

茯苓极性提取物对 CUMS 大鼠神经递质及昼夜节律调节的实验研究

孟美黛^{1,2}, 冯彦^{1,2}, 王鹏^{1,2}, 冯建有^{1,2}, 秦雪梅¹, 高晓霞^{1*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

摘要: **目的** 探讨茯苓极性提取物对慢性温和不可预知性应激 (CUMS) 大鼠神经递质和昼夜节律代谢途径的调节作用。**方法** 将雄性 SD 大鼠随机分为对照组、CUMS 模型组、阳性药盐酸文拉法辛组 (35 mg/kg)、茯苓极性提取物组 (15 g/kg), 造模同时 ig 给药 28 d, 动态观察各组大鼠体质量、糖水偏爱率、旷场行为; 采用 UHPLC-MS/MS 方法检测血清中色氨酸 (Trp)、5-羟色胺 (5-HT)、5-羟基吲哚乙酸 (5-HIAA)、去甲肾上腺素 (NE)、多巴胺 (DA)、乙酰胆碱 (Ach)、 γ -氨基丁酸 (GABA)、谷氨酸 (Glu)、GABA/Glu 的量, 并应用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测肝组织中与昼夜节律通路相关的 10 种基因表达水平的变化。**结果** 茯苓极性提取物可显著回调 CUMS 引起的糖水偏爱率、直立次数、水平穿越格数、理毛时间的异常, 且可回调血清中 5-HT、5-HIAA、Trp、NE、Ach、GABA、GABA/Glu 水平, 调节肝脏中 Arntl、Per1、Per2、Per3、Nr1d1 的基因表达水平。**结论** 茯苓极性提取物可增强 5-HT 代谢途径, 调节 Ach-NE 信号的相互作用以及氨基酸神经递质比例的平衡, 回调参与昼夜节律的 Arntl、Per1、Per2、Per3、Nr1d1 的表达水平改善 CUMS 大鼠神经递质及昼夜节律紊乱。**关键词:** 茯苓极性提取物; 慢性温和不可预知性应激; 神经递质; 昼夜节律; 5-羟色胺

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)01-0118-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.01.017

Regulatory effect of polar extract of *Poria cocos* on neurotransmitter and circadian rhythm disorder in CUMS rats

MENG Mei-dai^{1,2}, FENG Yan^{1,2}, WANG Peng^{1,2}, FENG Jian-you^{1,2}, QIN Xue-mei¹, GAO Xiao-xia¹

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective To explore the regulation of polar extract of *Poria cocos* on neurotransmitter and circadian rhythm metabolic pathway. **Methods** Male SD rats were randomly divided into blank group, chronic unpredictable mild stress (CUMS) model group, positive drug venlafaxine hydrochloride group (35 mg/kg), and polar extract of *P. cocos* group (15 g/kg). Rats were modeled and ig administrated for 28 d simultaneously, and the body weight, sugar preference rate, and opening behavior were observed dynamically after administration. The levels of tryptophan (Trp), 5-hydroxytryptophan (5-HT), and 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA), noradrenaline (NE), dopamine (DA), acetylcholine (Ach), γ -aminobutyric acid (GABA), glutamic acid (Glu), the proportion of GABA/Glu in serum were measured by LC-MS. The expression of key genes in the circadian rhythm pathway in liver tissue was detected by using qRT-PCR. **Results** Polar extracts of *P. cocos* significantly improved the abnormality of the sugar preference rate and opening behavior. And polar extracts of *P. cocos* significantly restored the levels of 5-HT, 5-HIAA, Trp, NE, Ach, GABA, the proportion of GABA/Glu in serum and regulated the gene expression levels of Arntl, Per1, Per2, Per3, and Nr1d1 in hepatocyte. **Conclusion** The polar extract of *P. cocos* could improve neurotransmitters and circadian rhythm disorders in CUMS rats through enhancing the 5-HT metabolic pathway, regulating Ach-NE signaling interaction and the equilibrium of proportion of amino acids neurotransmitter and restoring the expression levels of Arntl, Per1, Per2, Per3, and Nr1d1 involved in the circadian rhythm.

Key words: polar extract of *Poria cocos*; chronic unpredictable mild stress; neurotransmitter; circadian rhythm; 5-HT

收稿日期: 2019-07-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473415); 山西省重点研发计划 (社会发展方面) 项目 (201803D31019); 山西省应用基础研究优秀青年基金项目 (201701D211009); 山西省科技创新重点团队 (201605D131045-18); 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室项目 (201705D111008-21)

作者简介: 孟美黛, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药理学研究。E-mail: 770204955@qq.com

***通信作者** 高晓霞, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药理学与代谢组学研究。Tel: (0351)7019297 E-mail: gaomiaoxia@sxu.edu.cn

茯苓为多孔科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核, 性平, 味甘淡, 归心、肺、脾、肾经, 具有利水渗湿、健脾和胃、宁心安神的功效^[1]。茯苓因其助肺司宣肃、宁心以利窍、护肝利疏泄、利水伐肾邪, 具有安五脏、行气利水、解郁消滞之功^[2], 常用于复方中, 如逍遥散、半夏厚朴汤等。现代研究表明, 茯苓的化学成分主要包括茯苓多糖、茯苓酸等物质, 茯苓多糖具有明显的抗抑郁作用^[3-4], 茯苓及其有效成分茯苓酸有睡眠延长效应, 可增强快动眼睡眠 (REM), 减少睡眠-觉醒周期数量, 具有改善睡眠的作用^[5]。因此, 茯苓极性提取物的昼夜节律调节作用及其作用机制有待进一步深入研究。

