

不同配伍柴郁温胆汤对抑郁模型大鼠海马 CREB 和 BDNF 表达的影响

周志华¹ 周海虹^{2*} 陆 汎² 韩咏竹¹ 胡纪源¹ 王 训¹

(1. 安徽中医学院神经病学研究所, 安徽省合肥市长江中路 357 号, 230061; 2. 厦门大学医学院中医系)

基金项目: 福建省科技项目计划面上项目(2010J01239); 海峡(厦门)中医药科技平台资助项目(3502Z20100006)

* 通讯作者: hhzhou@xmu.edu.cn, (0592)2183069

[摘要] 目的 观察柴郁温胆汤及其不同配伍组合对抑郁模型大鼠海马环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)和脑源性神经营养因子(BDNF)表达的影响。方法 健康雄性 SD 大鼠 70 只, 随机分为正常组、模型组、复方组、化痰组、调气血组、养心脾组和马普替林组。除正常组外, 各组采用孤养加慢性轻度不可预见性刺激方法建立大鼠抑郁模型, 从应激第 2 天起分别灌胃给药至实验第 23 天。采用免疫组化法检测大鼠海马 CA3 区 CREB 和 BDNF 的表达。结果 与正常组相比, 模型组大鼠海马 CREB 和 BDNF 表达的总面积、阳性细胞数和平均光密度均明显降低($P < 0.01$)。与模型组相比, 复方组、化痰组、马普替林组能够显著上调大鼠海马 CREB 和 BDNF 表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 养心脾组能够提升 CREB 表达的总面积和阳性细胞数($P < 0.05$); 调气血组能够提升 BDNF 表达的平均光密度($P < 0.05$)。结论 柴郁温胆汤能够明显上调大鼠海马 CREB 和 BDNF 表达, 其中以化痰药的配伍组合作用较明显。

[关键词] 柴郁温胆汤; 抑郁症; cAMP 反应元件结合蛋白; 脑源性神经营养因子

Effect of the Chaiyu Wendan Decoction of Different Compatibilities on Expressions of CREB and BDNF in Hippocampus of Rat Models with Depression

ZHOU Zhihua¹, ZHOU Haihong², LU Fan², HAN Yongzhu¹, HU Jiyuan¹, WANG Xun¹

(1. Institute of Neurology, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui 230061; 2. Medical College, Xiamen University)

ABSTRACT Objective To explore the effect of Chaiyu Wendan Decoction [Decoction containing Chaihu (*Radix bupleuri*) and Yujin (*Radix curcumae*) for gallbladder diseases] and its different compatibilities on the expressions of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding protein (CREB) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the hippocampus of rat models with depression. **Methods** Seventy healthy male SD rats were randomized into normal group, model group, Chaiyu Wendan group, dissolving phlegm group, regulating qi and blood group, nourishing the heart and spleen group, and maprotiline group. Except the normal group, the other groups were made models by using a method of separate breeding plus chronic unpredictable mild stress (CUMS). The intragastric feeding of medicines was given from the second day of stress for 3 weeks. The expressions of CREB and BDNF in the hippocampus CA3 zone were detected by immunohistochemical method. **Results** Compared with the normal group, the total area, the amount of positive cells, and the averaged optical density of the CREB and BDNF expressions in the model group were decreased significantly ($P < 0.01$). Compared with the model group, the CREB and BDNF expressions in the Chaiyu Wendan group, dissolving phlegm group, and maprotiline group were significantly up-regulated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The total area and positive cells of the CREB expression in the nourishing the heart and spleen group were increased ($P < 0.05$). And the averaged optical density of the BDNF expression in the regulating qi and blood group was increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Chaiyu Wendan Decoction is effectively up-regulating the CREB and BDNF depressions in the hippocampal zone, indicating that one of the mechanisms of its function in anti-depression is possibly related with the regulation of signal transmission in cells, and this effect in the compatibility for dissolving phlegm is more significant. **Key Words** Chaiyu Wendan Decoction [Decoction containing Chaihu (*Radix bupleuri*) and Yujin (*Radix curcumae*) for gallbladder diseases]; depression; cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding protein (CREB); brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

