

复方柴归方超临界 CO₂ 提取物调控 cAMP 信号通路的抗抑郁作用机制研究

向 欢¹, 高 耀², 刘少博², 韩雨梅¹, 秦雪梅^{2*}, 田俊生^{2*}

1. 山西大学体育学院, 山西 太原 030006

2. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

摘 要: **目的** 从环磷酸腺苷(cAMP)信号通路角度探讨复方柴归方超临界 CO₂ 提取物的抗抑郁作用机制。**方法** 采用慢性温和不可预知应激(CUMS)程序对大鼠进行造模,以高、中、低剂量复方柴归方超临界 CO₂ 提取物及文拉法辛为干预药物,检测各组大鼠海马组织中 cAMP、蛋白激酶 A(PKA)、环磷酸腺苷反应原件结合蛋白(CREB)、脑源性神经生长因子(BDNF)水平及其相应 mRNA 水平。**结果** 与对照组比较,模型组大鼠海马组织中 cAMP、PKA、p-CREB、BDNF 水平显著下降($P < 0.05$ 、 0.01),复方柴归方干预后,与模型组比较,各剂量组 cAMP、PKA、p-CREB、BDNF 水平均出现回调($P < 0.05$ 、 0.01);同时,模型组大鼠海马组织中酪氨酸激酶 B(TrkB)、PKA、p-CREB、BDNF 的 mRNA 水平显著下降($P < 0.05$ 、 0.01),复方柴归方干预后,与模型组相比,各剂量组 TrkB、PKA、p-CREB、BDNF 的 mRNA 水平均出现回调($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 复方柴归方超临界 CO₂ 提取物可通过调控 cAMP-PKA-CREB-BDNF 信号通路发挥抗抑郁作用。

关键词: 复方柴归方;超临界 CO₂ 提取物;cAMP 信号通路;抗抑郁;cAMP-PKA-CREB-BDNF 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)14-3368-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.14.015

Antidepressant mechanism of supercritical CO₂ extract from Compound Chaigui Prescription regulating cAMP signaling pathway

XIANG Huan¹, GAO Yao², LIU Shao-bo², HAN Yu-mei¹, QIN Xue-mei², TIAN Jun-sheng²

1. School of Physical Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. Modern Research Center of Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: **Objective** To investigate the antidepressant mechanism of supercritical CO₂ extract from Compound Chaigui Prescription from the perspective of cAMP signaling pathway. **Methods** The rats model were established by chronic unpredictable mild stress (CUMS). The rats were administrated with high, medium and low doses of supercritical CO₂ extract from Compound Chaigui Prescription and venlafaxine as intervention drugs. The protein expression levels of cAMP, PKA, p-CREB and BDNF in tissues and their corresponding mRNA levels were explored for their antidepressant mechanism. **Results** Compared with the blank group, the expression levels of cAMP, PKA, p-CREB and BDNF in the hippocampus of the model group were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). After the intervention of the Compound Chaigui Prescription, compared with the model group, there was a significant difference in the callus of each dose group. At the same time, the mRNA levels of TrkB, PKA, p-CREB and BDNF in the hippocampus of the model group were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). After the intervention, there was a callback in each dose group compared with the model group, with significant differences. **Conclusion** Supercritical CO₂ extract from Compound Chaigui Prescription can exert antidepressant effect by regulating cAMP-PKA-CREB-BDNF signaling pathway.

