

## 开心散对小鼠抑郁样行为及海马中脑源性神经营养因子的影响

刘明月<sup>1,2</sup>, 董宪喆<sup>2</sup>, 张岗强<sup>2</sup>, 辛海量<sup>3</sup>, 刘屏<sup>2</sup>, 胡园<sup>2\*</sup>

1. 河北北方学院药理学系, 张家口 075000
2. 解放军总医院临床药理研究室, 北京 100853
3. 第二军医大学中医系, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 观察开心散对悬尾模型小鼠行为学、脑内单胺类递质及海马中脑源性神经营养因子(BDNF)水平的影响, 探究开心散的抗抑郁效果与海马中 BDNF 含量的相关性。**方法** 采用小鼠悬尾实验, 观察不同剂量开心散对小鼠不动时间的影响; HPLC 法测定脑内去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)的含量; 蛋白质印迹法检测小鼠海马中 cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)、p-CREB、BDNF 的表达; RT-PCR 检测海马中 BDNF mRNA 的表达, Pearson 相关性检验确定开心散的抗抑郁作用与海马中 BDNF 蛋白和 mRNA 水平的相关性。**结果** 开心散可缩短悬尾小鼠不动时间( $P < 0.05$ ), 可增加小鼠脑内单胺类递质(DA、5-HT)和海马中 CREB、p-CREB、BDNF 的含量( $P < 0.05$ ), 其抗抑郁作用与海马中 BDNF 水平呈良好相关性(蛋白质:  $r = -0.694$ ,  $P < 0.01$ ; mRNA:  $r = -0.547$ ,  $P < 0.01$ )。**结论** 开心散对小鼠的抗抑郁作用与海马 BDNF 水平呈正相关性, 提示开心散可能通过增加海马中 BDNF 表达发挥抗抑郁作用。

**[关键词]** 开心散; 抗抑郁药; 海马; cAMP 反应元件结合蛋白质; 脑源性神经营养因子

**[中图分类号]** R 971.43 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)12-1319-05

### Effect of Kaixin-San on depression behavior and hippocampal brain-derived neurotrophic factor in mice

LIU Ming-yue<sup>1,2</sup>, DONG Xian-zhe<sup>2</sup>, ZHANG Gang-qiang<sup>2</sup>, XIN Hai-liang<sup>3</sup>, LIU Ping<sup>2</sup>, HU Yuan<sup>2\*</sup>

1. Department of Pharmacy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei, China
2. Department of Clinical Pharmacology and Pharmacy, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China
3. Department of Traditional Chinese Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of Kaixin-San (KXS) on behavior, brain monoamine transmitters, and hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in mice receiving tail suspension test (TST), so as to explore the correlation of the antidepressant effect of KXS and hippocampal BDNF level. **Methods** The effect of KXS on the immobility time of mice in the TST was observed. The levels of norepinephrine (NE), dopamine (DA) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) in the brain were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). Western blotting analysis was used to examine the expressions of cAMP-response element-binding protein (CREB), p-CREB, and BDNF in the hippocampus. BDNF mRNA expression was also examined by RT-PCR. Pearson's correlation analysis was used to evaluate relationship between anti-depression effect of Kaixin-San and hippocampal BDNF level. **Results** KXS reduced the immobility time of mice in the TST ( $P < 0.05$ ); it also increased the brain levels of monoamine transmitters (DA and 5-HT) and hippocampal levels of CREB, p-CREB and BDNF compared with the control mice ( $P < 0.05$ ). Moreover, the anti-depression effect of KXS was correlated with BDNF level (protein:  $r = -0.694$ ,  $P < 0.01$ ; mRNA:  $r = -0.547$ ,  $P < 0.01$ ) in the hippocampus. **Conclusion** The anti-depression effect of KXS is positively correlated with the hippocampal BDNF level, indicating KXS may exert anti-depression effect via increasing hippocampal BDNF.

**[Key words]** Kaixin-San; antidepressive agents; hippocampus; cyclic AMP response element-binding protein; brain-derived neurotrophic factor

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(12): 1319-1323]

**[收稿日期]** 2012-05-25 **[接受日期]** 2012-11-28

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81173579). Supported by National Natural Science Foundation of China (81173579).

