

DOI 10.19656/j.cnki.1002-2406.20230703

天心解郁方对抑郁模型大鼠的作用及大脑内 CAMP/PKA/CREB/BDNF信号通路的影响

李亚慧¹, 王佳楣¹, 石玥¹, 刘芳¹, 何波琳¹, 杨名²✉

(1. 北京市海淀区妇幼保健院, 北京 100080; 2. 北京市通州区中西医结合医院, 北京 101100)

【摘要】目的:探索天心解郁方对抑郁模型大鼠的作用及大脑内CAMP/PKA/CREB/BDNF信号通路的影响。方法:雄性SD大鼠80只,剔除后随机分为空白组、模型组、天心解郁组、西药组、疏肝组、温肾组和疏肝健脾组7组,每组10只。除空白组外,其余组别按照慢性利血平诱导抑郁模型的方法造模28 d,造模前30 min给药,分别灌胃给药饮用水、天心解郁水煎液、氟西汀溶液、路优泰溶液、巴戟天寡糖胶囊溶液、舒肝解郁胶囊溶液,给药28 d后对各组大鼠的体质量、行为学指标、血清学细胞因子、脑组织相关靶点进行检测。结果:造模28 d后,与模型组相比,天心解郁组旷场实验水平运动得分、垂直运动得分和总路程的增加($P < 0.05$),强迫游泳不动时间的缩短($P < 0.001$),且较温肾组、疏肝组、疏肝健脾组更明显。与模型组相比,天心解郁组和温肾组可以增加大鼠血清内的CAMP含量($P < 0.001$, $P < 0.01$),其余组别则无明显变化($P > 0.05$)。与模型组相比,天心解郁组可以增加皮层内的PKA表达,促进海马内CREB、BDNF、ADRB2蛋白表达。与模型组相比,温肾组可以增加皮层内的PKA水平,其余组别无明显影响。结论:天心解郁方可能通过影响大脑内CAMP/PKA/CREB/BDNF信号通路,发挥抗抑郁作用,较单纯疏肝、温肾或疏肝健脾的方法,疗效更好,治疗靶点更多元化。

【关键词】抑郁症;天心解郁方;CAMP/PKA/CREB/BDNF信号通路;温肾;疏肝

【引用格式】

李亚慧,王佳楣,石玥,等.天心解郁方对抑郁模型大鼠的作用及大脑内CAMP/PKA/CREB/BDNF信号通路的影响[J].中医药信息,2023,40(7):15-22,52.

LI Y H, WANG J M, SHI Y, et al. Effect of Tianxin Jieyu Formula in treatment of depression model rats and its influence to CAMP/PKA/CREB/BDNF signaling pathway of brain [J]. Information on TCM, 2023, 40(7): 15-22, 52.

抑郁症是以显著而持久的思维迟缓、心境低落、意识活动减退为特征的一类心境障碍,具有高患病率、高自杀率、高经济负担的特点^[1]。目前抑郁症的发病机制尚未完全清楚,抗抑郁药的主要作用多为通过不同途径提高神经元突触的单胺类神经递质浓度,以期达到抗抑郁的治疗目的,由于不良反应的产生,有43%的抑郁症患者无法坚持服用抗抑郁药,患者依从性较差^[2]。

中医古籍中记载的“郁证”“百合病”“脏躁”“梅核气”等都与抑郁症表现类似,采用疏肝、健脾、温肾等方法治疗抑郁症,都取得了较好的疗效。近年来研究发现,许多天然药物及中药复方有抗抑郁作用^[3]。天心解郁方是高蕊教授依据温阳散郁、五脏同调的治疗原则并结合其自身丰富的临床经验创制的方剂,前期的临床研究发现,其对轻中度抑郁症总有效率为80.4%,且对中医症状的指标改善明显^[4],对

第一作者简介:李亚慧(1990-),女,住院医师,主要研究方向:抑郁症相关研究。

✉通信作者简介:杨名(1992-),男,主治医师,主要研究方向:抑郁症及乳腺病相关研究。

于慢性利血平导致的抑郁模型大鼠的抗抑郁作用明确,并可以增加大鼠脑内 CREB、BDNF 的含量,促进神经再生^[5]。

目前已经上市的抗抑郁中药新药中,笔者选取了比较有代表性且治疗思路有相似性的三个药物,由巴戟天提取物制成的巴戟天寡糖胶囊,核心治疗思路为温肾,组成温肾组;由贯叶金丝桃提取物制成的路优泰胶囊,其核心治疗思路为疏肝,组成疏肝组;由刺五加和贯叶金丝桃制成的舒肝解郁胶囊,核心治疗思路为疏肝健脾,组成疏肝健脾组;天心解郁方治疗思路为温阳散郁、五脏同调。本实验通过构建慢性利血平诱导的抑郁大鼠模型,对比天心解郁方与上述药物作用疗效及作用靶点的异同,初步探索天心解郁方抗抑郁的作用特色和作用通路,为后期的研究提供基础。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠,7 周龄,体质量 200~210 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司[动物合格证号:SCXK(京)2012-0001]提供,80 只。在恒温(24±2)℃、光照周期 12 h:12 h 的环境中饲养,所有实验动物的流程均符合伦理要求。

1.2 药物

利血平注射液(1 mg/mL,批号:20180105,天津金耀药业有限公司);盐酸氟西汀胶囊(20 mg/粒,批号:20160214,礼来苏州制药有限公司);天心解郁方水煎剂(药物的组成为刺五加 15 g,巴戟天 15 g,郁金 15 g,远志 6 g,贯叶金丝桃 9 g,柏子仁 15 g,五味子 10 g,香附 12 g,莲子心 3 g,法半夏 10 g 和三七 3 g,由中国中医科学院西苑医院制剂中心制成 1.0143 g/mL 水煎液);巴戟天寡糖胶囊(0.3 g/粒,批号:20170523,北京同仁堂股份有限公司);路优泰(300 mg/片,批号:JX20090038,德国威玛舒培博士药厂);舒肝解郁胶囊(0.36 g/粒,批号:20170321,成都康弘药业集团股份有限公司)。