Key words: Compound Chaigui Prescription; supercritical CO₂ extract; cAMP signaling pathway; antidepressant; cAMP-PKA-CREB-BDNF signaling pathway

抑郁症是一种以显著而持久的心境低落、思维征的一类心境障碍综合征^[1]。2017 年世界卫生组织指出,抑郁症已成为世界第 4 大疾患,全球抑郁症

收稿日期: 2019-03-31

基金项目: 国家科技重大专项课题(2017ZX09301047); 山西省科技重点研发计划(201603D3113013); 山西省科技重点研发计划(201603D321077); 山西省重点实验室项目(201605D111004); 山西省科技创新重点团队项目(201605D131045-18)

作者简介: 向 欢(1984—),女,湖北武汉人,讲师,研究方向为中医药康复与保健。Tel: (0351)7019297 E-mail: xianghuan0327@sxu.edu.cn

***通信作者** 田俊生(1980—),男,副教授,研究方向为中药药理学。Tel: (0351)7019297 Fax: (0351)7018397 E-mail: jstian@sxu.edu.cn

秦雪梅(1964—),女,博士生导师,教授,研究方向为中医药代谢组学。Tel: (0351)7011501 Fax: (0351)7018397 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

患者约有 3.22 亿人,我国抑郁症发病率约为 4.2%,目前已经有超过 5 000 万人患病^[2],严重影响了人们的正常生活,给家庭乃至整个社会带来沉重的负担,因此,阐明抑郁症的病理生理学基础对于治疗抑郁症和抗抑郁新药研发至关重要。抑郁症的发病机制复杂,目前主要涉及单胺类假说、受体假说、神经内分泌假说、神经元损伤假说、细胞分子机制假说等,其中关于细胞分子机制假说中的环磷酸腺苷(cAMP)信号通路的研究受到广泛关注^[3-4]。

本课题组前期通过系统溶剂提取,药效筛选和药效成分归属等方法,化裁了逍遥散复方中抗抑郁贡献较少的生姜和茯苓 2 味中药,得到了由柴胡、当归、白芍、炒白术、炙甘草、薄荷 6 味中药组成的复方柴归方^[5-6]。前期研究结果表明,复方柴归方对抑郁症具有很好的治疗作用^[7-10],但其是否可通过调控 cAMP-PKA-CREB-BDNF 信号通路发挥作用尚不清楚。本研究通过复制慢性温和不可预知应激(CUMS)抑郁模型,采用超临界 CO₂ 萃取工艺获得复方柴归方提取物,应用酶联免疫法(ELISA)和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)等检测方法,从 cAMP 信号通路调控的角度对其进行抗抑郁作用机制研究,为其进一步开发及临床应用提供参考。

1 材料

1.1 动物

成年雄性 SD 大鼠 60 只,SPF 级,体质量 180~200 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号 SCXK(京)2011-0012,在室温(24±1)℃、相对湿度(60±5)%及昼夜节律光照环境下,适应性饲养 1 周。

1.2 试剂

cAMP-GloTM Assay (V1501)、PepTag® Non-Radioactive cAMP-Dependent Protein Kinase Assay(V5340)、BDNF Emax® ImmunoAssay System (G7610),美国 Promega 公司;Human/Mouse/Rat Phospho-CREB (S133) Cell-Based ELISA (KCB2510,美国 R&D System 公司);RNAiso Plus (9109)、PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (RR036A)、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus, RR820A),宝生物工程(大连)有限公司;Tris-HCl、NaOH、氯仿、乙醇、异丙醇等试剂均为分子生物学级生化试剂、SD503196 孔酶标板、改良型 BCA 法蛋白质浓度测定试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 药材

复方柴归方组成:柴胡 30 g、当归 30 g、白芍 30 g、炒白术 30 g、炙甘草 15 g、薄荷 10 g,以上药材均购自山西省华阳药业有限公司,经山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定均为《中国药典》2015 年版规定的正品。

1.4 仪器

SpectraMax M5 多功能酶标仪,美国 Molecular Devices 公司;Centrifuge TDL-5 高速低温离心机,上海安亭科学仪器厂;UP-250 超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;ND-2000 Nano Drop 2000 超微量分光光度计,美国 Thermo Scientific 公司;MJ-Mini 48 孔梯度 PCR 仪,美国伯乐公司;Real-Time PCR System (StepOnePlus),美国应用生物系统公司。

