

基于 NO-cGMP 信号转导通路交泰丸对慢性温和不可预知性应激抑郁大鼠的抗抑郁作用研究

雒明池¹, 梁如², 高杉², 王朔², 高树明², 徐一兰², 李琳^{2*}, 于春泉^{2*}

1. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150

2. 天津中医药大学, 天津 300193

摘要: 目的 基于一氧化氮-环磷酸鸟苷酸 (NO-cGMP) 信号转导通路探讨交泰丸对慢性温和不可预知性应激 (CUMS) 抑郁模型大鼠的抗抑郁作用。方法 采用 CUMS 进行大鼠抑郁模型造模, 实验第 21 天各给药组连续 ig 治疗药物 14 d。采用 ELISA 法检测大鼠海马组织及血浆中 NO 和 cGMP 水平; RT-PCR 法检测大鼠海马组织中一氧化氮合酶 (包括 iNOS、nNOS) 及 NMDA 受体亚单位 NR1、NR2A 和 NR2B 基因 mRNA 表达。结果 与对照组比较, 模型组大鼠海马组织及血浆中 NO、cGMP 水平明显升高; 大鼠海马组织中 iNOS mRNA、nNOS mRNA、NR1 mRNA、NR2A mRNA、NR2B mRNA 表达显著升高。与模型组相比, 交泰丸高、中、低剂量 (3.00、1.50、0.75 g/kg) 及阳性药盐酸氟西汀均可逆转以上指标的改变。结论 交泰丸可通过调节 NO-cGMP 信号转导通路达到抗抑郁作用。

关键词: 交泰丸; 慢性温和不可预知性应激; 抗抑郁; 一氧化氮; 环磷酸鸟苷酸; NO-cGMP 信号转导通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)18-4344-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.18.019

Antidepressant effects of Jiaotai Pills based on NO-cGMP signal transduction pathway in chronic mild unpredictable stress depression rats

LUO Ming-chi¹, LIANG Ru², GAO Shan², WANG Shuo², GAO Shu-ming², XU Yi-lan², LI Lin², YU Chun-quan²

1. The Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300150, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Jiaotai Pills on antidepressants in chronic mildly unpredictable stress (CUMS) depression model rats based on nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate (NO-cGMP) signal transduction pathway. **Methods** The depression model of rats was induced by CUMS. On day 21 of the experiment, the rats in each group were treated with continuous ig administration for 14 d. The concentrations of NO and cGMP in hippocampus and plasma of rats were detected by Elisa method. The mRNA expression of NO synthase (including iNOS and nNOS) and NMDA receptor subunits NR1, NR2A, and NR2B in rat hippocampus was detected by RT-PCR. **Results** Compared with the control group, the levels of NO and cGMP in the hippocampus and plasma in the model group were significantly increased. The expressions of iNOS mRNA, nNOS mRNA, NR1 mRNA, NR2A mRNA, and NR2B mRNA in the hippocampus were significantly increased in the model group. Compared with the model group, Jiaotai Pills high, medium, and low dose and positive drug administration reversed the above changes. **Conclusion** Jiaotai Pills have the antidepressant effect on depression rats with CUMS by regulating NO-cGMP signal transduction pathway.

Key words: Jiaotai Pills; chronic mildly unpredictable stress; antidepressant; nitric oxide; cGMP; NO-cGMP signal transduction pathway

抑郁症是一种病因复杂、症状多变的情感精神类疾病, 发病机制涉及较广, 包括生物、心理、社会等多方面。近年来人们生活节奏加快, 生活压力

增加, 抑郁症发病率逐年升高。有研究显示, 至 2010 年精神类疾病导致的全球死亡人数已高达 23.2 万人, 是非致命性疾病致死的首要原因。抑郁症高发

收稿日期: 2018-03-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81273896)

