

· 药理研究 ·

逍遥散对抑郁大鼠海马 CA1 区 PI3K/AKT
信号通路的调节作用研究周雪明^{1,2}, 尹雅静¹, 常卓¹, 柳晨玥³, 邓贺¹, 梁碧月¹, 谭曾德⁴, 隋方宇^{1*}

(1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 北京中医药大学, 北京 100029; 3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 4. 黑龙江中医药大学附属第一医院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘 要:目的:本研究旨在探讨逍遥散通过调节 PI3K/Akt 信号通路进而改善由谷氨酸引起的兴奋性损伤的机制。方法:100 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、逍遥散组和氟西汀组,利用 CUMS 方法造模成为抑郁模型大鼠,上述组别分别予以双蒸水、双蒸水、逍遥散药液、氟西汀溶液连续灌胃 3 周,后进行行为学观察及相关指标检测。采用旷场试验(OFT)和蔗糖偏好试验(SPT)评价逍遥散的抗抑郁作用;ELISA 法测定海马组织中 5-HT/NE 水平;比色法检测各组大鼠海马 CA1 区谷氨酸水平;RT-qPCR 检测海马 CA1 区 NR2B、PI3K 的 mRNA 水平;western blot 检测海马 CA1 区 NR2B、PI3K、P-AKT、Akt 的蛋白表达。结果:逍遥散的体内干预可显著提高抑郁模型大鼠海马组织中的 5-HT/NE 水平、降低海马 CA1 区谷氨酸水平、增加了海马 CA1 区 NR2B、PI3K 及 P-AKT/Akt 比值,显著改善了大鼠的抑郁症状。结论:逍遥散可显著改善经慢性应激刺激后大鼠的抑郁样行为,其机制可能与降低谷氨酸兴奋性毒性,从而提高 PI3K/Akt 信号通路活性有关。

关键词:抑郁症;逍遥散;PI3K/Akt;谷氨酸**中图分类号:**R285.5**文献标识码:**A**文章编号:**1002-2392(2022)01-0012-06**DOI:**10.19664/j.cnki.1002-2392.220004

抑郁症是临床常见的精神疾病之一,主要表现为长期情绪低落和快感缺失等症状,根据世界卫生组织的最新统计数字,每年有近 80 万抑郁症患者死于自杀,抑郁症已经成为世界第三大疾病负担,并预测 2030 年将成为世界第一大疾病负担^[1]。基于藏象理论中“肝主疏泄,调畅情志”的观点,中医学多从“肝”论治情志疾病,包括抑郁症。逍遥散始载于《太平惠民和剂局方》,具有疏肝健脾之效,对情志疾病的治疗具有显著疗效。课题组前期研究发现逍遥散能降低抑郁大鼠海马组织中的谷氨酸水平,而谷氨酸是介导大部分中枢神经兴奋性的传导中枢^[2]。N-甲基-D-天门冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)是一类

离子型谷氨酸受体,研究表明 NMDA 受体所触发的信号通路中,磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)信号通路在介导突触可塑性、参与神经发生、损伤后修复等过程发挥重要作用^[3]。本研究选用慢性不可预知温和应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)法诱导建立抑郁大鼠模型,探讨逍遥散对谷氨酸和 PI3K/Akt 信号通路的调节作用。

1 材料

1.1 动物

实验用 SD 雄性大鼠 100 只,体质量(200±20)g,于北京中医药大学 SPF 级动物实验室进行饲养,温度(20±1)℃,相对湿度(60±10)%,每日 12 h 光/暗周期,自由摄食饮水,适应性喂养 1 周后开始进行实验。实验动物均购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号 SCXK(京)2016-0038。本实验已通过北京中医药大学动物伦理委员会批准(BUCM-4-2017051015-2015)。

1.2 药物

逍遥散由柴胡、白芍、当归、炒白术、茯苓、炙甘草、

收稿日期:2021-00-00 **修回日期:**2021-00-00**基金项目:**国家自然科学基金青年科学基金项目(81803999);中国博士后科学基金(2017M610067);黑龙江省中医管理局项目(ZHY19-071)**作者简介:**周雪明(1981-),女,博士,副教授,硕士研究生导师,专业:中医证候的生物学基础研究。*** 通讯作者:**隋方宇(1983-),女,博士,讲师,主要研究方向:中药学。