昼夜节律是一种接近 24 h (19~28 h) 的生物周期, 广泛存在于人及其他哺乳动物中, 以使机体功能适应日常环境的变化^[6]。人体的睡眠/觉醒周期, 神经递质的合成和分泌等都存在昼夜节律的变化, 当昼夜节律发生破坏时, 个体的睡眠/觉醒周期与当前所处环境模式不协调而引起睡眠障碍, 睡眠障碍与失眠的表现一致^[7]。由于造成昼夜节律紊乱的因素很多, 作用机制可能各不相同。目前, 昼夜节律紊乱的药理模型有慢性时差模型^[8]、产前应激模型^[9]等, 但应用不广泛, 不易操作, 且这些模型都会引起睡眠节律变化以及抑郁样行为。研究^[10]表明抑郁症的许多临床表现与昼夜节律的改变存在复杂的联系, 这些改变包括睡眠时间减少、REM 时期密度增加、REM 期潜伏期缩短等。昼夜节律、睡眠障碍、抑郁症之间存在密切的联系^[11], 抑郁症患者存在着明显的生物节律改变, 尤其是昼夜节律紊乱^[12], 所以本研究采用抑郁症的经典模型慢性温和不可预知性应激 (CUMS) 研究昼夜节律的变化。

课题组前期^[13]利用高通量测序技术对对照组和 CUMS 模型组的肝组织进行转录组分析, 通过 GO 显著富集分析和 KEGG 显著注释结果显示 CUMS 模型大鼠肝组织表达与昼夜节律通路有关, 并结合差异表达基因筛选结果, 筛选出与昼夜节律通路相关的 10 种基因关键基因: *Npas2*、*Cry1*、*Arntl*、*Rora*、*Rorc*、*Bhlhe41*、*Nr1d1*、*Per1*、*Per2*、*Per3*。因此本研究选用这 10 种生物钟基因进行研究。

本研究采用 CUMS 对大鼠进行造模, 通过行为学指标评价茯苓极性提取物对模型大鼠行为学的影响, 并应用超高效液相色谱-三重四极杆质谱方法 (UHPLC-MS/MS) 测定大鼠血清中 5-羟色胺

(5-HT)、5-羟基吲哚乙酸 (5-HIAA)、色氨酸 (Trp)、去甲肾上腺素 (NE)、多巴胺 (DA)、乙酰胆碱 (Ach)、 γ -氨基丁酸 (GABA)、谷氨酸 (Glu)、GABA/Glu 的量, 进一步采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术对肝组织中与昼夜节律通路相关的关键基因的表达水平进行分析, 利用 CUMS 模型探讨茯苓极性提取物对神经递质和昼夜节律代谢途径的影响。为茯苓极性提取物的宁心安神功效及其调控神经递质和昼夜节律代谢途径的作用机制研究提供依据, 也为新药开发奠定基础。

1 材料

1.1 动物

雄性 SD 大鼠, SPF 级, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号为 SCXK (京) 2012-0001, 体质量为 180~220 g。受试动物 12 h 明暗交替光照, 饲养温度 (24±2) °C, 湿度 (60±10) %, 水和垫料每 2 天更换 1 次, 适应 7 d 后开始实验。

1.2 药品与试剂

茯苓饮片 [安国市吉腾达药材有限公司, 批号 1805307132, 经山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定为茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf, 留样于山西大学中医药现代研究中心]; 盐酸文拉法辛胶囊 (成都康弘药业集团股份有限公司, 批号 171203); 葡萄糖对照品 (天津市博迪化工有限公司); 齐墩果酸对照品 (天津希恩思生化科技有限公司); 苯酚 (天津大茂化学试剂厂); 香草醛 (天津市光复精细化工研究所); 内标 3,4-二羟基苜蓿素 (DHBA, 批号 MKBS7646V) 购于 Sigma 公司; 硼酸、氢氧化钠 (北京化学工业集团有限责任公司); Tris、EDTA、DEPC 均购自北京索莱宝公司; Trizol 试剂、5×M-MLV Buffer、dNTP Mixture、RNase Inhibitor、RTase M-MLV (RNaseH-), RNase free dH₂O, SYBR Green Premix Ex Taq™ II 均购自日本 Takara 公司; oligo (dT) 以及引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成; 琼脂糖 (西班牙 BOWEST 公司); 无水乙醇、冰乙酸、高氯酸、浓硫酸、氯仿均为分析纯; 水为超纯水。

1.3 仪器

TU-1810 紫外分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司); 1290 II 超高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); 3200 QTRAP 三重四极杆串联质谱仪 (美国 AB Sciex 公司); Neofuge 13R 高速冷冻离心机 (中国力康公司); MX-S 可调式混匀仪 (美

国 Scilogex 公司); ABI Stepone Plus 实时荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司); 梯度 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); NanoDrop 2000 超微量分光光度计(美国 Thermo 公司); Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司); 大鼠旷场实验行为测试箱(自制, 长 100 cm、宽 100 cm、高 70 cm 的无顶部长方体, 内部四壁及底面涂成黑色, 底部用白线划出 25 个边长为 20 cm 的正方形小格)。

