

荷梗对慢性应激小鼠的抗抑郁作用及其对 TPH2 和 β CaMKII 表达的影响

张延红¹, 曹亚飞¹, 赵亚男², 平 鑫³, 张少丹^{4*}, 裴 林^{4*}

(1. 河北中医学院, 河北 石家庄 050031; 2. 华北理工大学中医学院, 河北 唐山 063000; 3. 河北大学中医学院, 河北 保定 071051; 4. 河北省中医药科学院, 河北省浊毒证重点实验室, 河北 石家庄 050031)

摘要: 目的 观察荷梗对慢性应激小鼠的行为学变化及其对 TPH2 和 β CaMKII 表达的影响。方法 40 只 ICR 小鼠随机分为正常组、模型组、氟西汀组及荷梗高、低剂量组 (0.4、0.2 g/kg), 通过慢性不可预见性温和刺激建立抑郁症模型, 检测糖水偏爱分数、强迫游泳及旷场实验观察小鼠行为学变化, 通过免疫组化法检测中缝背核 TPH2 和外侧缰核 β CaMKII 的表达。结果 与模型组比较, 荷梗高剂量组和氟西汀组小鼠糖水偏爱分数增加 ($P<0.01$), 荷梗高、低剂量组强迫游泳不动时间减少 ($P<0.05$), 强迫游泳潜伏期增长 ($P<0.05$, $P<0.01$); 小鼠在中央区累计行走距离及在中央区停留时间增长, 反复进入中央区的次数增多 ($P<0.05$, $P<0.01$); 脑内 TPH2 的免疫阳性细胞数增多, β CaMKII 的免疫阳性细胞数减少 ($P<0.01$)。结论 荷梗可改善抑郁症模型小鼠行为, 可能与下调脑内 β CaMKII 的表达、提高 TPH2 的表达有关。

关键词: 荷梗; 抑郁症; TPH2; β CaMKII; 慢性不可预见性温和刺激

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2020)10-2748-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.10.040

抑郁症是一种常见的慢性精神障碍性疾病, 严重影响人的思维、情绪和身体健康^[1]。据世界卫生组织 (WHO) 预测到 2030 年全球将有 3.5 亿人罹患抑郁症, 且抑郁症在各个年龄段均可患病, 其特点是情绪低落, 缺乏活力, 睡眠障碍, 并在一定程度上伴有生活或工作能力的下降^[2]。然而, 到目前为止抑郁症的临床用药并没有得到令人满意的效果^[3]。

荷梗属于睡莲科莲亚科植物睡莲的叶柄及花柄, 又称藕杆、莲蓬杆、荷叶梗, 味苦, 性平, 入脾、膀胱经, 功效通气宽胸、和胃安胎, 主治外感暑湿、胸闷不畅、妊娠呕吐、胎动不安^[4]。本课题前期临床和实验研究表明, 含有荷梗的中药复方具有很好的抗抑郁作用^[5]; 本研究采用慢性不可预见性温和刺激复制抑郁症小鼠模型, 探索荷梗的抗抑郁效应及其可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级健康雄性 ICR 小鼠 40 只, 购自河北医科大学动物实验中心, 生产许可证号 SCXK (冀) 2018-004, 鼠龄 7 周左右, 体质量 (30 ± 5) g。

1.2 试剂与药物 荷梗 (批号 180901) 由河北中医药科学院附属医院提供, 经河北省师范大学赵建成教授鉴定为正品, 称定 100 g 于 10 倍量蒸馏水中浸泡 1 h, 温火煎煮 2 次, 每次 25~30 min, 2 次滤液混匀后浓缩至生药量 2、1 g/mL, 再次过滤、分装, 4℃ 保存备用; 氟西汀片 (20 mg, 法国生产, 礼来苏州制药有限公司分装, 批号 J20170022)。Anti-TPH2 antibody (英国 Abcam 公司, 批号 ab6336); Anti- β CaMKII antibody (英国 Abcam 公司, 批号 ab1806); PV-9001 兔二步法检测试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号 K182430C); PV-9003 山羊二步法检测试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号 K1824231)。