薄荷、生姜组成,按照药物比例 5:5:5:5:5:4:1:5 进行配比调制。药物饮片购自北京同仁堂(亳州)饮片有限责任公司,由九芝堂股份有限公司按照《中国药典 2015 年版》的流程进行制备,放入 4℃ 冰箱备用;盐酸氟西汀分散片(百忧解,法国 Lilly 公司,批号 9492AA)。

1.3 试剂

谷氨酸检测试剂盒(BioAssay Systems, EGLT-100);5-HT 检测试剂盒(TSZ biological Trade Co., Ltd,货号 CSB-E08364r);NE 检测试剂盒(TSZ biological Trade Co., Ltd,货号 CSB-E07022r),PI3K 抗体(Proteintech,货号 60225-1-Ig);Akt 抗体(Abcam,货号 ab238477);P-AKT 抗体(Abcam,货号 ab81283);MAP2 抗体(Abcam,货号 ab5392);NR2B 抗体(Affinity,货号 AF6426)。

1.4 仪器

酶标仪(Biotek,型号 Epoch2);实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Red,型号 CFX96);梯度 PCR 仪(Bio-Red,型号 T100);大鼠脑切片模具(Zivic Instrument,BSRAS001-1);凝胶成像仪(Bio-Red)等。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

将 100 只雄性大鼠适应性饲养 7 d,称量后剔除体质量增长速度缓慢、过快的大鼠,旷场实验后剔除过于安静、活跃的大鼠,余下大鼠按照体质量进行标号,根据随机数字表法分为正常组、模型组、逍遥散组和氟西汀组。除正常组外的各组进行 CUMS 抑郁大鼠模型的制备:①24 h 禁水,②24 h 禁食,③45℃ 热烘 5 min,④24 h 潮湿垫料,⑤45° 笼具倾斜 17 h,⑥17 h 白噪声,⑦24 h 昼夜颠倒,⑧1 min 夹尾,⑨3 h 行为限制。上述刺激方式随机于 21 d 内每日选取 1 种,并连续 2 d 内不采用相同的刺激方式。每日观察大鼠的活动、进食情况、对刺激的应激反应,为造模成功标准提供参考。造模成功后,不同组别予以不同给药方案灌胃:逍遥散组(逍遥散生药 2.224 g/kg/d)、氟西汀组(氟西汀生药 2 mg/kg/d)、模型组(与逍遥散组等体积双蒸水)、正常组(与逍遥散组等体积双蒸水)灌胃。连续 3 周灌胃后(给药过程中仍进行 CUMS 刺激,操作方法与上述造模方法相同),通过体质量检测、行为学检测(糖水偏嗜实验、旷场实验)对各组大鼠进行评估。

2.2 糖水偏嗜实验(SFT)

于造模前一天、造模成功后和给药结束后进行 SFT。实验开始前 72 h 对大鼠进行适应性训练。第 1 日每笼放置 2 个外观、体积相同并均装有 1% 的蔗糖水的水瓶,第 2 日将其中一瓶糖水换为等体积双蒸水。禁食、水 24 h 后给予每只大鼠相同外观、体积的 1% 蔗糖水和双蒸水,1 h 后取走水瓶并称重。根据公式“糖

水偏嗜率(%) = 糖水摄入量 / (糖水摄入量 + 普通水摄入量) × 100%”计算各组大鼠的糖水偏嗜率,可反映大鼠快感缺失的程度。

2.3 旷场实验(OFT)

于造模成功后、给药结束后进行 OFT。将大鼠放置于一个正上方带有高清摄像头,体积为 100 cm × 100 cm × 50 cm 的黑色敞箱中,摄像头可拍摄大鼠在旷场箱中自由探索 5 min 的轨迹视频。每只大鼠探索结束后,用 75% 的乙醇清洗底部和四周。实验结束后,视频用 Etho Vision 3.0 软件分析计算大鼠在中央区停留时间和总的运动距离,可评估大鼠的行为活动。

2.4 体质量检测

于实验第 0 天(实验前),实验 1 周、2 周、3 周(造模成功后)、4 周、5 周、6 周(给药结束后)分别对各组大鼠进行称体质量并记录。

2.5 摄食量测定

于实验开始后,监测各组每日、每周(连续 6 周)的摄食量。每日摄食量 = 给予食量 - 剩余食量,每周摄食量 = 每周给予摄食量 - 每周剩余食量。

2.6 (酶联免疫吸附法)ELISA 检测海马组织中 NE、5-HT 水平

行为学检测结束后处死各组大鼠,留取海马组织。将海马组织块清洗后加入 PBS,使用超声破碎仪将海马组织匀浆,匀浆液离心(5 000 r/min,5 min)后留取上清液进行检测。NE 稀释为 400 pg/mL、200 pg/mL、100 pg/mL、50 pg/mL、25 pg/mL,5-HT 稀释为 240 pg/mL、120 pg/mL、60 pg/mL、30 pg/mL、15 pg/mL。余步骤按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

