

·基础研究·

加味温胆汤对抑郁模型大鼠学习记忆能力及
海马 cAMP-PKA 途径的影响*张丽萍¹ 张 曼² 陈友友² 张伯礼¹

摘要 目的:探讨加味温胆汤对抑郁模型大鼠学习记忆能力及海马信号转导 cAMP-PKA 途径的影响。**方法:**32 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、盐酸氟西汀组及加味温胆汤组,每组 8 只,应用孤养加慢性轻度不可预见性应激方法造模,采用 Morris 水迷宫实验测试大鼠空间学习记忆能力、放射免疫法测定海马 cAMP 含量,以及免疫组化 SABC 法测定海马区 PKA 蛋白表达水平。**结果:**模型组大鼠学习记忆能力显著下降($P<0.01$),海马 cAMP 含量增加($P<0.05$)、PKA 表达显著减少($P<0.01$)。中、西药组与模型组比较,学习记忆能力增强($P<0.05$),cAMP 含量下降($P<0.05$),PKA 蛋白表达显著上升($P<0.05$)。**结论:**加味温胆汤可增强抑郁症大鼠学习与记忆能力,其影响机制可能与海马信号转导 cAMP-PKA 途径有关。

关键词 抑郁症;加味温胆汤;学习记忆;环化腺苷酸;蛋白激酶 A

中图分类号:R749.4,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2008)-12-1082-04

Effects of Jiawei Wendan decoction on learning and memory and cAMP-PKA pathway of hippocampal signal transduction in rats model of depression/ZHANG Liping, ZHANG Man, CHEN Youyou,et al// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2008,23(12): 1082—1085

Abstract Objective:To observe effects of Jiawei Wendan decoction on learning and memory and cAMP-PKA pathway of hippocampal signal transduction in depressive rat models. **Method:** Depressive rat model was established by separation and chronic unpredictable mild stress. Thirty-two SD rats were selected and randomly divided into normal group, model group, Prozac group and Jiawei Wendan decoction group with 8 rats in each group. All rats were tested for spatial learning and memory in Morris water maze. Contents of cAMP were detected by radio-immunity assay, and the expression of PKA in CA3 region of the hippocampus was assayed by using immunohistochemical method. **Result:** Scores of spatial learning and memory lowered remarkably in model group, contents of cAMP increased and expressions of PKA remarkably reduced in hippocampus of model rats ($P<0.01$). Compared with model group, scores of spatial learning and memory increased obviously ($P<0.05$), contents of cAMP reduced ($P<0.05$) and expressions of PKA increased in drugs groups ($P<0.05$). **Conclusion:** These results indicate that Jiawei Wendan decoction can enhance the hippocampus-dependent spatial learning and memory function, and cAMP-PKA pathway of hippocampal signal transduction may participate in the mechanism of enhanced performance.

Author's address Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, 300193

Key words depression; Jiawei Wendan decoction; learning and memory; cyclic adenosine monophosphate; protein kinase A

抑郁症是一种常见的情感性精神障碍疾病,主要表现为情绪低落、思维迟钝、言语动作减少、对工作失去兴趣等症状。国内外研究证实抑郁症患者除一系列病理性情感或心境改变外,其认知功能常表现出缺损,如学习记忆受损、注意力不集中等,是影响患者工作、学习和生活的重要原因之一^[1-3]。然而,目前多数抗抑郁西药对患者认知功能的恢复作用却不尽如人意^[4],长期服用丙咪嗪、阿米替林等具有镇静和抗胆碱作用的抗抑郁药物,可引发人和动物的认知功能受损^[5]。因此,在抑郁症发病机制的相关研究中,不仅应关注抑郁症状的缓解,亦应重视对认知功能障碍的改善,以达到提高患者生存质量的目的。

近年研究发现:cAMP 级联的受体后信号转导通路:环磷酸腺苷-蛋白激酶 A-环(化)腺苷酸反应元件结合蛋白-脑源性神经营养因子(cyclic adenosine monophosphate-protein kinase A-cAMP response element binding protein-brain derived neurotrophic factor,cAMP-PKA-CREB-BDNF)中的部分

* 基金项目:中国博士后科学基金资助项目(20070410200)