1.3 仪器 CX41 生物显微镜 (日本 Olympus 公司); RM2245 旋转式切片机 (德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 小鼠抑郁模型制备 参照前期实验方法^[6]稍作改良。除正常组外共用 14 种应激刺激方法, 分别为昼夜颠倒 24 h、束缚 2 h、禁食 24 h、噪音 2 h、禁水 24 h、倾斜

收稿日期: 2020-01-24

基金项目: 国家重点研发计划课题任务 (2017YFC1701701); 省级中医药类重大医学科研课题 (zyzd2013014); 河北省政府资助临床医学优秀人才项目 (360601); 河北省中医药管理局科研计划项目 (2018060)

作者简介: 张延红 (1987—), 女, 硕士生, 主治医师, 从事中医内科学脑病研究。Tel: (0311) 85363979, E-mail: 1623308030@qq.com

* 通信作者: 张少丹 (1962—), 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向为小儿癫痫。E-mail: 13653115066@163.com

裴 林 (1961—), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中医脑病及中药资源开发研究。Tel: 13831190309, E-mail: 13831190309@163.com

24 h、空笼 24 h、冰水游泳 5 min、异味 24 h (每周不同)、摇晃 5 min、潮湿 24 h、热水游泳 5 min、夹尾 1 min、异物 24 h (每周不同)。每天随机选取 2 种进行,刺激方式不可预见,持续 21 d。

2.2 分组、给药 适应性饲养 1 周后,小鼠根据糖水偏爱分数随机分为正常组、模型组、氟西汀组及荷梗低、高剂量组,每组 8 只。造模结束后,正常组和模型组给予生理盐水灌胃,阳性对照组给予氟西汀 (10 mg/kg) 灌胃,荷梗高、低剂量浓度比为 2:1,分别为 0.4、0.2 g/kg,每天 1 次,给药 21 d。

2.3 糖水偏爱实验 参照前期文献报道,稍作改良^[7]。小鼠在适应性饲养期间进行糖水训练,第 1 天每笼均放 2 瓶 1%蔗糖水,第 2 天一瓶为 1%蔗糖水,一瓶为纯水,之后禁食禁水 24 h,第 4 天给予一瓶 1%蔗糖水、一瓶纯水,24 h 后测糖水消耗,计算糖水偏好,公式为糖水偏好 = (糖水消耗/总液体消耗) × 100%,正式实验于给药 21 d 后检测。

2.4 强迫游泳实验 强迫游泳试验是参照 Lin 等^[8]的实验方法设计。在正式测试前 1 d,小鼠放入高 50 cm、长 20 cm 的玻璃器皿 (水温 25 ℃ 左右) 中适应性游泳训练 15 min,正式实验时记录 6 min 内出现静止不动的潜伏期和静止不动时间 (后 4 min),静止的标准是小鼠仅有头部露出水面,或只做为保持平衡四肢微微波动的动作。

2.5 旷场实验 参照前人研究^[9],旷场实验需在安静、光线暗的环境中进行。在正式试验前,所有小鼠均需在旷场 (60 cm×60 cm,正方形底面等分成 5 cm×5 cm 方格) 内适应 1 h,正式实验时从旷场中央区域放入,由动物行为分析系统记录 5 min 内小鼠在中央区累计行走距离、在中央区停留时间和反复进入中央区的次数。