**[作者简介]** 刘明月, 硕士. E-mail: mingyueliu1987@163.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 010-66936678, E-mail: huyuan1980619@126.com

抑郁症是一种常见的慢性精神类疾病,严重危害人类的身心健康。传统认为抑郁症与脑内单胺能神经递质系统失调有关,近年的研究发现抗抑郁药可通过激活调节神经可塑性的胞内信号转导途径逆转抑郁症引起的病理改变<sup>[1]</sup>。研究表明抗抑郁药能缓解海马神经元萎缩,给予选择性5-羟色胺(5-HT)再摄取抑制剂类药物如氟西汀、氟伏沙明和三环类去甲丙米嗪,能增加海马CA1区和齿状回的树突棘密度,增加海马新生神经元的存活和数量,提高神经再生<sup>[2]</sup>。脑源性神经营养因子(BDNF)属神经营养素家族,对发育过程中神经元的存活、分化以及成年神经元的存活、功能起重要作用,而BDNF的存活又依赖于转录因子cAMP反应元件结合蛋白(CREB)的功能<sup>[3]</sup>。

开心散源于《备急千金要方》,由远志、人参、茯苓和石菖蒲四味药组成,为中医治疗情志疾病的基本方剂,主治悲忧不乐、神思不安、善忘、心悸等症。我们前期研究发现开心散具有明显的抗抑郁作用<sup>[4-5]</sup>,本研究通过观察开心散对悬尾模型小鼠行为学、脑内单胺类递质及海马中BDNF的影响,探究开心散的抗抑郁效果与海马中BDNF变化之间的相关性,为阐明开心散的作用机制提供实验依据。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂 KM小鼠,雄性,体质量(20±2)g,9~10周龄,自由进食饮水,饲养室温(22±2)℃,由解放军总医院实验动物中心提供,合格证号:SCXK(京)2011-0004;氟西汀购于礼来苏州制药有限公司,批号:J20050122;CREB、p-CREB、BDNF多克隆抗体(兔源性)购于美国Abcam公司, $\beta$ -actin抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔IgG二抗购于美国Bioworld公司,RNA提取试剂盒购于天根生化科技有限公司,3K15型冷冻离心机购于美国Sigma公司。去甲肾上腺素(NE;批号:BCBD7742V,纯度≥98.0%)、多巴胺(DA;批号:061M5128V,纯度≥99.0%)、5-羟色胺(5-HT;批号:099K1222V,纯度≥98.0%)对照品均购于美国Sigma公司。

开心散提取物以人参:远志:茯苓:石菖蒲=3:2:3:2配伍组成,4.83g(生药)/g(干粉),由中国医学科学院提供,批号:20111117。

1.2 实验方法 将小鼠随机分为空白对照组、盐酸氟西汀组(20mg/kg)、开心散组(100、550、275mg/kg),剂量选择参照文献<sup>[6]</sup>,每组12只,连

续灌胃给药7d,每天1次。末次给药1h后进行小鼠悬尾实验,小鼠悬尾实验测试结束后立即断头处死,冰上迅速取全脑,并剥离出海马,称质量后于一80℃保存。

1.2.1 小鼠悬尾实验<sup>[7]</sup> 将小鼠尾端2cm处固定在悬尾仪吊环上,使小鼠呈倒挂状态,其头部对准仪器摄像头,采用小鼠悬尾仪器进行录像,小鼠悬挂2min后,开始录像监测,持续4min,记录4min内小鼠的不动(小鼠在空中停止挣扎,或仅有细小的肢体运动)时间。

1.2.2 高效液相色谱法测定小鼠全脑中NE、DA、5-HT的含量<sup>[8]</sup> 组织样本制备:取小鼠脑组织0.35g,按每100mg400 $\mu$ l比例加入提取液(0.1%半胱氨酸,0.3mmol/L乙二胺四乙酸、0.1mmol/L高氯酸),置冰浴中超声提取,按每100mg200 $\mu$ l比例加入90mmol/L的磷酸二氢钠,涡旋混匀,21000 $\times$ g4℃离心15min,取上清,0.45 $\mu$ m微孔滤膜过滤,取20 $\mu$ l进样,检测NE、DA、5-HT的浓度。对照品储备液制备:精密称取NE、DA、5-HT对照品各5.0mg,用组织提取液分别溶解定容至5ml,摇匀,配成1mg/ml各对照品储备液。从各对照品储备液中分别吸取适量,用提取液稀释成5000、1000、500、200、100、50、40、10、5ng/ml的溶液作为混合对照品溶液,避光,4℃保存。临测定前用0.45 $\mu$ m滤膜过滤。色谱条件:色谱柱Agilent C<sub>18</sub>柱;流动相:30mmol/L磷酸二氢钠,1mmol/L庚烷磺酸钠,pH3.06;流速1ml/min;荧光检测器Ex=280nm,Em=316nm;柱温35℃。

