

柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠海马组织PI3K/Akt/GSK3 β / β -catenin信号通路的影响

尚立芝^{1,2}, 毛梦迪^{2,3}, 许二平^{1,2*}, 王国强¹, 李耀洋⁴, 刘保光^{1,2*}, 白明^{1,2},
栗俞程^{1,2}, 汪保英^{1,2}

(1. 河南中医药大学 中医药科学院, 郑州 450046;

2. 河南省仲景方药现代研究重点实验室, 郑州 450046;

3. 河南中医药大学 基础医学院, 郑州 450046; 4. 河南中医药大学 第一临床医学院, 郑州 450006)

[摘要] 目的:探讨柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠海马组织磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/糖原合成酶激酶3 β (GSK3 β)/ β -链环蛋白(β -catenin)信号通路的影响。方法:健康SD大鼠120只,随机取20只作为正常组,另100只大鼠用于制备慢性不可预见性温和应激(CUMS)抑郁模型。再将CUMS抑郁大鼠随机分为模型组,柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组,氟西汀组,每组20只。柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组分别灌胃3.25, 6.5, 13 g·kg⁻¹;氟西汀组灌胃盐酸氟西汀10 mg·kg⁻¹;正常组和模型组灌胃等量生理盐水;1次/d,共干预21 d。应用糖水偏好和强迫游泳实验评估抑郁行为,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组大鼠大脑海马组织中PI3K, Akt, GSK3 β 以及 β -catenin蛋白水平及其磷酸化水平。结果:给药21 d后,与正常组比较,模型组糖水偏好显著下降($P<0.01$);强迫游泳不动时间显著延长($P<0.01$);PI3K, p-PI3K p110, p-PI3K p85蛋白水平均显著降低($P<0.01$);Akt, p-Akt Thr308, p-Akt Ser473, p-GSK3 β Ser9, β -catenin水平均显著降低($P<0.01$);GSK3 β , p-GSK3 β Tyr216水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤中、高组大鼠糖水偏好显著增加($P<0.01$);强迫游泳不动时间显著缩短($P<0.01$);PI3K总蛋白, PI3K p110和PI3K p85亚基蛋白磷酸化水平均显著增高($P<0.01$);p-Akt Thr308和p-Akt Ser473水平均显著升高($P<0.01$);p-GSK3 β Ser9, β -catenin水平显著增高($P<0.01$),而GSK3 β , p-GSK3 β Tyr216水平却明显降低($P<0.05$)。结论:柴胡加龙骨牡蛎汤通过提高大鼠海马组织PI3K蛋白水平及活性,激活Akt,抑制GSK3 β 活性,阻止 β -catenin降解,即提高大鼠海马组织PI3K/Akt信号通路活性,保护海马神经元。

[关键词] 抑郁症; 柴胡加龙骨牡蛎汤; 慢性不可预知温和刺激; 磷脂酰肌醇3-激酶; 糖原合成酶激酶3 β ; 信号通路

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)23-0012-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202201

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200915.1821.003.html>

[网络出版日期] 2020-9-16 07:06

Effect of Chaihu Jia Longgu Mulitang on Signaling Pathway of PI3K/Akt/GSK3 β / β -catenin in Hippocampus Tissue of Rats with Depression

SHANG Li-zhi^{1,2}, MAO Meng-di^{2,3}, XU Er-ping^{1,2*}, WANG Guo-qiang¹, LI Yao-yang⁴, LIU Bao-guang^{1,2*},
BAI Ming^{1,2}, LI Yu-cheng^{1,2}, WANG Bao-ying^{1,2}

(1. Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Henan Key Laboratory for Modern Research of Zhongjing Compound Traditional Chinese

[收稿日期] 20200521(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81973739);河南省高等学校重点科研项目(20B360011, 21A360020);河南省教育科学“十三五”规划一般课题([2019]-JKGHYB-0101, [2019]-JKGHYB-0114);河南省中医药科学研究专项课题(2019JDZX2121, 2019ZY3048)

[第一作者] 尚立芝, 硕士, 教授, 硕士生导师, 从事中医药作用机制研究, Tel:0371-65680003, E-mail: lzshang2014@163.com

[通信作者] * 许二平, 博士, 教授, 博士生导师, 从事仲景方药现代研究, Tel:0371-65680029, E-mail: xuerping@sina.com;