2.7 比色法检测大鼠海马 CA1 区谷氨酸浓度

行为学检测结束后处死各组大鼠,冰面取脑后使用成年大鼠脑切片模具将脑组织切片(厚度 1.0 mm),在解剖显微镜下取海马 CA1 区组织,冻存于 -80℃ 低温冰。取 15 mg 海马 CA1 区组织加入 PBS,超声裂解样本后离心(14 000 r/min,10 min)取上清液,冻存于 -80℃ 箱中待测。配制 600 μL 2.5 mmol/L 谷氨酸预混合溶液 Premix,稀释后转移至透明底的 96 孔板孔中。每孔加入不同工作液后,记 OD 值检测,最后根据公式计算谷氨酸实际浓度。

2.8 (实时定量 PCR 法)RT-qPCR 检测 NR2B、PI3K 的 mRNA 水平

取适量海马 CA1 区组织加入 Trizol 研磨后提取总 RNA,测定 RNA 浓度及纯度后合成 cDNA。以反应条件 95℃ 预变性 10 min,95℃ 变性 15 s,60℃ 退火 60 s,40 个循环进行 RT-PCR 检测,所得 CT 值采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行计算。PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列	
PI3K	Forward	AAAGTTTCAGGCAGCACTGG
	Reverse	TCGTTGTGCCTGTCACCTAT
NR2B	Forward	TGCTCAACTACATGGCTGGA
	Reverse	AAGCAAAGACCTTGCCACTG
GAPDH	Forward	CCATTCTTCCACCTTTGAT
	Reverse	TGGTCCAGGGTTTCTTACT

2.9 Western blot (蛋白免疫印迹) 法测定 NR2B、PI3K、P-AKT、Akt 的蛋白表达

取 100 mg 海马 CA1 区组织加 500 μL RIPA 蛋白裂解液,用超声破碎匀浆后离心 (12 000 rmp/min, 15 min) 取上清液待测。以 12 000 rmp/min 的转速 4 ℃ 离心 15 min。留取总蛋白后根据 BCA 法检测总蛋白的浓度,计算蛋白的上样量。SDS-PAGE 电泳,转膜放入 5% BSA 的平皿中,室温封闭 2h。转移至用 5% 脱脂奶粉稀释的一抗 PI3K (1:3 000)、Akt (1:1 000)、P-AKT (1:4 000)、NR2B (1:1 000) 和 β-actin (1:5 000) 多克隆抗体中,4 ℃ 过夜孵育。TBST 清洗 3 次后将膜加入辣根酶标记的山羊抗兔的二抗 (1:5 000),室温 2 h 孵育。TBST 洗 3 次,TBS 洗 1 次。在 ChemiDoc MP Imaging System 成像仪中用高灵敏度化学发光显色试剂盒进行化学发光反应并拍照保存。用

Image J 2.0 软件进行各条带灰度值分析,目标蛋白的相对含量以目标蛋白/β-actin 蛋白灰度值的比值作为统计实验数据。

2.10 统计学分析

采用 SPASS 20.0 进行数据统计,所有实验数据采用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。数据资料满足正态分布且方差齐时采用 ANNOVA 分析,符合正态分布但方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验,不符合正态分布采用 LSD 法进行组间比较。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 实验结果

2.1 逍遥散改善抑郁模型大鼠抑郁行为

2.1.1 旷场实验

6 周 CUMS 造模和给药后各组大鼠 OFT 实验运动轨迹发生改变,见图 1。6 周 CUMS 造模改变了大鼠在旷场实验的中央区停留时间和运动总距离,见表 2。模型组与正常组比较中央区停留时间减少,有统计学差异 ($P < 0.05$)。逍遥散组、氟西汀组大鼠在中央区停留时间多于模型组,和模型组比较均有统计学意义 ($P < 0.05$)。模型组大鼠运动总距离短于正常组,和正常组比较有统计学意义 ($P < 0.05$)。逍遥散组、氟西汀组大鼠在中央区停留时间多于模型组,与模型组比较均有统计学意义 ($P < 0.05$)