2 方法

2.1 茯苓极性提取物的制备

准确称取茯苓饮片适量, 用 8 倍量的 95%乙醇浸泡 12 h, 回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并提取液, 滤过, 回收溶剂至干, 加水分散, 混悬液用等体积的石油醚萃取至无色, 得到下层混悬液。将药渣用 8 倍量的水回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并提取液与下层混悬液, 回收溶剂, 得到茯苓极性提取物(参照文献方法^[14-15], 对茯苓极性提取物中化学成分进行含量测定。以齐墩果酸为对照品, 采用香草醛-冰乙酸-高氯酸显色法测定三萜类成分, 结果茯苓总三萜的标准曲线为 $Y=0.004\ 5\ X+0.040\ 1$, $R^2=0.998\ 8$, 线性范围为 10~200 $\mu\text{g/mL}$, 茯苓极性提取物中总三萜质量分数为 1%; 以葡萄糖为对照品, 采用苯酚-硫酸显色法测定多糖含量, 结果茯苓总多糖的标准曲线为 $Y=0.008\ 8\ X+0.025\ 7$, $R^2=0.992\ 1$, 线性范围为 20~100 $\mu\text{g/mL}$, 茯苓极性提取物中总多糖质量分数为 33%)。取浸膏适量, 用蒸馏水溶解, 制成生药质量浓度为 55.45 mg/mL 的溶液。

2.2 CUMS 模型复制、分组与给药

大鼠适应性喂养 7 d 后, 根据体质量、糖水偏爱率、旷场实验的基线结果, 将 36 只 SD 大鼠随机分为 4 组($n=9$), 即对照组、模型组、阳性药盐酸文拉法辛(35 mg/kg)组, 茯苓水提物(15 g/kg, 前期研究结果表明逍遥散在 CUMS 模型大鼠中的有效剂量为生药 92.6 g/kg, 折合茯苓单味药材的剂量为 15 g/kg)组。对照组和模型组 ig 给予蒸馏水, 且各组大鼠给药体积为 10 mL/(kg·d)。除对照组外, 其他各组大鼠采用单只孤养, 且大鼠造模的同时 ig 给药, 给药后 1 h 给予刺激, 且每种刺激的实施随机不连续, 持续 28 d。参照文献报道方法^[13-14]并结合实验室前期基础进行造模, 刺激因子包括禁食 24 h、禁水 24 h、45 $^{\circ}\text{C}$ 热刺激 10 min、超声刺激 3 h、夹尾 2 min、束缚 3 h、电刺激、昼夜颠倒 12 h、4 $^{\circ}\text{C}$ 冰水浴 5 min。对照组大鼠除在糖水偏爱

率实验前禁水 24 h 外, 其他时间均正常饮水饮食, 不给予任何刺激。

2.3 行为学指标测定与样本采集

参照文献报道方法^[16-17], 分别在 0、7、14、21、28 d 对大鼠的体质量、糖水偏爱率、旷场行为(水平穿越格数和直立次数)进行测定, 动态观察大鼠行为学的变化。

2.4 样本采集

在 28 d 实验完成后, 通过股动脉取血的方式采集血液, 置于 EP 管中, 静置 30 min 后分离血清并分装(4 $^{\circ}\text{C}$ 下 3 500 r/min 离心 10 min), 储存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。同时取各组大鼠的肝脏组织, 分别用锡箔纸包裹, 在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.5 大鼠血清中神经递质水平的测定

2.5.1 内标溶液的配制 精密量取适量的内标(DHBA)储备液, 置于 100 mL 量瓶中, 加溶剂至刻度, 制成质量浓度为 3.6 $\mu\text{g/mL}$ 的 DHBA 内标溶液, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 备用。

2.5.2 血清样本的预处理 本实验采用课题组前期建立的方法^[15-16], 对神经递质的含量进行测定。实验时, 将大鼠血清在室温缓慢解冻后摇匀, 精密吸取 100 μL , 置 1.5 mL EP 管中, 加入 20 μL 内标和 20 μL 空白溶剂[0.2%甲酸水溶液-甲醇(8:2)], 加入 0.1%甲酸乙腈溶液 200 μL , 涡旋 5 min 混匀沉淀蛋白, 离心(13 000 r/min, 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$), 转移上清液置于干净 EP 管中, 吹干, 残渣加 100 μL 初始流动相复溶, 涡旋 2 min, 离心(13 000 r/min, 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$), 取上清液待分析。

2.5.3 色谱条件和质谱条件参照课题组前期建立的方法^[18-19]。

(1) 色谱条件: Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度条件为 0~2.5 min, 5% B; 2.5~4 min, 5%~20% B; 4~7 min, 20%~60% B; 7~7.5 min, 60%~5% B; 7.5~10 min, 5% B; 体积流量 0.2 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 3 μL 。

(2) 质谱条件: 电喷雾离子源(ESI); 正离子模式; 多反应监测模式(MRM); 气帘气 275.8 kPa(40.0 psi); 碰撞气体 N_2 ; 喷雾电压 5 500 V; 离子源温度 500 $^{\circ}\text{C}$; GS1: 344.75 kPa(50 psi), GS2: 344.75 kPa(50 psi); 气体体积流量 12 L/min。

2.6 大鼠肝脏组织昼夜节律相关基因表达水平的检测

2.6.1 大鼠肝脏总 RNA 的提取及检测 在 1.5 mL

EP 中加入 1 mL Trizol 试剂, 将对照组、模型组、茯苓水提物组大鼠适量肝组织放入液氮预冷的研钵中进行研磨, 待其变为粉末后加入 EP 管中, 混匀后, 室温静置 5 min。向静置后的 EP 管内加入 200 μ L 氯仿, 用力上下摇 15 s, 然后在冰上静置 5 min, 在 4 $^{\circ}$ C、12 000 $\times$ g 下离心 15 min, 可观察到匀浆液分层, 用移液枪小心取 500 μ L 上层水相转移到新 1.5 mL EP 管中, 然后加入 500 μ L 的异丙醇, 轻轻吹打混匀, -20 $^{\circ}$ C 下静置 30 min。将静置后的 EP 管在 4 $^{\circ}$ C、12 000 $\times$ g 下离心 10 min (RNA 沉淀于管侧), 弃去上清, 加入 1 mL 75%冰乙醇,