药物剂量换算,以天心解郁方水煎液为例,正常成人每天用量为 113 g,即 1.61 g/kg,用系数转换成大鼠的用药剂量为 $1.61 \times 6.3 = 10.134$ g/kg,大鼠的用药体积为 10 mL/kg,则药物浓度为 1.0143 g/mL,其余药物用药剂量及药物浓度依次换算。

1.3 试剂与溶液

水合氯醛(批号:20190330,北京化工厂);福尔马林(批号:20190401,北京化工厂);大鼠 5-HT(5-羟

色胺)ELISA 检测试剂盒(DG20153D-96T)、大鼠 DA(多巴胺)ELISA 检测试剂盒(DG20080D-96T)、大鼠 CAMP(环磷酸腺苷)ELISA 检测试剂盒(DG20165D-96T)(Dogesce);CREB(环磷酸腺苷效应元件结合蛋白)抗体(GR210487-3)、BDNF(脑源性神经营养因子)抗体(GR210587-2)、PKA(蛋白激酶 A)抗体(GR325214-3)、ADRB2(胰糜蛋白酶)抗体(GR287421-4)(Abcam)。

1.4 仪器

352 型酶标仪、ACB 洗板机(Labsystems Multiskan MS,芬兰);Tissue-TEK TEC 生物组织包埋机、Tissue-TEK VIP6 生物组织脱水机(樱花公司,日本);Leica ST5020 自动染色机、Leica HI1210 捞片仪、Leica CV5030 自动封片仪(徕卡公司,德国);Olympus BX53 显微镜(奥林帕斯公司,美国);Path QC 病理质控和资料管理系统(朗珈公司,中国);TS-1 脱色摇床(太仓市实验设备厂,中国);生物分子成像仪(富士 LAS-4000 MINI,日本);全波长扫描式多功能读数仪(Thermofisher,美国)。

2 方法

2.1 动物分组

适应性喂养 1 周后,进行体质量、行为学测试,剔除旷场活动偏多和强迫游泳时间偏长的大鼠。剩余的大鼠随机分为 7 组,每组 10 只,分别为空白组、模型组、天心解郁组、西药组、疏肝组、温肾组和疏肝健脾组。

2.2 动物造模及给药

除空白组外,其余各组大鼠均按照慢性利血平诱导抑郁动物模型^[6]的方法进行造模,大鼠每天腹腔注射利血平注射液 0.2 mg/kg,造模天数为 28 d,造模的同时给药,造模前 30 min 按照表 1 的剂量给药。

2.3 模型评价

慢性利血平诱导的抑郁模型造模后,模型组大鼠较空白组大鼠体质量明显减轻,旷场实验的水平运动、垂直运动和总路程得分减少,强迫游泳不动时间和悬尾不动时间明显延长,提示抑郁造模成功。

2.4 检测指标

2.4.1 体质量变化的测定

在造模前和实验第 1、7、14、21、28 天分别称取各组大鼠体质量。

2.4.2 行为学指标的测定

在造模前后实验第 28 天(给药后)分别对各组大鼠进行行为学指标的测定。

表1 各组大鼠灌胃药物及浓度

组别	灌胃药物	给药剂量	药物浓度	给药体积	是否造模
空白组	正常饮水	—	—	—	否
模型组	饮用水	—	—	10 mL/kg	是
西药组	氟西汀溶液	2.1 mg/kg	0.21 mg/mL	10 mL/kg	是
天心解郁组	天心解郁水煎液	10.143 g/kg	1.0143 g/mL	10 mL/kg	是
疏肝组	路优泰溶液	0.81 g/kg	0.081 g/mL	10 mL/kg	是
温肾组	巴戟天寡糖胶囊溶液	1.35 g/kg	0.135 g/mL	10 mL/kg	是
疏肝健脾组	舒肝解郁胶囊溶液	2.16 g/kg	0.216 g/mL	10 mL/kg	是

2.4.2.1 旷场实验

参考文献[7],实验在黑暗、安静的房间内进行,距中心正上方1 m处放置1个60 W灯泡,将大鼠置于敞箱中自由活动6 min,运用敞箱上方的摄像头记录后4 min内大鼠的运动情况,水平方向的运动情况即大鼠跨越格子数,垂直方向的运动情况即大鼠抬起两前肢的次数,总路程为两者得分相加的总分。

2.4.2.2 强迫游泳实验

参考文献[8],实验前一天,每只大鼠预游泳15 min,将大鼠放入水温23~25℃的水桶中,取出擦干放回笼中。24 h后再次将大鼠放入水桶中,运用摄像头摄像并记录6 min内后4 min大鼠的不动时间(s),即大鼠在水中停止挣扎呈漂浮状态或仅有偶尔的一个肢体轻微运动的持续时间。

2.4.3 血清细胞因子的检测

实验第29天,大鼠行为学测试后禁食、禁水12 h,第2天麻醉后仰位固定,沿腹白线剪开腹腔,用镊子剥离腹主动脉旁的筋膜组织,注射器从远心端向心刺入,抽取约6 mL血后放入试管中。将血样放入离心机中,3 000 r/min,离心10 min,取上清液-80℃保存待

测。按照ELISA试剂盒要求逐步操作,检测血清中5-HT、DA、CAMP标准曲线及样本浓度。

2.4.4 免疫组化检测

每组大鼠选取6只暴露脑组织,取左侧脑组织放入1%福尔马林溶液中,按步骤进行免疫组化检测CREB、BDNF、ADRB2、PKA。

2.5 统计学方法

应用SPSS 20.0统计软件进行统计分析,所有检验均采用双侧检验,计量资料用均数±标准差来描述,采用方差分析比较组间的差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠体质量变化情况比较