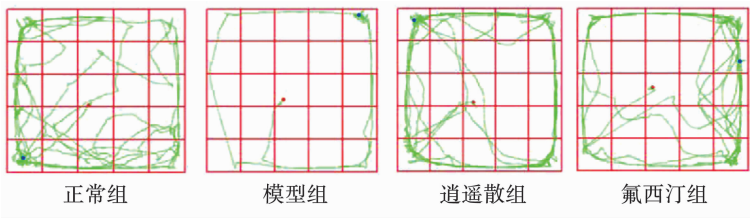


图 1 各组大鼠 OFT 实验运动轨迹图

表 2 各组大鼠中央区停留时间和运动总距离 ($n = 25, \bar{x} \pm s$)

组别	中央区停留时间 (s)	运动总距离 (cm)
正常组	12.35 ± 1.13	2 257.49 ± 196.22
模型组	4.20 ± 0.68 [#]	1 010.83 ± 202.57 [#]
逍遥散组	10.36 ± 0.60 [*]	2 275.64 ± 218.99 [*]
氟西汀组	10.35 ± 1.27 [*]	2 048.53 ± 182.96 [*]

表 3 各组大鼠 0、3、6 周糖水消耗试验中糖水偏好 ($n = 25, \bar{x} \pm s$)

组别	0 周	3 周	6 周
正常组	0.835 3 ± 0.045 1	0.841 9 ± 0.059 6	0.872 4 ± 0.025 1
模型组	0.838 2 ± 0.054 5	0.631 9 ± 0.065 0 [#]	0.601 2 ± 0.076 8 [#]
逍遥散组	0.832 3 ± 0.035 5	0.651 7 ± 0.065 0 [#]	0.773 0 ± 0.033 9 [*]
氟西汀组	0.835 3 ± 0.047 2	0.639 8 ± 0.085 0 [#]	0.740 9 ± 0.045 9 [*]

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

2.1.2 糖水消耗实验

第 0、21 和 41 日进行了 SPT,见表 3。4 组大鼠的基线蔗糖偏好率没有显著差异。CUMS 造模 3 周后,模型组、逍遥散组、氟西汀组的大鼠蔗糖偏好率明显低于正常组,各组与正常组比较均有统计学意义 ($P < 0.05$)。给药 3 周后,糖水消耗实验发现模型组大鼠蔗糖偏好率低于正常组,与正常组比较有统计学意义 ($P < 0.05$)。经过逍遥散、氟西汀 3 周的治疗后,逍遥散组、氟西汀组大鼠的糖水消耗量高于模型组 ($P < 0.05$)。

2.2 逍遥散增加抑郁模型大鼠的体质量和摄食量

2.2.1 大鼠摄食量监测结果

实验初,各组间大鼠摄食量比较没有统计学意义 ($P > 0.05$)。模型组大鼠第 3 周到第 6 周的摄食量均少于正常组,与正常组比较有统计学差异 ($P < 0.05$)。而逍遥散组、氟西汀组大鼠摄食量在造模前 3 周,与模型组比较没有统计学差异 ($P > 0.05$)。药物干预 3 周后,逍遥散组、氟西汀组大鼠摄食量较模型组增加,各组与模型组比较均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 各组大鼠摄食量变化 (n = 25, $\bar{x} \pm s$)

组别	1 周(g)	2 周(g)	3 周(g)	4 周(g)	5 周(g)	6 周(g)
正常组	145.69 ± 3.32	156.57 ± 4.50	172.58 ± 6.54	180.57 ± 8.74	189.42 ± 6.75	195.5 ± 6.25
模型组	145.33 ± 10.89	151.00 ± 3.49	154.33 ± 10.44 [#]	143.33 ± 9.45 [#]	140.33 ± 8.85 [#]	137.33 ± 7.55 [#]
逍遥散组	146.45 ± 9.65	147.59 ± 4.89	152.66 ± 7.64 [#]	159.67 ± 5.55 [*]	165.47 ± 7.85 [*]	172.52 ± 8.50 [*]
氟西汀组	145.67 ± 8.49	147.67 ± 6.50	151.66 ± 8.44 [#]	154.45 ± 6.00 [*]	160.77 ± 6.73 [*]	164.15 ± 4.23 [*]

