

加味温胆汤对抑郁模型大鼠海马 CaMK 信号转导通路的影响

张 曼^{1*} 张丽萍¹ 武 丽² 夏 猛² 颜 红¹

(1. 天津中医药大学人文管理学院, 天津市南开区双峰道 9 号, 300073; 2. 广西中医学院)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30973732)

* 通讯作者: lineage820525@163.com, 18663276626

[摘 要] 目的 探讨加味温胆汤对抑郁模型大鼠海马钙调素依赖蛋白激酶(CaMK)信号转导通路的影响。方法 128 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、中药组、西药组, 每组 32 只。采用孤养结合慢性不可预见性应激造模抑郁大鼠, 从造模第 1 天开始中药组给予加味温胆汤 12g/(kg·d), 西药组予氟西汀 1.8mg/(kg·d), 模型组、空白组给予生理盐水 2ml/(kg·d), 各组均灌胃给药, 连续 28 天。实验第 7、14、21、28 天时采用 Western 印迹法检测各组大鼠海马 N-甲基-D-天冬氨酸受体 1 (NMDA-NR1)、钙调素(CaM)、CaMK II 蛋白表达变化。结果 第 7、14 天, 各组大鼠海马 NMDA-NR1、CaM、CaMK II 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。21、28 天时, 与空白组比较, 模型组大鼠海马 NMDA-NR1、CaM、CaMK II 蛋白表达增多($P<0.01$); 与模型组比较, 中、西药组大鼠海马 NMDA-NR1、CaM、CaMK II 蛋白表达减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 中、西药组同时间比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 加味温胆汤可通过抑制 CaMK 信号转导通路的活性发挥其抗抑郁效应。**[关键词]** 加味温胆汤; 抑郁症; 大鼠; 海马; CaMK 通路

Effect of Jiawei Wendan Decoction on CaMK Signaling Pathway in the Hippocampus of Depression Model Rats

ZHANG Man¹, ZHANG Liping¹, WU Li², XIA Meng², YAN Hong¹

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300073; 2. Guangxi University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Jiawei Wendan Decoction (Supplemented Gallbladder-Warming Decoction) on calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) signaling pathway in the hippocampus of depression model rats. **Methods** The rat models were established with unpredictable chronic stress and isolation-induced depression. Then 128 models were randomized into blank group, model group, Chinese medication group and western medication group, with 32 in each. The Chinese medication group and western medication group was given 12g/(kg·d) of Jiawei Wendan Decoction and 1.8mg/(kg·d) of fluoxetine through gastric feeding respectively. Both the model group and blank group were given 2ml/(kg·d) of normal saline through gastric feeding. The administration lasted for 28 days. On the 7th, 14th, 21st and 28th day, the protein expression of N-methyl-D-aspartate receptor 1 (NMDA-NR1), calmodulin (CaM) and CaMK II in the hippocampus of rat models were tested with Western-Blot technique. **Results** There was no statistical significance in the protein expression of NMDA-NR1, CaM and CaMK II among groups on the 7th and 14th day of administration ($P>0.05$). On the 21st and 28th day, the protein expression of NMDA-NR1, CaM and CaMK II increased significantly in the model group as compared with the blank group ($P<0.01$). The protein expression of NMDA-NR1, CaM and CaMK II decreased significantly in the two medication groups as compared with the model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). The difference between two medication groups was not statistically significant at the same time period ($P>0.05$). **Conclusion** Jiawei Wendan Decoction has an antidepressant effect by inhibiting the activity of CaMK signaling pathway.

Keywords Jiawei Wendan Decoction (supplemented Gallbladder-Warming Decoction); depression; rat; hippocampus; calmodulin-dependent protein kinase signaling pathway

抑郁症是一种常见的情感障碍疾病, 世界卫生组织(WHO)预测到 2020 年其将成为第二大致残疾病^[1], 且现有抗抑郁西药, 如氟西汀、帕罗西汀等长期服用易产生恶心、失眠等副作用, 影响患者依从性^[2], 致使临床缺乏有效防治策略及干预药物。中医药在抑郁症的防治中具有身心整体调理优势, 前期临床实践证实, 加味温胆汤能改善抑郁症患者的

情绪、认知功能及躯体症状, 且无毒副作用^[2], 其通过影响神经—内分泌—免疫系统的关键因子, 神经可塑性相关的胞内信号转导通路, 发挥抗抑郁效应^[3-4]。本研究在前期临床研究及动物实验^[5-6]基础上, 以钙调素依赖蛋白激酶(CaMK)信号通路为切入点, 探讨加味温胆汤的抗抑郁作用机制, 为临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

