花中剂量组显著提高大鼠糖水消耗率( $P < 0.01$ )。见表2。

#### 3.2 对 CUMS 大鼠海马区神经元超微结构的影响

透射电镜下显示, 与正常组比较, 模型组大鼠海马区神经元细胞核明显固缩变性, 线粒体数量明显减少, 可见部分线粒体明显肿胀, 线粒体嵴断裂, 内质网水肿性扩张。酸枣仁-合欢花各剂量组及盐酸文拉法辛组可改善海马神经元的损伤, 表现为神经元细胞核形态规则, 核及核孔清晰, 线粒体嵴清晰,

表2 酸枣仁-合欢花对 CUMS 大鼠糖水消耗的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=15$ )

Table 2 Effect of Ziziphi Spinosae Semen and Albiziae Flos on sugar water preference scores of CUMS rats ( $\bar{x} \pm s, n=15$ ) %

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	实验第1天	实验第21天
正常		81.27±2.31	80.27±1.98
模型		79.47±2.42	52.67±1.95 <sup>1)</sup>
盐酸文拉法辛	0.008	80.40±2.26	76.93±2.74 <sup>2)</sup>
酸枣仁-合欢花	16	80.53±1.89	72.87±2.03 <sup>2)</sup>
	8	81.33±2.23	77.47±2.75 <sup>2)</sup>
	4	80.33±1.95	74.53±2.10 <sup>2)</sup>

内质网、高尔基体等细胞器数量适中。见图1。

**3.3 对 CUMS 大鼠海马区神经元凋亡的影响** 光镜下显示, TUNEL染色阳性细胞胞核呈棕黄色, 非凋亡细胞呈蓝色。与正常组比较, 模型组大鼠海马区神经元凋亡细胞数量显著增加( $P < 0.01$ ); 与模型

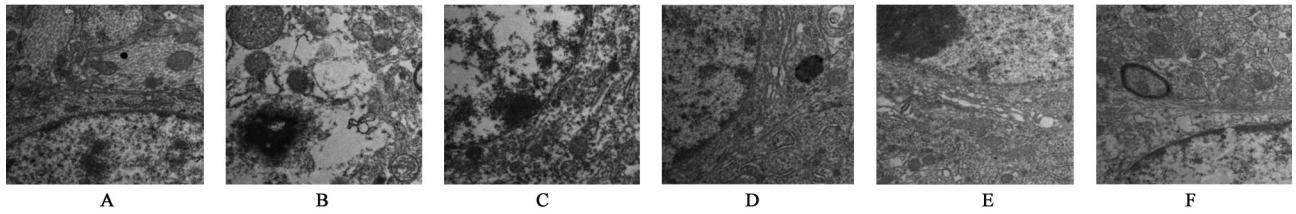


图1 酸枣仁-合欢花对CUMS大鼠海马区神经元超微结构的影响(透射电镜,×5 000)

Fig. 1 Effect of Ziziphi Spinosae Semen and Albiziae Flos on electron microscopy in hippocampus area in CUMS rats (SEM, ×5 000)

组比较,盐酸文拉法辛组和酸枣仁-合欢花各剂量组可显著降低大鼠海马区神经元凋亡细胞数,差异有显著统计学意义( $P<0.01$ ),尤其是盐酸文拉法辛组、

酸枣仁-合欢花中剂量组显著降低大鼠海马区细胞凋亡数,差异有显著统计学意义( $P<0.01$ )。见图2,表3。

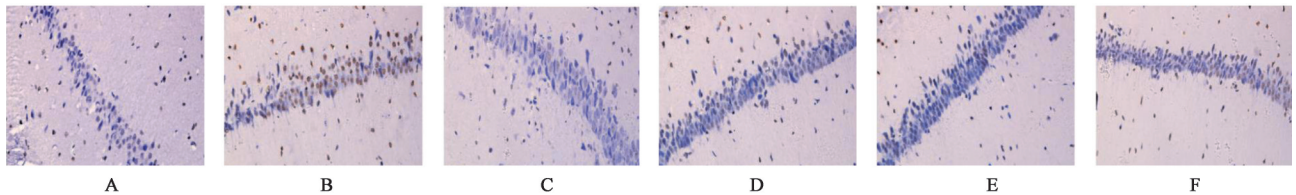


图2 酸枣仁-合欢花对CUMS大鼠海马区神经元凋亡的影响(TUNEL,×400)

Fig. 2 Effect of Ziziphi Spinosae Semen and Albiziae Flos on neuronal apoptosis in hippocampus area in CUMS rat (TUNEL,×400)