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

2.2.2 大鼠体质量监测结果

实验初,4 组大鼠体质量比较没有统计学意义 (*P* > 0.05),但整个应激期,各组接受 CUMS 大鼠的体质量均受到了影响,见表 5。各组模型大鼠体质量从

表 5 各组大鼠体质量变化 (n = 25, $\bar{x} \pm s$)

组别	1 周(g)	2 周(g)	3 周(g)	4 周(g)	5 周(g)	6 周(g)
正常组	322.50 ± 7.49	356.50 ± 7.09	368.64 ± 6.50	376.49 ± 10.33	388.50 ± 14.50	399.50 ± 11.50
模型组	295.53 ± 10.49 [#]	303.49 ± 17.49 [#]	307.49 ± 15.49 [#]	312.50 ± 12.49 [#]	319.50 ± 16.50 [#]	322.50 ± 17.49 [#]
逍遥散组	297.49 ± 11.23 [#]	308.51 ± 9.83 [#]	314.50 ± 16.17 [#]	338.50 ± 16.40	352.51 ± 13.38 [*]	368.50 ± 10.34 [*]
氟西汀组	299.52 ± 7.88 [#]	310.51 ± 5.66 [#]	337.50 ± 13.30 [#]	343.42 ± 14.54	360.51 ± 15.39 [*]	369.49 ± 13.83 [*]

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

2.3 逍遥散对大鼠海马 5-HT 和 NE 水平的作用

模型组大鼠海马组织 5-HT 和 NE 的水平较正常组下降 (*P* < 0.05),经逍遥散、氟西汀治疗了 3 周后,显著逆转了上述变化 (*P* < 0.05)。见表 6。

表 6 各组大鼠海马 5-HT、NE 表达情况 (n = 25, $\bar{x} \pm s$)

组别	5-HT (pg/mL)	NE (pg/mL)
正常组	213.13 ± 11.74	111.91 ± 9.85
模型组	184.86 ± 10.34 [#]	91.85 ± 10.28 [#]
逍遥散组	208.46 ± 16.39 [*]	109.93 ± 8.32 [*]
氟西汀组	209.40 ± 16.73 [*]	108.27 ± 7.35 [*]

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

2.4 逍遥散对大鼠海马 CA1 区谷氨酸水平的作用

各组接受 CUMS 造模的大鼠海马 CA1 区谷氨酸水平均有不同程度的升高,各组与正常组比较均有统计学意义 (*P* < 0.05)。逍遥散、氟西汀组谷氨酸水平较模型组降低,显著逆转了上述变化 (*P* < 0.05)。与正常组相比,模型组大鼠海马 CA1 区谷氨酸水平升高 (*P* < 0.05)。见表 7。

表 7 各组大鼠海马 CA1 区谷氨酸水平 (n = 25, $\bar{x} \pm s$)

组别	谷氨酸 (ng/dL)
正常组	11.00 ± 1.63
模型组	39.88 ± 0.75 [#]
逍遥散组	15.43 ± 1.34 [*]
氟西汀组	17.00 ± 1.67 [*]

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

2.5 逍遥散以抑郁模型大鼠海马 CA1 区 NR2B 表达的影响

RT-qPCR 检测 NR2BmRNA 水平。模型组大鼠海马 CA1 区 NR2B 水平均低于正常组 (*P* < 0.05)。而逍遥散、氟西汀治疗 3 周后,大鼠海马 CA1 区 NR2B 水平与模

第 1 周开始即低于正常组,与正常组比较有统计学意义 (*P* < 0.05)。而治疗 3 周后逍遥散组、氟西汀组大鼠体质量与模型组比较均有明显升高,与模型组比较有统计学意义 (*P* < 0.05)。

型组比较显著升高 (*P* < 0.05)。见表 8。

Western blot 检测 NR2B 相对表达量。模型组大鼠海马 CA1 区 NR2B 的阳性表达低于正常组 (*P* < 0.05)。经过逍遥散、氟西汀治疗 3 周后,抑郁模型大鼠海马 CA1 区 NR2B 阳性表达显著升高 (*P* < 0.05)。见表 8 和图 2。

表 8 各组大鼠海马 CA1 区 NR2B 的表达 (n = 25, $\bar{x} \pm s$)

组别	NR2B mRNA 水平	NR2B 蛋白表达
正常组	1.025 8 ± 0.042 0	1.209 5 ± 0.119 3
模型组	0.635 0 ± 0.083 7 [#]	0.859 9 ± 0.036 8 [#]
逍遥散组	0.825 0 ± 0.040 6 [*]	1.088 9 ± 0.061 1 [*]
氟西汀组	0.884 1 ± 0.080 9 [*]	1.084 1 ± 0.077 2 [*]