8 周龄 SD 雄性大鼠 128 只, 体重(180±20)g, 清洁级, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK(湘)2009—0004。按照随机数字表法将大鼠分成空白对照组(空白组)、模型对照组(模型组)、中药治疗组(中药组)、西药治疗组(西药组), 每组 32 只。

1.2 试剂

动物组织 RNA 提取试剂盒(离心柱型), 天根生化科技(北京)有限公司; Western 及 IP 细胞裂解液, 碧云天公司; 考马斯亮兰蛋白测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 一抗兔抗人 N-甲基-D-天冬氨酸受体 1(NMDA-NR1) 蛋白多克隆抗体, Saier-bio 公司; 二抗辣根酶标记山羊抗兔 IgG, 中杉金桥生物有限公司; PVDF 膜, 美国 Bio-rad 公司。

1.3 造模方法与给药

采用孤养结合慢性不可预测性应激造模^[7], 大鼠单笼饲养, 24h 禁食, 通宵照明, 4℃ 冷水游泳 5min, 45℃ 烘箱热烘 5min, 夹尾 1min, 高速水平振荡 3min, 100V 电击足底 1min, 悬尾 1min, 共 9 种刺激方法, 随机安排到 21 日内, 每日 1 种, 每种刺激至少出现 2 次, 同种刺激不能连续出现, 使动物不能预料刺激发生^[8]。造模结束后进行旷场试验, 以大鼠穿越底面块数为水平活动得分, 以直立次数为垂直活动得分的改变情况进行造模是否成功的评价, 各组均造模成功。各组在实验第 1 天开始给予不同干预方法, 中药组给予加味温胆汤 12g/(kg·d), 药物组成: 竹茹 6g, 法半夏 10g, 枳实 10g, 陈皮 10g, 远志 6g, 合欢花 10g, 茯苓 15g, 郁金 10g, 草果 6g, 石菖蒲 15g, 厚朴 10g, 桃仁 10g, 片姜黄 10g, (炒) 酸枣仁 12g, 薏苡仁 10g, 制为浸膏, 经生理盐水溶解灌胃给药; 西药组给予氟西汀 1.8mg/(kg·d); 模型组、空白组给予生理盐水 2ml/(kg·d); 每天早晨 8:00 开始, 各组均灌胃给药, 连续 28d。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 取材 实验第 7、14、21、28d, 从每组随机选

择 8 只大鼠, 禁食 12h, 经腹股沟动脉放血处死, 取脑, 分离海马约 100mg 置 1.5ml EP 管中, 生理盐水冲洗两遍同时充分剪碎, 离心去上清。然后每管加 4℃ 裂解液 1ml, 继续剪碎、混匀, 低温超声匀浆; 14000 转离心, 5min, 取上清备用。

1.4.2 大鼠 NMDA-NR1、钙调素(CaM)、CaMK II 蛋白相对表达量检测 取上清 5μl, 加考马斯亮蓝 3μl, 去离子水 95μl, 595nm 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 测各管 OD 值; 根据样品 OD 值调整蛋白浓度。

样品煮沸 5min, 冷却后取 50μg 上样; 电泳(12% 浓缩胶: 90v 30min; 10% 分离胶: 120v 120min); NC 膜转印(70v 120min); 5% 脱脂奶粉 TBST 溶液封闭抗体, 摇床 2h, TBS 漂洗 5min, 3 次。

一抗孵育(兔抗人 NMDA-NR1、CaM、CaMK II 多克隆抗体 1:500 稀释), 4℃ 过夜; 二抗孵育(辣根酶标记羊抗兔 IgG 1:1500 稀释), 37℃ 1h; 扫描并分析结果, 条件设置为曝光 2min, CCD 自动获取图像, 同时以 1:1000 稀释的小鼠抗大鼠 beta-actin 单克隆抗体作为内参照, 各蛋白相对表达量以相应蛋白/beta-actin 灰度值表示。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计软件包进行统计学处理, 计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间差异比较采用单因素方差分析, 用 SNK 法进行组间比较。