作者简介: 雒明池 (1963—), 男, 副主任医师。E-mail: 13602061763@163.com

*通信作者 于春泉 E-mail: ycq-4@163.com

李琳 E-mail: llbianji@163.com

病率、难治愈以及自杀率高的特点,导致的伤残占精神疾病的 40.5%^[1]。另世界卫生组织预测至 2020 年抑郁症将成为第 2 大致残原因,仅次于心脑血管疾病^[2]。中医古方交泰丸出自明朝·韩懋《韩氏医通》,由黄连和肉桂两味药组成,临床主要用于治疗失眠^[3-6]。经本课题组前期实验及其他动物实验验证交泰丸具有明显的抗抑郁作用^[7-9],并可通过影响脑内单胺类神经递质含量达到抗抑郁作用^[10]。为进一步探讨交泰丸的抗抑郁作用机制,本研究基于一氧化氮-环磷酸鸟苷酸(NO-cGMP)信号转导通路探讨交泰丸对慢性温和和不可预知性应激(CUMS)抑郁模型大鼠的抗抑郁作用机制,为该方的临床应用及进一步机制研究奠定基础。

1 材料

1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠,体质量 140~160 g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物合格证编号 SCXK(京)2012-0001,实验前适应性喂养 1 周。

1.2 实验药品

交泰丸中黄连、肉桂饮片均购自安徽省亳州市药材总公司中西药公司,由天津中医药大学中药学院李天祥教授鉴定分别为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch 的干燥根茎及樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥树皮。阳性对照药物盐酸氟西汀(百优解,礼来苏州制药有限公司,批号 4482A,用时以超纯水配制并超声助溶)。

1.3 主要仪器与试剂

Digibehave 双画面动物行为视频分析系统 2.1 版及开场实验观察箱(上海吉量软件科技有限公司);动物灌胃器(北京吉安得尔科技有限公司);Mouse/Rat cGMP Parameter Assay Kit 试剂盒(美国 R&D 公司);NO 试剂盒(南京建成生物工程研究所);Qiagen RNeasy Mini kit(德国 QIAGEN 公司);RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(美国 Thermo 公司);Fast SYBR® Green Master Mix(美国 Thermo 公司);DEPC-ddH₂O(大连宝生物工程有限公司)。

2 方法

2.1 交泰丸受试药物制备^[11]

黄连、肉桂以 10:1 的比例,取黄连饮片 1 000 g、肉桂饮片 100 g,制成 20 目粗粉。黄连粉加水回流提取 3 次,加水量依次为 10、8、8 倍,提取 170、80、40 min,滤过,2 000 r/min 离心 20 min,合并上

清液;肉桂粉加水用双提法提取 3 次,加水量依次为 10、8、8 倍,提取 170、80、40 min,滤过,2 000 r/min 离心 20 min,合并上清液;将分别获取的黄连、肉桂上清液混合,水浴浓缩,60 °C 烘干,粉碎成干粉(出膏率为 31.5%),超声溶解备用。

2.2 动物分组及造模^[12-13]

随机将 72 只大鼠分为对照组、模型组、阳性药(盐酸氟西汀,7.5 mg/kg)组和交泰丸低、中、高剂量(生药 0.75、1.50、3.00 g/kg)组,每组 12 只,分笼适应性饲养 1 周。对照组大鼠不接受任何刺激,其余各组大鼠均接受 35 d 的 CUMS 刺激,具体包括 4 °C 冷水游泳 5 min、昼夜颠倒、夹尾持续 2 min、振荡 2 min、禁食 24 h、禁水 24 h,每组动物每天随机给予 1 种刺激,同 1 种刺激累计使用不超过 5 次。刺激第 21 天,对照组、模型组按 10 mL/kg ig 生理盐水,其余各组按 10 mL/kg ig 给予相应药物,直至第 35 天。

2.3 实验动物取材及样本处理

在第 36 天使用 10%水合氯醛将大鼠麻醉,腹主动脉取血后断头处死,冰上取出大鼠脑组织并迅速分离出海马,称质量后各样品于液氮中速冻,然后置于-80 °C 冰箱中保存待测。