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

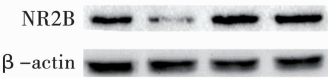


图 2 NR2B 蛋白表达

2.6 逍遥散对抑郁模型大鼠海马 CA1 区 PI3K/AKT 通路的影响

2.6.1 逍遥散对抑郁模型大鼠海马 CA1 区 PI3K 表达的影响

RT-qPCR 检测大鼠海马 CA1 区 PI3KmRNA 水平。实验结果显示模型组、大鼠海马 CA1 区 PI3KmRNA 水平低于正常组 (*P* < 0.05)。经过逍遥散、氟西汀治疗 3 周后,大鼠海马 CA1 区的 PI3K 水平明显增高,与模型组比较有统计学意义 (*P* < 0.05)。见表 9。

Western blot 检测大鼠海马 CA1 区 PI3K 蛋白相对表达量。模型组大鼠海马 CA1 区 PI3K 的表达低于正常组 (*P* < 0.05)。逍遥散、氟西汀治疗 3 周后,抑郁模型大鼠海马 CA1 区 PI3K 表达明显增加 (*P* < 0.05)。见表 9 和图 3。

表 9 各组大鼠海马 CA1 区 PI3K 的基因和蛋白表达水平($n=25, \bar{x} \pm s$)

组别	PI3KmRNA 水平	PI3K 蛋白表达
正常组	1.005 8 $\pm$ 0.028 7	0.908 2 $\pm$ 0.080 9
模型组	0.562 5 $\pm$ 0.068 2 [#]	0.691 8 $\pm$ 0.066 9 [#]
逍遥散组	0.865 0 $\pm$ 0.043 3 [*]	0.831 5 $\pm$ 0.065 5 [*]
氟西汀组	0.891 6 $\pm$ 0.043 4 [*]	0.819 6 $\pm$ 0.050 2 [*]

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



图 3 PI3K 蛋白表达

2.6.2 逍遥散对抑郁模型大鼠海马 CA1 区 P - AKT 表达的作用

Western Blot 检测结果显示大鼠海马 CA1 区 P - AKT/Akt 比值在模型组低于正常组($P<0.05$)。逍遥散、氟西汀治疗 3 周后,抑郁模型大鼠海马 P - AKT/Akt 比值表达明显增加($P<0.05$)。见表 10 和图 4。

表 10 各组大鼠海马 CA1 区 P - AKT/Akt 的相对表达情况($n=25, \bar{x} \pm s$)

组别	P - AKT/AKT
正常组	0.994 5 $\pm$ 0.097 6
模型组	0.676 5 $\pm$ 0.063 1 [#]
逍遥散组	0.865 9 $\pm$ 0.064 6 [*]
氟西汀组	0.818 3 $\pm$ 0.100 1 [*]

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

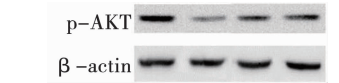


图 4 P - AKT/Akt 蛋白表达

4 讨论

抑郁症属于中医“郁证”范畴,其症状表现与中医学中癫狂、百合病、邪哭、脏躁、惊悸、奔豚气等病症的证候表现均有符合,长期以来也是中医学治疗的优势病种之一。中医学对抑郁症的治疗多从“肝”论治,其理论基础源于藏象理论中的“肝主疏泄”,其中“疏泄情志”是其重要的体现。而情志不畅反之又会使“肝失疏泄”,进一步引起“肝郁乘脾”,从而出现肝郁脾虚的证候,故对于抑郁症的治疗应在“疏肝”的基础上,酌以“健脾”。逍遥散是从古至今治疗“郁症”的常用基础方药,全方由柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、薄荷、甘草、生姜组成,以疏肝为主,兼以健脾养血,共奏疏肝解郁之功效。现代医学研究也不断地证明其在抑郁症治疗方面的显著疗效^[4-6],本课题组在前期研究中也证实了逍遥散的体内干预可显著降低汉密尔顿抑郁量表(HAMD)及抑郁症患者自评抑郁量表(SDS)得分^[7],本研究则在此基础上采用国际公认的 CUMS 方