造模第14天,与空白组比较,模型组大鼠体质量明显减轻,与模型组相比,天心解郁组大鼠体质量升高,其余组大鼠体质量无明显变化。造模第21天、第28天,与空白组相比,模型组大鼠体质量明显减轻。与模型组相比,西药组、天心解郁组、温肾组、疏肝组和疏肝健脾组体质量均升高。提示各组药物均能有效恢复大鼠体质量。见表2。

表2 各组大鼠体质量变化情况比较($\bar{x} \pm s, g$)

组别	n	造模前	造模14 d	造模21 d	造模28 d
空白组	10	255.10 ± 9.52	303.67 ± 15.65	324.43 ± 18.48	350.64 ± 18.04
模型组	10	247.80 ± 10.73	271.82 ± 10.39***	272.42 ± 10.27***	277.26 ± 14.87***
天心解郁组	10	247.60 ± 7.79	288.97 ± 15.85 ^{△△}	304.17 ± 9.38 ^{△△△}	322.03 ± 15.99 ^{△△△}
西药组	10	250.10 ± 5.80	281.06 ± 8.18	288.93 ± 9.91 ^{△△}	311.38 ± 9.92 ^{△△△}
温肾组	10	248.90 ± 8.63	276.25 ± 11.60	283.57 ± 9.49 [△]	297.53 ± 13.40 ^{△△}
疏肝组	10	248.30 ± 7.30	277.41 ± 8.21	284.37 ± 6.90 [△]	291.93 ± 15.10 [△]
疏肝健脾组	10	250.40 ± 9.65	270.45 ± 8.43	283.73 ± 8.17 [△]	304.05 ± 8.47 ^{△△△}

注:与空白组比较,*** $P < 0.001$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$,^{△△△} $P < 0.001$ 。

3.2 各组大鼠行为学测试情况比较

3.2.1 各组大鼠旷场实验得分情况比较

与空白组相比,模型组的水平运动得分、垂直运动得分和总路程得分均显著降低。与模型组相比,西药组、天心解郁组、温肾组、疏肝组和疏肝健脾组的水平运动得分、总路程得分均有所升高,疏肝组的垂直运动

运动得分改善不明显。与天心解郁组相比,温肾组、疏肝组和疏肝健脾组的旷场实验各项得分均较低,西药组没有明显差异。提示除疏肝组之外,其余各组药物均可以增加大鼠旷场实验的水平运动、垂直运动和总路程距离,且天心解郁组和西药组作用较好。见表3~5。

表3 各组大鼠水平运动得分比较($\bar{x} \pm s$,分)

组别	n	造模前	给药后
空白组	10	19.90 ± 2.03	17.30 ± 1.70
模型组	10	18.40 ± 2.07	2.70 ± 1.42***
天心解郁组	10	18.40 ± 2.27	9.80 ± 1.75 ^{△△△}
西药组	10	18.70 ± 2.21	8.60 ± 1.58 ^{△△△}
温肾组	10	18.90 ± 2.18	7.10 ± 1.91 ^{△△△□□}
疏肝组	10	19.10 ± 3.00	6.80 ± 1.93 ^{△△△□□□}
疏肝健脾组	10	20.10 ± 2.38	7.90 ± 1.37 ^{△△△□}

注:与空白组比较,*** $P < 0.001$;与模型组比较,^{△△△} $P < 0.001$;与天心解郁组比较,[□] $P < 0.05$,^{□□} $P < 0.01$,^{□□□} $P < 0.001$ 。

表4 各组大鼠垂直运动得分比较($\bar{x} \pm s$,分)

组别	n	造模前	给药后
空白组	10	12.30 ± 2.06	10.00 ± 1.41
模型组	10	11.90 ± 1.97	2.00 ± 1.05***
天心解郁组	10	11.50 ± 2.22	4.50 ± 1.08 ^{△△△}
西药组	10	10.90 ± 2.23	3.80 ± 1.14 ^{△△}
温肾组	10	11.80 ± 2.62	3.20 ± 1.14 ^{△□}
疏肝组	10	12.60 ± 2.63	2.60 ± 0.97 ^{□□}
疏肝健脾组	10	12.50 ± 2.37	3.20 ± 1.32 ^{△□}

注:与空白组比较,*** $P < 0.001$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$,^{△△△} $P < 0.001$;与天心解郁组比较,[□] $P < 0.05$,^{□□} $P < 0.01$ 。

表5 各组大鼠总路程得分比较($\bar{x} \pm s$,分)

组别	n	造模前	给药后
空白组	10	32.20 ± 2.86	23.70 ± 2.45
模型组	10	30.30 ± 2.67	4.70 ± 1.64***
天心解郁组	10	29.90 ± 2.23	14.30 ± 2.00 ^{△△△}
西药组	10	29.60 ± 2.66	12.40 ± 1.71 ^{△△△□}
温肾组	10	30.70 ± 3.47	10.30 ± 2.26 ^{△△△□□□}
疏肝组	10	31.70 ± 3.16	9.40 ± 2.37 ^{△△△□□□}
疏肝健脾组	10	32.60 ± 2.91	11.10 ± 2.08 ^{△△△□□}

注:与空白组比较,*** $P < 0.001$;与模型组比较,^{△△△} $P < 0.001$;与天心解郁组比较,[□] $P < 0.05$,^{□□} $P < 0.01$,^{□□□} $P < 0.001$ 。