2.4 大鼠海马组织及血浆中 NO、cGMP 水平测定

ELISA 法检测大鼠血浆及海马组织中 NO、cGMP 含量,严格按照试剂盒说明书进行操作。

2.5 大鼠海马组织中 NO-cGMP 通路相关基因 mRNA 表达的测定

PT-PCR 法检测大鼠脑海马组织中一氧化氮合酶(NOS),包括诱导型 NOS(iNOS)和内皮型 NOS(nNOS),以及 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸(NMDA)受体亚单位 NR1、NR2A 和 NR2B 基因 mRNA 表达。RNA 提取:大鼠海马组织称质量后采用 Qiagen RNeasy Mini kit 试剂盒提取总 RNA,测定 RNA 浓度;逆转录合成 cDNA:按照反转录试剂盒说明冰上操作,合成 cDNA 于-80 °C 保存备用;荧光定量 PCR 实验:应用 ABI®7500 实时荧光定量 PCR 仪分析软件测定 iNOS、nNOS、NR1、NR2A 和 NR2B mRNA 的表达。反应以 β -actin 和 GAPDH 作为内参,引物序列见表 1。其他操作按试剂盒说明书进行。

2.6 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 19.0 软件进行数据统计分析,组间比较使用单因素方差分析(One-Way ANOVA)法。

表 1 RT-PCR 引物序列及反应参数

Table 1 RT-PCR primer sequences and reaction parameters

引物名称	引物序列 (5'→3')	PCR 反应参数
GAPDH	正向: AGACAGCCGCATCTTCTTGT 反向: TGATGGCAACAATGTCCACT	① 94 ℃, 2 min, 1 个循环 ; ② 94 ℃, 15 s; 60 ℃, 1 min; 40 个循环; ③ 熔解
β-actin	正向: TGTTACCAACTGGGACGACA 反向: GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA	
iNOS	正向: GGGAGCCAGAGCAGTACAAG 反向: CATGGTGAACACGTTCTTGG	
nNOS	正向: GACAACGTTTCCTGTGGTCCT 反向: TCCAGTGTGCTCTTCAGGTG	
NR1	正向: CGGCTCTTGAAGATACAGC 反向: GTGAAGTGGTCGTTGGGAGT	
NR2A	正向: TTTCGAATCTGCCACCTAC 反向: TTCTGTGACCAGTCCTGCTG	
NR2B	正向: GTGAGAGCTCCTTTGCCAAC 反向: GTCAGGGTAGAGCGACTTGC	

表 2 交泰丸对 CUMS 大鼠血浆、海马组织中 NO 和 cGMP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)Table 2 Effect of Jiaotai Pills on content of NO and cGMP in plasma and hippocampus of CUMS rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	NO/(μmol·g ⁻¹)		cGMP/(μmol·g ⁻¹)	
		血浆	海马	血浆	海马
对照	—	36.21 ± 8.65	9.79 ± 3.95	32.24 ± 12.10	0.25 ± 0.10
模型	—	53.59 ± 6.09 ^{##}	21.65 ± 7.38 ^{##}	56.11 ± 10.75 ^{##}	0.57 ± 0.13 ^{##}
盐酸氟西汀	0.007 5	38.63 ± 8.31 ^{**}	11.88 ± 4.53 ^{**}	36.92 ± 10.99 ^{**}	0.31 ± 0.06 ^{**}
交泰丸	0.75	43.02 ± 8.35 [*]	15.61 ± 4.98 [*]	42.00 ± 13.43	0.40 ± 0.18 [*]
	1.50	42.37 ± 4.46 [*]	15.06 ± 3.74 [*]	41.93 ± 11.44	0.37 ± 0.13 ^{**}
	3.00	38.22 ± 5.48 ^{**}	13.74 ± 3.35 ^{**}	36.20 ± 10.86 ^{**}	0.35 ± 0.10 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下同^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below

组织中 iNOS、nNOS mRNA 表达显著升高, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。盐酸氟西汀组及交泰丸低、中、高剂量组均能够不同程度地下调海马组织中 iNOS、nNOS mRNA 的表达水平, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01)。以 β-actin 作为内参引物时, 模型组大鼠海马组织中 iNOS、nNOS mRNA 表达显著升高, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。盐酸氟西汀组及交泰丸低、中、高剂量组均能够不同程度地下调海马组织中 iNOS、nNOS mRNA 的表达水平, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果见图 1。