表3 酸枣仁-合欢花对CUMS大鼠海马区神经元凋亡的影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 3 Effect of Ziziphi Spinosae Semen and Albiziae Flos on neuronal apoptosis in hippocampus area in CUMS rats ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	细胞凋亡数/个(×100)
正常		0.84±0.09
模型		5.59±0.12 <sup>1)</sup>
盐酸文拉法辛	0.008	2.41±0.18 <sup>2)</sup>
酸枣仁-合欢花	16	3.38±0.23 <sup>2)</sup>
	8	2.56±0.12 <sup>2)</sup>
	4	3.64±0.15 <sup>2)</sup>

### 3.4 对CUMS大鼠海马组织PERK, CHOP, Bax, Caspase-3蛋白表达的影响 经21 d慢性温和

CUMS后,与正常组大鼠比较,模型组大鼠海马PERK, CHOP, Bax, Caspase-3蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组大鼠比较,盐酸文拉法辛组和酸枣仁-合欢花各剂量组明显降低大鼠海马PERK, CHOP, Bax, Caspase-3蛋白表达水平( $P<0.05, P<0.01$ ),尤其是酸枣仁-合欢花中剂量组显著降低大鼠海马PERK, CHOP, Bax, Caspase-3蛋白表达水平( $P<0.01$ )。见表4,图3。

### 4 讨论

酸枣仁是鼠李科灌木植物酸枣的干燥成熟种子,其性平、味酸甘,归肝、胆、心、脾经,具有宁心安神、疏肝理气、敛汗生津的功效。现代药理研究发现:酸枣仁可镇静、催眠、抗氧化、抗焦虑抑郁、改善记忆等,在临床上广泛用于治疗失眠、抑郁等精神

表4 酸枣仁-合欢花对CUMS大鼠模型海马组织PERK, CHOP, Caspase-3, Bax蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 4 Effect of Ziziphi Spinosae Semen and Albiziae Flos on expression of PERK, CHOP, Caspase-3 and Bax protein in CUMS rats ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	PERK/ $\beta$ -actin	CHOP/ $\beta$ -actin	Caspase-3/ $\beta$ -actin	Bax/ $\beta$ -actin
正常		0.52±0.02	0.63±0.01	0.47±0.01	0.63±0.00
模型		0.95±0.01 <sup>1)</sup>	1.00±0.02 <sup>1)</sup>	1.18±0.01 <sup>1)</sup>	1.36±0.03 <sup>1)</sup>
盐酸文拉法辛	0.008	0.62±0.00 <sup>3)</sup>	0.70±0.03 <sup>3)</sup>	0.80±0.05 <sup>3)</sup>	0.89±0.04 <sup>3)</sup>
酸枣仁-合欢花	16	0.67±0.03 <sup>3)</sup>	0.67±0.02 <sup>3)</sup>	0.82±0.04 <sup>3)</sup>	0.86±0.05 <sup>3)</sup>
	8	0.57±0.03 <sup>3)</sup>	0.60±0.01 <sup>3)</sup>	0.66±0.02 <sup>3)</sup>	0.79±0.01 <sup>3)</sup>
	4	0.78±0.03 <sup>3)</sup>	0.86±0.04 <sup>3)</sup>	1.12±0.02 <sup>2)</sup>	1.17±0.04 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ ,<sup>3)</sup> $P<0.01$ 。

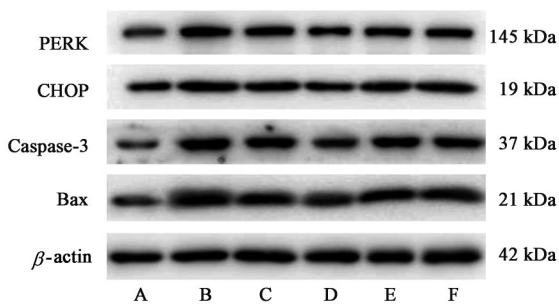


图3 各组大鼠海马组织 PERK, CHOP, Bax, Caspase-3 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of PERK, CHOP, Bax and Caspase-3 protein expression in each group rat

类疾病<sup>[12-13]</sup>。赵启铎等<sup>[14]</sup>研究发现酸枣仁总黄酮具有较明显的抗抑郁作用。合欢花为豆科植物合欢的花序,其性平、味甘,归心脾经,具有解郁、安神、理气、和胃的功效。近期研究发现合欢花能够有效改善抑郁大鼠学习记忆能力<sup>[15]</sup>。酸枣仁-合欢花记载于《名医验药对》,是各医家临床用药经验总结。酸枣仁酸甘收敛心阴使心神安宁;合欢花甘苦能解肝郁使情绪愉悦,二者合用,疗效确切<sup>[16]</sup>。本实验采用 CUMS 方法建立抑郁大鼠模型,模拟人类长期、慢性应激所表现出的抑郁核心症状,如快感缺失等,该模型的抑郁行为可持续几个月,具有高度有效性。通过旷场实验和糖水消耗实验发现,酸枣仁-合欢花可改善大鼠抑郁样行为,提示酸枣仁-合欢花具有一定的抗抑郁作用。