1 天津中医药大学,天津市南开区卫津路双峰道 154 号天津中医药大学文理部 201 室,300193

2 广西中医学院

作者简介:张丽萍,女,教授,博士

收稿日期:2008-05-20

环节与抑郁症的发病机制密切相关^[6];海马信号转导 cAMP-PKA 途径在学习记忆形成机制中发挥着极为关键的作用^[7]。

加味温胆汤由《三因极一病证方论》温胆汤化裁而成,以调理脾胃气机为旨,具调中行气、驱化痰浊之功^[8]。相关研究表明,该方可通过上调抑郁大鼠海马 p-CREB 的表达,改善抑郁大鼠的行为表现,发挥抗抑郁功效。然而,除情绪低落外,抑郁症患者还伴有学习记忆等认知功能减退,其生存质量的降低一定程度上取决于认知功能减退。所以,对认知行为的恢复在现今抑郁症研究中已逐渐受到关注^[9]。前期研究虽已证实加味温胆汤可改善抑郁行为表现,但其对学习记忆等认知功能有何影响尚未见报道。本研究通过观察抑郁大鼠学习、记忆能力及海马 cAMP 含量、PKA 表达变化及其加味温胆汤的干预作用,以期从海马信号转导 cAMP-PKA 途径,进一步阐释加味温胆汤的抗抑郁作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 药物与试剂:加味温胆汤(半夏、竹茹、枳实、茯苓、柴胡、石菖蒲、合欢花等),购于广西中医学院附属一院中药房,经中药植化室鉴定后,水煎浓缩为 1.5g/ml,置 4℃冰箱内备用。盐酸氟西汀(百忧解),由上海中西药业股份公司提供,用前 2h 用双蒸水新鲜配制。主要试剂:¹²⁵I 放射免疫试剂盒,由美国 Sigma 公司提供;PKA 免疫组化试剂盒、联苯二胺(DAB 显色剂),由武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.1.2 实验动物:清洁级 SD 雄性大鼠 40 只,体质量 180—200g,由长沙市开福区实验动物科技服务部提供,动物生产许可证号:SCXK(湘)20060001。自由饮食,室温(25±3)℃,光/暗周期为 12h/12h(光照时间 6:00—18:00)

1.1.3 主要仪器:Morris 水迷宫(中国药科大学)、TDL-5000B 放免专用冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)、冰冻切片机 CRYOTOME AS620(华骏医疗器材有限公司)、CAIMS 系列-多功能真彩病理图像分析系统(北京麦克奥迪图像技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及给药:购买动物适应性喂养 1 周后,进行 Morris 水迷宫实验,选择得分接近的动物 36 只,随机分为模型对照组(以下简称模型组)8 只、模型+加味温胆汤组(以下简称中药组)10 只、模型+盐酸氟西汀组(以下简称西药组)10 只、正常对照组(以下简称正常组)8 只。各组在造模同时即开始给

药,中药组喂饲加味温胆汤药液 12g/kg/d,西药组喂饲盐酸氟西汀 1.8mg/kg/d,模型组、正常组胃饲等容量生理盐水,每日 8:00 开始。

1.2.2 造模方法:参考文献方法^[10-11],除正常组外,其余各组大鼠孤养,自分组之日起,接受 21d 各种未预知的应激刺激,包括 24h 禁食,24h 禁水,通宵照明,4℃冷水游泳 5min,45℃烘箱热烘 5min,夹尾 1min,高速水平振荡 3min,100V 电击足底 1min,悬尾 1min,共 9 种刺激,21d 内随机安排每日给予 1 种,每种刺激出现 2—3 次。

1.2.3 Morris 水迷宫实验测定各组大鼠学习记忆能力:在造模前、后各测定 1 次,每次 4d,每天上下午各进行 1 次。将大鼠面向池壁分别从两个象限的入水点放入水中,记录其在 90s 内寻找到平台的时间,即为逃避潜伏期。记录实验最后一天各组大鼠的逃避潜伏期时间(取上、下午两次实验成绩均值),作为学习记忆成绩。

1.2.4 放射免疫法测定各组大鼠海马 cAMP 含量:各组动物末次造模结束 24h 后,冰上取大鼠一侧海马组织 50mg,固定后,将大鼠海马组织置于 pH4.75 醋酸缓冲液中,匀浆,加入无水乙醇沉淀蛋白,离心取上清液,60℃烘干。采用 ¹²⁵I 标记放免法测定上述样品 cAMP 含量,根据标准曲线,将放射性强度折算为 pmol/g 湿重组织表示。