* 刘保光, 博士, 讲师, 从事仲景方药防治感染性疾病作用机制研究, E-mail: liubaoguang83@sina.com

Medicine, Zhengzhou 450046, China; 3. School of Basic Medical Science, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 4. The First Clinical School of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Chaihu Jia Longgu Mulitang on phosphatidylinositol-3-kinases (PI3K)/protein kinase B (Akt)/glycogen synthase kinase 3β (GSK3 β)/ β -catenin signaling pathway of hippocampus in rats with depression. **Method:** A total of 120 SD rats were randomly divided into normal group, model group, and low, middle and high-dose Chaihu Jia Longgu Mulitang groups (3.25, 6.5, 13 g·kg⁻¹), and fluoxetine group, with 20 rats in each group. Except normal group, the depression model was prepared through chronic unpredictable mild stimulation (CUMS). The normal group and the model group were given normal saline with 6.5 g·kg⁻¹ by gavage. Chaihu Jia Longgu Mulitang groups were intragastrically given corresponding herbal drugs 3.75, 6.5, 13 g·kg⁻¹, while fluoxetine group was intragastrically given fluoxetine 10 mg·kg⁻¹ for 21 days, once a day. Then the depressive behaviors of rats were observed by sucrose preference test (SPT) and forced swimming test (FST). Western blot was used to detect the protein expressions of PI3K, Akt, GSK3 β and phosphorylation level. **Result:** Compared with normal group, the sucrose preference index was decreased significantly, while the immobility time in FST was increased significantly ($P<0.01$), the protein expressions of PI3K, p-PI3K p110, p-PI3K p85 were decreased significantly ($P<0.01$), and expressions of Akt, p-Akt Thr308, p-Akt Ser473, p-GSK3 β Ser9 and β -catenin were decreased significantly ($P<0.01$), while the level of GSK3 β , p-GSK3 β Tyr216 were increased significantly in model group ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with model group, Chaihu Jia Longgu Mulitang could increase sucrose preference index and decrease the immobility time in FST ($P<0.01$), the protein expressions of PI3K p110 and PI3K p85 was increased significantly ($P<0.01$), levels of Akt Thr308, Akt Ser473, p-GSK3 β Ser9, β -catenin were increased significantly ($P<0.01$), whereas levels of GSK3 β , and GSK3 β Tyr216 were decreased significantly. **Conclusion:** Chaihu Jia Longgu Mulitang could increase protein expression and activity of PI3K in rat hippocampus, activate Akt, inhibit GSK3 β kinase activity and prevent β -catenin from degradation, so as to increase PI3K/Akt pathway activity in rat hippocampus, and protect hippocampal neurons.

[Key words] depression; Chaihu Jia Longgu Mulitang; chronic unpredictable mild stimulation (CUMS); phosphoinositide 3-kinase (PI3K); glycogen synthase kinase 3β (GSK3 β); signaling pathway

抑郁症是常见的精神障碍疾病,具有高复发率、高致残率和高自杀率等特点,给社会和家庭带来沉重的疾病负担^[1]。目前抑郁症的发病机制不清,研究发现抑郁患者的海马神经元受损、数目减少,功能明显降低^[2-3]。抗抑郁药物通过保护海马神经元、促进神经分化而发挥抗抑郁作用^[4]。磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/糖原合成酶激酶 3β (GSK3 β)/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路,在调控海马神经发生和抑郁行为中发挥重要作用^[5-6]。

抑郁症属中医学“情志病”“心病”等范畴。临床治疗宜调和气血、疏肝解郁及整体调节。柴胡加龙骨牡蛎汤出自张仲景《伤寒论·辨少阳病脉证并治少阳病兼变证篇》,该方药疏肝开郁、祛痰调气,升清降浊,定志摄神,控制神经系统疾病的发作^[7-8]。临床及实验研究均表明柴胡加龙骨牡蛎汤具有

很好的抗抑郁作用^[9-10]。但柴胡加龙骨牡蛎汤治疗抑郁症的药理机制不清,其对PI3K/Akt/GSK3 β / β -catenin信号通路影响的研究,目前报道甚少。

本研究制备慢性不可预见性温和应激(CUMS)抑郁大鼠模型,以柴胡加龙骨牡蛎汤干预,探究柴胡加龙骨牡蛎汤对CUMS大鼠抑郁行为及PI3K/Akt/GSK3 β / β -catenin信号通路关键分子的影响,揭示柴胡加龙骨牡蛎汤抗抑郁的作用及分子机制,为中医药治疗抑郁症提供药效及药理依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级健康SD雄性大鼠,6周龄,体重(200±20)g,购自河南省实验动物中心,动物质量合格证号NO.41003100006058,实验动物生产合格证号SCXK(豫)2017-0001。河南省实验动物饲料A级,购自河南省实验动物中心,动物饲料质量合格

证号 NO. 41000100004370, 饲料生产合格证号 SCXK(豫)2015-0005。实验动物使用许可证号 SYXK(豫)2015-0005, 经河南中医药大学实验动物伦理委员会审核, 该实验动物伦理审查批准编号 DWLL2017010032。