2 结果

在实验第 24d 时, 中药组 1 只大鼠因灌胃损伤死亡。共 127 只大鼠进入结果分析。

各组大鼠海马 NMDA-NR1、CaM、CaMK II 蛋白表达的比较: 表 1、2、3 示, 7d、14d, 各组大鼠海马区 NMDA-NR1、CaM、CaMK II 蛋白表达比较差异无统计学意义($P>0.05$)。21d、28d 时, 与空白组比较, 模型组 NMDA-NR1、CaM、CaMK II 蛋白表达增加($P<0.01$); 与模型组比较, 中、西药组 NMDA-NR1、CaM、CaMK II 蛋白表达减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 各时间点各指标中、西药组间比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 各组大鼠不同时间 NMDA-NR1 蛋白相对表达量比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	7d	14d	21d	28d
空白组	48.67±13.67(8)	50.43±13.56(8)	54.45±16.43(8)	64.23±22.34(8)
模型组	46.78±17.94(8)	68.45±13.89(8)	78.87±18.34*(8)	93.23±21.24*(8)
中药组	50.89±13.23(8)	54.56±18.45(8)	60.56±21.34△(8)	80.56±18.45△△(7)
西药组	54.54±15.45(8)	60.00±16.44(8)	64.77±18.23△△(8)	78.56±25.76△△(8)

注: 与空白组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$; 括号内为鼠数

表 2 各组大鼠不同时间 CaM 蛋白相对表达量比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	7d	14d	21d	28d
空白组	16.34±5.45(8)	20.67±5.34(8)	22.21±5.21(8)	23.45±9.32(8)
模型组	18.56±6.56(8)	27.87±6.56(8)	35.32±7.32*(8)	42.34±7.36*(8)
中药组	17.23±5.43(8)	24.88±7.45(8)	26.45±5.43 [△] (8)	29.45±9.12 [△] (7)
西药组	15.82±4.34(8)	23.56±8.21(8)	25.45±6.89 [△] (8)	31.23±7.22 [△] (8)

注:与空白组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.01$;括号内为鼠数

表 3 各组大鼠不同时间 CaMK II 蛋白相对表达量比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	7d	14d	21d	28d
空白组	8.45±2.56(8)	10.45±3.7(8)	18.34±3.89(8)	23.45±5.32(8)
模型组	9.54±2.89(8)	14.56±3.77(8)	26.78±3.78*(8)	42.34±6.36*(8)
中药组	9.67±2.45(8)	12.56±2.56(8)	23.56±4.67 [△] (8)	29.45±7.12 [△] (7)
西药组	8.78±2.45(8)	11.34±3.56(8)	25.45±3.89 [△] (8)	31.23±8.22 [△] (8)

注:与空白组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.01$;括号内为鼠数

3 讨论

CaMK 通路在抑郁症发病及抗抑郁治疗途径中具有重要作用。Nowak 等^[8]用放射性配体结合技术对抑郁症自杀者与其他原因突然死亡者的大脑进行比较,发现前者额叶皮质 NMDA 受体(NMDA-NR1)复合物中高亲和性甘氨酸结合位点的数目减少,NMDA-NR1 的结合率显著下降。钟晓明等^[9]研究发现,抑郁症模型小鼠海马突触体内游离 Ca^{2+} 浓度明显升高。另有研究证实,CaMK 在钙信号转导通路中起着轴心的作用,其不但受 CaM 的活化,而且受各种蛋白激酶的调节,蛋白激酶的磷酸化和去磷酸化是 CaMK 活化的开关^[10]。Lee 等^[11]认为,CaMK II 是一种在脑组织尤其是海马区内高度表达的蛋白激酶,在神经可塑性变化及记忆形成中具有重要作用。

本项目组提出调理脾胃是抑郁症治疗不可忽视的原则^[12],重视中焦脾胃在调畅诸脏腑气机中重要的枢纽作用,加味温胆汤即以此为立方依据,方中半夏辛温,长于降气和中、燥湿化痰,为君药。橘皮辛苦温,擅调和中气、驱化痰湿,枳实苦微寒,长于行气破滞、化痰散结,竹茹甘微寒,化痰开郁、清胃降逆,茯苓,性平,味甘、淡,利水渗湿,健脾宁心,上 4 味为臣药。生姜辛微温,益气和中、下气降逆为佐药。甘草,甘平,归脾、胃、心、肺经,益气补中调和诸药,为使药。诸药合用,寓辛开苦降之理,共奏调中行气、驱化痰浊之功,全方苦辛、升降相因,从调理脾胃气机入手,使枢轴旋转而诸脏腑气机调畅,则浊邪可祛,抑郁症可望向愈。