1.2.5 免疫组织化学法对各组大鼠海马 PKA 蛋白表达的检测及分析:各组动物末次造模结束 24h 后,常规灌流固定,冰上取脑后固定,常规冰冻切片,片厚 15μm,-20℃冰箱保存备测。按 SABC 法进行下述免疫组织化学处理:切片晾干后,入 4℃冰丙酮固定 10min,滴加 0.3%H₂O₂ 孵育 30min,加血清,37℃室温孵育 20min,加入兔抗 PKA 多克隆抗体(1:100)4℃孵育 48h,依次滴加生物素化羊抗兔抗体和辣根过氧化物酶标记链酶卵白素工作液,均在 37℃孵育 20min;以上各步除接入一抗外,其余各步骤之间均用 0.01mol 磷酸盐缓冲液(PBS)洗 5min 3 次,最后以 DAB 显色,常规脱水、透明、封片,光镜下观察,拍片。阴性对照以抗体稀释液代替一抗,其余步骤同上。每只动物取相同部位的 3 张切片,每张切片选取 3 个视野,在同一放大倍数、同一光强度下,采用 CMLAS 系列多功能真彩色病理图像分析系统,分别计算每张切片中海马 CA3 区表达 PKA 的阳性细胞数,以 3 张切片的均值为数据进行统计学分析。

1.3 统计学分析

统计分析采用 SPSS11.5 软件,数据以均数±标准差表示,以单因素方差分析进行组间差异比较,两

两比较用 q 检验,以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 实验动物数量分析

中药组死亡 2 只、西药组死亡 1 只,解剖无特殊发现,死亡原因不明。进入结果分析 32 只,每组各 8 只。

2.2 加味温胆汤对大鼠学习记忆能力的影响

造模前各组大鼠的逃避潜伏期无明显差异($P>0.05$)。造模结束后,模型组与正常组比较,逃避潜伏期明显延长($P<0.01$);与模型组相比,中、西药组逃避潜伏期明显缩短($P<0.05$);中、西药组间相比($P>0.05$)。见表 1。

表 1 造模前后各组平均逃避潜伏期变化比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	逃避潜伏期(s)	
		造模前	造模后
正常组	8	14.55±3.30	6±1.64
模型组	8	15.14±2.01	10.11±2.42 ^①
中药组	8	4.83±2.041	7.5±2.57 ^②
西药组	8	15.81±1.07	7.15±2.75 ^②

①与正常组比较 $P<0.01$;②与模型组比较 $P<0.05$

2.3 加味温胆汤对大鼠海马 cAMP 含量的影响

与正常组比较,模型组海马 cAMP 含量显著增加;与模型组相比,中、西药组 cAMP 含量均显著下降($P<0.05$);中、西药组间相比 $P>0.05$ 。见表 2。

2.4 加味温胆汤对大鼠海马组织 PKA 蛋白表达的影响

光镜下,各组大鼠海马 CA3 区均可见 PKA 免疫标记阳性表达,其阳性反应物呈棕褐色,位于胞浆内。正常组大鼠海马 CA3 区 PKA 表达尤为明显,着色较深;与正常组比较,模型组海马 CA3 区着色浅淡,PKA 表达明显减少($P<0.01$);与模型组比较,中、西药组海马 CA3 区 PKA 表达增强($P<0.05$),着色加深;中、西药组间相比($P>0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠海马组织 cAMP 含量、CA3 区 PKA 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	cAMP 含量(pmol/mg)	PKA
正常组	8	0.49±0.27	188.75±19.54
模型组	8	0.67±0.20 ^①	144.88±27.67 ^②
中药组	8	0.44±0.22 ^③	169.13±22.25 ^③
西药组	8	0.48±0.11 ^③	166.63±23.45 ^③

与正常组比较:① $P<0.05$,② $P<0.01$;与模型组比较:③ $P<0.05$

3 讨论

随着当今社会竞争的日益加剧,各种压力纷至沓来,抑郁症发病率逐年升高。其发病机制错综复杂,迄今尚未完全阐明。研究发现,慢性应激性生活事件是引发抑郁的主要原因,海马作为应激易损的