近年来,国内外学者发现受体后第二信使系统在抑郁症发病中具有重要作用。有研究表明,长期慢性应激可以下调环磷酸腺苷反应元件结合蛋白

(cyclic AMP response element binding protein CREB)和脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)的表达与功能,而抗抑郁治

疗能够逆转这种改变^[1-4]。中药复方柴郁温胆汤由古方温胆汤化裁而来,具有疏肝解郁、调和气血、化痰健脾功效。我们前期研究显示,该方能明显改善抑郁大鼠行为学变化、调节 HPA 轴的功能、提高脑单胺类神经递质的含量和海马区 PKA 的表达^[5-7]。为进一步探讨其作用机理,本研究观察柴郁温胆汤不同配伍对大鼠海马 CA3 区 CREB 和 BDNF 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级健康 SD 雄性大鼠,体重 180~200g,由南京医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(苏)2002-0031。适应性饲养 2 周后造模。

1.2 药物

柴郁温胆汤(复方组)由柴胡 10g、郁金 10g、半夏 10g、陈皮 12g、竹茹 10g、枳实 10g、人参 5g、茯苓 10g、炙甘草 5g、生姜 5g、大枣 5g 组成。拆方分为化痰组(半夏、陈皮、竹茹);调气血组(柴胡、郁金、枳实);养心脾组(人参、茯苓、炙甘草、大枣)。以上药物均由安徽中医学院生药学专家鉴定。严格按中药煎煮提取工艺制剂,含生药量:复方组 1.84g/ml、化痰组 0.64g/ml、调气血组 0.60g/ml、养心脾组 0.50g/ml。提取液中每味药的浓度在复方和不同配伍组合中均相同,以保证各组实验结果的可比性。

盐酸马普替林片(北京诺华制药有限公司生产,国药准字:H19991047)。用时碾成粉末,用去离子双蒸水配制成 1mg/ml 药物混悬液。

1.3 主要试剂及仪器

一抗(CREB 兔抗,BDNF 兔抗)试剂盒、二抗(与一抗相对应,均为鼠抗)试剂盒、免疫组化 SABC 试剂盒、APES 及 DAB 显色剂、PBS 缓冲液(均为武汉博士德生物工程有限公司产品);T3-200 型分析天平(成都科学仪器厂);101-A 恒温干燥箱(宁波自动化仪表厂);石蜡包埋机(英国 HISTOCENTRE 公司);石蜡切片机(英国 FINESSE 公司);DP801 形态分析系统(江苏捷达科技发展有限公司)。

1.4 造模方法

正常组每笼饲养 5 只,正常饮水摄食,不给任何刺激。其余各组每笼饲养 1 只,并接受各种不同的应激刺激 21 天,刺激方法根据 Katz 法^[8]改进,包括:48h 禁食,24h 禁水,通宵照明(12h),4℃冷水游泳 5min,45℃烘箱热烘 5min,夹尾 1min,高速水平振荡(160Hz)10min,昼夜颠倒,潮湿饲养,闪光刺激

15min 等。每天随机给予一种刺激,使大鼠不能预料刺激的发生,以避免产生适应。

1.5 分组及给药

选取 Open-field 评分^[1]相近的大鼠 70 只,按随机数字表法分为正常组、模型组、复方组、化痰组、调气血组、养心脾组、马普替林组,每组 10 只。后 5 组从应激第 2 天起均按提取液 1ml/100g 灌胃给药,模型组和正常组给予等量生理盐水。每天上午 8:00 灌胃给药 1 次,持续至实验的第 23 天。

1.6 检测指标及方法

1.6.1 实验大鼠 Open-field 行为评分^[1] 实验第 21 天再次 Open-field 行为学评分,将大鼠置于高 40cm、直径 80cm、周壁为黑色的圆柱体内,底面用黑线划分为面积相等的 25 块。以动物四肢完全进入一个分区作为一个水平活动(crossing)得分、以双前肢完全抬离地面至放下作为一个垂直活动(rearing)得分、以及观察大鼠的理毛(修饰)次数和大便颗粒数。每只动物仅进行一次测定,每次观察 3min。