1.2 药物及试剂 柴胡加龙骨牡蛎汤组成: 醋柴胡 12 g, 龙骨 4.5 g, 黄芩 4.5 g, 生姜 4.5 g, 人参片 4.5 g, 桂枝(去皮) 4.5 g, 茯苓 4.5 g, 清半夏 6 g(洗), 大黄 6 g, 牡蛎 4.5 g(江阴天江药业有限公司, 批号分别为 18051111, 17121671, 18081431, 18021811, 1701120, 18020081, 18041411, 18032321, 18061591, 1702189); 盐酸氟西汀(法国礼来有限公司, 规格 20 mg, 批号 J20170022); 兔抗大鼠 Akt 单克隆抗体, 辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二抗免疫球蛋白(Ig)G(美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号分别为 4691, 112586); 兔抗大鼠 p-PI3K p110 α 多克隆一抗, 兔抗大鼠 p-PI3K p85 单克隆抗体, 兔抗大鼠 p-Akt pThr308 单克隆抗体, 兔抗大鼠 p-Akt Ser473 单克隆抗体, 兔抗大鼠 p-GSK3 β Tyr216 多克隆抗体, 兔抗大鼠 p-GSK3 Ser9 多克隆抗体(美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号分别为 09841, 05212, P3862, SAB4504331, AB4503763, MABN2443); 兔抗大鼠 Akt, GSK3 β 多克隆抗体(美国 Signalway Antibody 公司, 批号分别为 21054, 21002); 兔抗大鼠 β -catenin 多体(碧云天生物技术, 批号 AC106); 兔抗大鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(美国 Immuno Way 公司, 批号 B4501); RIPA 裂解液, BCA 蛋白定量试剂盒, 彩色预染蛋白质 Marker, ECL 超敏发光试剂盒(上海威奥生物科技有限公司, 批号分别为 WB0101, WB0125, WB0173, WB2164); 其他试剂均由河南中医药大学中医药科学院提供。

1.3 仪器 DU640 型紫外分光光度计(美国 Beckman 公司); TGL16A 型台式高速离心机(金坛市科析仪器有限公司); D37520 型台式高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司); 1575 型全自动酶标洗板机(美国伯乐公司); DYCZ-24DN 型垂直电泳槽及转膜仪(北京六一仪器厂); 5200 化学发光成像系统(上海天能科技有限公司); Powerwave XS 型波长扫描酶标仪(美国 BioTek 公司); HDRCX610E/BC 型摄像机(日本 SONY 公司)。

2 方法

2.1 模型制备、分组与给药 参照文献[11]制备 CUMS 抑郁大鼠模型。将购买的 SD 大鼠适应性

饲养 7 d 后, 随机选取 20 只作为正常组。对正常组不做特殊处理, 仅每天抓取 1 次。余 100 只用于造模, 接受 CUMS 抑郁模型制备的 8 种应激刺激: ①冰水游泳(4 °C, 5 min); ②潮湿垫料(每笼注水 200 mL, 24 h); ③禁水(24 h); ④禁食(24 h); ⑤昼夜颠倒(12/12 h); ⑥热水游泳(40 °C, 5 min); ⑦电击足底(0.9 mA, 15 s/次, 4 次); ⑧夹尾(距尾根 1 cm, 1 min)。每天随机给予一种上述刺激, 且连续 2 d 不可选取同一顺序刺激, 使大鼠不可预见刺激的发生, 同时配合单笼饲养, 全程共刺激 42 d。到第 22 天, 将参与造模的 100 只大鼠随机分为模型组、柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组、氟西汀组, 每组 20 只。第 22 天开始柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组分别灌胃(ig)柴胡加龙骨牡蛎汤 3.25, 6.5, 13 g·kg⁻¹(溶于生理盐水 3 mL); 正常组和模型组 ig 等体积生理盐水; 氟西汀组将盐酸氟西汀 1 粒(20 mg)溶解于生理盐水 3 mL, ig 盐酸氟西汀 10 mg·kg⁻¹[12]。以上均 1 次/d, 共 21 d。

2.2 行为学检测 每组 20 只大鼠, 于实验前, 造模 21 d, 给药 21 d 各进行 1 次行为学检测。

2.2.1 糖水偏好实验(SPT) 实验过程分为适应阶段和正式实验阶段: 适应阶段先给予大鼠 2 瓶 1% 蔗糖溶液, 24 h 后将其中 1 瓶 1% 蔗糖溶液更换为纯净水, 随后的 24 h 中每隔 12 h 变换 1 次水瓶位置以避免大鼠对饮水位置的偏好, 适应阶段结束后禁食禁水 24 h。进入正式实验, 给予大鼠食物, 1 瓶纯净水(200 mL)和 1 瓶 1% 蔗糖水(200 mL), 每隔 12 h 调换 1 次水瓶位置, 24 h 后量剩余的水和蔗糖溶液。计算糖水偏好率=糖水消耗量(mL)/总液体消耗量(mL)×100%。

2.2.2 强迫游泳实验(FST) 将动物置于水温为 25 °C, 水深 30 cm 的实验容器(高 30 cm, 直径 10 cm)中, 使用行为学视频分析系统, 采集大鼠 5 min 内的不动时间。

