

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.20.013

愈癲汤对精神分裂症模型大鼠脑组织 Glu/GABA 代谢平衡的影响

白冰^{1,2}, 柴剑波^{3,4}, 于明³, 赵永厚³✉

1. 浙江省立同德医院, 浙江省杭州市西湖区古翠路234号, 310000; 2. 黑龙江神志医院博士后科研工作站; 3. 黑龙江神志医院; 4. 黑龙江省精神心理卫生研究中心

[摘要] **目的** 探讨愈癲汤治疗精神分裂症的可能作用机制。**方法** 5只正常雌性孕17天SD大鼠所产雄性子鼠选取20只为空白组。15只雌性孕17天SD大鼠单次性腹腔注射醋酸甲基偶氮甲酯(MAM) 25 mg/kg, 所产雄性子鼠模拟神经发育异常建立精神分裂症大鼠模型。选取造模成功60只子鼠随机分为模型组、愈癲汤组、利培酮组各20只。适应性分笼喂养3天后, 愈癲汤组大鼠灌胃愈癲汤1.54 g/(kg·d), 利培酮组灌胃利培酮胶囊0.24 mg/(kg·d), 空白组和模型组灌胃6.7 ml/(kg·d)蒸馏水, 每日灌胃1次, 连续14天, 最后一次灌胃后次日取材。免疫荧光法检测海马区和前额叶皮质中谷氨酸受体(GluR)、 γ -氨基丁酸受体亚单位 $\alpha 1$ (GABAAR $\alpha 1$)阳性神经元的表达情况, 计算阳性率; 免疫组织化学法检测海马CA1区和内侧前额叶皮质中小清蛋白(PV)表达; 蛋白免疫印迹法和反转录PCR法检测海马区和前额叶皮质中谷氨酸脱羧酶65(GAD65)、谷氨酸脱羧酶67(GAD67)蛋白及mRNA表达。**结果** 与空白组比较, 模型组大鼠海马区和前额叶皮质GluR阳性率升高, 海马区GABAAR $\alpha 1$ 阳性率降低, 海马CA1区和内侧前额叶皮质中PV光密度值均降低, 海马区和前额叶皮质中GAD65、GAD67蛋白及mRNA表达均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 利培酮组、愈癲汤组海马区和前额叶皮质中GluR阳性率均降低, 海马区GABAAR $\alpha 1$ 阳性率均升高, 海马CA1区和内侧前额叶皮质中PV光密度值均升高, 海马区和前额叶皮质中GAD65、GAD67蛋白及mRNA表达均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与利培酮组比较, 愈癲汤组海马区和前额叶皮质中GluR、海马区GABAAR $\alpha 1$ 阳性率均降低, 海马CA1区PV光密度值升高, 海马区GAD67蛋白及mRNA表达升高, 前额叶皮质中GAD65蛋白表达降低($P<0.05$)。**结论** 愈癲汤可能通过调节海马区及前额叶皮质谷氨酸/ γ -氨基丁酸(Glu/GABA)代谢平衡的关键调控因子, 维持大脑神经元兴奋和抑制之间的平衡状态, 从而改善精神分裂症的病理过程。

[关键词] 精神分裂症; 愈癲汤; 谷氨酸; γ -氨基丁酸; 谷氨酸脱羧酶

全国性精神障碍流行病学调查结果显示, 精神分裂症及其他精神障碍终生患病率为0.61%^[1]。精神分裂症的症状表现复杂多样, 患者出现不同程度的社会功能受损, 疾病负担较重。其发病机制目前尚不明确, 其中对神经递质代谢障碍和神经发育异常假说的相关研究较为丰富, 多递质受体共病假说更接近精神分裂症的病理基础^[2]。基于中医神志

病学对精神分裂症的认识, 我们从癲病、狂病进行辨证论治, 以痰、瘀、气三个病理因素为核心^[3], 创立以“化痰消瘀、理气通滞”为主要治疗原则的愈癲汤, 应用于精神分裂症中医临床实践20余年, 取得了良好的临床疗效^[4]。前期基础研究显示, 愈癲汤可通过调节精神分裂症模型大鼠脑组织中谷氨酸(Glu)、 γ -氨基丁酸(GABA)、5羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)等神经递质的功能活动, 改善精神病症状和认知功能障碍^[5-6]。Glu/GABA代谢平衡影响和维持大脑的正常生理活动^[7-8]。本研究拟从

基金项目: 国家自然科学基金(81873299); 黑龙江省博士后基金(LBH-Z19095)

✉ 通讯作者: zhaoyh777@126.com

大脑 Glu/GABA 代谢平衡角度进一步深入探讨愈癲汤治疗精神分裂症的可能作用机制。本研究经黑龙江中医药大学实验动物管理和使用委员会审批, 审批号: 2020091102。