法构建抑郁症动物模型^[8],进一步对逍遥散治疗抑郁症的作用机制进行了深入探究。

抑郁症的发生与神经系统疾病密切相关,通过参与脑内神经突触可塑性保护、恢复神经营养因子及神经递质功能等可能是探索抗抑郁治疗效应机制的重要方向^[9]。在所有的脑区中,海马 CA1 区对认知和空间学习至关重要^[10],是参与记忆和情绪信息处理的关键脑区,对应激反应敏感且易损伤,且研究证实抑郁症患者的海马 CA1 区会出现损伤及退化,而这种损伤也更易引起神经系统疾病的发生,从而加重抑郁症状^[11]。谷氨酸是介导大多数中枢兴奋性神经传导的递质,脑内神经元中谷氨酸的合成、代谢和再摄取异常时介导的兴奋性毒性会造成脑内神经元损伤,与抑郁症的发生密切相关^[12-13]。NR2B 作为 NMDA 家族中的一员,也是一种谷氨酸受体,对调控突触可塑性和记忆功能具有重要作用^[14],NR2B 的异常降低被证实与抑郁症的发生密切相关^[15],而经过抗抑郁治疗后 NR2B 也得到了显著提高^[16]。根据本研究结果,抑郁症大鼠的海马 CA1 区谷氨酸水平显著高于正常大鼠($P<0.05$),而 NR2B 则出现了明显的降低($P<0.05$),进一步证实了与 NR2B 减少相关的谷氨酸积累可能是抑郁症发生的重要机制,这也与 Dong Jun 等^[17]人的研究结果相符合。通过进一步的研究发现,NR2B 的改变会影响其下游的 PI3K/Akt 信号通路,参与了大部分的神经元死亡事件^[18]。PI3K/Akt 是近年来在抑郁症领域研究的重要信号通路,对于该信号通路的调控可通过抑制神经元凋亡从而发挥抗抑郁作用,如二环类抗抑郁药物文法拉辛通过作用于 PI3K/Akt 通路,可显著改善大鼠的抑郁行为^[19]。本研究结果中,抑郁症大鼠海马中 PI3K、p - AKT 的 mRNA 和蛋白表达较正常大鼠均有不同程度的降低($P<0.05$),提示该条信号通路受到抑制,而这也与其上游 NR2B 的异常降低相关。经过逍遥散体内干预后,抑郁症大鼠海马中 NR2B、PI3K、p - AKT 的水平均显著提高($P<0.05$),且谷氨酸水平也出现了明显降低($P<0.05$),这说明逍遥散可能通过干预 NR2B 调节 PI3K/Akt 信号通路,从而改善谷氨酸升高引起的兴奋性毒性,最终发挥抗抑郁的作用。

综上所述,逍遥散可改善抑郁样行为从而发挥抗抑郁作用,其机制可能与活化 PI3K/Akt 信号通路,进一步发挥神经保护作用而实现的,但关于该方发挥主要抗抑郁作用的药物以及全方的内在抗抑郁机制还有待进一步研究。

参考文献:

[1] MURPHY J F. The goobal burden of disease[J]. IRISH MEDICAL JOURNAL,2013,106(1):4.
[2] ZHOU X M,LIU C Y,LIU Y Y,et al. Xiaoyaosan alleviates hippocampal glutamate - induced toxicity in the CUMS rats via NR2B and PI3K/Akt signaling pathway[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021,