表7 各组大鼠血清学细胞因子水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	5-HT/(pg/mL)	DA/(pg/mL)	CAMP/(nmol/L)
空白组	8	47.98 ± 1.06	47.03 ± 1.78	43.45 ± 2.26
模型组	8	19.33 ± 1.64***	20.33 ± 1.82***	21.15 ± 2.21***
天心解郁组	8	25.33 ± 2.96 ^{△△△}	25.33 ± 3.00 ^{△△△}	34.30 ± 3.51 ^{△△△}
西药组	8	34.13 ± 1.20 ^{△△△□□□}	33.73 ± 2.16 ^{△△△□□□}	21.10 ± 3.91
温肾组	8	26.10 ± 1.85 ^{△△△}	25.48 ± 1.87 ^{△△△}	25.40 ± 1.75 ^{△△△}
疏肝组	8	26.40 ± 1.94 ^{△△△}	26.05 ± 1.51 ^{△△△}	21.00 ± 1.81
疏肝健脾组	8	27.55 ± 3.72 ^{△△△}	27.43 ± 4.09 ^{△△△}	21.58 ± 3.09

注:与空白组比较,*** $P < 0.001$;与模型组比较,^{△△△} $P < 0.01$,^{△△△△} $P < 0.001$;与天心解郁组比较,^{□□□} $P < 0.001$ 。

3.4 各组大鼠大脑内相关靶点表达情况比较

3.4.1 各组大鼠海马内CREB表达的比较

光镜下可见CREB免疫标记阳性表达,免疫阳性细胞在海马区主要集中于CA1和CA3区的齿状回颗粒细胞和锥体细胞,反应物呈棕褐色,CREB的阳性反应存在于胞核,细胞浆和树突不着色。见图1。根据染色面积

3.2.2 各组大鼠强迫游泳不动时间情况比较

与空白组相比,模型组的强迫游泳不动时间显著延长。与模型组相比,西药组、天心解郁组、温肾组和疏肝健脾组的强迫游泳不动时间有所缩短,而疏肝组无明显变化。与天心解郁组相比,温肾组、疏肝组和疏肝健脾组的强迫游泳不动时间较长,西药组无明显差异。提示除疏肝组之外,其余药物都可以缩短抑郁大鼠强迫游泳不动时间,天心解郁组和西药组效果更好。见表6。

表6 各组大鼠强迫游泳不动时间比较($\bar{x} \pm s$,s)

组别	n	造模前	给药后
空白组	10	51.40 ± 11.04	71.40 ± 11.04
模型组	10	49.50 ± 8.21	132.40 ± 8.34***
天心解郁组	10	45.80 ± 10.10	107.80 ± 8.60 ^{△△△}
西药组	10	52.50 ± 9.72	110.70 ± 7.63 ^{△△△}
温肾组	10	49.90 ± 9.43	123.10 ± 5.71 ^{△□□□}
疏肝组	10	53.60 ± 11.48	130.60 ± 10.18 ^{□□□}
疏肝健脾组	10	50.20 ± 9.13	121.20 ± 5.22 ^{△△□□}

注:与空白组比较,*** $P < 0.001$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$,^{△△△} $P < 0.001$;与天心解郁组比较,^{□□} $P < 0.01$,^{□□□} $P < 0.001$ 。

3.3 各组大鼠血清学细胞因子水平比较

与空白组相比,造模后模型组大鼠血清内的5-HT、DA、CAMP的水平明显降低。与模型组相比,西药组、天心解郁组、疏肝组、温肾组和疏肝健脾组大鼠血清的5-HT、DA水平明显升高。与模型组相比,天心解郁组和温肾组血清内的CAMP水平明显升高。与模型组相比,西药组、疏肝组、疏肝健脾组血清内的CAMP水平无明显变化。各组药物可以增加血清中的5-HT和DA的含量,且氟西汀最为明显。天心解郁方和温肾组可以增加血清内的CAMP含量。见表7。

和强度计算IOD值可知,与空白组相比,模型组海马内的CREB含量明显降低。与模型组相比,西药组和天心解郁组海马内的CREB含量明显升高,而温肾组、疏肝组和疏肝健脾组海马内的CREB含量则无明显变化。提示抑郁大鼠海马内的CREB含量明显降低,西药组和天心解郁组可以显著增加海马内的CREB含量。见图2。

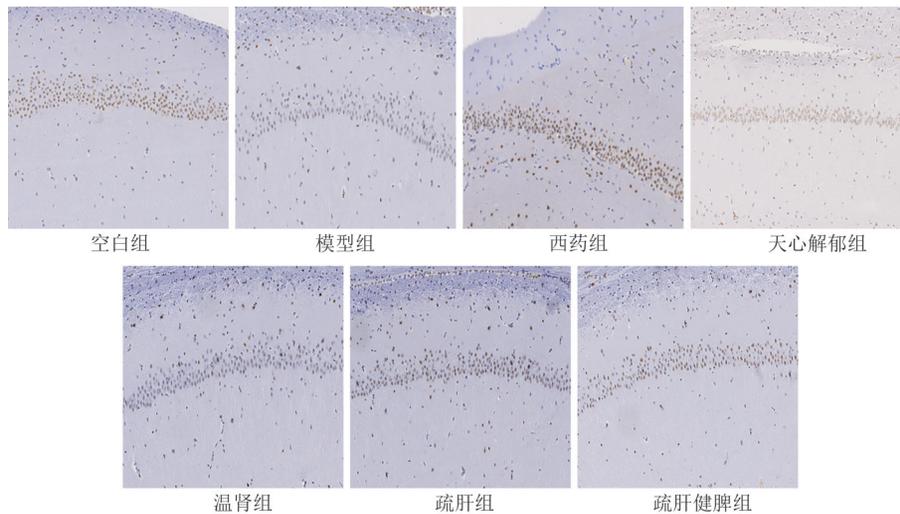
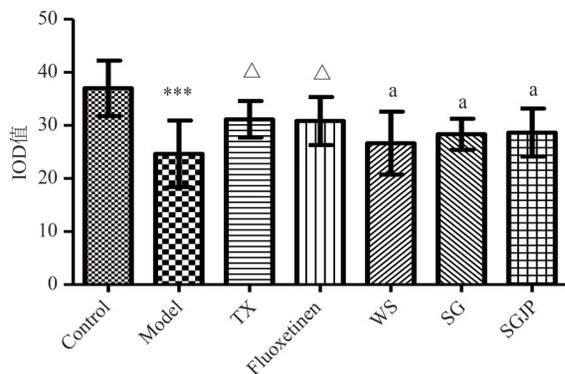