1 材料及方法

1.1 动物

清洁级雌性健康 SD 孕 15 天 (GD15) 大鼠 20 只, 鼠龄 8~12 周, 体质量 (350 ± 20) g, 由辽宁长生生物技术股份有限公司提供, 实验动物生产许可证号: SCXK (辽) 2020-0001。饲养环境: 昼夜节律 12 h/12 h (7: 00~19: 00), 自然光线, 室内温度 (24 ± 2) °C、湿度 55%~60%。实验前适应性喂养 2 天, 自由进食水。

1.2 药物

愈癲汤组成: 清半夏 15 g, 制天南星 15 g, 三棱 15 g, 莪术 15 g, 槟榔 15 g, 牵牛子 10 g, 大黄 10 g, 茵陈 15 g。中药材购自北京同仁堂哈尔滨药店, 浸泡 30 min 后, 以先武火后文火的方法常规煎煮。中药煎液经过预冻 (-80 °C, 12 h)、升华干燥 (-30 °C, 48 h)、解析干燥 (30 °C, 24 h), 冻干粉出粉率约为 23.30%, 将冻干粉配制浓度为 0.23 g/ml 的混悬液 (每毫升悬浊液约含生药量 1 g)。利培酮胶囊 (宁波大红鹰药业, 国药准字: H20060697) 配制浓度为 0.036 mg/ml 的混悬液。醋酸甲基偶氮甲酯 (MAM, 日本和光纯药工业株式会社), 配制浓度为 5 mg/ml 的注射液。

1.3 主要试剂及仪器

γ -氨基丁酸受体亚单位 $\alpha 1$ (GABAAR $\alpha 1$) 抗体 (货号: ab252430)、谷氨酸受体 (GluR) 抗体 (货号: ab183127)、谷氨酸脱羧酶 65 (GAD65) 抗体 (货号: ab239372)、谷氨酸脱羧酶 67 (GAD67) 抗体 (货号: ab26116), Abcam 公司; 小鼠蛋白 (PV) 兔单克隆抗体 (ABclonal 公司, 货号: A19098); 水合氯醛 (西亚化学科技有限公司, 货号: A14434); 4% 多聚甲醛 (武汉卡诺斯科技有限公司, 货号: PH0427); DAPI 工作液 (货号: BL105A)、苏木素 (货号: BL700B), Biosharp 公司; 过氧化物酶标准染色试剂盒 (Vector 公司, 货号: PK-6100); 吐温-20 (BioFroxx 公司, 货号: 1247); DAB 显色试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 货号: ZLI-9019); 超敏 ECL 发光液 (Meilunbio 公司, 货号: MA0186-L); TB Green Premix Ex Taq II (货号: RR820A)、Prime Script

RT reagent Kit with gDNA Eraser (货号: RR047A), TAKARA 公司。

电子天平 (METTLER TOLEDO 公司, ME104E 型); 低温离心机 (Thermo 公司, SORVALL ST8/8R 型); 超微量分光光度计 (KAIAO 公司, K5600 型); 电泳仪 (Talon 公司, EPS600 型); 梯度 PCR 仪 (Select BioProducts 公司, Select Cyclor II 型); 实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad 公司, CFX96 型); 显微镜 (Olympus 公司, BX53 型)。

1.4 分组、造模及给药方法

健康孕 17 天 (GD17) 大鼠采用随机数字表法选取 5 只, 腹腔注射 5 ml/kg 的生理盐水, 产下的健康雄性子鼠按体质量排序, 选取中间 20 只作为空白组。剩余 GD17 大鼠单次腹腔注射 MAM 25 mg/kg 后产下的雄性子鼠即为精神分裂症模型大鼠^[9]。前期研究证实, GD17 孕鼠腹腔注射 MAM 后可导致子鼠神经发育异常, 大脑单胺类神经递质浓度发生改变, 类似精神分裂症的病理改变^[10]。

将模型大鼠按体质量排序, 选取中间 60 只分为 3 个区组, 其中 170~185 g 17 只、185~200 g 29 只、200~215 g 14 只。从 1 到 60 对 3 个区组的大鼠进行编号。采用随机数字表按照随机数余数, 分别将 3 个区组的大鼠随机分配给模型组、利培酮组、愈癲汤组, 每组 20 只, 适应性分笼喂养 3 天。按照体表面积折算^[11], 愈癲汤组大鼠灌胃剂量为 1.54 g/(kg·d), 利培酮组灌胃剂量为 0.24 mg/(kg·d)。空白组和模型组灌胃 6.7 ml/(kg·d) 蒸馏水。每日灌胃 1 次, 连续 14 天。