2.3 取材与样品制备 末次给药 1.5 h 后, 每组先取 10 只大鼠, 用 10% 水合氯醛溶液腹腔麻醉, 断头取脑, 在冰上迅速分离出两侧海马组织, 快速置入遇冷的 1.5 mL 冻存管中, 放入液氮罐, 再将样本转至 -80 °C 冰箱保存待测, 用于蛋白免疫印迹法(Western blot)检测。每组剩余 10 只大鼠经体内灌注多聚甲醛固定, 用于形态学观察。

2.4 Western blot 检测 海马组织中 PI3K, p-PI3K p110, p-PI3K p85, AKt, p-Akt Thr308, p-Akt Ser473, GSK3 β , p-GSK3 β Ser9, p-GSK3 β Tyr216

和 β -catenin表达水平 从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出并剪取大鼠海马组织,在液氮中研磨后,迅速加入含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的蛋白裂解液充分裂解。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min ,取上清,提取组织总蛋白,用BCA试剂盒测定蛋白含量。蛋白样品进行电泳(SDS-PAGE)和Western blot蛋白样品加入 $5\times$ Loading Buffer,蛋白变性 10 min ,冷却后上样,浓缩胶 80 V , 1 h ,分离胶 120 V , 1 h ,蛋白电泳。电泳后湿转法转膜:取出蛋白胶,标记右上角,PVDF膜经过甲醇活化 2 min 后,依次序从下到上叠放,滤纸-蛋白胶-PVDF膜-滤纸,电泳槽置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰水混合物中,从负极(黑)到正极(红), 180 V 电泳 2 h ,将蛋白转至硝酸纤维素膜(PVDF)上。把PVDF膜放入 5% 脱脂奶粉TBST缓冲液中,室温摇床封闭膜 2 h 。用TBST洗1次封闭后的PVDF膜,将PVDF膜放入用TBST稀释的一抗溶液里,一抗体分别为PI3K($1:1\text{ }000$),p-PI3K p110($1:500$),p-PI3K p85($1:500$),AKt($1:1\text{ }000$),p-Akt Thr308($1:500$),p-Akt Ser473($1:500$),GSK3 β ($1:1\text{ }000$),p-GSK3 β

Ser9($1:1\text{ }000$),p-GSK3 β Tyr216($1:1\text{ }000$), β -catenin($1:500$),GAPDH($1:500$), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,用TBST洗膜3次, 5 min /次。用TBST稀释二抗溶液中放入PVDF膜,室温孵育二抗(辣根过氧化物酶标记的二抗) 2 h ,用TBST洗膜4次, 5 min /次。ECL化学发光、曝光、显影,GAPDH为内参,Image J图像分析软件定量分析Western blot各条带的灰度值。

2.5 统计学处理 应用统计软件SPSS 25.0统计数据,数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对抑郁大鼠抑郁行为的影响

3.1.1 对抑郁大鼠糖水消耗量的影响 造模前各组大鼠糖水偏好无显著性差异。从造模的第1天开始计算天数,造模第21天,与正常组比较,CUMS模型组大鼠糖水偏好显著下降($P<0.01$),差异有显著的统计学意义。给药21 d,与模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤高、中、低剂量组、氟西汀组糖水偏好性显著升高($P<0.01$)。见表1。

表1 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠糖水消耗量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=20$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	实验前	造模21 d	给药21 d
正常	—	27.18 $\pm$ 3.17	26.02 $\pm$ 4.02	28.25 $\pm$ 3.73
模型	—	26.53 $\pm$ 3.88	15.56 $\pm$ 3.36 ²⁾	17.59 $\pm$ 3.48 ²⁾
柴胡加龙骨牡蛎汤	3.25	25.72 $\pm$ 4.11	15.74 $\pm$ 3.28	25.19 $\pm$ 3.47 ³⁾
	6.5	25.12 $\pm$ 4.13	16.26 $\pm$ 3.47	25.34 $\pm$ 3.79 ⁴⁾
	13	25.67 $\pm$ 3.58	15.46 $\pm$ 4.34	26.79 $\pm$ 3.52 ⁴⁾
氟西汀	0.01	26.48 $\pm$ 3.46	15.52 $\pm$ 3.71	27.23 $\pm$ 3.29 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表2~5同)。

3.1.2 对抑郁大鼠强迫游泳时间的影响 造模前各组大鼠强迫游泳不动时间差异无明显统计学意义。在造模21 d后,与正常组比较,模型组大鼠强迫游泳不动时间显著延长($P<0.01$),差异有显著统

计学意义;给药21 d,与模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤中、高剂量组、氟西汀组大鼠强迫游泳不动时间均显著缩短($P<0.01$),差异有显著统计学意义。见表2。