2 方法

2.1 复方柴归方超临界 CO₂ 提取物的制备

按比例取复方组方各药材,混匀后粉碎,采用本课题组前期确定的超临界 CO₂ 萃取工艺^[11],即萃取压力 20 MPa,萃取温度 50 ℃,CO₂ 体积流量为 25 kg/h,物料颗粒度 20 目,萃取时间 3 h,采用 GC-MS 方法从复方柴归方超临界 CO₂ 提取物中共鉴定出 25 种成分,占色谱峰总面积的 88.59%。使用前将复方柴归方超临界 CO₂ 提取物置于 4 ℃冰箱中保存。

2.2 动物分组与给药

大鼠适应性饲养 1 周后,根据体质量、糖水测试和旷场实验结果,将 60 只雄性 SD 大鼠随机分为 6 组,分别为对照组、模型组、文拉法辛(50 mg/kg)阳性对照组及复方柴归方(复方柴归方超临界 CO₂ 提取物以食用色拉油稀释至相应浓度)高、中、低剂量(生药 64、32、16 g/kg)组。各给药组均 ig 给药,对照组和模型组 ig 给予食用色拉油,给药体积为 10 mL/kg,每日 1 次,连续给药 28 d,造模与给药同时进行。

2.3 CUMS 抑郁模型复制与海马组织样本收集

参照 Willner 等^[12-14]的方法复制 CUMS 抑郁模型,9 个应激因子随机安排:(1)禁食 24 h;(2)禁水 24 h;(3)4 ℃冰水浴 5 min;(4)超声刺激 3 h;(5)45 ℃热刺激 10 min;(6)足底电击,电压 36 V;(7)陌生物体;(8)夹尾 2 min;(9)束缚 3 h。对照组 5 只/笼,正常饲养;其余各组单独喂养,并连续 28 d 给予应激。每天随机 1 种应激,同种应

激不连续出现。所有组别大鼠每周 1 次糖水偏爱率测试。28 d 实验结束后,于次日用 20%乌拉坦麻醉大鼠,股动脉取血,然后在冰上取出大鼠海马组织,并将其置于 2 mL 冻存管中,液氮速冻后置于-80 °C 冰箱中保存,备用。

2.4 海马组织中 cAMP、蛋白激酶 A (PKA)、磷酸化环磷酸腺苷反应原件结合蛋白 (p-CREB)、脑源性神经生长因子 (BDNF) 水平测定

采用酶联免疫法 (ELISA) 测定海马组织中 cAMP、PKA、p-CREB、BDNF 水平,严格按照相应说明书完成操作,根据标准曲线,得到每个大鼠海马组织中的 cAMP、PKA、p-CREB、BDNF 水平,并将其对海马组织蛋白质量浓度进行归一化处理。

2.5 海马组织中 PKA、p-CREB、BDNF 及脑源性神经生长因子受体酪氨酸激酶 B (TrkB) mRNA 表达水平测定

依照 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒说明书上的步骤进行 qRT-PCR 反应,测定大鼠海马组织中 PKA、p-CREB、BDNF 和 TrkB 的 mRNA 表达水平,各引物序列见表 1,将反应液加入 PCR 管中,涡旋后离心使反应液集中于管底;设置的扩增程序为 95 °C、30 s,1 个循环;95 °C、5 s;60 °C、30 s;40 个循环;95 °C、15 s;60 °C、60 s;95 °C、15 s。应用 Step One Software v 2.1 分析软件调整基线和阈值后,分析反应板数据,从而获得每个样品反应的 C_t 值,与对照组比较后,取 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值进行数据统计。

2.6 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 17.0 和

Origin Pro 8 软件对实验数据进行统计分析并作图;采用单因素方差分析及 t 检验进行统计。

3 结果

3.1 对大鼠海马组织中 cAMP、PKA、p-CREB、BDNF 水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠海马组织中 cAMP 水平及 PKA 活性显著下降 ($P < 0.01$);与模型组比较,复方柴归方各剂量组均能显著性增加 CUMS 抑郁模型大鼠海马组织中 cAMP 水平和升高 PKA 活性 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与对照组比较,模型组大鼠海马组织中 p-CREB、BDNF 水平明显下降 ($P < 0.05$ 、 0.01);与模型组比较,复方柴归方各剂量组大鼠海马组织中 p-CREB 水平显著升高 ($P < 0.01$),复方柴归方高、中剂量组大鼠海马组织中 BDNF 水平显著升高 ($P < 0.05$),结果见图 1。