2.6 免疫组织化学检测 行为学测试结束后,所有小鼠用 10%水合氯醛 (5 mg/kg) 腹腔麻醉,生理盐水透心灌注至肝脏发白后用 4%多聚甲醛灌注,取全脑组织用于免疫组化,石蜡切片透明、脱蜡至水,经微波加热抗原修复,山羊血清室温封闭 30 min,分别对应脑部位滴加 Anti-TPH2 抗体 (1:300) 和 Anti-β CaMKII 抗体 (1:200),置于 4 ℃ 冰箱中 12 h, PBS 洗 3 次,5 min/次,分别对应滴加山羊抗兔 IgG 和兔抗山羊 IgG (二抗稀释倍数均为 1:200),室温下孵育 30 min, PBS 溶液冲洗 3 次,5 min/次, DAB 显色反应 3~5 min,水洗 10 min 终止反应,苏木精复染,梯度酒精脱水,封片, CX41 显微照相系统观察,每只小鼠取 5 张脑片,计数各组中缝背核 TPH2 和外侧缰核 CaMKII β 的免疫阳性细胞数。

2.7 统计学分析 应用 SPSS 23.0 软件进行处理,实验数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析;两两比较如果方差齐则采用 SNK-q 检验,如果方差不齐则采用 Kruskal-Wallis 非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 糖水偏爱 与正常组相比,模型组糖水偏爱分数减少 ($P < 0.01$);与模型组相比,氟西汀组及荷梗高剂量组糖水偏爱分数增加 ($P < 0.01$),而且荷梗剂高剂量组与氟西汀组相比无差异 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组小鼠糖水偏爱分数的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	糖水偏爱分数/%
正常组	87.75±6.39
模型组	61.63±10.07**
氟西汀组	84.38±6.14 [#]
荷梗低剂量组	64.00±5.86
荷梗高剂量组	78.00±9.80 [#]

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.01$ 。

3.2 强迫游泳 与正常组相比,模型组小鼠强迫游泳不动时间延长,潜伏期缩短 ($P < 0.01$);与模型组相比,荷梗各剂量组、氟西汀组小鼠强迫游泳不动时间缩短,潜伏期延长 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 2。

表 2 各组小鼠强迫游泳不动时间和潜伏期的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	不动时间/s	潜伏期/s
正常组	184.36±24.66	71.00±18.35
模型组	225.38±11.99**	41.00±17.95**
氟西汀组	192.50±19.40 [#]	67.25±18.80 [#]
荷梗低剂量组	205.50±22.08 [#]	60.00±15.10 [#]
荷梗高剂量组	198.88±16.09 [#]	68.50±21.60 [#]

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

3.3 旷场实验 与正常组相比,模型组小鼠在中央区行走距离、中央区停留时间减短,反复进入中央区次数减少 ($P < 0.01$);与模型组相比,荷梗各剂量组、氟西汀组小鼠在中央区行走距离、在中央区停留时间增长,反复进入中央区的次数增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 3。

表 3 各组小鼠中央区行走距离、中央区停留时间、反复进入中央区次数的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	中央区行走 距离/m	中央区停留 时间/s	反复进入中 央区次数/次
正常组	7.55±2.12	131.75±25.18	30.63±8.25
模型组	4.64±2.12**	72.98±31.60**	16.75±7.91**
氟西汀组	6.83±1.83 [#]	101.01±16.11 [#]	27.75±8.00 [#]
荷梗低剂量组	6.69±1.74 [#]	97.09±24.45 [#]	25.13±7.53 [#]
荷梗高剂量组	7.33±1.85 ^{##}	106.48±13.65 ^{##}	28.00±9.02 ^{##}

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

3.4 相应脑区 TPH2、β CaMKII 表达 与正常组相比,模型组小鼠中缝背核 TPH2 的阳性细胞数量减少,外侧缰核 β CaMKII 的阳性细胞数量增多 ($P < 0.01$);与模型组相比,荷梗各剂量组和氟西汀组小鼠中缝背核 TPH2 阳性细胞数量增多 ($P < 0.01$),外侧缰核 β CaMKII 的阳性细胞数量减少 ($P < 0.05$)。见表 4、图 1。