3.3 对 CUMS 大鼠海马组织中 NMDA 受体亚单位 NR1、NR2A 和 NR2B 基因 mRNA 表达的影响

以 GAPDH 作为内参引物时, 模型组大鼠海马

3 结果

3.1 对 CUMS 大鼠血浆、海马组织中 NO 和 cGMP 水平的影响

模型组大鼠血浆、海马组织中 NO 水平明显升高, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。盐酸氟西汀组及交泰丸低、中、高剂量组均能够不同程度地降低大鼠血浆、海马组织中 NO 水平, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果见表 2。

模型组大鼠血浆、海马组织中 cGMP 水平明显升高, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。盐酸氟西汀组及交泰丸低、中、高剂量组均能够不同程度地降低大鼠血浆、海马组织中 cGMP 水平, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果见表 2。

3.2 对 CUMS 大鼠海马组织中 iNOS 和 nNOS mRNA 表达的影响

以 GAPDH 作为内参引物时, 模型组大鼠海马

组织中 NMDA 受体亚单位 NR1、NR2A 和 NR2B 基因 mRNA 表达显著升高, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。盐酸氟西汀组及交泰丸低、中、高剂量组均能够不同程度地下调海马组织中 NMDA 受体亚单位 NR1、NR2A 和 NR2B 基因 mRNA 的表达水平, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01)。以 β-actin 作为内参引物时, 模型组大鼠海马组织中 NMDA 受体亚单位 NR1、NR2A 和 NR2B 基因 mRNA 表达显著升高, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。盐酸氟西汀组、交泰丸低、中、高剂量组均能够不同程度地下调海马组织中 NMDA 受体亚单位 NR1、NR2A 和 NR2B 基因 mRNA 的表达水平, 其中, 盐酸氟西汀组及交泰丸中、高剂量组与模型组比较差异显著 ($P < 0.01$)。结果见图 2。

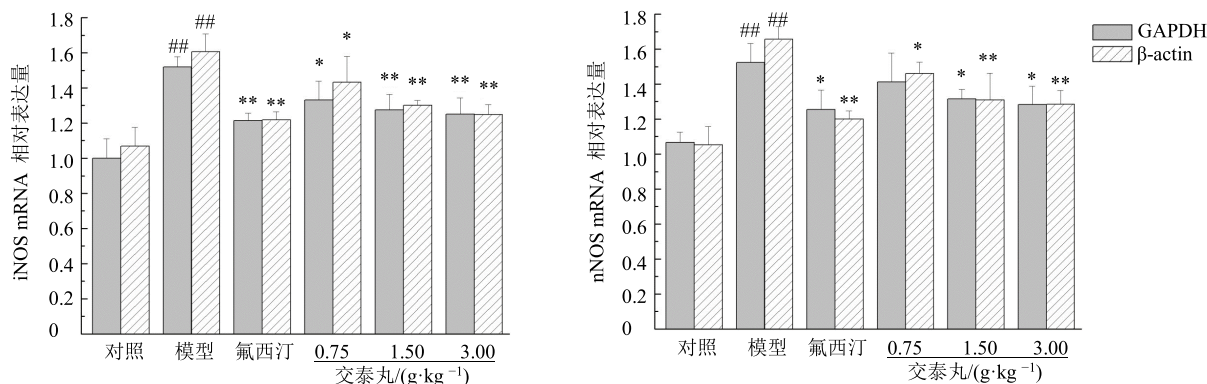


图 1 交泰丸对 CUMS 大鼠海马组织中 iNOS 和 nNOS mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 1 Effect of Jiaotai Pills on iNOS and nNOS mRNA expression in hippocampus of CUMS rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