1.5 观察指标及方法

最后一次灌胃后次日进行取材, 腹腔注射水合氯醛 350 mg/kg 进行麻醉。各组采用随机数字表法选取 10 只大鼠采取快速断头取脑法, 在冰盘上剥离出完整的脑组织, 保存于 -80 °C 冰箱中, 用于免疫印迹 (Western Blot) 法和反转录 PCR 法检测。各组剩余 10 只大鼠采取心脏灌流取脑的方法, 用 4% 多聚甲醛固定并保存, 用于免疫荧光 (IF) 法和免疫组织化学 (IHC) 法检测。

1.5.1 大鼠海马区和前额叶皮质中 GluR、GABAAR $\alpha 1$ 阳性表达 采用 IF 法检测, 将 4% 多聚甲醛固定的样本按照规定程序进行冲水。脱水后, 进行石蜡包埋。蜡块冰镇后, 50 °C 摊片, 80 °C 烤片, 95 °C 烘片。样本切片厚度为 4 μ m, 按照规定程序进行脱蜡水化。双蒸水洗片, 抗原修复后, 2% PBST 洗片。玻片滴加封闭液室温孵育; 滴加一抗 (GluR

稀释比例 1 : 300, GABAAR α 1 稀释比例 1 : 500), 孵育过夜; 洗片后滴加荧光二抗 (稀释比例为 1 : 500), 避光孵育; 洗片后滴加 DAPI 工作液, 避光孵育; 洗片后滴加抗荧光淬灭剂; 显微镜下观察, 并拍照。应用 Image J 软件 V1. 8. 0 版, 统计免疫荧光的阳性信号, 软件自动得到阳性面积占所选区域面积的百分比即为阳性率。

1. 5. 2 大鼠海马 CA1 区和内侧前额叶皮质中 PV 的表达 采用 IHC 法检测, 脱水包埋、切片、脱蜡水化、洗片程序同上。玻片滴加封闭液室温孵育; 滴加一抗 (PV 抗体稀释比例为 1 : 100), 孵育过夜; 洗片后滴加二抗 (稀释比例为 1 : 400), 室温孵育; 洗片后滴加 ABC 液, 室温孵育; 洗片后滴加 DAB 显色, 用 2% PBST 终止反应; 苏木素染色, 水冲洗。按规定程序脱水透明, 滴加中性树胶; 显微镜下观察, 并拍照。使用 Imagepro-Plus 6. 0 软件, 测量光密度值。

1. 5. 3 大鼠海马区和前额叶皮质中 GAD65、GAD67 蛋白表达 采用 Western Blot 法检测, 提取总蛋白, 并检测浓度, 用 RIPA 稀释样品。GAD65 抗体的稀释比例为 1 : 5000, GAD67 抗体的稀释比例为 1 : 1000。分别配制 10% 分离胶和 5% 浓缩胶; 点样, 电泳, 转膜时间为 65 min (110 V), 封闭, 孵育一抗, 洗膜, 结合二抗, 洗膜; 用超敏 ECL 发光液显色, 使用数码凝胶图像分析系统 (Tanon-1600) 测定灰度值。目的蛋白的灰度值除以内参的灰度值, 得到目的蛋白的相对含量。

1. 5. 4 大鼠海马区和前额叶皮质中 GAD65、GAD67 mRNA 表达 采用反转录 PCR 法检测。用 Trizol 法提取总 RNA, 进行 cDNA 反转录; 测定 cDNA 浓度并定量至 200 ng/ μ l, 按 19 μ l 分装, 加入 cDNA 模板 1 μ l; 按照设置好的程序开始扩增, 进行荧光定量 PCR 检测。引物合成由武汉金开瑞生物工程有限公司完成, 引物序列: GAD65, 上游 TGGCAGACCAACCGCAAAATCT, 产物大小 22 bp; 下游 GGCCTCACCAGGAAAGGAACAAA, 产物大小 24 bp。GAD67 上游 AGGCACGACTGTTTATGGAGCGTT, 产物大小 24 bp; 下游 AATTGGCCCTTTCTATGCCGCTGA, 产物大小 24 bp。GAPDH, 上游 GGTGGACCTCATGGCCTACAT, 产物大小 21 bp; 下游 CTCTCTTGCTCTCAGTATCCTTGCT, 产物大小 25 bp。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析 mRNA 相对表达量。

1. 6 统计学方法

采用 SPSS 22. 0 统计软件进行分析。数据符合

正态分布用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 方差齐者多组间比较采用 F 检验, 组间两两比较采用 LSD- t 检验; 方差不齐时多组间比较采用校正 F 检验 (Welch 检验), 组间两两比较采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。 $P<0. 05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2. 1 各组大鼠海马区和前额叶皮质中 GluR、海马区 GABAAR α 1 阳性率比较