4 讨论

一般认为,应激是诱发抑郁症的一个重要因素,慢性

表 4 各组小鼠 TPH2、 β CaMKII 阳性细胞数的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	TPH2 阳性细胞数/个	β CaMKII 阳性细胞数/个
正常组	128.63 $\pm$ 11.19	125.00 $\pm$ 17.94
模型组	63.75 $\pm$ 7.40**	265.00 $\pm$ 24.84**
氟西汀组	111.00 $\pm$ 11.39 ^{##}	162.00 $\pm$ 29.46 ^{##}
荷梗低剂量组	84.13 $\pm$ 9.67 ^{##}	233.75 $\pm$ 28.20 [#]
荷梗高剂量组	100.25 $\pm$ 14.40 ^{##}	178.88 $\pm$ 34.29 ^{##}

注:与正常组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

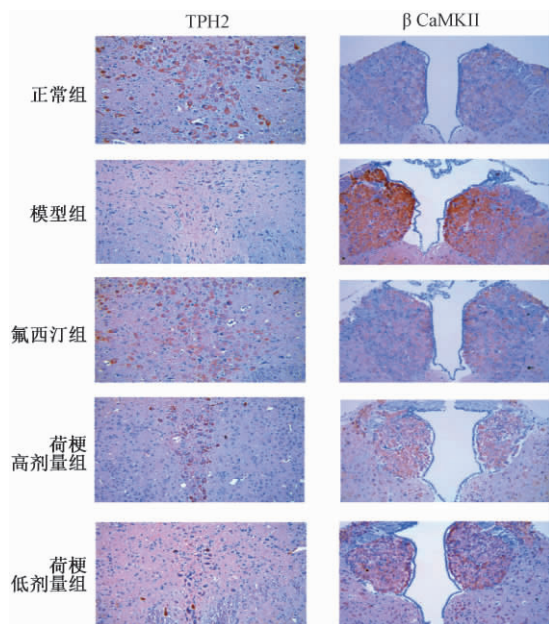


图 1 各组小鼠 TPH2、 β CaMKII 表达 (免疫组化染色, $\times 200$)

不可预见性温和刺激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS)^[10] 建立小鼠的抑郁模型是一种常见的动物模型,该模型动物的行为表现与人类抑郁症的表现高度相似。本研究观察到,模型组小鼠的糖水偏爱分数显著降低,证实造模成功,且模型组小鼠的强迫游泳不动时间明显增加,强迫游泳潜伏期显著缩短,用临床上公认的西药氟西汀作为阳性对照药,来验证中药荷梗的抗抑郁作用。旷场实验可检测小鼠在新异环境中的探究行为、紧张恐惧状态和对新环境的警觉性。本研究中,运动能力和探索行为能力的下降是抑郁症小鼠出现的典型表现。本研究结果显示,与模型组相比,中药荷梗组尤其高剂量组小鼠在中央区累计行走距离及在中央区停留时间显著增长,反复进入中央区的次数显著增多,且与氟西汀组相当,说明荷梗可以改善动物抑郁样行为和认知。

研究表明,5-羟色胺 (5-HT) 系统异常与抑郁症、焦虑症、厌食症、失眠、昼夜节律紊乱、内分泌功能障碍等密切相关^[11]。色氨酸羟化酶 (TPH) 是 5-HT 合成途径中的限速酶,色氨酸羟化酶 2 (TPH2) 是色氨酸羟化酶 (TPH) 的一个亚型,是 5-HT 神经元的特异性标志物之一^[12]。据报道,TPH2 在中缝背核 (DRN) 中特异性表达,其含量减少会直接影响 5-HT 的代谢功能,导致情感障碍和