1.2.3 蛋白质印迹法测定小鼠海马中CREB、p-CREB和BDNF蛋白含量 将海马组织按100mg:1ml比例加入预冷的RIPA裂解液(含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂)在冰上研磨,12000 $\times$ g4℃离心10min,取上清液为提取的总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,加入5 $\times$ 加样缓冲液,95℃变性5min,-80℃保存备用。蛋白上样量为40 $\mu$ g,通过10%SDS-PAGE并转移至0.45 $\mu$ mPVDF膜,3%BSA室温封闭2h,以 $\beta$ -actin为内参,分别加入CREB(1:800)、p-CREB(1:500)和BDNF(1:1000)多克隆抗体,4℃过夜,TBST洗3次,每次10min;加入HRP标记的羊抗兔IgG二抗室温孵育2h,TBST洗3次,每次10min;采用ECL化学发光试剂显色,UVP凝胶成像系统拍照,并分析蛋白相对表达量(以目的蛋白CREB、p-CREB、

BDNF 与相应的  $\beta$ -actin 蛋白灰度比值表示蛋白相对含量)。

1.2.4 RT-PCR 测定小鼠海马中 BDNF mRNA 的含量 按 RNA 提取试剂盒说明书提取海马中总 RNA, 用反转录试剂盒反转录合成 cDNA, 并以 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 总量为 20  $\mu$ l。所用引物如下: BDNF 上游 5'-GAC GGT CAC AGT CCT AGA GAA-3', 下游 5'-CCT TAT GAA TCG CCA GCC AAT-3', 扩增产物长度 311 bp;  $\beta$ -actin 上游 5'-AGA CCT CTA TGC CAA CAC AGT-3', 下游 5'-GCT CAG TAA CAG TCC GCC TA-3', 扩增产物长度 447 bp。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 35 个循环。BDNF mRNA 表达水平采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法进行计算<sup>[9]</sup>。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 one-way ANOVA 方差分析, 有差异者采用 Dunnett's *t* 检验进行两两比较; 相关分析采用 Pearson 相关性检验。检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 开心散对小鼠悬尾实验不动时间的影响 如图 1 所示, 开心散(1100、550、275 mg/kg)和氟西汀

(20 mg/kg)灌胃 1 周后, 均能缩短小鼠悬尾实验的不动时间。其中开心散高(1 100 mg/kg)、中(550 mg/kg)剂量效果明显( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 开心散中剂量作用与氟西汀相当。

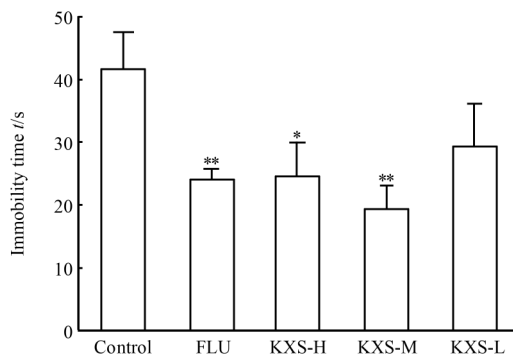


图 1 开心散对悬尾小鼠不动时间的影响

Fig 1 Effect of Kaixin-San (KXS) on immobility time in mouse tail suspension test

FLU: Fluoxetine (20 mg/kg); KXS-H: 1 100 mg/kg KXS; KXS-M: 550 mg/kg KXS; KXS-L: 275 mg/kg KXS. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group;  $n = 12$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.2 开心散对小鼠脑内 NE、DA 和 5-HT 含量的影响 结果如表 1 所示, 与对照组比较, 氟西汀和 1 100 mg/kg 开心散均可增强小鼠脑内 DA 和 5-HT 的含量, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 1 开心散对小鼠脑内 NE、DA、5-HT 含量的影响