图1 各给药组对抑郁大鼠海马内CREB表达的影响(×200)



注:Control为空白组;Model为模型组;TX为天心解郁组;Fluoxetine为西药组;WS为温肾组;SG为疏肝组;SGJP为疏肝健脾组。与空白组比较,*** $P < 0.001$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,^a $P > 0.05$ 。

图2 大鼠海马内CREB的含量比较

3.4.2 各组大鼠海马内BDNF、ADRB2表达的比较

光镜下可见BDNF和ADRB2免疫标记阳性表达,且免疫阳性细胞在海马区主要集中于CA1和CA3区的

齿状回颗粒细胞和锥体细胞,反应物呈棕褐色,BDNF、ADRB2的阳性反应存在于细胞浆和树突中,胞核不着色。根据染色面积和强度计算IOD值可知,与空白组相比,模型组海马内的BDNF含量明显降低。与模型组相比,西药组和天心解郁组、温肾组、疏肝健脾组海马内的BDNF含量明显升高,而疏肝组海马内的BDNF含量则无明显变化。与天心解郁组相比,温肾组、疏肝组、疏肝健脾组海马内的BDNF含量明显较少,西药组则无明显变化。提示抑郁大鼠海马内的BDNF水平降低,西药组、天心解郁组、温肾组、疏肝健脾组可以显著增加海马内的BDNF含量。见图3、图4。与空白组相比,模型组海马内的ADRB2含量明显降低。与模型组相比,天心解郁组海马内的ADRB2含量明显恢复,而西药组、温肾组、疏肝组和疏肝健脾组则无明显变化。提示抑郁大鼠海马内的ADRB2表达降低,天心解郁方可以显著增加海马内的ADRB2含量。见图5、图6。

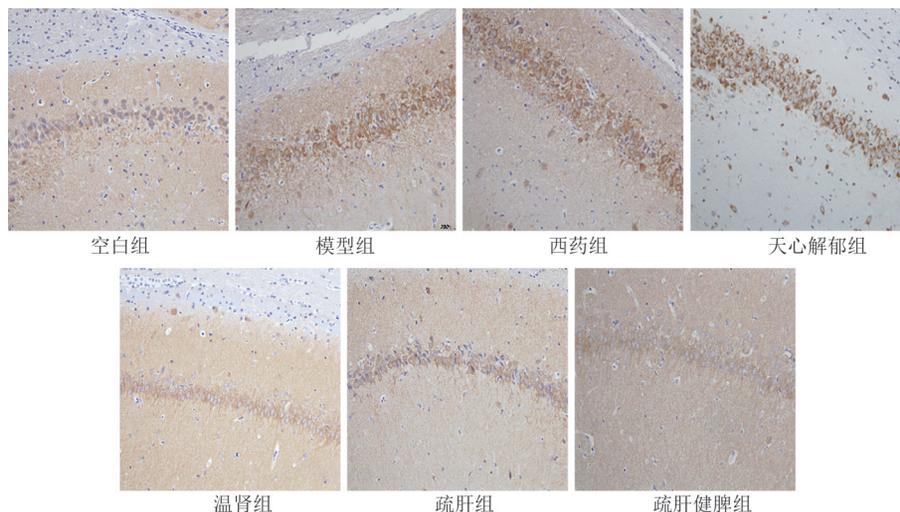
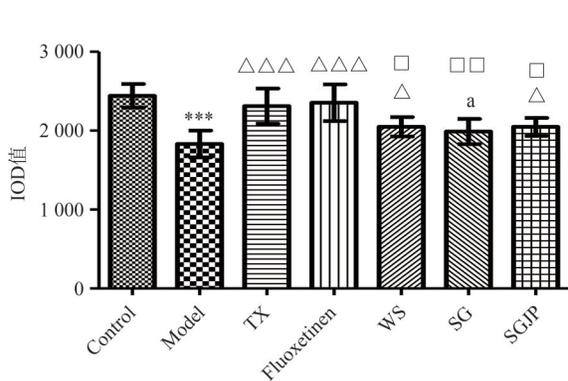
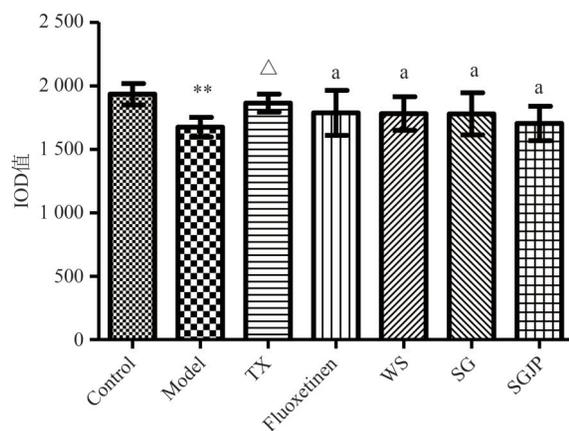


图3 各组大鼠海马内BDNF免疫组化图(×200)



注:Control为空白组;Model为模型组;TX为天心解郁组;Fluoxetine为西药组;WS为温肾组;SG为疏肝组;SGJP为疏肝健脾组。与空白组比较,*** $P < 0.001$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.001$,△△△ $P > 0.05$;与天心解郁组比较,□ $P < 0.05$,□□ $P < 0.01$ 。

图4 各组大鼠海马内BDNF的含量比较



注:Control为空白组;Model为模型组;TX为天心解郁组;Fluoxetine为西药组;WS为温肾组;SG为疏肝组;SGJP为疏肝健脾组。与空白组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△ $P > 0.05$ 。