表2 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠强迫游泳不动时间的影响($\bar{x}\pm s$, $n=20$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	实验前	造模21 d	给药21 d
正常	—	20.26 $\pm$ 3.25	22.46 $\pm$ 3.71	29.27 $\pm$ 4.25
模型	—	19.65 $\pm$ 4.47	42.52 $\pm$ 3.45 ²⁾	40.55 $\pm$ 3.41 ²⁾
柴胡加龙骨牡蛎汤	3.25	18.87 $\pm$ 4.43	40.98 $\pm$ 3.27	37.86 $\pm$ 3.36
	6.5	19.47 $\pm$ 4.24	41.22 $\pm$ 3.35	33.21 $\pm$ 5.00 ⁴⁾
	13	19.78 $\pm$ 4.13	40.72 $\pm$ 3.11	31.34 $\pm$ 3.42 ⁴⁾
氟西汀	0.01	18.74 $\pm$ 4.26	41.01 $\pm$ 3.34	30.25 $\pm$ 3.87 ⁴⁾

3.2 对抑郁大鼠海马组织 PI3K, p-PI3K p110, p-PI3K p85, Akt, p-Akt Thr308, p-Akt Ser473, GSK3 β , p-GSK3 β Ser9, p-GSK3 β Tyr216 和 β -catenin 蛋白表达的影响

3.2.1 对抑郁大鼠大脑海马组织 PI3K 表达及其活性的影响 与正常组比较,模型组 PI3K 总蛋白水平均显著降低($P<0.01$),p-PI3K p110,p-PI3K p85 水平均显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤中、高剂量组、氟西汀组大鼠海马组织中 PI3K 总蛋白,p-PI3K p110 和 p-PI3K p85 亚基蛋白水平显著升高($P<0.01$)。见图 1,表 3。

3.2.2 对抑郁大鼠海马组织 Akt 表达及其活性的影响 与正常组比较,模型组 Akt 总蛋白水平均显著降低($P<0.01$),p-Akt Thr308,p-Akt Ser473 水平均显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤中、高剂量组、氟西汀组海马组织中 Akt 总蛋白水平,差异无统计学意义,p-Akt Thr308 和 p-Akt Ser473 水平均显著升高($P<0.01$)。见图 1,表 3。

3.2.3 对抑郁大鼠海马组织 GSK3 β 活性及 β -catenin 表达水平的影响 与正常组比较,模型组 GSK3 β , p-GSK3 β Tyr216 明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),p-GSK3 β Ser9, β -catenin 水平显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤中、高剂

量组、氟西汀组海马组织中 GSK3 β 总蛋白,p-GSK3 Tyr216 水平显著减低($P<0.01$),p-GSK3 β Ser9 水平显著升高, β -catenin 水平显著增高($P<0.01$)。但 p-GSK3 Tyr216 水平与模型组比较差异无统计学意义。见图 1,表 4。

4 讨论

《伤寒论·辨少阳病脉证并治少阳病兼变证篇》107 条曰:“伤寒八九日,下之,胸满烦惊,小便不利,谵语,一身尽重,不可转侧者,柴胡加龙骨牡蛎汤主之。”柴胡加龙骨牡蛎汤由醋柴胡、龙骨、牡蛎、黄芩、生姜、人参片、清半夏、茯苓、桂枝、大黄、大枣、铅丹(铅丹有毒,药房多不备)组成,为临床上治疗少阳阳明合病的经典名方^[10]。方中柴胡入肝胆经,引清气上行,清少阳之邪热;桂枝与柴胡配伍,通阳透达,平冲降逆;大黄、黄芩清泻少阳阳明之郁热;人参片、茯苓、大枣益气养营,健脾安神,驱除邪气;半夏佐以茯苓,健脾利湿祛痰,疏通三焦,与柴胡、黄芩相配,去上蒙心神之痰浊;龙骨、牡蛎性寒,入肝肾经,专于重镇安神、定惊止烦、平肝潜阳。方中诸药寒温同用,攻补兼施,共奏疏肝解郁、通阳泄热、畅达三焦、宁心安神之功,现代临床常将其用于抑郁症的治疗^[7]。本实验制备 CUMS 模型 21 d,与正常组比较,模型组大鼠糖水偏好显著下降,强迫

表 3 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠海马组织 PI3K 和 Akt 蛋白表达及其活性的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