Tab 1 Effect of Kaixin-San (KXS) on brain levels of NE, DA, and 5-HT in mouse

$n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $w_B / (ng \cdot g^{-1})$

Group	NE	DA	5-HT
Control	98.5 $\pm$ 11.8	196.3 $\pm$ 13.7	117.8 $\pm$ 9.4
Fluoxetine 20 mg $\cdot$ kg <sup>-1</sup>	101.3 $\pm$ 17.8	240.1 $\pm$ 9.5*	144.9 $\pm$ 4.6*
Kaixin-San 1 100 mg $\cdot$ kg <sup>-1</sup>	164.2 $\pm$ 8.6	243.5 $\pm$ 12.3*	132.2 $\pm$ 5.9*
550 mg $\cdot$ kg <sup>-1</sup>	105.6 $\pm$ 7.6	202.2 $\pm$ 6.2	126.3 $\pm$ 11.7
275 mg $\cdot$ kg <sup>-1</sup>	109.1 $\pm$ 9.7	187.7 $\pm$ 8.8	113.5 $\pm$ 10.4

NE: Norepinephrine; DA: Dopamine; 5-HT: 5-hydroxytryptamine. \*  $P < 0.05$  vs control group

2.3 开心散对小鼠海马中 CREB、p-CREB 表达的影响 蛋白免疫印迹分析检测结果显示, 与对照组相比, 开心散高剂量(1 100 mg/kg)可增加海马中 CREB 和 p-CREB 的表达, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 图 2)。

2.4 开心散对小鼠海马中 BDNF 蛋白和 mRNA 水平的影响 结果如图 3 所示, 开心散 1 100、550 mg/kg 给药 7 d 可增加海马中 BDNF 蛋白的表达量( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 不同浓度开心散给药 7 d 均

可提高小鼠海马中 BDNF mRNA 的表达( $P < 0.01$ )。

2.5 海马中 BDNF 表达水平与小鼠悬尾不动时间之间的相关性 每组各取 6 只小鼠, 将其海马中 BDNF 蛋白和 mRNA 水平分别与悬尾不动时间进行 Pearson 相关分析, 结果显示悬尾不动时间与 BDNF 蛋白( $r = -0.694$ ,  $P < 0.01$ )、BDNF mRNA ( $r = -0.547$ ,  $P < 0.01$ ) 表达均呈负相关, 即脑内 BDNF 含量越多, 开心散抗抑郁的作用效果越好。

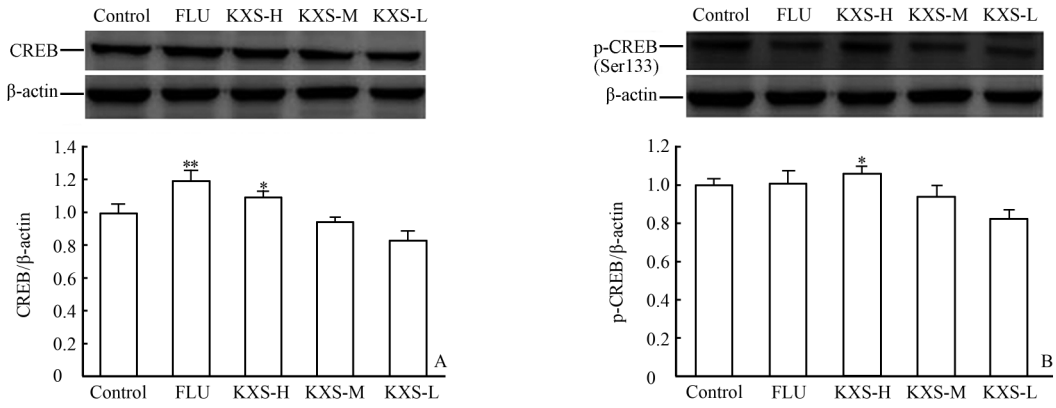


图 2 开心散对小鼠海马中 CREB 和 p-CREB 蛋白表达的影响

Fig 2 Effects of Kaixin-San (KXS) on CREB and p-CREB expression in mouse hippocampus

FLU: Fluoxetine (20 mg/kg); KXS-H: 1 100 mg/kg KXS; KXS-M: 550 mg/kg KXS; KXS-L: 275 mg/kg KXS. A: CREB protein; B: p-CREB protein. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group;  $n = 12$ ,  $\bar{x} \pm s$