本研究发现,模型组大鼠海马 NMDA-NR1、

CaM、CaMK II 蛋白表达在抑郁形成过程中上升趋势相同;随着治疗时程的增加,中药组、西药组 NMDA-NR1、CaM、CaMK II 蛋白表达上升趋势得到明显抑制,与模型组比较,21d 时差异有统计学意义($P<0.05$),28d 时,3 种蛋白表达量进一步降低,差异有统计学意义($P<0.01$),结果提示,加味温胆汤对 NMDA-NR1、CaM、CaMK II 表达的抑制作用具有时效关系,21d 出现抑制蛋白表达作用,28d 抑制作用进一步增强。由于 NMDA-NR1、CaM、CaMK II 是 CAMK 通路上关键因子,其蛋白表达变化反映了 CaMK 通路的活性,因此,综合上述研究结果推断,加味温胆汤可能通过抑制 CaMK 信号转导通路活性而发挥其抗抑郁效应。

参考文献

- [1] McKenna MT, Michaud CM, Murray CJ, et al. Assessing the burden of disease in the United States using disability-adjusted life years[J]. Am J Prev Med, 2005, 28(5):415-423.
- [2] 施学丽,刘泰,唐全胜,等. 调理脾胃气机法治疗抑郁症临床疗效观察[J]. 广西中医药,2007,30(5):7-9.
- [3] 武丽,张丽萍,夏猛,等. 解郁 1 号对 SS 调衡 HPA 轴功能的干预研究[J]. 医学研究杂志,2009,23(3):65-66.
- [4] 武丽,张丽萍,陈贵海,等. 解郁 1 号对抑郁大鼠血浆促肾上腺皮质激素释放因子和皮质醇含量的影响[J]. 时珍国医国药,2009,24(2):513-514.
- [5] Zhang LP, Xia M, Wu L, et al. Effects of Jiawei Wendan decoction on hippocampal p-CREB protein expression in a rat model of depression[J]. Neural Regen Res, 2008, 3(9):962-966.
- [6] 武丽,张丽萍,叶庆莲,等. 加味温胆汤的抗抑郁功效[J]. 中国临床康复,2006,10(23):63-64.

(下转第 973 页)