1.6.2 免疫组化法半定量检测大鼠海马 CA3 区 CREB 和 BDNF 大鼠用 10%水合氯醛(0.36ml/100g)腹腔注射麻醉后开胸,主动脉弓插管,开右心房,先灌注 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)250ml,继灌注 150ml 混合液(4%多聚甲醛+0.1mol/L PBS)内固定,持续 30min,可以看到大鼠四肢和尾轻微快速颤动继而全身僵硬。断头取出脑组织浸入 4%多聚甲醛外固定待测。采用免疫组化 SAB 检测法,当细胞膜上出现适当的阳性颗粒时,及时双蒸水冲洗终止显色。苏木素轻度复染约 30s,水洗;1%盐酸酒精稍分化后蓝化片刻,常规脱水,透明,中性树脂胶封片。Olympus 显微镜、DP801 形态分析软件进行图像采集和处理,计算抗原表达的总面积、阳性细胞数和平均光密度。每个部位测 7 个视野,取平均值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计软件处理,计量数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠 Open-field 行为评分比较

表 1 示,实验第 21 天与正常组比较,模型组水平得分、垂直得分、修饰次数和大便颗粒数均明显减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);实验第 21 天与模型组比

较,复方组能够逆转上述各观察指标的改变($P<0.01$);化痰组对水平得分与修饰次数的提升差异有统计学意义($P<0.05$);调气血组对垂直得分与大便颗粒数的提升差异有统计学意义($P<0.05$);养心脾组对于上述指标无改变($P>0.05$);马普替林组对于水平得分、垂直得分和修饰次数的提升差异均具有统计学意义($P<0.01$),但对于大便颗粒数的改变差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 各组大鼠海马 CREB 表达比较

表 2 示,与正常组相比,模型组大鼠海马区 CREB 表达的总面积、阳性细胞数和平均光密度均明显降低($P<0.01$);与模型组相比,复方组、马普替林组、化痰组均能够显著上调大鼠海马区 CREB 上述 3 个指标的表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$);养心脾组能够提升大鼠海马区 CREB 表达的总面积和

阳性细胞数($P<0.05$);调气血组对 CREB 的表达无明显影响($P>0.05$)。

2.3 各组大鼠海马 BDNF 表达比较

表 3 示,与正常组相比,模型组大鼠海马区 BDNF 表达的总面积、阳性细胞数和平均光密度均明显降低($P<0.01$);与模型组相比,复方组、化痰组、马普替林组均能够明显上调 BDNF 的表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$);调气血组亦提高 BDNF 表达的平均光密度($P<0.05$);养心脾组对上述指标的改变差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

本研究采用孤养加慢性轻度不可预见性刺激方法建立大鼠抑郁模型,经行为学观察证实该模型基本模拟了抑郁症患者兴趣缺失、探究能力下降、精神运动迟滞等抑郁表现,可作为研究抑郁症的较理想模型。