涡旋振荡样品, 4 $^{\circ}$ C、7 500 $\times$ g 下离心 5 min, 重复上述步骤 1 次, 弃去上清, 在超净台中干燥约 10 min, 加入 10 μ L DEPC 处理水, 用移液枪吹打几次混匀。采用琼脂糖凝胶电泳对其纯度进行检测, 用 NanoDrop 2000 分光光度计检测总 RNA 的浓度, 计算 A_{260}/A_{280} 及 A_{230}/A_{280} 等参数。 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0, A_{230}/A_{280} 大于 2.0 表明 RNA 质量较好。

2.6.2 实验引物的设计及合成 实验引物的序列信息的设计部分利用 Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) 在线软件完成, 引物信息见表 1。

表 1 qRT-PCR 实验引物信息
Table 1 Primer information in qRT-PCR experiment

基因名称	序列 (5'→3')		片段大小/bp
	正向引物	反向引物	
Npas2	CCTAGCCCCCTCTGTAATGG	AGGTTTCGTCAGCTACACACA	141
Cry1	ACGTGATAGGGAAGTGCACA	GTGCCTCAGTTTCTCCTCCT	135
Nr1d1	ACAGCTGACACCACCCAGATC	CATGGGCATAGGTGAAGATTTCT	101
Bhlhe41	ATTGCTTTACAGAATGGGGAGCG	AAAGCGCGGAGGTATTGCAAGAC	117
Arntl	TGCGATGTCCCGGAAGTTAGATA	TCATCGGATAGAAATGTTGGCTTG	126
Per1	TGGTAAAGCACCAGGGACAAC	GAAGGACTTTGGCCTTGAATGTAC	102
Per2	TGACGACAGTGGAAAGGAGC	GCTTGTGGAGGGGTATGCT	115
Per3	TTTCATGACCGTCCTCCTGC	TTCTTCGCTGTGTGTCTCCC	199
Rora	TGCCGGTGTACTTTGATCCC	CGATCGACATTCCGTAGCCA	173
Rorc	CCTCTGAGGGGCTGTCAAAG	CAGAGAGGGAAAGGCTGGTG	104
ACTB (内参)	TCTTCCAGCCTTCCTTCCTG	CAATGCCTGGGTACATGGTG	147

2.6.3 mRNA 反转录 cDNA 采用 Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) 试剂盒进行反转录, 得到 cDNA 溶液。

2.6.4 SYBR 实时荧光定量 PCR 将反转录得到的 cDNA 稀释 10 倍, 以稀释的 cDNA 为模板, 采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 qRT-PCR 实验, 反应试剂盒选用 TaKaRa 公司 SYBR Green Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus) 型试剂盒, 20 μ L 反应体系包括 SYBR Green Premix Ex TaqTM II 10 μ L、PCR 正向引物 (10 μ mol/L) 0.8 μ L、PCR 反向引物 (10 μ mol/L) 0.8 μ L、cDNA 模板 3 μ L、ddH₂O 5.4 μ L。反应程序: 预变性 95 $^{\circ}$ C、30 s; 95 $^{\circ}$ C、15 s, 60 $^{\circ}$ C、15 s, 40 个循环; Melt Curve 阶段。

2.7 统计分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。根据标准曲线获得 qRT-PCR 的 C_t 值, 并转

化为相对定量数据, 基因表达采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法, 运用 GraphPad Prism 6.0 软件对行为学数据和基因表达量进行做图。

3 结果

3.1 茯苓极性提取物对 CUMS 模型大鼠行为学的影响

3.1.1 茯苓极性提取物对 CUMS 模型大鼠体质量的影响 实验 28 d 大鼠的体质量测定结果见表 2, 在实验开始时, 各组大鼠体质量差异均不显著, 对大鼠进行 CUMS 造模后, 模型组大鼠的体质量增加缓慢。在 7 d 时, 与对照组比较, 模型组大鼠的体质量显著降低 ($P < 0.05$); 在 14 d 时, 文拉法辛组和茯苓水提物组大鼠的体质量接近于对照组; 在 21 d 时, 与对照组比较, 茯苓极性提取物组大鼠体质量显著升高 ($P < 0.05$), 且效果强于阳性药; 28 d 时, 与对照相比, 模型组、文拉法辛组和茯苓极性

提取物组大鼠体质量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)；与模型相比较，茯苓极性提取物组大鼠体质量显著回调 ($P < 0.05$)，表明茯苓极性提取物可显著增加 CUMS 模型大鼠的体质量，对抑郁大鼠的生长迟缓具有一定的改善作用。

3.1.2 茯苓极性提取物对 CUMS 模型大鼠糖水偏爱率的影响 如表 3 所示，在实验开始时，各组大鼠糖水偏爱率差异均不显著。在造模 14 d 后，与对照组相比，茯苓极性提取物组的大鼠糖水偏爱率显著降低 ($P < 0.05$)。21 d 时，与对照组比较，模型组的大鼠糖水偏爱率显著降低 ($P < 0.01$)，表明 CUMS 造模使动物的快感消失，CUMS 造模成功；与模型组相比，文拉法辛组和茯苓极性提取物组的