3.2 对大鼠海马组织中 PKA、p-CREB、BDNF 和 TrkB mRNA 表达水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠海马组织中 TrkB、PKA mRNA 表达量下降;复方柴归方高、低剂量组大鼠海马组织中 TrkB、PKA mRNA 表达水平与模型组比较显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01);与对照组比较,模型组大鼠海马组织中 p-CREB、BDNF mRNA 表达量下降;复方柴归方高、中、低剂量组大鼠海马组织中的 p-CREB mRNA 与模型组比较显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01),复方柴归方中、低剂量组大鼠海马组织中 BDNF mRNA 表达水平与模型组比较显著升高 ($P < 0.05$),结果见图 2。

4 讨论

cAMP 是细胞内参与调节内源性物质代谢和生理功能的重要物质,是生命信息传递的第二信使。腺苷酸环化酶 (AC) 具有 G 蛋白信号偶联信号转导功能,可催化三磷酸腺苷 (ATP) 水解转化为具有第二信使作用的 cAMP,再由 cAMP 激活 PKA,PKA 可使多种靶蛋白如转录因子、细胞骨架原件、离子通道和酶等磷酸化,其中 CREB 就是被磷酸化的转录因子。有研究表明,cAMP 及调节 cAMP 浓度的 AC 和 cAMP 调节细胞作用的媒介 PKA 在 cAMP 信号通路中起着至关重要的作用。李德顺等^[15]在研究百合知母汤对 CUMS 大鼠 cAMP 信号通路的影响时发现,模型组大鼠脑海马 cAMP 水平、PKA 活性、CREB 表达量明显低于对照组,给予百合知母汤后 CUMS 抑郁大鼠的 cAMP 水平、PKA 活性明显升高,且 CREB mRNA 的表达水平有所上

表 1 qRT-PCR 反应引物序列

Table 1 Real time qRT-PCR reaction primer sequences

基因 (大鼠)	引物序列 (5'→3')
GAPDH	正向: CAAGTTCAACGGCAGTCAA 反向: CGCCAGTAGACTCCACGACA
PKA	正向: GGTGACAGACTTCGGTTTTGC 反向: CAGCTTTGTTGTAGCCTTTGC
BDNF	正向: TGGGGTTAGGAGAAGTCAAGC 反向: GTCAGGTAACCACTAACACATTTCG
TrkB	正向: CAACTGACATCGGGGATACTACA 反向: CACAGAGGCAATCACCACCA
CREB	正向: GCAGCAAGAGAATGTCGTAGAAA 反向: CCAATCCAGTCCATTTTCCA