主要靶区,与情绪行为、学习记忆等高级认知功能密切相关,已证实海马区损伤可导致抑郁症患者情绪低落和学习记忆能力下降^[12]。Morris 水迷宫作为一种主要用于检测啮齿类动物空间学习能力的实验方法,因其能够全面地考察实验动物空间认知加工的过程,客观地反映其认知水平,被各国神经科学家广泛推广和应用^[13]。本研究采用目前国内外公认的经典动物模型-孤养模型结合慢性不可预见性应激抑郁模型为研究对象,运用 Morris 水迷宫观察模型大鼠空间学习记忆能力的变化及加味温胆汤的干预作用。结果发现,模型组大鼠空间学习记忆能力明显下降,提示抑郁模型大鼠存在认知功能的减退,加味温胆汤则在一定程度上能够逆转或改善该状态。

近年来,随着细胞信号转导研究的进展,抑郁症的病理生理研究逐渐转向细胞内第二信使系统。cAMP 作为细胞内第二信使,通过激活 cAMP 依赖的 PKA 调节细胞功能,进而介导多种细胞内激素、神经递质及其他信号分子,且已证实 cAMP-PKA 途径在学习记忆信号通路中发挥着关键作用^[14]。Duman 等研究提示抑郁症患者存在 cAMP-CREB 信号传导通路功能异常,抗抑郁治疗一段时期后细胞内的 cAMP-PKA 信号通路被激活^[15]。洪小平等^[16]研究发现慢性应激可能通过下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(hypothalamo-pituitary-adrenal,HPA)影响 PKA 的表达和催化活性,从而参与调控海马依赖的学习记忆功能;而刘能保等^[7]在同一实验的后续研究中认为复合应激模式可作为一种丰富的环境刺激活化 PKA 信号通路,影响海马组织内 PKA 依赖的突触可塑性,从而使学习与记忆能力增强。张学礼等^[17]证实孤养加慢性不可预见性中等刺激所致抑郁症大鼠行为学发生显著改变,甘麦大枣汤加味方能改善抑郁大鼠的抑郁症状,调整大鼠海马胞内信号转导 cAMP-PKA 途径。

本次实验观察到,孤养加慢性轻度不可预见性应激抑郁大鼠海马 cAMP 含量升高、PKA 蛋白表达降低,加味温胆汤对此有逆转作用。前期相关研究工作发现,模型大鼠水平运动次数和垂直运动次数减少,悬尾静止时间延长,海马组织内 p-CREB 表达及 BDNF 蛋白表达降低,提示加味温胆汤可能通过活化转录因子 CREB 促进 BDNF 蛋白的表达,实现对 cAMP 级联受体后信号转导 CREB-BDNF 途径的调控作用。结合本次研究,初步推测:加味温胆汤的抗抑郁作用机制可能与其调节 cAMP 级联受体后信号转导 cAMP-PKA-CREB-BDNF 通路,从而改善抑郁大鼠认知行为表现有关。