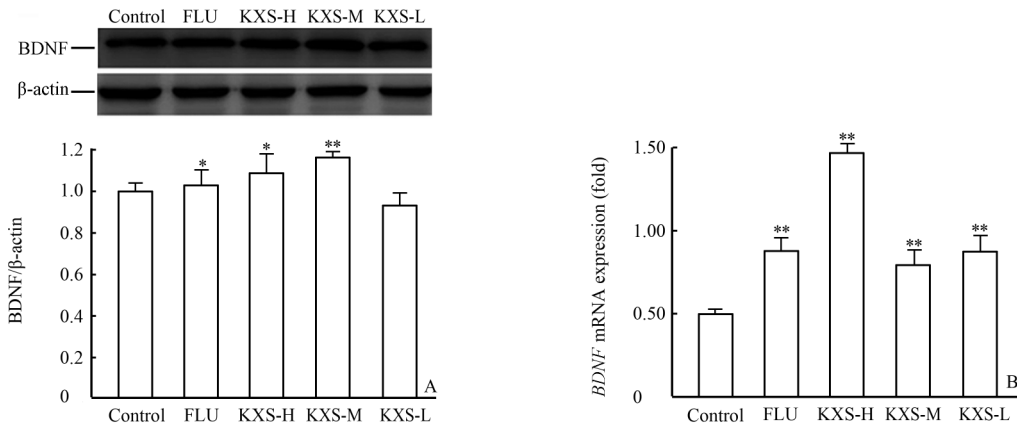


图 3 开心散对小鼠海马中 BDNF 蛋白(A)和 mRNA(B)表达的影响

Fig 3 Effects of Kaixin-San (KXS) on BDNF protein (A) and mRNA(B) expression in mouse hippocampus

FLU: Fluoxetine (20 mg/kg); KXS-H: 1 100 mg/kg KXS; KXS-M: 550 mg/kg KXS; KXS-L: 275 mg/kg KXS; BDNF: Brain-derived neurotrophic factor. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group;  $n = 12$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

抑郁症的发病率呈逐年上升趋势,严重影响了人类的生活质量。NE、DA、5-HT 等单胺类神经递质是中枢神经系统的重要生物活性物质,参与机体的多项生理活动,包括机体情绪、学习记忆、精神活动等的中枢调节,目前研究表明抑郁症的发生与脑内单胺类递质代谢失调密切相关,许多抗抑郁药都是通过调节中枢单胺类递质的重摄取和代谢平衡来发挥作用的<sup>[10-11]</sup>。本实验采用小鼠悬尾绝望模型,结果显示开心散可降低小鼠的不动时间,该结果与本课题组前期研究<sup>[12]</sup>结果相同;测定脑内 NE、DA、5-HT 含量发现开心散可明显增加小鼠脑内 DA 和 5-HT 的含量,提示开心散可参与小鼠脑内单胺类神经递质的代谢。

抑郁症患者的边缘系统部分脑区结构改变、功能受损、神经元再生出现障碍,特别是成熟海马神经元的再生障碍导致的抑郁和情绪失控的研究日益受到关注<sup>[13]</sup>。各种神经递质(5-HT、NE 等)作用于大脑特异性脑区,由 CREB 等介导神经递质诱导的基因表达,在相应的脑区产生一些发挥保护性作用的物质(如 BDNF)<sup>[14-17]</sup>。近年“神经营养假说”认为海马 BDNF 的表达减少和功能下调与抑郁的发生相关,BDNF 下调可增加海马神经元对伤害性应激的敏感性,间接引起神经毒性,导致海马神经元的萎缩<sup>[18]</sup>。长期服用不同类型的抗抑郁药具有促神经再生作用,减少脑萎缩、促进胶质细胞增殖,使应激引起的 BDNF 下调恢复正常;同时抗抑郁药还可以激活促进神经可塑性的胞内信号转导途径阻断神经元细胞的萎缩和凋亡,逆转抑郁症引起的病理改