图5 各组大鼠海马内ADRB2的含量比较

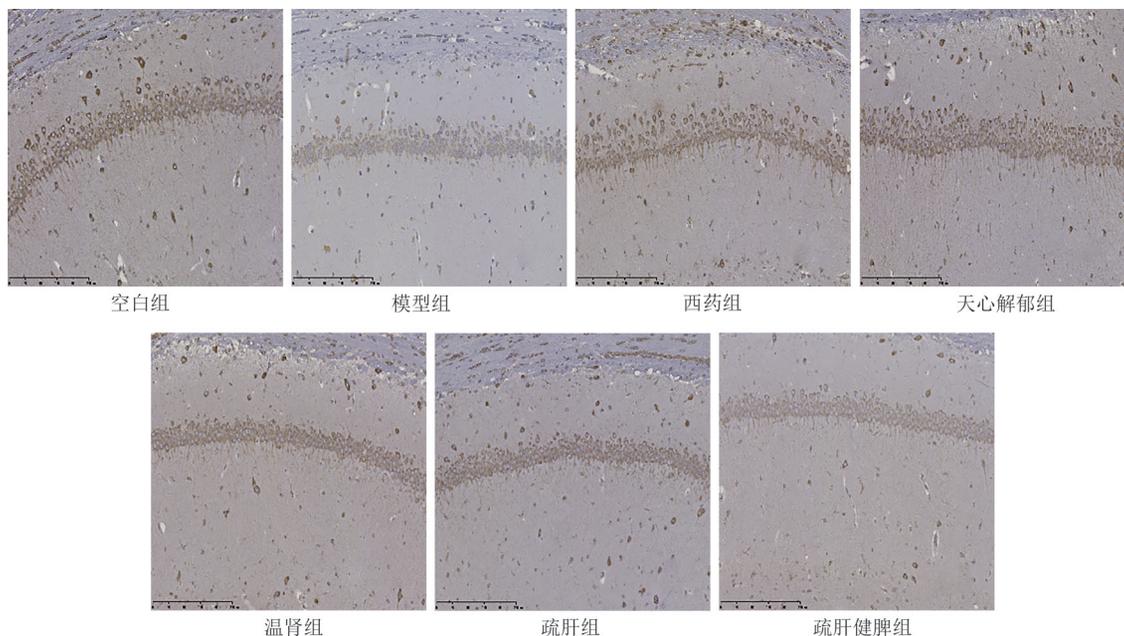
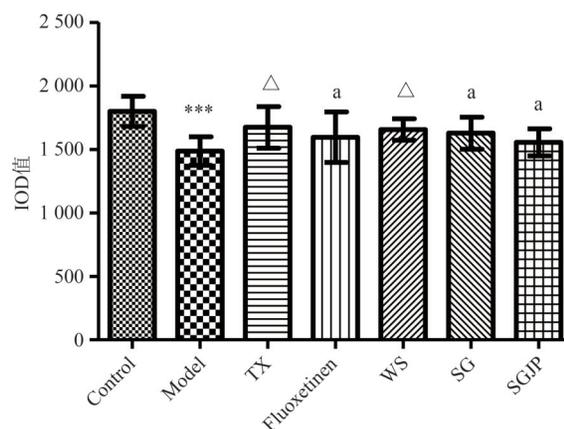


图6 各组大鼠海马内ADRB2免疫组化图(×200)

3.4.3 各组大鼠皮层内PKA表达的比较

光镜下可见PKA免疫标记阳性表达,免疫阳性细胞在皮层区主要集中于神经元和神经元轴突、树突,反应物呈淡黄色或棕黄色,反应物呈棕褐色。根据染色面积和强度计算IOD值可知,与空白组相比,模型组海马内的PKA含量明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.001$)。与模型组相比,天心解郁组和温肾组皮层内的PKA含量明显升高($P < 0.05$),而西药组、疏肝组和疏肝健脾组海马内的PKA含量则无明显变化($P > 0.05$)。提示抑郁大鼠皮层内的PKA含量明显降低,天心解郁组和温肾组可以显著增加皮层内的PKA含量。各组大鼠皮层内PKA免疫组化图和含量比较情况见图7、图8。



注:Control为空白组;Model为模型组;TX为天心解郁组;Fluoxetine为西药组;WS为温肾组;SG为疏肝组;SGJP为疏肝健脾组。与空白组比较,*** $P < 0.001$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△ $P > 0.05$ 。

图7 各组大鼠皮层内PKA的含量比较

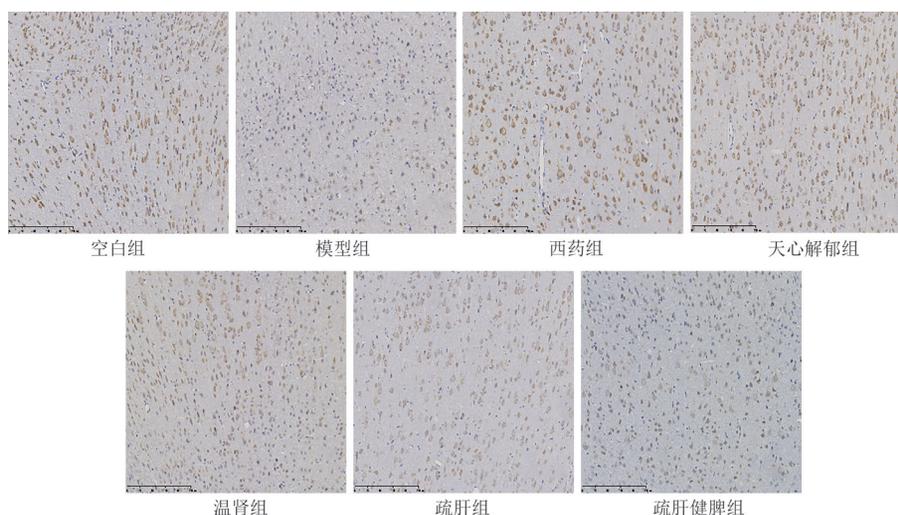


图8 各组大鼠皮层内PKA免疫组化图(×200)