参考文献

- [1] 张艳明, 姚辉, 屈亚萍, 等. 急性期康复对脑卒中患者抑郁影响的临床研究[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(1): 69—70.
- [2] 陈远岭, 徐俊晃, 张铁忠. 对不同程度认知障碍抑郁症的治疗学研究[J]. 中国心理卫生杂志, 2000, 14(4): 279—282.
- [3] Deuschle M, Knies A, Niemann H. Impaired declarative memory in depressed patients is slow to recover: clinical experience[J]. *Pharmacopsychiatry*, 2004, 37(4): 147—151.
- [4] 刘建琪, 邓元民. 认知治疗与帕罗西汀对抑郁症疗效的对照研究[J]. 中国康复医学杂志, 2006, 21(7): 655—656.
- [5] Zimmer CA, Lopez JF, Campeau S. Effect of chronic stress and antidepressants in rat hippocampal function [J]. *Biological Psychiatry*, 1996, 39(7): 589.
- [6] Manji HK, Drevets WC, Charney DS. The cellular neurobiology of depression[J]. *Nat Med*, 2001, 7: 541—547.
- [7] 刘能保, 洪小平, 李晓恒, 等. 慢性复合应激对学习记忆的影响及 cAMP/PKA-CREB 信号通路的作用 [J]. 解剖学报, 2006, 37(6): 611—616.
- [8] 张丽萍. 温胆汤治疗抑郁症的辨证施治[J]. 中国临床康复, 2005, 9(16): 3.
- [9] 王敏建, 况利, 黎雪梅, 等. 噻奈普汀对抑郁模型大鼠学习记忆能力及海马胆碱能纤维的作用 [J]. 中国行为医学科学, 2006, 15(5): 426—428.
- [10] 许晶, 李晓秋. 慢性应激抑郁模型的建立及其评价[J]. 中国行为医学科学, 2003, 12(1): 14—16.
- [11] 王哲, 胡随瑜, 雷德亮, 等. 慢性应激对大鼠海马神经元 PKA 和 p-CREB 蛋白表达的影响及抗抑郁剂的拮抗作用[J]. 中南大学学报(医学版), 2006, 31(5): 767.
- [12] 郑晖, 杨权. 慢性应激对海马结构和功能的影响[J]. 国外医学·精神病学分册, 2001, 28(3): 162.
- [13] 单德红, 柴纪严, 王德山. 定志小丸对抑郁模型大鼠齿状回神经干细胞和学习记忆能力的影响 [J]. 中医药学刊, 2005, 23(8): 1426—1427.
- [14] Matsushita M, Tomizawa K, Moriwaki A, et al. A high-efficiency protein transduction system demonstrating the role of PKA in long-lasting long-term potentiation [J]. *Journal of Neuroscience*, 2001, 21(16): 6000—6007.
- [15] Duman RS, Chen AC, Shirayama Y. Expression of the cAMP response element binding protein (CREB) in hippocampus produces an antidepressant effect[J]. *Biological Psychiatry*, 2001, 49(9): 753—762.
- [16] 洪小平, 刘能保, 张敏海, 等. 慢性复合应激对大鼠学习和记忆功能及海马内 PKA-C β 表达的影响[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2005, 34(3): 257—261.
- [17] 张学礼, 金国琴, 戴薇薇, 等. 甘麦大枣汤加味对抑郁症大鼠海马 cAMP-蛋白激酶 A 途径的影响 [J]. 上海中医药大学学报, 2006, 20(4): 73—75.
- [18] Lothian C, Prakash N, Lendahl U, et al. Identification of both general and region-specific embryonic CNS enhancer elements in the nestin promoter[J]. *Exp Cell Res*, 1999, 248(2): 509—519.
- [19] Michalczyk K, Ziman M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation [J]. *Histol Histopathol*, 2005, 20(2): 665—671.
- [20] Sakakibara S, Imai T, Hamaguchi K, et al. Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell[J]. *Dev Biol*, 1996, 176(2): 230—242.
- [21] Sakakibara S, Okano H. Expression of neural RNA-binding proteins in the postnatal CNS: implications of their roles in neuronal and glial cell development [J]. *J Neurosci*, 1997, 17(21): 8300—8312.
- [22] Okano H, Kawahara H, Toriya M, et al. Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cells [J]. *Exp Cell Res*, 2005, 306(2): 349—356.
- [23] Kaneko Y, Sakakibara S, Imai T, et al. Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells [J]. *Dev Neurosci*, 2000, 22(1-2): 139—153.
- [24] Cremer H, Chazal G, Lledo PM, et al. PSA-NCAM: an important regulator of hippocampal plasticity [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2000, 18(2-3): 213—220.
- [25] Franceschini I, Vitry S, Padilla F, et al. Migrating and myelinating potential of neural precursors engineered to over express PSA-NCAM [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2004, 27(2): 151—162.
- [26] Uchida N, Buck DW, He D, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(26): 14720—14725.
- [27] Fliniaux I, Viallet JP, Dhoulailly D, et al. Transformation of amnion epithelium into skin and hair follicles [J]. *Differentiation*, 2004, 72(9-10): 558—565.
- [28] Wei JP, Zhang TS, Kawa S, et al. Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *Cell Transplant*, 2003, 12(5): 545—552.
- [29] Takashima S, Ise H, Zhao P, et al. Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions[J]. *Cell Struct Funct*, 2004, 29(3): 73—84.
- [30] Zhao P, Ise H, Hongo M, et al. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes [J]. *Transplantation*, 2005, 79(5): 528—535.
- [31] Sakuragawa N, Kakinuma K, Kikuchi A, et al. Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells[J]. *J Neurosci Res*, 2004, 78(2): 208—214.

(上接 1081 页)