表 1 示, 各组大鼠海马区和前额叶皮质中 GluR、海马区 GABAAR α 1 阳性率总体比较差异均有统计学意义 ($P<0. 01$)。组间比较: 与空白组比较, 其余各组组海马区和前额叶皮质中 GluR 阳性率升高, 海马区 GABAAR α 1 阳性率降低 ($P<0. 01$); 与模型组比较, 利培酮组、愈癲汤组海马区和前额叶皮质中 GluR 阳性率均降低, 海马区 GABAAR α 1 阳性率均升高 ($P<0. 05$ 或 $P<0. 01$); 与利培酮组比较, 愈癲汤组海马区和前额叶皮质中 GluR、海马区 GABAAR α 1 阳性率均降低 ($P<0. 05$)。

表 1 各组大鼠海马区和前额叶皮质中 GluR、海马区 GABAAR α 1 阳性率比较

		in each group		
		GluR		海马区 GABAAR α 1
组别	鼠数	海马区	前额叶皮质	
空白组	10	22. 40 $\pm$ 2. 46	25. 50 $\pm$ 3. 35	42. 20 $\pm$ 2. 64
模型组	10	39. 90 $\pm$ 4. 89 ^{a)}	44. 30 $\pm$ 3. 16 ^{a)}	18. 60 $\pm$ 2. 73 ^{a)}
利培酮组	10	34. 50 $\pm$ 3. 77 ^{a) b)}	36. 40 $\pm$ 3. 38 ^{a) c)}	33. 10 $\pm$ 3. 78 ^{a) c)}
愈癲汤组	10	31. 00 $\pm$ 2. 76 ^{a) c) d)}	32. 90 $\pm$ 3. 30 ^{a) c) d)}	28. 70 $\pm$ 4. 31 ^{a) c) d)}
F 值		41. 67	55. 95	81. 30
P 值		<0. 001	<0. 001	<0. 001

注: GluR, 谷氨酸受体; GABAAR α 1, γ -氨基丁酸受体亚单位 α 1。

a) 与空白组比较, $P<0. 01$; b) 与模型组比较, $P<0. 05$; c) 与模型组比较, $P<0. 01$; d) 与利培酮组比较, $P<0. 05$ 。

2. 2 各组大鼠海马 CA1 区和内侧前额叶皮质中 PV 光密度值比较

表 2 示, 各组大鼠海马 CA1 区和内侧前额叶皮质中 PV 光密度值总体比较, 差异均有统计学意义 ($P<0. 01$)。组间比较: 与空白组比较, 其余各组海马 CA1 区和内侧前额叶皮质中 PV 光密度值均降低 ($P<0. 01$); 与模型组比较, 利培酮组、愈癲汤组海马 CA1 区和内侧前额叶皮质中 PV 光密度值均升高 ($P<0. 05$ 或 $P<0. 01$); 与利培酮组比较,

愈癲汤组海马 CA1 区 PV 光密度值升高 ($P<0.05$), 而内侧前额叶皮质中 PV 光密度值差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.3 各组大鼠海马区和前额叶皮质中 GAD65、GAD67 蛋白表达比较

表 3 示, 各组大鼠海马区和前额叶皮质中 GAD65、

表 2 各组大鼠海马 CA1 区和内侧前额叶皮质中 PV 光密度值比较

Table 2 Comparison of PV optical density values in hippocampal CA1 area and medial prefrontal cortex of rats in each group (OD 值, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	海马 CA1 区 PV	内侧前额叶皮质 PV
空白组	10	0.36±0.04	0.35±0.03
模型组	10	0.19±0.03 ^{a)}	0.21±0.04 ^{a)}
利培酮组	10	0.24±0.04 ^{a) b)}	0.27±0.03 ^{a) c)}
愈癲汤组	10	0.28±0.04 ^{a) c) d)}	0.29±0.04 ^{a) c)}
<i>F</i> 值		41.50	23.54
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注: PV, 小清蛋白。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$;

c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与利培酮组比较, $P<0.05$ 。

表 3 各组大鼠海马区及前额叶皮质中 GAD65、GAD67 蛋白相对表达量比较

Table 3 Comparison of relative expression of GAD65 and GAD67 proteins in the hippocampal region and prefrontal cortex of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	海马区		前额叶皮质	
		GAD65	GAD67	GAD65	GAD67
空白组	10	0.76±0.10	0.79±0.07	0.83±0.06	0.78±0.07
模型组	10	0.51±0.09 ^{a)}	0.55±0.07 ^{a)}	0.61±0.07 ^{a)}	0.55±0.08 ^{a)}
利培酮组	10	0.60±0.08 ^{a) c)}	0.63±0.07 ^{a) c)}	0.77±0.06 ^{b) d)}	0.67±0.06 ^{a) d)}
愈癲汤组	10	0.62±0.06 ^{a) c)}	0.70±0.07 ^{b) d) e)}	0.70±0.07 ^{a) c) e)}	0.65±0.06 ^{a) c)}
<i>F</i> 值		15.05	19.37	20.93	19.94
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: GAD65, 谷氨酸脱羧酶 65; GAD67, 谷氨酸脱羧酶 67。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与空白组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.05$; d) 与模型组比较, $P<0.01$; e) 与利培酮组比较, $P<0.05$ 。