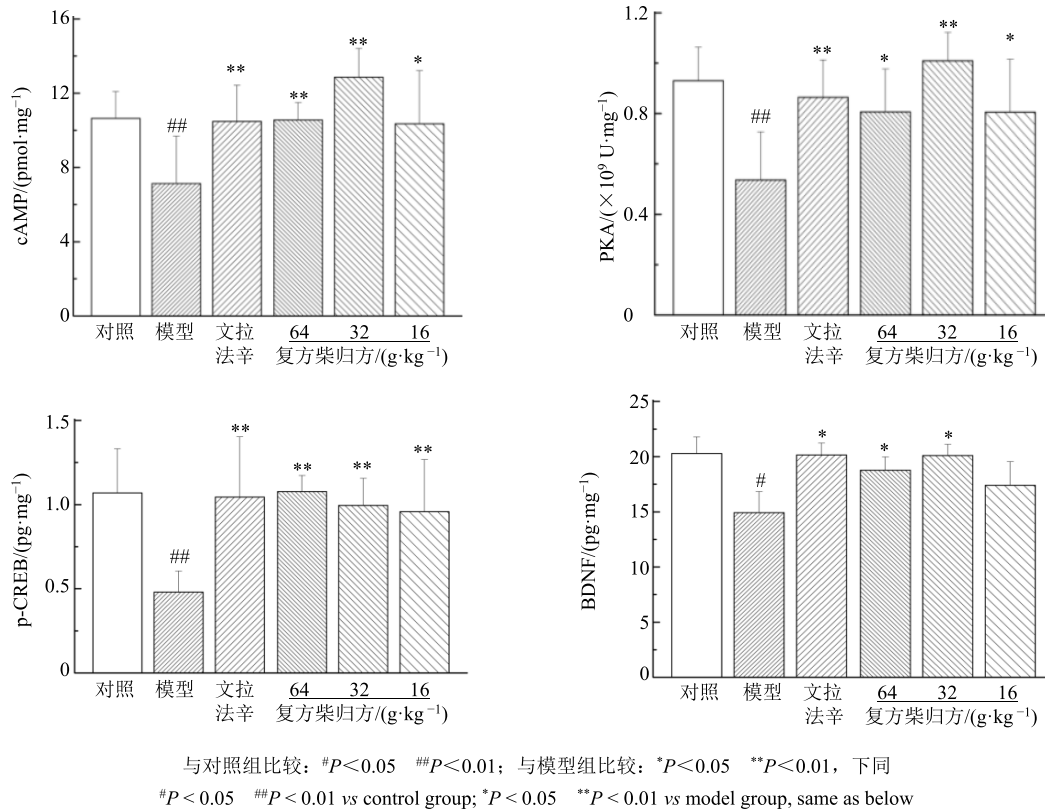


图 1 各组大鼠海马组织中 cAMP、PKA、p-CREB、BDNF 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Comparison on levels of cAMP, PKA, p-CREB, and BDNF in hippocampus of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