大鼠糖水偏爱率显著性回调 ($P < 0.05$ 、 0.01)。在 28 d 时，与模型组相比，茯苓极性提取物组的大鼠糖水偏爱率显著升高且接近于对照组，结果表明茯苓极性提取物可改善 CUMS 模型大鼠的糖水偏爱率。

3.1.3 茯苓极性提取物对 CUMS 模型大鼠旷场实验的影响 结果如图 1 所示，在造模 7 d 时，对照组和模型组大鼠直立次数和水平穿越格数表现出显著性差异 ($P < 0.01$)；造模 14 d，对照组和模型组大鼠理毛时间表现出显著差异 ($P < 0.01$)，同时给药组大鼠理毛时间显著高于模型组 ($P < 0.05$)；在给药 21 d 后，茯苓极性提取物组的大鼠水平穿越格数和直立次数显著高于模型组 ($P < 0.05$ 、 0.01)；在

表 2 茯苓极性提取物对 CUMS 模型大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 2 Effect of polar extract of *P. cocos* on body weight in CUMS model rats ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	体质量/g				
	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
对照	229.2 ± 8.7	281.6 ± 7.9	300.4 ± 12.4	340.9 ± 3.8	358.5 ± 14.9
模型	234.9 ± 5.4	271.3 ± 14.4 [#]	291.4 ± 16.2	317.7 ± 19.7 [#]	310.8 ± 20.6 ^{###}
文拉法辛	237.7 ± 6.7	274.3 ± 10.3	299.8 ± 13.5	325.3 ± 16.3	327.3 ± 9.4 ^{##}
茯苓极性提取物	238.3 ± 6.5	274.3 ± 9.9	303.7 ± 6.6	344.1 ± 23.3 [#]	336.4 ± 23.7 ^{#*}

与对照组比较：[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ ；与模型组比较：^{*} $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group；^{*} $P < 0.05$ vs model group

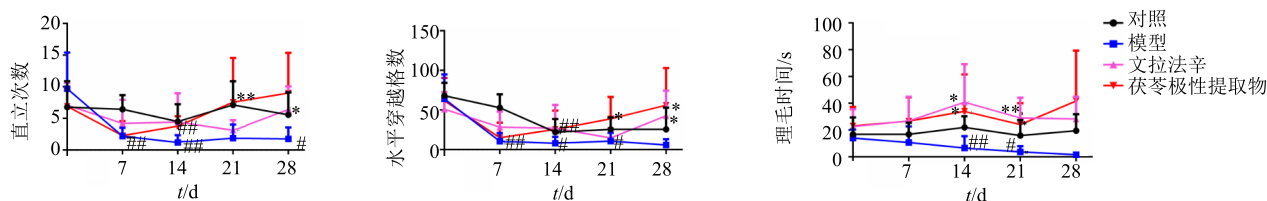
表 3 茯苓极性提取物对 CUMS 模型大鼠糖水偏爱率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 3 Effects of polar extract of *P. cocos* on sugar preference rate in CUMS model rats ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	糖水偏爱率/%				
	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
对照	78.1 ± 5.1	75.9 ± 6.0	85.8 ± 11.4	87.9 ± 5.9	87.3 ± 6.6
模型	75.2 ± 8.2	72.8 ± 6.6	74.1 ± 5.9	58.6 ± 16.2 ^{###}	55.6 ± 18.3 ^{##}
文拉法辛	70.1 ± 6.4	77.2 ± 10.0	80.1 ± 7.1	84.3 ± 10.2 ^{**}	84.7 ± 6.3 ^{**}
茯苓极性提取物	71.0 ± 10.5	72.0 ± 12.0	70.7 ± 17.9 [#]	80.7 ± 20.3 [*]	85.6 ± 11.8 ^{**}

与对照组比较：[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较：^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group；^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group



与对照组比较：[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较：^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group；^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

图 1 茯苓极性提取物对 CUMS 模型大鼠旷场实验的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 1 Effects of polar extract of *P. cocos* on open-field experiment of CUMS model rats ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

给药 28 d, 文拉法辛组的水平穿越格数和直立次数显著高于模型组 ($P<0.05$), 同时给药组的直立次数、水平穿越格数、理毛时间均高于对照组。结果表明茯苓极性提取物可提高 CUMS 模型大鼠的活动能力以及对新奇事物的探索能力。

3.2 茯苓极性提取物对 CUMS 模型大鼠血清中神经递质水平的影响

昼夜节律的调节与多种神经递质的作用有关^[9]。本实验对血清中 8 种神经递质水平进行测定, 结果见表 4, 与对照组相比, 模型组大鼠血清中 5-HT、5-HIAA、Trp、NE、DA、Ach、GABA、GABA/Glu 水平明显降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),

与文献报道的研究结果一致^[20-21], 表明 CUMS 模型造模成功; 与模型组相比, 阳性药文拉法辛组大鼠血清中 5-HIAA、Trp、NE、GABA、GABA/Glu 水平显著回调 ($P<0.001$), 5-HT 有回调的趋势, 但无统计学差异, 与文拉法辛的 5-HT 与 NE 的再摄取抑制作用机制一致; 茯苓极性提取物组大鼠血清中 5-HT、5-HIAA、Trp、NE、Ach、GABA、GABA/Glu 水平均有不同程度的回调 ($P<0.01$ 、 0.001), 且作用优于阳性药文拉法辛, 提示茯苓极性提取物可增强 5-HT 代谢途径, 调节 Ach-NE 信号的相互作用以及氨基酸神经递质比例的平衡。