4 讨论

天心解郁方以温阳散郁、五脏同调、五志共济为治则。阳虚气郁、五脏失调是抑郁症发生的重要病机。基于中医五行相关理论,肾阳虚则肝木不能舒达,导致肝郁气滞,出现胁胀、易怒等症状;肝郁日久、郁而化火,使心火亢盛,出现失眠、心悸等症状;木盛克土、肝病及脾,使脾土受损,出现忧思、纳呆等症状;土不生金、心火克金,使肺金不足,出现忧郁、悲伤等症状;肺金被克、金不生水,进一步加重肾虚,出现懒言、畏寒、情绪低落等症状,进而影响脑的功能,导致抑郁症的发生。阳虚气郁日久会影响气血运行,出现瘀血、痰浊等病理产物。高蕊教授以温阳散郁、五脏同调为抑郁症的重要治法,同时关注瘀血、痰浊的治疗,标本兼顾,创立了天心解郁方。

天心解郁方以五脏神理论为支撑,调五脏即可安五神,基于中医“形与神俱”整体观下的五脏同调,五志共济。除五脏同调的思想外,取贯叶金丝桃、香附、三七疏肝以安魂散怒,柏子仁、莲子心清养心以宁神持喜,法半夏、刺五加健脾而定意省思,五味子、半夏摄气归元以藏魄化悲,远志、巴戟天温肾而定志除恐,此乃五志共济之意。

近年来,CAMP作为机体的第二信使,参与了多种生理以及病理过程,具有促进激素分泌、调节神经激素等多种功能^[9]。CAMP信号通路涉及的神经可塑性假说得到越来越多的关注,CAMP增强了大脑特定部位的PKA活性,PKA广泛分布在神经系统中从而激活下游信号通路的转录反应^[10],而CREB就是被磷酸化的转录因子,CREB作为细胞内与抑郁症相关信号通路中的一个交汇点,能够调节多种神经系统功能,进一步调节BDNF因子的活性,从而改变外界细胞对刺激的

反应^[11]。多项研究表明,抑郁大鼠脑内的PKA、CREB和BDNF含量明显降低^[12],而抗抑郁药物可以促进CAMP的激活,增加PKA、CREB和BDNF的活性^[13]。综上,抑郁症患者可能的发病机制为CAMP信号通路下调,PKA活性减弱进而不能有效促进靶蛋白的磷酸化,而使得CREB、BDNF的水平降低,大脑神经元的变性坏死增多,细胞排列不规律,细胞层数明显减少^[14-15]。

与模型组相比,天心解郁方可以增加血清中的CAMP水平,增加海马内ADRB2以及皮层的PKA表达,促进海马内CREB和BDNF的表达。因此笔者推测天心解郁方可能通过上调CAMP/PKA/CREB/BDNF信号通路而发挥抗抑郁作用。

实验结果提示,各给药组均可以有效对抗抑郁造模造成的体质量减轻,恢复大鼠对外界的探索能力,缩短大鼠的绝望不动时间,对抗利血平造模造成的单胺类递质耗竭,增加海马神经细胞数,可以有效对抗利血平注射导致的大鼠抑郁状态。且天心解郁方在改善旷场实验得分和缩短强迫游泳不动时间方面,抗抑郁效果优于温肾组、疏肝组和疏肝健脾组。

温肾组可以增加血清中的CAMP水平,增加皮层内PKA含量,疏肝组和疏肝健脾组对各靶点没有明显作用。天心解郁组除对上述靶点有作用外,还可以增加海马内的BDNF和CREB的水平,促进海马内ADRB2的水平,其作用靶点较温肾组、疏肝组、疏肝健脾组更多元化,作用通路更丰富。

本实验研究验证了天心解郁方对CAMP/PKA/CREB/BDNF信号通路的作用,并初步探索了天心解郁方的作用特色,为后期的进一步探索其抗抑郁作用机制的研究提供了方向。但实验仍有一些不足,如本实

验虽设置了一些已上市中药作为对比,但设置组别仍不全面;本实验对天心解郁方的作用机制探索是基于目前的最新研究进展和前期的实验基础,不能全面阐释其抗抑郁作用机制等,后期可以增加对照药物扩大对照组别、增加网络药理学探索等方式探明作用机制。

【参考文献】

[1] OTTE C, GOLD S M, PENNINX B W, et al. Major depressive disorder [J]. *New England Journal of Medicine*, 2008, 358 (17) : 1869.

[2] GAO X, ZHU Q, GU W. Prediction of glycosaminoglycan synthesis in intervertebral disc under mechanical loading [J]. *Journal of Biomechanics*, 2016, 49(13): 2655 – 2661.

[3] 张潇,田俊生,刘欢,等. 抗抑郁中药新药研发进展[J]. *中国中药杂志*, 2017(42): 29 – 33.

[4] 李亚慧. 抑郁症的文献研究与天心解郁方的实验研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2020: 6 – 7.

[5] 李亚慧,杨斌,高蕊. 天心解郁方对抑郁模型大鼠大脑内 CREB、BDNF 及神经再生的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2021 (4) : 2290 – 2293.

[6] ANTKIEWICZ M L, WSIK A, MO E E, et al. Antidepressant – like effect of tetrahydroisoquinoline amines in the animal model of depressive disorder induced by repeated administration of a low dose of reserpine: behavioral and neurochemical studies in the rat [J]. *Neurotoxicity Research*, 2015, 26(1): 85 – 98.