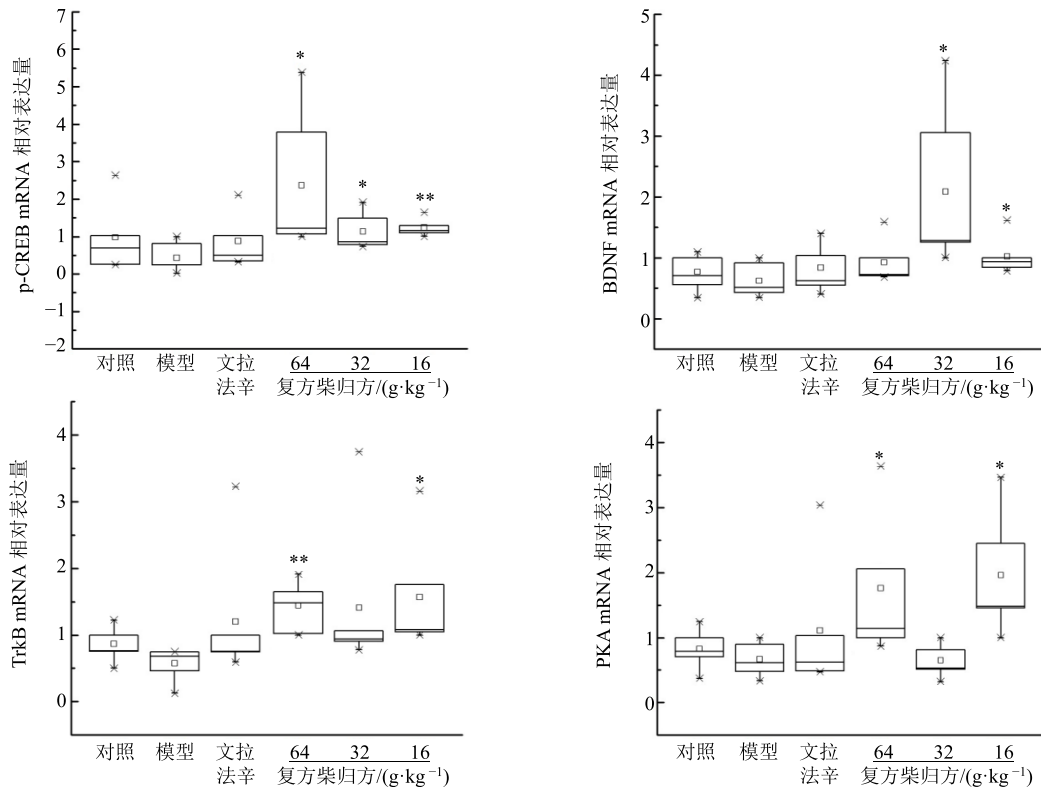


图 2 各组大鼠海马组织中 TrkB、PKA、BDNF、p-CREB mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Comparison on TrkB, PKA, BDNF, and p-CREB mRNA expression in hippocampus of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

升,治疗效果与阳性药氟西汀一致;Lalley 等^[16]认为 cAMP-PKA 第二信使系统可通过调节电压影响神经元兴奋性;抗抑郁药物如蒙药槟榔十三味丸能激活 CUMS 大鼠海马和前额叶皮层 AC-cAMP-PKA 信号通路,使 AC 活性、cAMP 和 PKA 含量显著回调^[17]。使用抗抑郁药物治疗抑郁症后能使受体细胞中 cAMP 信号通路上调,长期使用抗抑郁药治疗可提高 AC 活性,增加 AC 含量,进而激活 cAMP 依赖性 PKA 活性。综上所述,抑郁症患者脑组织中海马神经元 cAMP 信号通路下调,对其进行相应的抗抑郁治疗后海马 cAMP 信号通路上调,因此,AC-cAMP-PKA 级联与抑郁症的发病机制密切相关。

CREB 是一种细胞核内转录因子,cAMP 信号通路可启动 CREB 的磷酸化并使其活化。CREB 能够调节多种包括学习记忆在内的神经系统功能,在胞内生化过程中起到了重要作用,是胞内与抑郁症相关信号通路中的一个交汇点^[18-19]。Ma 等^[20]通过对 512 名重症抑郁症(MD)患者和 513 名对照受试者研究发现,CREB 是抑郁症的易感基因之一,CREB1 的变异和负性生活事件相互作用可以增加 MD 的患病风险;有研究表明 CREB 的调节转录功能还受到磷酸化 CREB(p-CREB)的调节,p-CREB 能够调节促进神经元细胞生长、增殖、存活和神经可塑性的基因表达^[21];Tsuchimine 等^[22]测试了 23 名重度抑郁症患者和 47 名健康受试者体内的 CREB 表达量,发现抑郁症患者体内的 CREB 和 p-CREB 表达量均显著低于健康受试者;有研究表明与对照组相比,慢性轻度应激(CMS)大鼠海马和前额叶皮质层 CREB 磷酸化水平明显升高,可能与压力引起的情绪改变有关^[23];Wang 等^[24]在对抑郁模型大鼠研究时发现,抑郁症可下调 cAMP-PKA-CREB-BDNF 信号转导系统功能,降低 CREB 和 BDNF 的 mRNA 表达水平,从而减少 CREB、BDNF 及其受体 TrkB 含量。

BDNF 是 1982 年德国神经生物学家从猪脑中分离出来的小分子蛋白质,过去的研究证实 BDNF 是调控高等动物中枢神经系统发育与稳态的重要信号分子,可通过靶源性、自分泌、旁分泌方式与神经元细胞膜受体酪氨酸蛋白激酶 B(TrkB)结合,进而激活下游信号,使其在神经元的发育、分化、功能维持以及突出可塑性中发挥关键性作用。目前 BDNF-TrkB 的信号机制探讨已成为神经科学的研究热点之一^[25];有研究人员对大量文献进行系统综