表 4 各组大鼠海马区及前额叶皮质中 GAD65、GAD67 mRNA 表达比较

Table 4 Comparison of GAD65 and GAD67 mRNA expression in the hippocampal region and prefrontal cortex of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	海马区		前额叶皮质	
		GAD65	GAD67	GAD65	GAD67
空白组	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	10	0.61±0.09 ^{a)}	0.63±0.10 ^{a)}	0.70±0.11 ^{a)}	0.69±0.07 ^{a)}
利培酮组	10	0.71±0.08 ^{a) b)}	0.73±0.09 ^{a) b)}	0.79±0.06 ^{a) b)}	0.76±0.06 ^{a) b)}
愈癲汤组	10	0.79±0.08 ^{a) c) d)}	0.82±0.07 ^{a) c) d)}	0.81±0.06 ^{a) b)}	0.78±0.07 ^{a) b)}
<i>F</i> 值		52.64	43.04	32.97	56.62
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: GAD65, 谷氨酸脱羧酶 65; GAD67, 谷氨酸脱羧酶 67。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与利培酮组比较, $P<0.05$ 。

GAD67 蛋白表达总体比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。组间比较: 与空白组比较, 其余各组大鼠海马区和前额叶皮质中 GAD65、GAD67 蛋白表达均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型组比较, 利培酮组、愈癲汤组大鼠海马区和前额叶皮质中 GAD65、GAD67 蛋白表达均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与利培酮组比较, 愈癲汤组大鼠海马区 GAD67 蛋白表达升高、前额叶皮质中 GAD65 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。

2.4 各组大鼠海马区和前额叶皮质中 GAD65、GAD67 mRNA 表达比较

表 4 示, 各组大鼠海马区和前额叶皮质中 GAD65、GAD67 mRNA 表达总体比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。组间比较: 与空白组比较, 其余各组大鼠海马区和前额叶皮质中 GAD65、GAD67 mRNA 表达均降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 利培酮组、愈癲汤组海马区和前额叶皮质中 GAD65、GAD67 mRNA 表达均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与利培酮组比较, 愈癲汤组海马区中 GAD65、

GAD67 mRNA 表达均升高 ($P < 0.05$), 而前额叶皮质中 GAD65、GAD67 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

中医神志病学认为, 思虑太过, 所愿不遂, 脏腑阴阳气血失调, 导致体内产生气、血、痰、火、瘀等病理产物, 破坏了五脏之神与脑神之间的协调关系, 是精神分裂症(癲病、狂病)的主要病机^[3]。愈癲汤以化痰消瘀、行气通滞为治疗原则, 其中清半夏、制天南星和茵陈具化痰散结之功效, 三棱、莪术具有化瘀行气之功效, 大黄、槟榔和牵牛子具消积泻下之功效, 诸药相合, 痰瘀同治, 气血兼调, 共奏脑窍清灵通利之功。利培酮属于 5-HT 和 DA 受体平衡拮抗剂, 有研究表明, 利培酮能够改善首发精神分裂症的临床症状及大脑皮层厚度^[12], 故本研究选择为对照药物。

Glu 是一种重要的兴奋性神经递质, 通过与受体结合, 在中枢神经系统兴奋传递过程中发挥生物学作用^[13]。当受到长时程强刺激后, GluR 最先插入到突触后膜, 出现持续增强的突触传递, 与学习、记忆等认知过程密切相关^[14]。在 Glu 能系统的影响下, GABA 能系统的功能减弱, GABA 释放减少, 使 GABA 受体调控下的 Glu 能神经元脱抑制, Glu 水平相应增高^[15]。GABA 是一种重要的抑制性神经递质, 由 Glu 在谷氨酸脱羧酶 (GAD) 的作用下脱羧生成^[16]。神经发育学研究^[17-18]表明, 介导 GABA 生物学功能的 GABAAR α 1 与记忆、注意等认知过程的关系密切。一项磁共振波谱成像研究发现, 首发精神分裂症患者背外侧前额叶中 Glu/GABA 平衡的改变存在于疾病表现之前^[7], 可以考虑作为早期病理生理标志物。在本研究中, 腹腔注射 MAM 建立精神分裂症大鼠模型, 其海马区和前额叶皮质的 GluR 表达升高, 海马区的 GABAAR α 1 表达下降, 提示存在 Glu/GABA 代谢平衡的异常; 而愈癲汤和利培酮均能够下调 GluR 的表达、上调 GABAAR α 1 的表达。结合课题组前期的研究结果^[6], 两者均能够提高 Glu/GABA 的比值, 说明愈癲汤和利培酮对 Glu/GABA 代谢平衡具有正向的调节作用, 且愈癲汤的调节作用优于利培酮。