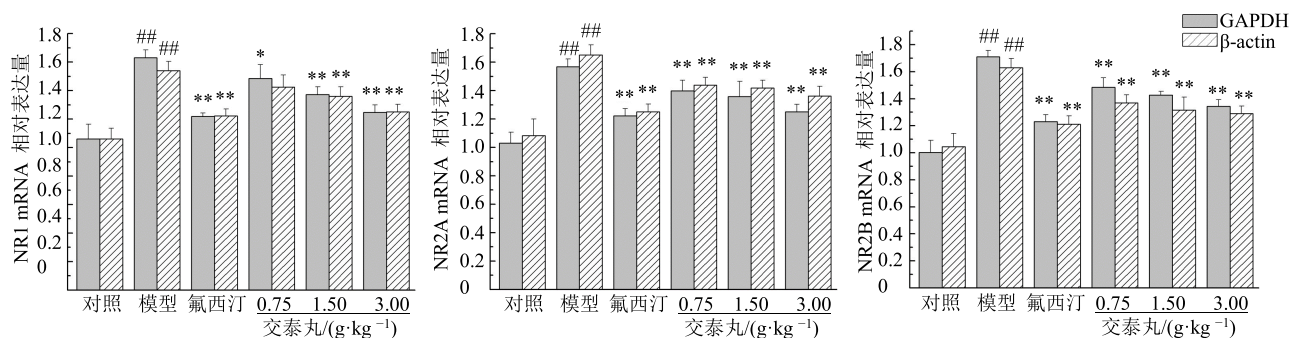


图 2 交泰丸对 CUMS 大鼠海马组织中 NR1、NR2A、NR2B mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 2 Effect of Jiaotai Pills on NR1, NR2A, and NR2B mRNA expression in hippocampus of CUMS rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

4 讨论

近年来关于抑郁症作用机制的研究逐渐成为抑郁症研究者们关注的热点和焦点，研究者们逐渐从信号转导理论来阐明抗抑郁药物的多靶点作用机制。目前所有的抗抑郁药物从单胺氧化酶抑制剂和三环类抗抑郁药到双重再摄取抑制剂，有 30% 的患者治疗显示无效，所以需要从新的靶点机制上进行抗抑郁药物的研究与开发。有研究显示，NO-cGMP 通路抗抑郁药物的作用机制相关^[14-15]。NO 含量的变化可以导致 cGMP 水平的改变，进而引起中枢神经递质多巴胺分泌的变化，而多巴胺被认为在抑郁症的发生发展以及预防治疗中发挥一定作用。另外 NO 作为一种重要的神经元信使，在中枢神经系统发挥着重要的调节作用，参与机体多种生理调节和机制保护作用^[16]。NO 含量升高能够促使谷氨酸的释放，谷氨酸作用于 NMDA 受体导致钙离子升高，进而活化 NOS，从而影响神经元正常功能的维持，影响大脑的学习和记忆等功能^[17]。当 NMDA 受体亚单位 NR1、NR2A 和 NR2B 的含量发

生异常时，也会介导产生神经兴奋性毒性作用，发生相应的神经精神症状^[18]。

本研究采用经典的 CUMS 刺激进行大鼠抑郁模型造模，采用配方简单、疗效显著的中医古方交泰丸^[7]进行干预治疗，方中黄连清热泻火解毒、燥湿，含有小檗碱、黄连碱、甲基黄连碱等多种生物碱^[19]。其中小檗碱的抗抑郁活性已有报道^[20]，Kulkarni 等^[15]研究表明，黄连中有效成分小檗碱可通过 NO-cGMP 信号通路发挥抗抑郁作用。肉桂助阳补火、散寒止痛，可温经通脉、引火归元，含有桂皮醛、肉桂醇、肉桂醇醋酸酯、肉桂酸等多种成分^[19]。有文献报道，肉桂或桂皮醛作为主要活性成分的药物对抑郁症具有明显的治疗作用^[21]。也有研究显示肉桂可以促进交泰丸中黄连的抗抑郁作用^[22]。

本研究结果表明，CUMS 大鼠海马组织、血浆中 cGMP 与 NO 的浓度增高，表明 NO-cGMP 信号通路参与了抑郁症的发生，给予交泰丸药物治疗后，有效地降低了大鼠海马组织及血浆中 cGMP 与 NO 的浓度。另外 RT-PCR 研究结果显示，给予交