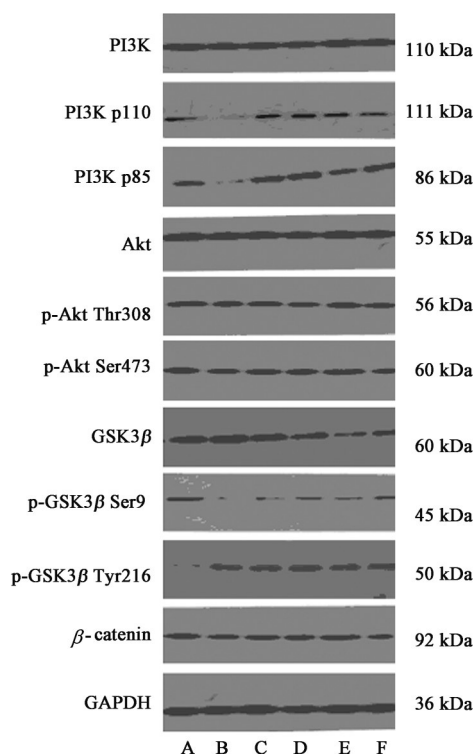
Table 3 Effect of Chaihu Jia Longgu Mulitang on expression and activity of PI3K and Akt in hippocampus of depression rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	PI3K /GAPDH	p-PI3K p110 /GAPDH	p-PI3K p85 /GAPDH	Akt /GAPDH	p-Akt Thr308 /GAPDH	p-Akt Ser473 /GAPDH
正常	—	1.05±0.08	1.01±0.03	0.99±0.05	1.08±0.12	1.01±0.01	1.00±0.03
模型	—	0.47±0.14 ²⁾	0.23±0.02 ²⁾	0.24±0.06 ²⁾	0.87±0.07 ²⁾	0.46±0.02 ²⁾	0.41±0.01 ²⁾
柴胡加龙骨牡蛎汤	3.25	0.50±0.11	0.24±0.02	0.25±0.04	0.83±0.04	0.48±0.02	0.67±0.01 ³⁾
	6.5	0.88±0.11 ⁴⁾	0.36±0.03 ⁴⁾	0.54±0.02 ⁴⁾	0.85±0.08	0.77±0.02 ⁴⁾	0.78±0.03 ⁴⁾
	13	0.91±0.12 ⁴⁾	0.38±0.02 ⁴⁾	0.57±0.03 ⁴⁾	0.88±0.06	0.79±0.03	0.92±0.03 ⁴⁾
氟西汀	0.01	0.95±0.21 ⁴⁾	0.39±0.11 ⁴⁾	0.47±0.02 ⁴⁾	0.90±0.12	0.80±0.02 ⁴⁾	0.81±0.02 ⁴⁾

表 4 柴胡加龙骨牡蛎汤对抑郁大鼠海马组织 GSK3 β 活性及 β -catenin 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 4 Effect of Chaihu Jia Longgu Mulitang on activity of GSK3 β and level of β -catenin protein expression in hippocampus of depression rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	GSK3 β /GAPDH	p-GSK3 β Ser9 /GAPDH	p-GSK3 β Tyr216 /GAPDH	β -catenin /GAPDH
正常	—	0.98±0.07	0.92±0.02	0.41±0.02	1.11±0.01
模型	—	1.98±0.12 ²⁾	0.26±0.01 ²⁾	1.23±0.03 ¹⁾	0.41±0.04 ²⁾
柴胡加龙骨牡蛎汤	3.25	1.79±0.13	0.41±0.02 ³⁾	1.21±0.02	0.44±0.02
	6.5	1.12±0.15 ⁴⁾	0.79±0.04 ⁴⁾	0.65±0.04 ⁴⁾	0.98±0.12 ⁴⁾
	13	1.01±0.13 ⁴⁾	0.87±0.03 ⁴⁾	0.63±0.03 ⁴⁾	0.99±0.11 ⁴⁾
氟西汀	0.01	1.21±0.11 ⁴⁾	0.52±0.04 ⁴⁾	0.75±0.01 ⁴⁾	0.81±0.14 ⁴⁾



A. 正常组; B. 模型组; C. 柴胡加龙骨牡蛎汤低剂量组; D. 柴胡加龙骨牡蛎汤中剂量组; E. 柴胡加龙骨牡蛎汤高剂量组; F. 氟西汀组

图1 各组大鼠海马组织中PI3K, p-PI3K p110, p-PI3K p85, Akt, p-Akt Thr308, p-Akt Ser473, GSK3β, p-GSK3β Ser9, p-GSK3β Tyr216及β-catenin蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of PI3K, p-PI3K p110, p-PI3K p85, Akt, p-Akt Thr308, p-Akt Ser473, GSK3β, p-GSK3β Ser9, p-GSK3β Tyr216 and β-catenin protein expression in hippocampus of each group rats

游泳不动时间显著延长,与文献报道一致^[13],说明大鼠对奖赏反应程度减低、对所处的环境不挣脱甚至绝望,提示造模成功。给予柴胡加龙骨牡蛎汤干预21 d,与模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤中、高剂量组糖水偏好性显著升高,强迫游泳不动时间显著缩短。提示柴胡加龙骨牡蛎汤提高了大鼠对应激的耐受性,改善抑郁行为。

Akt是PI3K的下游底物,柴胡加龙骨牡蛎汤激活PI3K/Akt通路可保护神经元。本实验发现,与正常组比较,模型组PI3K及Akt总蛋白水平均显著降低, p-PI3K p110, p-PI3K p85以及 p-Akt Thr308, p-Akt Ser473水平均显著降低,与文献报道一致^[14-15],提示模型组中PI3K, Akt激酶活性均被抑制。与模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤中、高剂量组海马组织中PI3K总蛋白, p-PI3K p110和 p-PI3K p85亚基蛋白水平显著增高; Akt总蛋白水平与模型组差异无显著性差异, p-Akt Thr308和 p-Akt Ser473