ERS 可进而诱发未折叠蛋白反应(UPR),UPR 是细胞的一种自我保护性反应,能激活 PERK 等促细胞存活通路,使 ER 折叠能力增强,以达到细胞修复和维稳的目的<sup>[17]</sup>。但强烈的 ERS 可使 PERK/ATF4/CHOP 通路被激活,诱导细胞凋亡。

PERK 具有丝/苏氨酸蛋白激酶活性,当 ERS 产生时,其可将真核起始因子 2 $\alpha$ (eIF2 $\alpha$ )的第 51 位丝氨酸磷酸化。一方面,磷酸化的 eIF2 $\alpha$  可阻止蛋氨酸-RNA 与核糖体的结合,从而抑制目标蛋白质的起始翻译<sup>[18]</sup>。蛋白质的合成减缓,减轻了 ER 的蛋白质合成负荷。已有实验研究表明,在神经元中注射入 PERK 选择性抑制剂 U0126 可以加重其死亡<sup>[19]</sup>。由此可推测 PERK 在保护神经元中起到一定的作用。另一方面,磷酸化的 eIF2 $\alpha$  可促进 ATF4 中 mRNA 的选择性翻译,进而上调 CHOP,可诱导细胞的凋亡和自噬。研究发现内质网应激 UPR 信号通路 PERK/ATF4/CHOP 参与了饱和脂肪酸所诱导的肝细胞脂毒性凋亡<sup>[20]</sup>。总之,在 ERS 状态下,PERK 既能够诱导 CHOP 的表达,又能够抑制蛋白质的翻

译,使细胞凋亡。适度的 ERS 可以保护细胞器,而持续严重的 ERS 可导致细胞凋亡。

CHOP 是 C/EBP 转录因子家族成员之一,是 ERS 特异性的转录因子,在正常情况下其表达量很低,但在 ERS 时,CHOP 的表达量会过多的累积于细胞核内,并通过下调抗凋亡基因 Bcl-2,上调促凋亡基因 Bax 等凋亡反应蛋白,促进细胞凋亡<sup>[21]</sup>。根据已知研究显示,PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4 是 CHOP 蛋白表达所必须的途径<sup>[22]</sup>。Caspase-3 作为细胞凋亡级联的关键酶,是细胞凋亡级联的核心,Caspase-3 酶的水解活性超细蛋白作用可直接诱导细胞凋亡<sup>[23]</sup>。

本实验通过行为学检测发现酸枣仁-合欢花可以改善大鼠抑郁样行为。Western blot 检测发现,模型组大鼠海马 PERK, CHOP, Bax, Caspase-3 蛋白表达水平上升,说明持续的慢性应激可诱导 PERK, CHOP, Bax, Caspase-3 的高表达,而酸枣仁-合欢花中剂量组降低抑郁模型大鼠海马 PERK, CHOP, Bax, Caspase-3 蛋白表达水平较明显。透射电镜观察下发现模型组大鼠海马神经元细胞核明显固缩变性,线粒体数量下降,部分线粒体明显肿胀,内质网呈水肿性扩张。酸枣仁-合欢花各剂量组大鼠海马神经元细胞核形态较规则,核孔清晰,高尔基体及内质网数量适中,大部分形态正常。故认为在应激状态下,抑郁模型大鼠海马神经元超微结构遭到损害,而酸枣仁-合欢花各剂量组可在不同程度上减轻慢性应激所造成的抑郁模型大鼠海马细胞超微结构的损害。TUNEL 实验结果发现,模型组大鼠海马神经元凋亡数量增加,说明持续应激可使大鼠海马区神经细胞凋亡。酸枣仁-合欢花各剂量组大鼠海马区神经细胞凋亡细胞数量减少,说明酸枣仁-合欢花可拮抗大鼠海马区神经细胞凋亡。

通过研究抑郁症发生时 ER 中相关关键应激因子的变化,以及酸枣仁-合欢花基于 PERK/ATF4/CHOP 途径的抗抑郁机制,证实 ERS 在抑郁症的发生中起到重要作用,而酸枣仁-合欢花组能够改善抑郁模型大鼠的抑郁症状,其作用机制可能与激活 PERK/ATF4/CHOP 通路中的相关因子表达有关。