泰丸各剂量后,大鼠海马组织中 NOS (包含 iNOS 及 nNOS) 基因的 mRNA 均呈现下降趋势,且有剂量依赖关系。综上结果表明,交泰丸各剂量均可有效降低大鼠海马组织、血浆中 cGMP 与 NO 的浓度以及 NMDA 受体亚单位 NR1、NR2A 和 NR2B 基因的 mRNA 表达水平,研究表明交泰丸可通过调节 NO-cGMP 信号传导通路达到抗抑郁的目的。

参考文献

- [1] Whiteford H A, Degenhardt L, Rehm J, *et al.* Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders findings from the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 2013, 382(9904): 1575-1586.
- [2] Mayberg H S, Lozano A M, Voon V, *et al.* Deep brain stimulation for treatment-resistant depression [J]. *Neuron*, 2005, 45(5): 651-660.
- [3] 龚梦鹃, 岳 贺, 周祥羽, 等. 交泰丸干预对氯苯丙氨酸致大鼠失眠的作用机制研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2017, 12(9): 1230-1234.
- [4] 王 宁, 常 顺. 交泰丸加味治疗失眠 89 例临床观察 [J]. 河北中医, 2004, 26(6): 442-442.
- [5] Kou J, Wu Y, Wang Q, *et al.* Studies on the sedative and hypnotic activities of Jiaotai Wan prepared by raw or wine-processed *Coptidis Rhizoma* [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2007, 23(5): 15-17.
- [6] 瞿 彬, 张 蓉, 杨云霜, 等. 交泰丸加减方治疗失眠症 50 例 [J]. 陕西中医, 2016, 37(12): 1632-1634.
- [7] 于春泉, 王 怡, 高 杉, 等. 交泰丸不同配比抗抑郁作用的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 225-228.
- [8] 张 潇, 高 耀, 向 欢, 等. 基于网络药理学的交泰丸治疗抑郁症作用机制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(8): 1584-1590.
- [9] 吴 琨, 时京珍, 曲莉莎, 等. 交泰丸抗抑郁作用的药理实验研究 [J]. 贵阳中医学院学报, 2009, 31(5): 29-31.
- [10] 杨 帅, 潘 晔, 宋彦奇, 等. 交泰丸对抑郁大鼠行为学及脑内单胺类神经递质的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(23): 4218-4223.
- [11] 梁 如, 殷 佳, 潘 晔, 等. 交泰丸对慢性温和不可预知性应激抑郁模型大鼠炎性细胞因子的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(5): 1100-1105.
- [12] 于泽胜, 路腾飞, 周好波, 等. 柴胡白芍药对慢性温和不可预知性应激抑郁模型大鼠脑内单胺类神经递质的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(16): 2887-2892.
- [13] Menniti F S, Faraci W S, Schmidt C J. Phosphodiesterases in the CNS: Targets for drug development [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(8): 660-670.
- [14] Shelly M, Lim B K, Cancedda L, *et al.* Local and long-range reciprocal regulation of cAMP and cGMP in axon/dendrite formation [J]. *Science*, 2010, 327(5965): 547-552.
- [15] Kulkarni S K, Dhir A. Current investigational drugs for major depression [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2009, 18(6): 767-788.
- [16] 王景霞, 刘 妍, 张建军. 一氧化氮与抑郁症 [J]. 现代医学, 2011, 39(1): 104-107.
- [17] 张 镛. 神经系统的 NO/cGMP 系统 [J]. 临床与病理杂志, 1996, 15(2): 77-79.
- [18] 王 文, 徐天乐. NMDA 受体通道的结构与功能 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1997(4): 321-326.
- [19] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [20] Shen J D, Ma L G, Hu C Y, *et al.* Berberine up-regulates the BDNF expression in hippocampus and attenuates corticosterone-induced depressive-like behavior in mice [J]. *Neurosci Lett*, 2016, 614(5): 77-82.
- [21] 郑乐建. 一种治疗抑郁症药物及肉桂或其提取物桂皮醛在制备治疗抑郁症药物中的应用: 中国, CN 1810274A [P]. 2006-08-02.
- [22] 全世建, 张丽君, 林杏娥, 等. 交泰丸最优配伍比例研究 [J]. 中医学报, 2008, 23(2): 28-29.