[7] ZANO T A, MOFFA A H, SHIOZAWA P, et al. Impact of two or less missing treatment sessions on tDCS clinical efficacy: results from a factorial, randomized, controlled trial in major depression [J]. *Neuromodulation*, 2014, 17(8) : 737 – 742.

[8] SAEKI K, YUO A, TAKAKU F. Cell – cycle – regulated phosphory-

lation of CAMP response element – binding protein: identification of novel phosphorylation sites [J]. *Biochemical Journal*, 2018, 338(1) : 49 – 54.

[9] 王睿,黄树明. 抑郁症发病机制研究进展[J]. *医学研究生学报*, 2014(12): 1332 – 1336.

[10] YE Y L, KAI Z, DAN D L, et al. Huanglian – Jie – Du – Tang extract ameliorates depression – like behaviors through BDNF – TrkB – CREB Pathway in rats with chronic unpredictable stress [J]. *Evidence – Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 17(1): 1 – 13.

[11] RAY M T, SHANNON W C, WEBSTER M J. Decreased BDNF and TrkB mRNA expression in multiple cortical areas of patients with schizophrenia and mood disorders [J]. *Transl Psychiatry*, 2016, 4(5): 389 – 395.

[12] YANG B, WANG Z, SHENG C, et al. Evidence – based review of oral traditional Chinese medicine compound recipe administration for treating weight drop – induced experimental traumatic brain injury [J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 16 (1) : 95 – 102.

[13] HOSANG G M, SHILES C, TNSEY K E, et al. Interaction between stress and the BDNF Val66Met polymorphism in depression: a systematic review and meta – analysis [J]. *Comprehensive Psychiatry*, 2014, 12(1): 7 – 14.

[14] QI Q, LI R, LI H Y, et al. Identification of the anti – tumor activity and mechanisms of nuciferine through a network pharmacology approach [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2016, 37 (7) : 963 – 972.

[15] AN J, YANG H, ZHANG Q, et al. Natural products for treatment of osteoporosis: The effects and mechanisms on promoting osteo – blast – mediated bone formation [J]. *Life Sci*, 2016, 147(2) : 46 – 58.

(收稿日期: 2022 – 10 – 22)

Effect of Tianxin Jieyu Formula in Treatment of Depression Model Rats and Its Influence to CAMP/PKA/CREB/BDNF Signaling Pathway of Brain

LI Yahui¹, WANG Jiamei¹, SHI Yue¹, LIU Fang¹, HE Bolin¹, YANG Ming^{2✉}

(1. *Beijing Haidian District Maternal and Child Care Hospital, Beijing 100080, China;*

2. *Tongzhou District Integrated Hospital of Traditional Chinese and Western Medicine, Beijing 101100, China)*

【Abstract】 Objective: To explore the effect of Tianxin Jieyu Formula in treatment of depression model rats and its influence to CAMP/PKA/CREB/BDNF signaling pathway of brain. Methods: 80 male SD rats were randomly divided into the blank group, the model group, the Tianxin Jieyu group, the western medication group, the Shugan (soothing Liver) group, the Wenshen (warming Kidney) group and the Shugan Jianpi (soothing Liver and strengthening Spleen) group after exclusion, with 10 rats in each group. Except for the blank group, the rest groups were established depression model according to the method of Reserpine chronic induction for 28 days, the advanced interventions of drinking water, Tianxin Jieyu Decoction, Fluoxetine Solution, Luyote Solution, Morinda Officinalis Oligose (MOO) Capsule and Shugan Jieyu Capsule were given 30 minutes before each modeling, respectively. After 28 days of administration, body weight, behavioral indexes, serum cytokines and brain tissue targets were detected in each group. Results: After 28 days of intervention, compared with the model group, the horizontal motion score, the vertical motion score and the

(下转第 52 页)

analysis. Results: The HPLC fingerprints of cultivated *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* with different soil quality and growth years matched 24 common peak components, and the similarity between samples was 0.917–0.991. The results of 3D mapping analysis showed that the quality of cultivated *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* in different soil quality and growth years was ranked as 3-year sandy land, 5-year sandy land, 3-year land, 4-year sandy land, 5-year land and 4-year land in order, and the quality of cultivated *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* in sandy land was significantly higher than that in land. The results of cluster analysis could completely distinguish the cultivated *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* samples with different soil quality and growth years. Conclusion: The HPLC fingerprint of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* combined with the chemometrics analysis method is stable and reliable, which can be applied to the quality evaluation of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* and the exploration of potential markers.

【Key words】 Different soil quality; Length of growth; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; Content determination; Chemometrics; Quality evaluation

(上接第22页)

total distance of open field experiment were increased ($P < 0.05$), and the forced swimming immobility time was shortened in the Tianxin Jieyu group ($P < 0.001$); of which the improvements in the Tianxin Jieyu group were more significant than those in the Wenshen group, the Shugan group and the Shugan Jianpi group. Compared with those in the model group, the serum content of CAMP was increased in the Tianxin Jieyu group and the Wenshen group ($P < 0.001$, $P < 0.01$); however there was no change in serum content of CAMP in the other groups ($P > 0.05$). Compared with those in the model group, the PKA expression in cortex was increased and the protein expressions of CREB, BDNF and ADRB2 in hippocampus were promoted in the Tianxin Jieyu group; compared with that in the model group, the PKA expression in cortex was increased in the Wenshen group; there were no significant changes in the PKA expression and the protein expressions of CREB, BDNF and ADRB2 in the other groups. Conclusion: Tianxin Jieyu Formula can play the role in anti-depression through influencing CAMP/PKA/CREB/BDNF signaling pathway. Its effect is better than single application of soothing Liver, warming Kidney or soothing Liver and strengthening Spleen, with its multiple treatment targets.

【Key words】 Depression; Tianxin Jieyu Formula; CAMP/PKA/CREB/BDNF signaling pathway; Warming Kidney; Soothing Liver