表 4 茯苓极性提取物对 CUMS 模型大鼠血清中神经递质水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 4 Effect of polar extract of *P. cocos* on serum neurotransmitter levels in CUMS model rats ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	5-HT/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	5-HIAA/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Trp/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	NE/ ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	DA/ ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Ach/ ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Glu/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	GABA/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	GABA/Glu
对照	2.19 ± 0.26	2.79 ± 0.43	11.73 ± 1.97	239.08 ± 19.35	27.85 ± 4.78	9.46 ± 1.33	1.65 ± 0.26	8.09 ± 0.97	5.27 ± 1.07
模型	$0.91 \pm 0.11^{###}$	$1.78 \pm 0.38^{####}$	$7.44 \pm 1.72^{###}$	$169.30 \pm 19.30^{####}$	$18.07 \pm 2.68^{\#}$	$6.91 \pm 1.00^{####}$	1.63 ± 0.35	$5.15 \pm 0.96^{###}$	$4.08 \pm 0.65^{###}$
文拉法辛	$1.13 \pm 0.06^{####}$	$3.38 \pm 0.40^{***}$	$14.94 \pm 2.26^{####}$	$288.78 \pm 23.70^{####}$	$25.13 \pm 9.30^{###}$	$7.26 \pm 0.61^{###}$	1.67 ± 0.29	$9.98 \pm 1.40^{####}$	$5.66 \pm 0.80^{***}$
茯苓极性提取物	$2.67 \pm 0.67^{***}$	$3.42 \pm 0.49^{***}$	$15.81 \pm 2.56^{####}$	$275.88 \pm 19.08^{####}$	$17.60 \pm 4.12^{###}$	$8.62 \pm 0.56^{**}$	1.74 ± 0.26	$10.53 \pm 1.33^{####}$	$5.87 \pm 0.62^{***}$

与对照组比较: $^{\#}P<0.05$ $^{##}P<0.01$ $^{###}P<0.001$; 与模型组比较: $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$

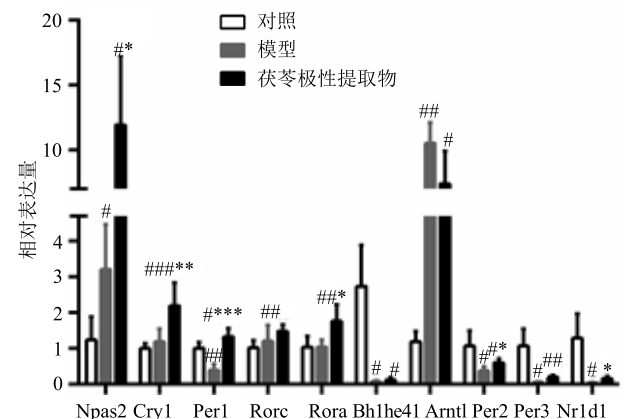
$^{\#}P<0.05$ $^{##}P<0.01$ $^{###}P<0.001$ vs control group; $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$ vs model group

3.3 茯苓极性提取物对昼夜节律相关的基因表达的调节作用

结果如图 2 所示, 经过 28 d 的造模后, 与对照组相比, 模型组大鼠肝组织中 Npas2、Arntl 表达水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), Bhlhe41、Per1、Per2、Per3、Nr1d1 表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01); 茯苓极性提取物组大鼠肝组织中 Npas2、Cry1、Per1、Rorc、Rora、Arntl 表达水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), Bhlhe41、Per2、Per3 表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。与模型组相比, 茯苓极性提取物给药后, Npas2、Cry1、Per1、Rora、Per2、Nr1d1 表达水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 提示茯苓水提取物干预后可回调 Arntl、Per1、Per2、Per3、Nr1d1 的表达水平。

4 讨论

抑郁症是涉及多种神经递质、脑区及环路的疾病, 研究显示长期慢性刺激可能导致神经递质紊乱和 HPA 轴功能亢进, 导致糖代谢、脂质和脂肪酸等代谢紊乱^[22-24], 代谢物失衡进一步又会影响到下丘脑视交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) 下游生



与对照组比较: $^{\#}P<0.05$ $^{##}P<0.01$ $^{###}P<0.001$; 与模型组比较:

$^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$

$^{\#}P<0.05$ $^{##}P<0.01$ $^{###}P<0.001$ vs control group; $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$

vs model group

图 2 茯苓极性提取物对昼夜节律相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Effect of *P. cocos* polar extract on expression levels of circadian rhythm genes ($\bar{x} \pm s, n=6$)

物钟基因表达的节律性^[25], 反过来下丘脑 SCN 损伤可导致 HPA 轴紊乱^[26], 可见昼夜节律和抑郁互为因果关系。因此, 本研究中采用抑郁症的经典模型 CUMS 探讨茯苓极性提取物对神经递质及昼夜节律的调节作用。