PV 阳性的 GABA 神经元占大脑皮层 GABA 神经元总数的四分之一左右, 通过影响皮层网络振荡, 在记忆活动中发挥重要作用^[19]。有研究^[20]显示, 前额叶皮质和海马等多个脑区存在 PV 阳性的

GABA 神经元密度下降, 提示 GABA 能代谢异常参与精神分裂症的病理过程。在本研究中, 模型组大鼠海马区 CA1 区和内侧前额叶皮质的 PV 表达较空白组大鼠下降, 而经愈癲汤和利培酮干预后 PV 表达上调, 且愈癲汤在上调海马 CA1 区 PV 表达方面优于利培酮, 提示愈癲汤对海马 CA1 区 PV 阳性的 GABA 神经元调节水平高于利培酮。

GAD 既是 Glu 的降解酶, 又是 GABA 的合成酶, 是维持 Glu/GABA 代谢平衡的关键调控因子^[21]。GAD65 和 GAD67 是 GAD 的主要同工酶, GAD65 主要合成神经突触释放的 GABA, GAD67 主要合成神经元代谢池内的 GABA^[22]。研究^[23]显示, GABA 能中间神经元功能障碍与精神分裂症的病理生理学有关, 其中 GAD 的表达也发生了改变。在本研究中, 模型组大鼠海马区、前额叶皮质的 GAD65、GAD67 蛋白和 mRNA 水平均呈降低趋势, 而愈癲汤和利培酮均能够上调 GAD65、GAD67 蛋白和 mRNA 水平; 在上调海马区 GAD65 mRNA、GAD67 蛋白和 mRNA 方面, 愈癲汤优于利培酮, 而在上调前额叶皮质 GAD65 蛋白方面, 利培酮优于愈癲汤。因此可以推测, 愈癲汤可能通过上调海马区和前额叶皮质中 GAD65 和 GAD67 的水平, 使 Glu 与 GluR 结合障碍, 从而降低神经兴奋性毒性, 来保护海马区和前额叶皮质; 同时增加海马区和前额叶皮质中 PV 表达, 提高 GABA 含量, 增加 GABAAR α 1 的结合, 有助于维持 Glu/GABA 代谢平衡。

综上, 愈癲汤可能通过调节海马区及前额叶皮质 Glu/GABA 代谢平衡的关键调控因子, 维持大脑神经元兴奋和抑制之间的平衡状态, 从而改善精神分裂症的病理过程。本研究仅在分子生物学层面探讨神经递质及其受体、关键调控因子的分布和表达。下一步的研究设计中, 我们将增加神经化学成像研究, 对于阐明相关神经代谢物改变的神经发育和病理过程, 以及评估治疗精神分裂症的药物靶标的潜力至关重要。

参考文献

- [1]HUANG YQ, WANG Y, WANG H, et al. Prevalence of mental disorders in China: a crosssectional epidemiological study[J]. *Lancet Psychiatry*, 2019, 6(3): 211-224.
- [2]张馨月, 姚晶晶, 吕一丁, 等. 精神分裂症的发病机制及治疗靶点的研究进展[J]. *国际精神病学杂志*, 2018, 45(2): 201-204.
- [3]贺泰宇, 柴剑波, 白冰, 等. 赵永厚教授痰瘀同治首发精神分裂症临床经验举隅[J]. *中国中医药现代远程教育*