变<sup>[19-21]</sup>。本研究发现开心散可提高神经递质受体调控的下游神经信号通路中转录因子 CREB 和神经营养因子 *BDNF* mRNA 以及蛋白的表达水平, 且开心散的抗抑郁表现行为作用效果与 *BDNF* 表达水平呈现相关性, 即开心散增加小鼠脑内 *BDNF* 越多, 其抗抑郁的作用越明显。

本研究结果不仅验证了神经营养相关的抗抑郁假说, 同时进一步推测开心散的抗抑郁作用可能是通过调节 *BDNF* 的表达, 保护甚至逆转应激对神经元、突触的损伤, 从而改善抑郁状态。但开心散对神经元再生和保护的具体成分及具体通路和靶点还有待于进一步研究。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Castrén E. Neurotrophic effects of antidepressant drugs[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2004, 4: 58-64.
- [2] 任广立. cAMP 反应元件结合蛋白与神经系统相关疾病[J]. *国外医学儿科学分册*, 2002, 29: 73-76.
- [3] Peters J, Dieppa-Perea L M, Melendez L M, Quirk G J. Induction of fear extinction with hippocampal-infralimbic *BDNF*[J]. *Science*, 2010, 328: 1288-1290.
- [4] 汪进良. 开心散抗抑郁的物质基础和作用机制研究[D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2005.
- [5] Zhou X J, Liu M, Yan J J, Cao Y, Liu P. Antidepressant-like effect of the extracted of Kai Xin San, a traditional Chinese herbal prescription, is explained by modulation of the central monoaminergic neurotransmitter system in mouse[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139: 422-428.
- [6] Cao Y, Hu Y, Liu P, Zhao H X, Zhou X J, Wei Y M. Effect of a Chinese traditional formula Kai Xin San (KXS) on chronic fatigue syndrome mice induced by forced wheel running[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139: 19-25.
- [7] Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1985, 85: 367-370.
- [8] 朱杰, 马冯飞, 冯芳. 大鼠脑组织中抑郁症相关生化物质分析方法的建立及应用[J]. *中国生化药物杂志*, 2011, 32: 444-448.
- [9] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [10] Whale R, Clifford E M, Bhaqwaqar Z, Cowen P J. Decreased sensitivity of 5-HT<sub>1D</sub> receptors in melancholic depression[J]. *Br J Psychiatry*, 2001, 178: 454-457.
- [11] Fink K B, Göthert M. 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release[J]. *Pharmacol Rev*, 2007, 59: 360-417.
- [12] Hu Y, Liu P, Hong G D, Rahman K, Wang D X, Chen M L, et al. Behavioral and biochemical effects of Kaixin-San, a traditional Chinese medicinal empirical formula[J]. *Drug Develop Res*, 2008, 69: 267-271.
- [13] Eisch A J, Petrik D. Depression and hippocampal neurogenesis: a road to remission[J]. *Science*, 2012, 338: 72-75.
- [14] Pittenger C, Duman R S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2008, 33: 88-109.
- [15] Tardito D, Perez J, Tiraboschi E, Musazzi L, Racagni G, Popoli M. Signaling pathways regulating gene expression, and neurotrophic mechanisms in the action of antidepressants: a critical overview[J]. *Pharmacol Rev*, 2006, 58: 115-134.
- [16] 陈琳, 赵玉男, 戴建国, 王中立, 黄玉芳. 海马 cAMP 反应元件结合蛋白与抗抑郁治疗[J]. *生理学报*, 2010, 62: 489-494.
- [17] Taliáz D, Stall N, Dar D E, Zangen A. Knockdown of brain-derived neurotrophic factor in specific brain sites precipitates behaviors associated with depression and reduces neurogenesis[J]. *Mol Psychiatry*, 2010, 15: 80-92.
- [18] Norrholm S D, Ouimet C C. Altered dendritic spine density in animal models of depression and in response to antidepressant treatment[J]. *Synapse*, 2001, 42: 151-163.
- [19] Jacobs B L. Adult brain neurogenesis and depression[J]. *Brain Behav Immun*, 2002, 16: 602-609.
- [20] Kempermann G. Regulation of adult hippocampal neurogenesis: implications for novel theories of major depression[J]. *Bipolar Disord*, 2002, 4: 17-33.
- [21] Gerstner W, Sprekeler H, Deco G. Theory and simulation in neuroscience[J]. *Science*, 2012, 338: 60-65.

[本文编辑] 周燕娟, 孙岩