自杀行为^[13]。缰核是边缘前脑和边缘中脑联系的重要节点,可分为内侧缰核 (Medial habenula, MHb) 和外侧缰核 (Lateral habenula, LHb)。钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II 亚单位 β (β CaMKII) 是一种钙依赖性蛋白激酶,在部位表达上具有缰核特异性。LHb 和 DRN 在调节抑郁中发挥重要作用。这两个区域在结构和功能上有着密切的联系。LHb 在应激条件下过度活跃,向下游的投射信号增强,可直接投射到 DRN,抑制 5-HT 的释放,从而导致抑郁的发生^[14]。而 LHb 在应激条件下被过度活化,可能是由于突触前膜谷氨酸释放增加,上调 β CaMKII,提高兴奋性突触在 AMPA 型受体的传播,而且 LHb 可以直接控制 DRN,并直接影响多巴胺能和 5-HT 能的大脑系统,这些系统涉及多种大脑功能和神经精神疾病,比如抑郁症。目前认为缰核是调节厌恶行为和逃避行为的关键脑区,中缝背核是调节奖赏行为的关键脑区。外侧缰核和中缝背核之间有往返纤维,这表明对于某种刺激,小鼠选择厌恶性逃避还是进一步探索,可能是上述脑区协同调节的结果。如果外侧缰核神经元有更多活化,对中缝背核的抑制可能增加,表现为探索行为减少。反之,奖赏环路活化,探索行为增加。实验结果表明,与正常组相比,模型组小鼠脑内 β CaMKII 的表达明显增多,TPH2 的表达显著减少,此结果与之前报道吻合^[15]。与模型组相比,中药荷梗各剂量组小鼠脑内 β CaMKII 的表达明显减少,TPH2 的表达显著增多,且荷梗高剂量组的表达水平与西药氟西汀组相当。由此推断荷梗的抗抑郁作用机制可能与调节外侧缰核中 β CaMKII 及中缝核中 TPH2 水平的表达有关。

综上所述,荷梗对 CUMS 小鼠具有抗抑郁作用,而通过抑制 β CaMKII 的过度活化,从而减少对 TPH2 的抑制可能是其作用机制之一。

参考文献:

- [1] Avenevoli S, Swendsen J, He J P, et al. Major depression in the national comorbidity survey-adolescent supplement: prevalence, correlates, and treatment [J]. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 2015, 54(1): 37-44.
- [2] Qiao Y M, Lu Y K, Yan Z, et al. Reciprocal associations between job strain and depression: a 2-year follow-up study from the survey of health, ageing and retirement in Europe [J]. *Brain Behav*, 2019, 9(9): e01381.
- [3] Tursi M F de S, Baes C von W, Camacho F R de B, et al. Effectiveness of psychoeducation for depression: a systematic review [J]. *Aust N Z J Psychiatry*, 2013, 47(11): 1019-1031.
- [4] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 (第三册) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 408-409.
- [5] 芦 晔, 裴 林, 关振伟, 等. 化浊解毒疏肝方对慢性应激小鼠的抗抑郁作用及对 BDNF-Rac1-cofilin 通路的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(5): 2089-2093.
- [6] 刘勇永, 芦 晔, 楚 立, 等. 黄芩苷对抑郁症模型小鼠海马钙结合蛋白 D28K 表达的影响 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2019, 38(2): 107-111.

- [7] Mineur Y S, Belzung C, Crusio W E. Functional implications of decreases in neurogenesis following chronic mild stress in mice [J]. *Neuroscience*, 2007, 150(2): 251-259.
- [8] Lin J, Song Z, Chen X, et al. *Trans*-cinnamaldehyde shows anti-depression effect in the forced swimming test and possible involvement of the endocannabinoid system [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 518(2): 351-356.
- [9] Lin L Y, Luo S Y, Al-hawwas M, et al. The long-term effects of ethanol and corticosterone on the mood-related behaviours and the balance between mature BDNF and proBDNF in mice [J]. *J Mol Neurosci*, 2019, 69(1): 60-68.
- [10] Willner 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.
- [11] Holmes A. Genetic variation in cortico-amygdala serotonin function and risk for stress-related disease [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2008, 32(7): 1293-1314.
- [12] Tidemand K D, Peters G H, Harris P, et al. Isoform-specific substrate inhibition mechanism of human tryptophan hydroxylase [J]. *Biochemistry*, 2017, 56(46): 6155-6164.
- [13] Zhang Y, Jin C, Wang X, et al. Propamocarb exposure decreases the secretion of neurotransmitters and causes behavioral impairments in mice [J]. *Environ Toxicol*, 2019, 34(1): 22-29.
- [14] Shen X F, Yuan H B, Wang G Q, et al. Role of DNA hypomethylation in lateral habenular nucleus in the development of depressive-like behavior in rats [J]. *J Affect Disord*, 2019, 252: 373-381.
- [15] 景兴科, 马小兰, 尹洁, 等. 雌雄小鼠对伤害性刺激敏感度不同和缰外侧核反应有关 [J]. *西安交通大学学报 (医学版)*, 2019, 40(5): 674-678.