- 育, 2021, 19(7): 74-76.
- [4] 张浩, 高潇, 柴剑波, 等. 愈癲汤治疗痰瘀互结型周期性精神病的临床观察[J]. 中医药信息, 2016, 33(4): 74-75.
- [5] 赵玉萍, 柴剑波, 高潇, 等. 愈癲汤对 MK-801 致精神分裂症模型大鼠 Glu-DA 神经递质系统的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(3): 331-333.
- [6] 白冰, 柴剑波, 王万宇, 等. 基于液相色谱-质谱联用技术探讨愈癲汤对精神分裂症大鼠神经递质含量的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(30): 3317-3321.
- [7] MAYELI A, SONNENSCHNEIN SF, YUSHMANOV VE, et al. Dorsolateral prefrontal cortex glutamate/gamma-aminobutyric acid (GABA) alterations in clinical high risk and first-episode schizophrenia: a preliminary 7-T magnetic resonance spectroscopy imaging study [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(24): 1422-1467.
- [8] SONNENSCHNEIN SF, MAYELI A, YUSHMANOV VE. A longitudinal investigation of GABA, glutamate, and glutamine across the insula during antipsychotic treatment of first-episode schizophrenia [J]. Schizophr Res, 2022, 248: 98-106. doi: 10.1016/j.schres.2022.08.008.
- [9] MATRICON J, BELLON A, FRIELING H, et al. Neuro-pathological and Reelin deficiencies in the hippocampal formation of rats exposed to MAM; differences and similarities with schizophrenia [J]. PLoS One, 2010, 5(4): e10291.
- [10] 胡玲, 胡志斌, 胡筠卿, 等. 精神分裂症动物模型的研究概述[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(2): 145-155.
- [11] 吴秉纯. 医学动物实验基础及基本技术方法[M]. 哈尔滨: 黑龙江人民出版社, 2008: 184.
- [12] SAHA S, GONZALEZ-MAESO J. The crosstalk between 5-HT(2A)R and mGluR2 in schizophrenia [J]. Neuropharmacology, 2023, 230: 1873-7064. doi: 10.1016/j.neuropharm.2023.109489.
- [13] 付丽环, 陈品红, 毛更生. 谷氨酸模型和神经振荡理论与精神分裂症认知损害的研究进展[J]. 国际精神病学杂志, 2020, 47(5): 878-880.
- [14] 颖怡, 吕钦谕, 陆燕华, 等. 谷氨酸受体与精神分裂症治疗的研究进展[J]. 中国医药导报, 2019, 16(22): 42-45, 65.
- [15] BELL TK, CRAVEN AR, HUGDAHL K, et al. Functional changes in GABA and Glutamate during motor learning [J]. eNeuro, 2023, 10(2): 2373-2822.
- [16] YANG Z, ZHU Y, SONG Z, et al. Comparison of the density of gamma-aminobutyric acid in the ventromedial prefrontal cortex of patients with first-episode psychosis and healthy controls [J]. Shanghai Arch Psychiatry, 2015, 27(6): 341-347.
- [17] WU C, SUN D. GABA receptors in brain development, function, and injury [J]. Metab Brain Dis, 2015, 30(2): 367-379.
- [18] 尚彤, 刘娟, 陈小江, 等. 阻断 GABA_A 受体对精神分裂症小鼠认知能力和胼胝体髓鞘超微结构的影响[J]. 神经解剖学杂志, 2018, 34(6): 722-726.
- [19] 施艺, 马天驰, 赵再华, 等. GABA 能神经元光遗传学调控在神经精神疾病研究中的应用[J]. 神经解剖学杂志, 2022, 38(6): 721-724.
- [20] 冯丹妮, 陶虹, 德向研, 等. 癲癇致大鼠岛叶皮层及海马 GABA 能神经元亚型变化的形态学观察[J]. 宁夏医科大学学报, 2013, 35(8): 841-844, 849.
- [21] UEHARA T, SUMIYOSHI T, KURACHI M, et al. New pharmacotherapy targeting cognitive dysfunction of schizophrenia via modulation of gaba neuronal function [J]. Curr Neuropharmacol, 2015, 13(6): 793-801.
- [22] STEINER J, BRISCH R, SCHILTZ K. GABAergic system impairment in the hippocampus and superior temporal gyrus of patients with paranoid schizophrenia: a post-mortem study [J]. Schizophr Res, 2016, 177(1-3): 10-17.
- [23] FÖRSTER A, MODEL V, GOS T, et al. Reduced GABAergic neuropil and interneuron profiles in schizophrenia: complementary analysis of disease course-related differences [J]. J Psychiatr Res, 2021, 145: 50-59. doi: 10.1016/j.jpsychires.2021.11.028.

Effects of *Yudian Decoction* (愈癲汤) on the Metabolic Balance of Glu/GABA in the Brain Tissue of Schizophrenia Model Rats

BAI Bing^{1,2}, CHAI Jianbo^{3,4}, YU Ming³, ZHAO Yonghou³

1. Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou, 311100; 2. Postdoctoral Station of Heilongjiang Mental Hospital; 3. Heilongjiang Mental Hospital; 4. Heilongjiang Research Centre for Mental Health