“单胺类假说”是首个抑郁症的神经生物化学理论^[21], 认为体内神经突触间隙 NE、5-HT 或 DA 相对或绝对不足是引起抑郁症发生的主要原因, 同时也有文献报道神经递质参与昼夜节律的调节^[9], 睡眠/觉醒的交替过程与单胺类神经递质含量的动态变化密切相关^[27]。研究发现昼夜节律可能与 5-HT 功能有关^[9], 5-HT 水平受其合成前体 Trp 和其代谢物 5-HIAA 含量的影响, 而 95%Trp 参与犬尿氨酸(Kyn)的合成, 只有 1%参与 5-HT 途径^[28], 在 CUMS 模型组中, 5-HT、5-HIAA、Trp 水平均显著减少, 可能是由于 Trp 的代谢从 5-HT 的产生转向 Kyn 的产生。在茯苓极性提取物干预后, 5-HT、5-HIAA、Trp 水平显著回调, 表明茯苓极性提取物可能通过增强 5-HT 代谢途径来发挥昼夜节律的调节作用。Janowsky 等^[29]于 1972 年首先提出乙酰胆碱和肾上腺素神经元功能低下, 两者平衡失调可能会引发抑郁症。另有研究表明 Ach-NE 信号通过 β_2 nAChRs 和 α_2 -去甲肾上腺素能受体相互作用来介导与焦虑和抑郁有关的行为^[30]。CUMS 模型组中 Ach、NE 水平显著降低, 在茯苓极性提取物干预后, Ach、NE 水平均显著回调, 表明茯苓极性提取物可调节 Ach-NE 信号的相互作用。GABA 和 Glu 分别是中枢神经系统中重要的抑制性氨基酸和兴奋性氨基酸, 抑制系统和兴奋系统之间的平衡是避免疾病发生的关键^[31-32], 应激性生活事件使 Glu 浓度升高, GABA 浓度降低, 引起 Glu 能系统过度激活, 而 GABA 神经传递活动减退, Glu 和 GABA 的平衡失调导致抑郁等情感障碍疾病的发生^[33]。CUMS 模型组中 GABA/Glu 显著降低, 给药后 GABA/Glu 显著升高并趋近对照组, 表明茯苓极性提取物可调节氨基酸神经递质比例的平衡。综上, 茯苓极性提取物可通过增强 5-HT 代谢途径, 调节 Ach-NE 信号的相互作用以及氨基酸神经递质比例的平衡发挥昼夜节律的调节作用。

生物钟系统由位于 SCN 的母钟和分布于外周组织、器官的子钟组成。整个胃肠道, 特别是肝脏的各种过程似乎处于昼夜节律控制之下^[34]。生物钟基因所控制的生物钟, 可以产生内源性生物节律,

并能通过视网膜-下丘脑通路使得内源性周期与外界 24 h 光暗循环变化保持同步, 并通过输出途径完成对生理、行为的调节^[35]。目前研究最多的生物钟基因为核心激活因子 CLOCK 和 BMAL1 及其靶基因 Per1-3、Cry1-2 等。CLOCK/BMAL1 通过调节和控制下游相关钟控基因的表达, 使其节律性表达并将生物节律信号输出。CLOCK/BMAL1 形成异二聚体, 启动正向调控, 激活 Per1-3、Cry1-2、Nr1d1、Bhlhe41、Ror 等基因的表达, 而 Per、Cry、Nr1d1 和 Bhlhe41 蛋白作为负性调节元件可参与抑制 CLOCK/BMAL1 的活性, Ror 则促进 Bmal1 的基因表达^[36]。本实验结果显示, 与对照组相比, 模型组中 Npas2、Arntl 表达水平显著升高, Bhlhe41、Per1、Per2、Per3、Nr1d1 表达水平显著降低, 表明 CUMS 造模使靶基因对核心基因 Npas2、Arntl 的抑制作用减弱, 使核心基因过度激活, 引起昼夜节律的紊乱, 其结果与前期研究结果^[13]基本一致。在茯苓极性提取物干预后, Arntl、Per1、Per2、Per3、Nr1d1 的表达水平都有不同程度的回调, 表明茯苓极性提取物可改善 CUMS 大鼠昼夜节律紊乱。另外, 与对照组相比, 模型组中其他靶基因 Cry1、Rora、Rorc 表达水平不具有显著性, 但趋势与前期研究结果^[13]基本一致, 其原因可能与造模天数的差异等有关(前期造模天数为 21 d)。生物钟是一种通过昼夜节律基因“转录-翻译”反馈回路而自主产生的昼夜节律^[37], 本研究主要在转录水平对茯苓极性提取物的昼夜节律调节作用进行研究, 并不能完全反映这些基因表达的蛋白也有同样的差异变化, 因此需要进一步利用 Western blotting 对其进行验证分析。

综上所述, 本实验采用 CUMS 模型测定了血清中神经递质和肝脏中与昼夜节律通路相关的 10 种基因表达水平的变化, 揭示了茯苓极性提取物可能增强 5-HT 代谢途径, 调节 Ach-NE 信号的相互作用以及氨基酸神经递质比例的平衡, 回调参与昼夜节律的 Arntl、Per1、Per2、Per3、Nr1d1 的表达水平改善 CUMS 大鼠神经递质及昼夜节律紊乱, 为茯苓极性提取物的宁心安神功效及其调控神经递质和昼夜节律代谢途径的作用机制研究提供依据, 也为新药开发奠定基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 黄世敬. 茯苓在治疗抑郁症中的应用 [J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(2): 366-368.