表 1 各组大鼠 Open-field 行为评分比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	水平得分(分)		垂直得分(分)		修饰次数(次)		大便颗粒数(个)	
		第 1 天	第 21 天	第 1 天	第 21 天	第 1 天	第 21 天	第 1 天	第 21 天
正常组	10	62.9±12.6	63.7±15.8	12.0±4.7	12.7±5.9	4.6±1.8	6.3±1.7	3.5±1.4	4.7±2.5
模型组	10	61.1±17.5	48.4±13.1*	12.9±6.3	7.2±3.1*	4.3±3.7	3.5±1.6**	3.7±2.9	2.5±1.4*
复方组	10	60.2±10.2	66.3±8.7 ^{△△}	12.5±6.7	14.6±6.9 ^{△△}	4.0±3.2	6.1±2.0 ^{△△}	3.1±1.4	5.1±2.4 [△]
化痰组	10	60.2±10.8	63.5±12.3 [△]	12.8±4.3	11.8±5.4	4.4±1.6	5.8±2.2 [△]	3.7±1.8	3.7±1.7
调气血组	10	65.2±12.0	56.9±11.5	12.4±3.0	12.3±4.9 [△]	4.3±1.0	3.2±1.6	3.4±1.6	4.9±2.1 [△]
养心脾组	10	63.5±12.4	52.1±12.9	12.7±3.5	8.6±4.1	4.5±1.5	2.8±1.9	3.3±2.0	4.5±3.0
马普替林组	10	63.8±14.3	66.2±23.0 ^{△△}	12.5±5.7	13.9±7.9 ^{△△}	4.8±1.9	6.2±2.7 ^{△△}	3.4±1.9	4.2±2.2

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

表 2 各组大鼠海马区 CREB 表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	阳性产物总面积(μm^2)	阳性细胞数(个)	平均光密度(μm^2)
正常组	10	7576.50±1412.56	286.50±33.83	0.15±0.03
模型组	10	3795.50±1458.33*	186.00±26.38*	0.07±0.01*
复方组	10	7554.33±1225.71 ^{△△}	273.67±21.57 ^{△△}	0.12±0.03 ^{△△}
化痰组	10	7187.50±1515.51 [△]	267.33±49.03 [△]	0.11±0.03 [△]
调气血组	10	3937.33±2497.40	171.50±66.37	0.09±0.04
养心脾组	10	7025.33±3044.16 [△]	268.00±101.34 [△]	0.08±0.01
马普替林组	10	8159.50±4108.66 ^{△△}	276.00±54.56 ^{△△}	0.12±0.02 ^{△△}

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

表 3 各组大鼠海马区 BDNF 表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	阳性产物总面积(μm^2)	阳性细胞数(个)	平均光密度(μm^2)
正常组	10	8855.20±3081.73	309.60±69.60	0.19±0.32
模型组	10	4307.00±670.19*	186.50±51.31*	0.14±0.04*
复方组	10	6514.10±1389.57 ^{△△}	304.50±90.18 ^{△△}	0.19±0.02 ^{△△}
化痰组	10	6115.90±831.20 [△]	298.20±150.91 [△]	0.18±0.02 ^{△△}
调气血组	10	5500.20±1348.94	229.30±118.39	0.17±0.02 [△]
养心脾组	10	4199.10±1330.57	173.50±103.39	0.13±0.03
马普替林组	10	6386.65±1516.12 ^{△△}	287.50±92.52 [△]	0.18±0.02 ^{△△}

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

CREB 属于亮氨酸转译因子家族成员的核内蛋白,在不同组织中表达并扮演多种不同的功能。它包含一个基本的亮氨酸序列和一个 DNA 结合区,使之可以识别并和其 DNA 结合区相结合,从而可以启动 cAMP 反应元件基序。当 CREB 第 133 位的丝氨酸残基(S133)被磷酸化后,CREB 的转录活性被激活。能引起 CREB 磷酸化的经典通路是 cAMP-PKA 信号转导通路^[9]。

BDNF 属神经营养素家族,对发育过程中神经元的存活、分化和发育、以及参与成熟脑神经元的存活和功能发挥重要作用。酪氨酸激酶 B(TrkB)是 BDNF 高亲和力受体。BDNF 与 TrkB 结合,参与激活神经营养因子作用的磷脂酰肌醇-3-激酶/Akt (PI-3K/Akt)、RAS-丝裂素激活蛋白激酶(RAS-MAPK)等信号转导途径^[10]。BDNF 在长程增强效应、学习、记忆的突触可塑性中扮演重要角色^[11]。临床也观察到抑郁症患者血清 BDNF 水平较正常人明显降低,经过抗抑郁治疗后可以显著提升抑郁症患者的血清 BDNF 水平,同时改善患者的抑郁症状^[12]。因此 BDNF 的功能涉及到结构重建—神经可塑性和突触重塑,也可能是抗抑郁剂治疗的潜在靶物。