金银花木樨草苷对大鼠抑郁及中枢海马神经递质调控的影响

赵 孟¹, 王玉婷², 戢汉斌^{1*}

[1. 武汉市武东医院 (武汉市第二精神病医院), 湖北 武汉 430084; 2. 武汉大学药学院实验中心, 湖北 武汉 430072]

摘要: **目的** 研究金银花木樨草苷对大鼠抑郁及中枢海马神经递质调控的影响。**方法** 将 48 只成年健康的 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、氟西汀组和金银花木樨草苷高、中、低 (100 mg/kg、50 mg/kg、25 mg/kg) 组。采用慢性不可预知性应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 结合孤养方法构建抑郁模型, 旷场实验、悬尾实验、强迫游泳实验等考察药物对抑郁大鼠行为学的影响, HPLC-F 检测海马中 5-HT 等单胺递质水平, Western blot 和 RT-PCR 测定海马组织 BDNF 蛋白和 mRNA 的表达。**结果** 与空白组比较, 模型组大鼠旷场实验自主活动量下降, 悬尾不动时间和游泳不动时间延长 ($P < 0.05$); 海马区神经递质 5-HT、NE 及 DA 水平降低 ($P < 0.05$), BDNF 表达下调 ($P < 0.05$)。**结论** 金银花木樨草苷可逆转并改善慢性应激引起的抑郁样行为, 其可能的机制是上调海马 BDNF 表达, 增加中枢单胺类神经递质水平。

关键词: 金银花; 木樨草苷; 抗抑郁; 海马神经递质

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2020)10-2571-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.10.041

抑郁症是一种持续的心境低落, 甚至有自残、自杀等行为的疾病, 有研究认为其与遗传、外界环境应激等相关^[1], 但具体的病理机制尚不明确。临床报道显示抑郁症患者外周血中 5-羟色胺 (5-HT) 和多巴胺 (DA) 等神经递质的水平是显著降低的, 因此大多数学者认为中枢系统单胺递质失衡, 如 5-HT、DA、NE 下调可能是导致抑郁发生的主要原因^[2-3]。目前, 临床上抗抑郁治疗的一线药物是氟西汀, 作为选择性 5-HT 再摄取抑制剂, 它能通过抑制突触间隙对 5-HT 的再摄取快速逆转中枢及外周单胺递质水平

的失衡; 但不足的是患者服药治疗后抑郁症状缓解相对滞后^[4-5], 这表明不仅单胺递质参与了抑郁的生理病理过程, 其他因子可能也参与其中。在长期应激刺激下, 机体下丘脑-垂体-肾上腺皮质 HPA 轴功能持续亢进, 由于海马神经元源性神经营养因子 (BDNF) 水平下调, 海马结构和功能随之发生改变^[6], 这可能使抑郁进一步加剧。因此, 从天然产物中寻找治疗神经精神类疾病的活性单体物质, 弥补现有药物疗效的不足, 探讨相关的作用机制是近年来中医药研究的热点。

收稿日期: 2019-04-03

作者简介: 赵 孟 (1981—), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向为心境障碍的临床诊疗与病区管理。E-mail: 13969397@qq.com

*** 通信作者:** 戢汉斌 (1966—), 男, 副主任医师, 研究方向为物质依赖与成瘾医学。E-mail: 150224904@qq.com