- 12;586788.
- [3] ITOH N, ENOMOTO A, NAGAI T, et al. Molecular mechanism linking BDNF/TrkB signaling with the NMDA receptor in memory; the role of Girdin in the CNS[J]. *Reviews in the Neurosciences*, 2016, 27(5): 481–490.
- [4] 赵佳源, 王小方, 袁荣荣, 等. 逍遥散治疗卒中后抑郁有效性及安全性的系统评价[J]. *中药药理与临床*, 2020, 36(5): 173–179.
- [5] HOU Y, LIU Y, LIU C, et al. Xiaoyaosan regulates depression-related behaviors with physical symptoms by modulating Orexin A/OxR1 in the hypothalamus[J]. *The Anatomical Record*, 2020, 303: 2144.
- [6] YUAN N, GONG L, TANG K, et al. An integrated pharmacology-based analysis for antidepressant mechanism of Chinese herbal formula Xiao-Yao-San[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 284.
- [7] YANG W, FENG D, TANG T, et al. Nine traditional Chinese herbal formulas for the treatment of depression: an ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology review[J]. *Neuropsychiatric Disease & Treatment*, 2016, 12: 2387–2402.
- [8] WAN Q, GAO K, RONG H, et al. Histone modifications of the Crhr1 gene in a rat model of depression following chronic stress[J]. *Behavioural Brain Research*, 2014, 271: 1–6.
- [9] 李越峰, 司昕蕾, 牛江涛, 等. 脑源性神经营养因子及其酪氨酸激酶受体 B 信号通路在神经性疾病研究进展[J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(9): 1121–1125.
- [10] HAYASHI K, KUBO K, KITAZAWA A, et al. Cellular dynamics of neuronal migration in the hippocampus[J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2015, 9: 135.
- [11] BARTSCH T, DÖHRING J, ROHR A, et al. CA1 neurons in the human hippocampus are critical for autobiographical memory, mental time travel, and autonoetic consciousness[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(42): 17562–17567.
- [12] MURROUGH J, ABDALLAH C, MATHEW S. Targeting glutamate signalling in depression: progress and prospects[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2017, 16: 472–486.
- [13] AUTRY A, ADACHI M, NOSYREVA E, et al. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses[J]. *Nature*, 2011, 475(7354): 91–95.
- [14] KIM J I, LEE H, SIM S, et al. PI3K γ is required for NMDA receptor-dependent long-term depression and behavioral flexibility. [J]. *Nature Neuroscience*, 2011, 14(11): 1447–1454.
- [15] DUMAN R, VOLETI B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents[J]. *Trends in Neurosciences*, 2012, 35(1): 47–56.
- [16] VANJA D, MOUNIRA B, STOCKMEIER C, et al. Altered expression of synapse and glutamate related genes in post-mortem hippocampus of depressed subjects[J]. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 2013(1): 69–82.
- [17] DONG J, SU M, KE W, et al. Effects of electroconvulsive therapy and propofol on spatial memory and glutamatergic system in hippocampus of depressed rats[J]. *The Journal of ECT*, 2010, 26(2): 126–130.
- [18] DAI H, XU M, LV J, et al. Mild hypothermia combined with hydrogen sulfide treatment during resuscitation reduces hippocampal neuron apoptosis via NR2A, NR2B, and PI3K–Akt signaling in a rat model of cerebral ischemia–reperfusion injury[J]. *Molecular Neurobiology*, 2016, 53(7): 4865–4873.
- [19] HUANG X, MAO Y, LI C, et al. Venlafaxine inhibits apoptosis of hippocampal neurons by up-regulating brain-derived neurotrophic factor in a rat depression model[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(8): 4577–4586.

Regulation of Xiaoyao Powder on PI3K/AKT Signaling Pathway in Hippocampal CA1 Region of CUMS Rats

ZHOU Xueming^{1,2}, YIN Yajing¹, CHANG Zhuo¹, LIU Chenyue³, DENG He¹, LIANG Biye¹, TAN Zengde⁴, SUI Fangyu¹
(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 4. The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Abstract: Objective: To explore the mechanism of Xiaoyao Powder in improving glutamate-induced excitotoxicity by regulating PI3K/Akt signaling pathway. Methods: 100 SD Rats were randomly divided into the normal group, the model group, the Xiaoyao Powder group and the Fluoxetine group. The depression model was established by the method of chronic unpredictable mild stress (CUMS). After 3 weeks of corresponding interventions, ethology was observed and related indicators were detected. The open field test (OFT) and sucrose preference test (SPT) were used to assess the anti-depressant effects of Xiaoyao Powder. The levels of 5-HT and NE in hippocampus were detected by ELISA; the level of glutamate was detected by colorimetry; the mRNA expressions of NR2B and PI3K were detected by RT-qPCR; and the protein expressions of NR2B, PI3K, P-AKT and Akt in hippocampal CA1 region were detected by Western Blot. Results: Xiaoyao Powder decreased the level of glutamate and increase the levels of 5-HT and NE of the hippocampal CA1 area in CUMS rats. Furthermore, Xiaoyao Powder increased the expressions of NR2B, PI3K and P-AKT/Akt ratio in the hippocampal CA1 region in the CUMS rats. Conclusion: Xiaoyao Powder can significantly improve the depression-like behavior of CUMS. The mechanism may be related to the enhancement of PI3K/Akt signaling pathway activity by decreasing the excitatory toxicity of glutamate.

Key words: Depression; Xiaoyao Powder; PI3K/Akt; Glutamate