述和荟萃分析后发现,抗抑郁药治疗后重度抑郁症患者的 BDNF 水平显著增加,表明 BDNF 水平与抑郁症的临床变化有关,研究结果支持抑郁症改善与神经可塑性改变相关的观点^[26-27];有证据表明,BDNF 和 microRNAs(miRNA)在抑郁症的病因学中起关键作用^[28],并且通过对抑郁症患者的研究显示,BDNF 及其相关的 miRNA 可以用作诊断的重要生物标记或作为抑郁症的治疗靶标^[29]。有研究表明,精神分裂症和情绪障碍患者与对照受试者相比海马区 BDNF、TrkB 表达量有所下降^[30]。综上所述,神经营养因子的功能和水平异常可能参与了抑郁症的病理和病因过程。

研究表明 cAMP-PKA-CREB-BDNF 信号通路功能障碍与抑郁症的发病有关,在此通路中,多种神经递质与 G 蛋白偶联受体结合后,导致 AC 水平升高,ATP 转化 cAMP 增多,进而激活 PKA,活化的 PKA 使 CREB 磷酸化为 p-CREB,从而调节转录因子的活性,介导细胞对外界刺激的反应^[24,31]。

本研究结果显示,CUMS 程序可导致大鼠海马组织中 cAMP 水平、PKA 活性、p-CREB、BDNF 水平及其相应的 mRNA 表达水平显著下调,而给予复方柴归方后,上述通路中的分子表达量均显著上调,提示 cAMP-PKA-CREB-BDNF 信号通路激活是复方柴归方发挥抗抑郁作用的机制之一。

参考文献

- [1] Dillon D G, Pizzagalli D A. Mechanisms of memory disruption in depression [J]. *Trends Neurosci*, 2018, 41(3): 137-149.
- [2] Mokdad A H, Forouzanfar M H, Daoud F, et al. Global burden of diseases, injuries, and risk factors for young people's health during 1990—2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. *Lancet*, 2016, 387(10036): 2383-2401.
- [3] Blier P. Neurobiology of depression and mechanism of action of depression treatments [J]. *J Clin Psych*, 2016, 77(3): e319.
- [4] 彭生,杨建平,张晓庆,等.磷酸二酯酶-4 抑制剂 Ro20-1724 对氯胺酮麻醉后学习记忆及大鼠海马 cAMP/PKA-CREB-BDNF 信号通路的影响 [J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2014, 23(6): 528-530.
- [5] 郑晓芬. 复方柴归方抗抑郁有效组分制备工艺及质量标准研究 [D]. 太原: 山西大学, 2015.
- [6] 陈磊. 复方柴归方抗抑郁组分药效及机理研究 [D]. 太原: 山西大学, 2015.
- [7] 张涛,赵芳,张潇,等. 复方柴归方抗抑郁作用