#### [参考文献]

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Depression and other common mental disorder global health estimate* [M]. Geneva: World Health Organization, 2017: 7-9.
- [2] HUANG Y Q, WANG Y, WANG H, et al. Prevalence

- of mental disorders in China: a cross-sectional epidemiological study [J]. *Lancet Psychiatry*, 2019, 6 (3):211-224.
- [ 3 ] DRANOVSKY A, LEONARDO E D. Is there a role for young hippocampal neurons in adaptation to stress [J]. *Behav Brain Res*, 2012, 227:371-375.
- [ 4 ] TAN H Y, ZOU W, JIANG J M, et al. Disturbance of hippocampal H2S generation contributes to CUMS-induced depression-like behavior: involvement in endoplasmic reticulum stress of hippocampus [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2015, 47:285-291.
- [ 5 ] MACHADO-VIEIRA R, DIAZGRANADOS N, et al. New therapeutic targets for mood disorders [J]. *Sci World J*, 2010, 10:713-726.
- [ 6 ] 施学丽, 曹智怡, 马晓聪, 等. 对药酸枣仁-合欢花对抑郁模型大鼠行为学及皮质ERK-CREB细胞信号转导通路的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2020, 31 (1):8-14.
- [ 7 ] 施学丽, 曹智怡, 杜晓娜, 等. 对药酸枣仁-合欢花对抑郁模型大鼠学习记忆能力及BDNF-MEK-ERK-CREB细胞信号转导通路的影响 [J]. *神经解剖学杂志*, 2019, 35(6):617-622.
- [ 8 ] 施学丽, 杜晓娜, 郭超峰, 等. 不同剂量对药酸枣仁-合欢花对抑郁模型大鼠体质量及行为学指标的影响 [J]. *广西医学*, 2018, 40(22):2702-2705.
- [ 9 ] 贾宝辉, 李志刚, 卢峻, 等. 电针抗抑郁研究的模型探讨 [J]. *针刺研究*, 2005, 30(1):22-25.
- [ 10 ] 周敏, 王晓斌. 慢性不可预轻度应激抑郁症动物模型研究进展 [J]. *泸州医学院学报*, 2013, 36 (6) : 651-654.
- [ 11 ] WILLNER P, TOWELL A, SAMPSON D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its resorption by a tricyclic antidepressant [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1987, 93(3):358.
- [ 12 ] 杨楠, 叶晓川. 酸枣仁汤的神经药理作用及分子机制研究进展 [J]. *湖北中医药大学学报*, 2017, 19(3) : 114-117.
- [ 13 ] 熊庭旺, 吴芹, 刘杰, 等. 基于神经递质途径抗焦虑中药及其复方研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45 (1):14-19.
- [ 14 ] 赵启铎, 舒乐新, 王颖, 等. 酸枣仁总黄酮抗抑郁作用的实验研究 [J]. *北华大学学报:自然科学版*, 2015, 16(5):617-620.
- [ 15 ] 李旻. 合欢花改善抑郁大鼠学习记忆能力的实验研究 [J]. *中医临床研究*, 2017, 9(22):27-28.
- [ 16 ] 施学丽, 杜晓娜, 刘强, 等. 对药酸枣仁-合欢花对抑郁模型大鼠海马CA3区神经元凋亡GRP78蛋白表达的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30 (2) : 162-167.
- [ 17 ] NYBERG W A, ESPINOSA A. Imiquimod induces ER stress and Ca<sup>2+</sup> influx independently of TLR7 and TLR8 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 473 (4) : 789-794.
- [ 18 ] FELS D R, KOUMENIS C. The PERK/eIF2alpha/ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth [J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5 (7) : 723-728.
- [ 19 ] DAVIDE F, PIETRO G, STEPHEN D S. MEK inhibition exacerbates ischemic calcium imbalance and neuronal cell death in rat cortical cultures [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 553:18-27.
- [ 20 ] 曹洁, 姚隆. PERK/ATF4/CHOP信号通路在饱和脂肪酸诱导肝细胞脂毒性凋亡中的作用 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2017, 30(8):811-818.
- [ 21 ] WANG X Y, MA Z C, SHAO S, et al. Radio protective effect of adenine on irradiation-induced apoptosis [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11:139-144.
- [ 22 ] CILIEBORG M S, BOYE M, SANGILD P T. Bacterial colonization and gut development in preterm neonates [J]. *Early Hum Dev*, 2012, 88(1):S41-S49.
- [ 23 ] HUANG X, MAO Y S, LI C, et al. Venlafaxine inhibits apoptosis of hippocampal neurons by up-regulating brain-derived neurotrophic factor in a rat depression model [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7 (8) : 4577-4586.

[责任编辑 周冰冰]