- [3] 张武霞, 陈 露, 段金友. 三种中药多糖的抗抑郁活性及其机制研究 [J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2017, 37(12): 905-912.
- [4] Zhang W, Chen L, Li P, *et al.* Antidepressant and immunosuppressive activities of two polysaccharides from *Poria cocos* (Schw.) Wolf [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120(Pt B): 1696-1704.
- [5] 오기완. *Poria cocos* ethanol extract and its active constituent, pachymic acid, modulate sleep architectures via activation of GABA_A-ergic transmission in rats [J]. *J Biomed Res*, 2015, 16(3): 84-92.
- [6] Bass J, Takahashi J S. Circadian integration of metabolism and energetics [J]. *Science*, 2010, 330(6009): 1349-1354.
- [7] 吕中卿, 熊桂华. 中西医结合治疗昼夜节律紊乱性睡眠障碍的研究进展 [J]. 中国医药指南, 2017, 15(34): 14-15.
- [8] 周奇志. 慢性时差模型的情绪时间动力学特征及其针刺干预机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2010.
- [9] 朱晓彤. 睡眠生物节律的神经生物学研究 [J]. 国外医学: 精神病学分册, 2005(02): 117-121.
- [10] 周江燕. 抗抑郁治疗对抑郁症昼夜节律影响的相关性研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2015.
- [11] Miranda-Scippa A M, Pires M L, Handfas B W, *et al.* Pituitary volume and the effects of phototherapy in patients with seasonal winter depression: A controlled study [J]. *Revista Brasileira Psiquiatria*, 2008, 30(1): 50-54.
- [12] Rainer Q, Xia L, Guilloux J P, *et al.* Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2012, 15(3): 321-335.
- [13] 赵 芳. 基于转录组学的柴胡石油醚部位抗抑郁作用机制研究 [D]. 太原: 山西大学, 2018.
- [14] 徐 雷, 张 群, 刘常丽, 等. 茯苓菌核不同药用部位有效成分含量 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(06): 289-290.
- [15] 宋 潇, 谢昭明, 黄 丹, 等. 茯苓不同产地、不同药用部位多糖含量比较 [J]. 山东中医药大学学报, 2015, 39(2): 186-189.
- [16] Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: A 10-year review and evaluation [J]. *Psychopharmacology*, 1997, 134(4): 319-329.
- [17] Gao X, Liang M, Fang Y, *et al.* Deciphering the differential effective and toxic responses of *Bupleuri Radix* following the induction of chronic unpredictable mild stress and in healthy rats based on serum metabolic profiles [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 8(2018): 995.
- [18] 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.
- [19] 赵 芳, 李 强, 梁梅丽, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定大鼠血清中 8 种神经递质 [J]. 分析化学, 2018, 46(1): 121-128.
- [20] 臧雨馨, 孙冰婷, 赵文珠, 等. LC-MS/MS 法同时测定 CUMS 大鼠血浆中 3 种单胺类神经递质 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(2): 273-278.
- [21] Duffey K C, Shih O, Wong N L, *et al.* Evaporation kinetics of aqueous acetic acid droplets: Effects of soluble organic aerosol components on the mechanism of water evaporation [J]. *Phys Chem Chem Physics Pccp*, 2013, 15(28): 11634-11639.
- [22] 何小燕, 陈建丽, 向 欢, 等. 谷氨酸和皮质酮诱导的 PC12 抑郁症细胞模型差异性的 ¹H-NMR 代谢组学研究 [J]. 药学学报, 2017, 52(2): 245-252.
- [23] Monaghan D T, Bridges R J, Cotman C W. The excitatory amino acid receptors: Their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1989, 29(1): 365-402.
- [24] 梁梅丽. 基于 LC-MS 代谢组学技术的柴胡石油醚部位抗抑郁的量-效/毒关系研究 [D]. 太原: 山西大学, 2018.
- [25] 朱春水, 孙 玲, 王来友, 等. 昼夜节律调控糖脂代谢的研究进展 [J]. 广东药学院学报, 2016, 32(3): 398-402.
- [26] Grosse J, Davis F C. Melatonin entrains the restored circadian activity rhythms of syrian hamsters bearing fetal suprachiasmatic nucleus grafts [J]. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*, 1998, 18(19): 8032.
- [27] 刘雨星, 曾 征, 景晓明. 头皮针对倒相活动节律大鼠间脑中单胺类神经递质的调整作用 [J]. 中国中医基础医学杂志, 1999(2): 49-51.
- [28] Wang L S, Zhang M D, Tao X, *et al.* LC-MS/MS-based quantification of tryptophan metabolites and neurotransmitters in the serum and brain of mice [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2019, 1112(2019): 24-32.
- [29] Janowsky D S, El-Yousef M K, Davis J M, *et al.* A cholinergic-adrenergic hypothesis of mania and depression [J]. *Lancet*, 1972, 300(7787): 632-635.
- [30] Mineur Y S, Cahuzac E L, Mose T N, *et al.* Interaction between noradrenergic and cholinergic signaling in amygdala regulates anxiety-and depression-related

- behaviors in mice [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2018, 43(10): 2118-2125.
- [31] 温 瀑, 李玲玲, 牛源菲, 等. 细辛干预小鼠抑郁的初步研究 [J]. 世界中医药, 2018, 13(4): 794-798.
- [32] Zhang Q, Ma X, Yang Y, *et al.* Jieyuanshen Decoction exerts antidepressant effects on depressive rat model via regulating HPA axis and the level of amino acids neurotransmitter [J]. *Afric J Tradit Compl Altern Med*, 2017, 14(2): 33-46.
- [33] 李 珍, 安书成, 李江娜. 抑郁症发生中 γ -氨基丁酸与其他相关递质的关系 [J]. 生理科学进展, 2014, 45(3): 190-194.
- [34] Reinke H, Asher G. Circadian clock control of liver metabolic functions [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(3): 574-580.
- [35] 牟 丽. 缰核对大鼠自发活动昼夜节律的影响及可能机制 [D]. 长春: 吉林大学, 2009.
- [36] Albrecht U. Timing to perfection: The biology of central and peripheral circadian clocks [J]. *Neuron*, 2012, 74(2): 246-260.
- [37] Bechtold D A, Gibbs J E, Loudon A S. Circadian dysfunction in disease [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2010, 31(5): 191-198.