- 及其调控 5-羟色胺代谢途径机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(6): 1338-1344.
- [8] 刘少博, 许 腾, 高 耀, 等. 基于 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学复方柴归方干预抑郁模型大鼠血清代谢物规律分析 [J]. 中草药, 2019, 50(1): 97-103.
- [9] 夏小涛. 复方柴归方治疗轻中度抑郁症临床疗效观察 [D]. 太原: 山西大学, 2017.
- [10] 张 涛, 令狐婷, 张 潇, 等. 复方柴归方抗抑郁药效学特点 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30(10): 1017-1018.
- [11] 郭晓擎. 复方柴归方抗抑郁有效组分筛选及其药效学评价研究 [D]. 太原: 山西大学, 2013.
- [12] Willner P, Benton D, Brown E, *et al.* "Depression" increases "craving" for sweet rewards in animal and human models of depression and craving [J]. *Psychopharmacology*, 1998, 136(3): 272-283.
- [13] Luo D D, An S C, Zhang X. Involvement of hippocampal serotonin and neuropeptide Y in depression induced by chronic unpredicted mild stress [J]. *Brain Res Bull*, 2008, 77(1): 8-12.
- [14] Wu L M, Han H, Wang Q N, *et al.* Mifepristone repairs region-dependent alteration of synapsin I in hippocampus in rat model of depression [J]. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*, 2007, 32(12): 2500.
- [15] 李德顺, 袁 丽, 刘 奇, 等. 百合知母汤对抑郁症大鼠环磷酸腺苷信号通路的影响 [J]. 武汉大学学报: 医学版, 2015, 36(6): 867-871.
- [16] Lalley P M, Pierrefiche O, Bischoff A M, *et al.* cAMP-dependent protein kinase modulates expiratory neurons *in vivo* [J]. *J Neurophysiol*, 1997, 77(3): 1119-1131.
- [17] 佟海英, 乌吉斯古冷, 白亮凤, 等. 槟榔十三味丸对抑郁模型大鼠海马和前额叶皮层 AC-cAMP-PKA 信号通路的影响 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(10): 1946-1950.
- [18] Ye Y L, Zhong K, Liu D D, *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 Compl Altern Med*, 2017, 2017(4): 1-13.
- [19] Meylan E. *Crtc1*^{-/-} mice and mood disorders: Role of the CREB-CRTC1 pathway in depression and antidepressant treatment [D]. Lausanne: Université de Lausanne, 2016.
- [20] Ma J, Wang L, Yang Y, *et al.* GNB3 and CREB1 gene polymorphisms combined with negative life events increase susceptibility to major depression in a Chinese Han population [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0170994.
- [21] Saeki K, Yuo A, Takaku F. Cell-cycle-regulated phosphorylation of cAMP response element-binding protein: Identification of novel phosphorylation sites [J]. *Biochem J*, 1999, 338(Pt 1): 49-54.
- [22] Tsuchimine S, Sugawara N, Yasui-Furukori N. Increased levels of CREB in major depressive patients with antidepressant treatment [J]. *Psychiatry Res*, 2018, 263(5): 296-297.
- [23] 王凌霄, 彭代辉, 黄建华, 等. CREB 磷酸化水平在慢性应激模型大鼠中表达研究 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2014, 40(1): 26-30.
- [24] Wang C, Guo J, Guo R. Effect of XingPiJieYu decoction on spatial learning and memory and cAMP-PKA-CREB-BDNF pathway in rat model of depression through chronic unpredictable stress [J]. *Bmc Compl Altern Med*, 2017, 17(1): 73-85.
- [25] Zhang J, Yao W, Hashimoto K. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-TrkB signaling in inflammation-related depression and potential therapeutic targets [J]. *Curr Neuropsychopharmacol*, 2016, 14(7): 721-731.
- [26] Kielstein H, Suntharalingam M, Perthel R, *et al.* Role of the endogenous nitric oxide inhibitor ADMA and BDNF in depression and behavioural changes: Clinical and preclinical data in chronic kidney disease [J]. *Nephrol Dial Transpl*, 2015, 30(3): 1699-1705.
- [27] Hosang G M, Shiles C, Tansey K E, *et al.* Interaction between stress and the BDNF Val66Met polymorphism in depression: A systematic review and meta-analysis [J]. *Compreh Psych*, 2014, 12(1): 7-18.
- [28] Bartel D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [29] Pulay A J, Réthelyi J M. Multimarker analysis suggests the involvement of BDNF signaling and microRNA biosynthesis in suicidal behavior [J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2016, 171(6): 763-776.
- [30] Ray M T, Weickert C S, Webster M J. Decreased BDNF and TrkB mRNA expression in multiple cortical areas of patients with schizophrenia and mood disorders [J]. *Transl Psych*, 2014, 4(5): e389.
- [31] Chen Q, Luo Y, Kuang S, *et al.* Cyclooxygenase-2 signalling pathway in the cortex is involved in the pathophysiological mechanisms in the rat model of depression [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 488-500.