- 碍性贫血小鼠 IL-3、IFN- γ 的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2003, 17(3): 52-54.
- [2] 代喜平, 王运律, 朱宇清, 等. 补肾复方冲剂对慢性再生障碍性贫血患者红细胞免疫黏附功能和膜分子 CD35 和 CD58 表达的影响[J]. 临床血液学杂志, 2004, 17(1): 39-40.
- [3] 邱仲川, 赵琳, 陈珮, 等. 补肾复方冲剂影响再生障碍性贫血患者造血祖细胞研究[J]. 北京中医药大学学报, 2001, 24(3): 55-57.
- [4] 邱仲川, 赵琳, 陈珮. 补肾复方冲剂对免疫介导再障小鼠作用机制的实验研究[J]. 临床血液学杂志, 2002, 15(5): 221-222.
- [5] 尹艳, 尚溪瀛, 初云海, 等. 补肾生血法对慢性再障患者表达 $\alpha 5\beta 1$ /CD49e 水平影响的研究[J]. 中医药信息, 2008, 25(6): 40-42.
- [6] 徐瑞荣, 王琰, 安玉姬, 等. 补肾益髓法对慢性再生障碍性贫血 IL-3、SCF、IFN- γ 、TNF- α mRNA 表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(3): 13-14.
- [7] 孙伟正, 潘桂华, 钟玉林, 等. 补髓生血冲剂对慢性再生障碍性贫血患者造血调控因子表达水平的影响[J]. 中医药信息, 2002, 19(5): 59-60.
- [8] 王运律, 韩惠杰, 刘敏, 等. 补肾颗粒对慢性再生障碍性贫血患者 CD28、CD95 表达的影响[J]. 中医杂志, 2010, 51(4): 323-325.
- [9] 石琳, 王祥麒. 龟鹿二仙胶加味治疗慢性再障疗效观察[J]. 医药论坛杂志, 2007, 28(5): 104-105.
- [10] 丁敬远, 黄振翹, 孙关林, 等. 健脾药对免疫介导再生障碍性贫血小鼠 IL-3、IFN- γ 影响的实验研究[J]. 新中医, 2004, 30(1): 76-77.
- [11] 曾清, 程纬民, 韦常丽, 等. 参芪补血方对脾肾阳虚型慢性再生障碍性贫血 T 细胞免疫机制的影响[J]. 四川中医, 2007, 25(10): 64-65.
- [12] 刘宝山, 戴锡孟. 再生障碍性贫血痰瘀互结病机理论基础及应用探微[J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(9): 688-689.
- [13] 刘宝山, 顾民华, 王兴丽, 等. 补肾化痰活血法促进再生障碍性贫血小鼠骨髓基质细胞黏附分子表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(9): 657-659.
- [14] 刘宝山, 顾民华, 范国平, 等. 补肾化痰活血中药对再生障碍性贫血小鼠骨髓 CD34⁺ 和细胞因子表达的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36(5): 705-707.
- [15] 吴迪炯, 沈一平, 周郁鸿, 等. 浅谈急性再生障碍性贫血的“痰瘀同治”观[J]. 中医杂志, 2010, 51(1): 91-92.
- [16] 胡永珍, 李达. 补肾活血法对再障小鼠骨髓基质黏附分子的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(1): 113-114.
- [17] 孙绪江, 王树庆, 李建华, 等. 补肾活血通络法对慢性再生障碍性贫血患者骨髓 CD34⁺ 细胞凋亡的影响[J]. 中国中医药科技, 2003, 10(5): 257-276.
- [18] 宋艳萍, 胡凯, 王浩. 补肾活血通络方对慢性再生障碍性贫血患者血清可溶性 Fas 含量的影响[J]. 陕西中医, 2008, 29(6): 686-687.
- [19] 郑瑾, 刘强, 王宗仁, 等. 化瘀补肾汤对再生障碍性贫血小鼠 CFU-F 及血清 IL-2、IFN- γ 的影响[J]. 安徽中医学院学报, 2004, 23(4): 34-35.
- [20] 黄振翹, 黄韬, 周永明, 等. 补肾泻肝方对再生障碍性贫血外周血 IFN- γ 、IL-2 的影响[J]. 中国医药学报, 2001, 16(6): 24-25.
- [21] 黄振翹, 黄韬, 李艳红, 等. 补肾泻肝方药对再生障碍性贫血患者骨髓造血祖细胞的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2001, 15(3): 47-48.
- [22] 杨淑莲, 张文艺, 王东侠, 等. 凉血解毒汤治疗急性再生障碍性贫血的机制探讨[J]. 中医杂志, 2007, 48(3): 230-231.
- [23] 胡永珍, 李达. 凉血解毒汤对再障小鼠骨髓免疫紊乱的调控[J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36(2): 298-299.
- [24] 刘素平, 梁勇, 孙晓静, 等. 清开灵对急性再生障碍性贫血患者 T 细胞亚群的影响[J]. 河北中医, 2009, 31(1): 107-109.
- (收稿日期: 2010-10-20; 修回日期: 2011-03-15)
- [编辑: 李 巍]

(上接第 958 页)

- [7] Luo DD, An SC, Zhang X. Involvement of hippocampal serotonin and neuropeptide Y in depression induced by chronic unpredicted mild stress[J]. Brain Res Bull, 2008, 77(1): 8-12.
- [8] Nowak G, Li Y, Paul IA. Chronic glycine treatment desensitizes the behavioral response to 1-aminocyclopropanecarboxylic acid (ACPC), a partial agonist at the strychnine-insensitive glycine site of the NMDA receptor complex[J]. J Neural Transm, 2000, 107(2): 123-131.
- [9] 钟晓明, 毛庆秋, 黄真, 等. 金丝桃提取物对应激动物模型的抗抑郁作用及其机理研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2006, 30(2): 214-216.
- [10] Sazonova OV, Blishchenko EY, Tolmazova AG, et al. Stimulation of fibroblast proliferation by neokytorphin requires Ca influx and activation of PKA, CaMK II and MAPK/ERK[J]. FEBS J, 2007, 274(2): 474-484.
- [11] Lee SJ, Kim HE, Choi SE, et al. Involvement of Ca²⁺/calmodulin kinase II (CaMK II) in genistein-induced potentiation of leucine/glutamine-stimulated insulin secretion[J]. Mol Cells, 2009, 28(3): 167-174.
- [12] 张丽萍. 抑郁症治疗中重视调理脾胃气机作用的探讨[J]. 陕西中医, 2005, 26(1): 45-47.
- (收稿日期: 2011-06-28; 修回日期: 2012-01-08)
- [编辑: 行 之]