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Yudian Decoction* (愈癲汤) in the treatment of schizophrenia. **Method** Twenty male offspring from 5 normal female 17-day-pregnant SD rats were selected as blank group. Fifteen female 17-day-pregnant SD rats were injected intraperitoneally with methyl azomethine acetate (MAM) 25 mg/kg, and the male offspring simulated the neurodevelopmental abnormality to establish a rat model of schizophrenia. Sixty successfully-modeled rats were randomly divided into 20 rats in the model group, 20 rats in the

Yudian Decoction group and 20 risperidone group. After 3 days of adaptive cage feeding, the rats in the *Yudian Decoction* group were gavaged with 1.54 g/(kg·d) of *Yudian Decoction*, the risperidone group was gavaged with 0.24 mg/(kg·d) of risperidone capsule, while the blank group and the model group were gavaged with 6.7 ml/(kg·d) of distilled water, once a day, for 14 consecutive days. Sample was collected on the day after the last gavage. The expression of glutamate receptor (GluR) and γ -aminobutyric acid receptor subunit $\alpha 1$ (GABAAR $\alpha 1$)-positive neurons in the hippocampus and prefrontal cortex were detected by immunofluorescence, and the positive rate was calculated; the expression of small clear proteins (PVs) in the hippocampal CA1 region and the medial prefrontal cortex was detected by immunohistochemistry; The expression of glutamic acid decarboxylase 65 (GAD65) and glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67) proteins and mRNAs in the hippocampus and prefrontal cortex were detected by immunoblotting and reverse transcription PCR. **Result** Compared with the blank group, the positive rate of GluR in hippocampal area and prefrontal cortex of rats in the model group increased, the positive rate of GABAAR $\alpha 1$ in hippocampal area decreased, the PV optical density value in hippocampal CA1 area and medial prefrontal cortex decreased, and the expression of GAD65, GAD67 proteins and mRNA in hippocampal area and prefrontal cortex decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, GluR positivity rate in hippocampus and prefrontal cortex of risperidone group and *Yudian Decoction* decreased, GABAAR $\alpha 1$ positivity rate in hippocampus increased, PV optical density value in hippocampus CA1 area and medial prefrontal cortex increased, and GAD65, GAD67 proteins and mRNA expression in hippocampus and prefrontal cortex increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the risperidone group, the positive rate of GluR in hippocampus and prefrontal cortex and GABAAR $\alpha 1$ in hippocampus in the *Yudian Decoction* group was reduced, the PV optical density value of hippocampal CA1 area was increased, the protein and mRNA expression of GAD67 in hippocampus area was elevated, and the protein expression of GAD65 in prefrontal cortex was reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** *Yudian Decoction* may improve the pathological process of schizophrenia by regulating key regulators of glutamate/ γ -aminobutyric acid (Glu/GABA) metabolic balance in the hippocampus and prefrontal cortex and maintaining the balance between neuronal excitation and inhibition.

Keywords schizophrenia; *Yudian Decoction* (愈癲汤); glutamate; γ -aminobutyric acid; glutamate decarboxylase

(收稿日期: 2023-04-04; 修回日期: 2023-08-16)

[编辑: 邓媛]

广告

欢迎订阅 2024 年《中医杂志》

《中医杂志》(ISSN 1001-1668, CN 11-2166/R)是由中华中医药学会和中国中医科学院主办的全国性中医药综合性学术期刊。创刊以来始终坚持“以提高为主, 兼顾普及”的办刊方针, 是我国中医药界创刊早、发行量大、具有较高权威性和学术影响力的国家级中医药期刊之一, 是中文核心期刊和科技核心期刊、中国精品科技期刊、首届国家期刊奖获得者和中国期刊方阵双奖期刊、新中国 60 年有影响力的期刊、中国百强科技期刊、中国百种杰出学术期刊, 中医药科技期刊分级目录 T1 级期刊。荣获第五届中国出版政府奖期刊奖, 第二届、第三届、第四届中国出版政府奖期刊奖提名奖。

《中医杂志》主要栏目中当代名医和临证心得分别介绍名老中医和临床医生辨证用药治疗疑难病的经验; 临床研究介绍中医药治疗的新方法、新成果; 学术探讨、思路与方法、循证中医药、病例讨论、综述、百家园等栏目, 提供最新学术观点、研究成果与治疗方法, 成为学习中医药、研究中医药, 不断提高临床及研究水平的良师益友。

《中医杂志》为半月刊, 每月 2 日和 17 日出版, 每期定价 40.00 元, 全年 960 元。国内读者可以到全国各地邮局办理订阅手续(邮发代号: 2-698), 也可以与本刊读者服务部联系邮购, 邮购免邮费。电话: 010-64035632, 010-64089195。国外发行: 中国国际图书贸易集团有限公司(北京 399 信箱, 邮编: 100044, 代号: SM140)。

本社地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 邮政编码: 100700。

网址: <http://www.jtcm.net.cn>。