本研究结果表明,慢性应激可以导致抑郁模型大鼠海马 CREB 和 BDNF 表达下降,这进一步证实了 CREB 和 BDNF 与抑郁症发病密切相关。柴郁温胆汤能够明显上调抑郁大鼠海马 CREB 和 BDNF 表达,与四环类抗抑郁剂马普替林作用相类似,提示该方抗抑郁机理之一可能是参与了细胞信号通路的调节,起作用的主要是化痰组药物,其次是养心脾药物,调气血组药物作用不明显,但 3 组配伍合用后的全方作用最显著,表明中药复方配伍具有多途径、多靶点的整体调节优势,也提示化痰中药在抑郁症治疗中具有重要意义。此外,复方组能够改善抑郁模型大鼠大便颗粒数的改变,一定程度显示了柴郁温胆汤抗抑郁的优越性,即改善抑郁症患者便秘的并发症。综上,中药复方柴郁温胆汤具有良好的抗抑郁作用,但其药效的确切物质基础有待进一步明确。

参考文献

- [1] Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, et al. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression[J]. J Neurosci, 2002, 22(8):3251-3261.
- [2] 王哲, 胡随瑜, 雷德亮, 等. 慢性应激对大鼠海马神经元 PKA 和 p-CREB 蛋白表达的影响及抗抑郁剂的拮抗作用[J]. 中南大学学报(医学版), 2006, 31(5): 767-771.
- [3] 何国琪, 张建荣, 王兴祥, 等. 神经营养因子 3 在慢性应激诱发抑郁症的作用机制研究[J]. 中国全科医学, 2006, 9(20):1680-1682.
- [4] 吴丽丽, 王文竹, 严灿, 等. 加味四逆散对慢性心理应激抑郁大鼠海马损伤的保护作用[J]. 中医杂志, 2008, 49(4): 353-355.
- [5] 周海虹, 陆汎, 陈艳玲, 等. 柴郁温胆汤对大鼠抑郁模型行为学及脑内单胺类神经递质的影响[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(10): 931-934.
- [6] 周海虹, 陈艳玲, 陆汎, 等. 柴郁温胆汤及其组分对抑郁大鼠脑单胺类神经递质及 PKA 表达的影响//连建伟. 方剂学现代研究[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008: 211-215.
- [7] 周志华, 周海虹, 陆汎, 等. 柴郁温胆汤及其拆方对抑郁模型大鼠血清 ACTH、COR 及海马 cAMP 的影响[J]. 浙江中医药大学学报, 2010, 34(1): 58-61.
- [8] Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression[J]. Neurosci Biobehav Rev, 1981, 5(2): 247-251.
- [9] De Cesare D, Fimia GM, Sassone-Corsi P. Signalling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation[J]. Trends Biochem Sci, 1999, 24(7): 281-285.
- [10] Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators[J]. Nat Rev Neurosci, 2001, 2(1): 24-32.
- [11] Bramham CR, Messaoudi E. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis[J]. Prog Neurobiol, 2005, 76(2): 99-125.
- [12] 张玉梅, 张志珺, 沙维伟, 等. 抑郁症患者治疗前后血清脑源性神经营养因子水平变化及相关因素分析[J]. 中华精神科杂志, 2009, 42(4): 210-214.

(收稿日期:2011-03-02;修回日期:2011-05-13)

[编辑:行 之]

欢迎邮购《中医杂志》光盘合订本

1951—1986 年(4 张光盘)480 元;1987—1994 年(1 张光盘)260 元;1995—2004 年(1 张光盘)280 元。光盘合订本为计算机用数据光盘,收入了同期出版的全部《中医杂志》的内容,可对所有文章进行任意字检索,方便实用。

汇款地址:北京东直门内南小街 16 号中医杂志北京医海林音像书店,邮政编码:100700,电话:(010)64035632。网址: <http://www.jtcm.net.cn>。