水平均显著升高。说明柴胡加龙骨牡蛎汤显著提高大鼠海马组织中PI3K的表达及其活性;活化的PI3K激活下游底物Akt,柴胡加龙骨牡蛎汤虽然未增加Akt总蛋白水平,但 p-Akt Thr308和 p-Akt Ser473水平提高,说明Akt活性显著提高。PI3K/Akt通路的激活对细胞存活、增殖、减少氧化应激等具有重要作用^[16]。提示柴胡加龙骨牡蛎汤通过提高大鼠海马组织中PI3K的表达及活性,提升Akt Thr308和Akt Ser473位点的磷酸化水平,即通过激活PI3K/Akt信号通路发挥对神经元的保护作用。

GSK3β是Akt的下游底物,抑制GSK3β的活性是药物治疗情感障碍性疾病的新靶点^[17]。应激可降低海马组织中 p-GSK3β Ser9的蛋白水平,而使GSK3β活性增强^[18],即 p-GSK3β Ser9的水平降低, GSK3β活性增强;相反, p-GSK3β Ser9的水平升高, GSK3β活性抑制。而 p-GSK3β Tyr216的水平升高, GSK3β活性增强;反之, p-GSK3β Tyr216的水平降低, GSK3β抑制^[19]。过度激活GSK3β可抑制神经发生、加重内质网应激。但是敲除或抑制GSK3β后,神经发生增加,减轻了因内质网应激引起的细胞凋亡^[20]。本实验显示,与正常组比较,模型组GSK3β, p-GSK3β Tyr216显著增高, p-GSK3β Ser9显著降低,与文献报道一致^[21-22],提示CUMS提高了GSK3β的表达水平及活性,诱导抑郁行为。与模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤中、高剂量组GSK3β总蛋白, p-GSK3 Tyr216水平显著减低, p-GSK3β Ser9水平显著升高,说明柴胡加龙骨牡蛎汤通过提高大鼠海马组织中 p-GSK3β Ser9水平,同时降低 p-GSK3β Tyr216水平,进而抑制GSK3β的活性。有氧运动、抗抑郁药物可通过抑制GSK3β的活性而发挥抗抑郁作用^[23-24]。提示柴胡加龙骨牡蛎汤通过抑制GSK3β的活性保护神经元,而发挥抗抑郁作用。氟西汀组GSK3β总蛋白水平显著减低, p-GSK3β Ser9水平显著增高,但 p-GSK3 Tyr216水平与模型组无显著差异,可能柴胡加龙骨牡蛎汤与氟西汀对GSK3β活性抑制的机制不太一样。

β-catenin是GSK3β的主要作用底物, GSK3β的活性决定β-catenin在胞质中的稳定性。在正常海马组织中,转位入核的β-catenin可调控神经元祖细胞增殖,促进海马神经发生^[6]。GSK3β受到抑制后,可保障β-catenin转位入核,聚集核内β-catenin激活Tcf/Lef1启动子家族,抑制细胞凋亡、促进轴突发生^[25]。本实验发现,与正常组比较,模型组大鼠海马组织中β-catenin蛋白水平显著下调。与文献

报道一致^[22,25]。模型组大鼠长期接受应激或抑郁状态下 p-GSK3 β Ser9 水平降低, GSK3 β 活性提高, β -catenin 蛋白被活化的 GSK3 β 水解而水平降低,使胞质中 β -catenin 转位入核减少,海马神经元凋亡等损伤加重,促进抑郁进程^[26],与模型组比较, β -catenin 水平显著增加,提示柴胡加龙骨牡蛎汤组海马组织通过升高 p-GSK3 β Ser9,降低 p-GSK3 β Tyr216 水平,抑制 GSK3 β 活性,减弱活化的 GSK3 β 对下游底物 β -catenin 的降解,保障 β -catenin 的稳定及转位入核,避免了内质网应激引起的细胞凋亡,有效地保护海马神经元的结构与功能,进而发挥抗抑郁作用。

综上,柴胡加龙骨牡蛎汤可有效控制抑郁行为,通过 PI3K/Akt/GSK3 β / β -catenin 信号通路保护海马神经元。其机制可能通过提高大鼠海马组织中 PI3K, Akt 活性,抑制 GSK3 β 活性,减少 β -catenin 的降解,进而使转位入核的 β -catenin 保护海马神经元的存活与增殖。

[参考文献]

- [1] KNOL M J, TWISK J W R, BEEKMAN A T F, et al. Depression as a risk factor for the onset of type 2 diabetes mellitus. A meta-analysis [J]. *Diabetologia*, 2006, 49(5): 2799-2800.
- [2] YI J H, JEON J, KWON H, et al. Rubrofusarin attenuates chronic restraint stress-induced depressive symptoms [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, doi: 10.3390/ijms21103454.
- [3] DAVID D J, SAMUELS B A, RAINER Q, et al. Neurogenesis-dependent and independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression [J]. *Neuron*, 2009, 62(4): 479-493.
- [4] DUMAN R S, MALBE R G J, NAKAGAWA S. Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 299(2): 401-407.
- [5] WU Z, WANG G, WEI Y, et al. PI3K/AKT/GSK3 β /CRMP-2-mediated neuroplasticity in depression induced by stress [J]. *Neuroreport*, 2018, 29(15): 1256-1263.
- [6] BAYOD S, MENNELLA I, SANCHEZ-RIGE S, et al. Wnt pathway regulation by long-term moderate exercise in rat hippocampus [J]. *Brain Res*, 2014, 1543: 38-48.
- [7] 胡燕, 洪敏. 柴胡类方治疗抑郁症研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(17): 247-249.
- [8] 周劲光, 杨霄鹏. 柴胡龙骨牡蛎汤对慢性应激大鼠的抗抑郁作用 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2010, 13(19): 5-7.
- [9] 张有志, 聂惠民, 付延龄, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤等经方治疗抑郁症的动物行为学研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2001, 7(7): 30-32.
- [10] 汤艳莉, 王继明, 庄庭怡, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤加味治疗轻中度原发性高血压合并抑郁肝阳上亢证的临床观察 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20201390.
- [11] 杨婵娟, 安瑞娣, 杨俊卿, 等. 造模时间对慢性不可预见性刺激致大鼠抑郁模型的影响 [J]. *四川动物*, 2015, 34(3): 383-388.
- [12] YANG C, WANG G, WANG H, et al. Cytoskeletal alterations in rat hippocampus following chronic unpredictable mild stress and re-exposure to acute and chronic unpredictable mild stress [J]. *Behavioural Brain Res*, 2009, 205(2): 518-524.
- [13] ZHU Y L, LI S L, ZHU C Y, et al. Antidepressant metabolomics study of Danzhi Xiaoyao powder on rat model of chronic unpredictable mild stress (CUMS) [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, doi: 10.1016/j.jep.2020.112832.
- [14] XU H X, LIN S X, GONG Y, et al. Chaiyu-Dixian formula exerts protective effects on ovarian follicular abnormal development in chronic unpredictable mild stress (CUMS) rat model [J]. *Front Pharmacol*, 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.00245.
- [15] WU R, XIAO D, SHAN X, et al. Rapid and prolonged antidepressant-like effect of crocin is associated with GHSR-mediated hippocampal plasticity-related proteins in mice exposed to prenatal stress [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2020, 11(8): 1159-1170.
- [16] KERRI S. Mentalhealth: a world of depression [J]. *Nature*, 2014, 515(7526): 180-181.
- [17] VAISHNAV K, ERIC J N. The molecular neurobiology of depression [J]. *Nature*, 2008, 455(7215): 894-902.
- [18] FANG Z H, LEE C H, SEO M K, et al. Effect of treadmill exercise on the BDNF-mediated pathway in the hippocampus of stressed rats [J]. *Neurosci Res*, 2013, 76(4): 187-194.
- [19] SURGET A, SAXE M, LEMAN S, et al. Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal [J]. *Biological Psychiatry*, 2008, 64(4): 293-301.
- [20] WOO-YANG K, WANG X S, WU Y H, et al. GSK-3 is a master regulator of neural progenitor homeostasis [J]. *Nat Neurosci*, 2009, 12(11): 1390-1397.

- [21] INKSTER B, SIMMONS A, COLE J H, et al. Unravelling the GSK3 β -related genotypic interaction network influencing hippocampal volume in recurrent major depressive disorder[J]. *Psychiatr Genet*, 2018, 28(5):77-84.
- [22] LIU W, WANG H, WANG Y, et al. Metabolic factors-triggered inflammatory response drives antidepressant effects of exercise in CUMS rats[J]. *Psychiatry Res*, 2015, 228(3):257-264.
- [23] WANG L R, KIM S H, BAEK S S, et al. Effects of treadmill exercise on the anxiety-like behavior through modulation of GSK3 β /beta-catenin signaling in the maternal separation rat pup [J]. *J of Exercise Rehabilitation*, 2019, 15(2):206-212.
- [24] LEEM Y H, KATO M, CHANG H, et al. Regular exercise and creatine supplementation prevent chronic mild stress-induced decrease in hippocampal neurogenesis via Wnt/GSK3 β /beta-catenin pathway [J]. *Phy Act Nutr*, 2019, 22(2):1-6.
- [25] HUI J, ZHANG J, PU M, et al. Modulation of GSK-3 β / β -catenin signaling contributes to learning and memory impairment in a rat model of depression [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2018, 21(9):858-870.
- [26] VIDAL R, GARRO-MARTÍNEZ E, DIAZ A, Targeting β -catenin in GLAST-expressing cells: impact on anxiety and depression-related behavior and hippocampal proliferation[J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(1):553-566.

[责任编辑 周冰冰]