

苍艾挥发油对大鼠抑郁样行为的影响及机制研究

王维, 王玉莲, 张凯玲, 解宇环, 陈柏君, 熊磊

(云南中医药大学基础医学院, 云南 昆明 650500)

摘要:目的 研究苍艾挥发油(Volatile oil of Cang Ai, VOCA)对不可预知慢性温和应激所致的大鼠抑郁样行为的影响及其可能的作用机制。方法 将 40 只 SD 大鼠, 随机分为 4 组, 正常对照组、模型对照组、阳性药组(氯米帕明, 20 mg/kg)和苍艾挥发油组(14.6 μ L/kg)各 10 只; 后 3 组大鼠均采用 6 种不同刺激方式复制慢性不可预知温和应激模型(CUMS)。在 CUMS 造模第 15~42 天进行药物干预, 除阳性药灌胃给药外, 其他各组均雾化吸入相应剂量的药物或溶媒。于造模后第 21、28、35、42 天进行体质量、食量和毛态检测, 造模结束后的第 1 天进行旷场实验和蔗糖偏好实验, 以评价苍艾挥发油对应激所导致的抑郁样行为的作用。用免疫荧光染色检测大鼠海马齿状回 BDNF 阳性细胞数、蛋白免疫印迹法检测大鼠海马中突触囊泡蛋白(Synaptophysin)和突触后致密物质-95(PSD-95)的蛋白表达水平。结果 与模型组比较, VOCA 可明显增加模型大鼠的水平运动总路程、穿行格子数和移动速度, 同时缩短静止时间($P<0.01$), 提高蔗糖偏好度($P<0.05$)。VOCA 在给药第 7、14、21 和 28 天可显著增加造模动物体质量增幅和进食量($P<0.05\sim 0.01$), 毛态评分则明显低于模型组($P<0.01$)。同时, VOCA 能够明显增加海马齿状回中 BDNF 阳性细胞数和海马组织中 Synaptophysin 表达量($P<0.01$)。结论 苍艾挥发油对抗大鼠慢性不可预见应激抑郁的机制可能与增加 BDNF 含量进而增加突触囊泡膜蛋白表达从而改善突触传递效能有关。

关键词:苍艾挥发油; 慢性不可预知温和应激模型; 脑源性神经营养因子; 突触囊泡蛋白; 突触后致密物-95

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-0482(2019)04-0421-05

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2019.0421

引文格式:王维, 王玉莲, 张凯玲, 等. 苍艾挥发油对大鼠抑郁样行为的影响及机制研究[J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35(4): 421-425.

The Study on the Anti-Depression Effect and Mechanism of Volatile Oil of Cang Ai

WANG Wei, WANG Yu-lian, ZHANG Kai-ling, XIE Yu-huan, CHEN Bo-jun, XIONG Lei

(Basic Medical School, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming, 650500, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To discuss the antidepressant effect and related mechanism of the Volatile oil of Cang Ai(VOCA). **METHODS** 40 Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 4 groups on average. They were normal control group, model group, VOCA group(14.6 μ L/kg) and clomipramine group(20 mg/kg). Then the rats in later three groups were exposed constantly to 6 types of chronic and mild unpredictable stressors for 42 d. VOCA, solvent or clomipramine were administered by aerosol inhalation or gavage from d15 to d42. Body weight, food intake and coat state were measured on d21, d28, d35 and d42. Open field test and sucrose preference test were applied to elucidate the antidepressant effects of VOCA at the first day after the modeling. Immunofluorescence staining was used for detection of BDNF positive cells in hippocampal dentate. Western blotting was used in the observation of the expression of Synaptophysin and PSD-95 proteins. **RESULTS** Compared with model group, VOCA could increase the total horizontal movement, number of squares traveled and moving speed of CUMS rats, while shorten the rest time significantly ($P<0.01$). The rats' preference for sucrose solution was obviously increased in VOCA group($P<0.05$). The weight gain amplitude and food take of rats in VOCA group were also increased on the 7th, 14th, 21th and 28th day of administration($P<0.05, P<0.01$). At the same time, the coat state scores of the rats which treated with VOCA decreased significantly ($P<0.01$). VOCA significantly increased the number of positive cells of BDNF and promoted the expression of Synaptophysin protein($P<0.05$). **CONCLUSION** The antidepressant effect of the VOCA may be related to modulate the expression of BDNF and the critical proteins associated with synaptic structural and plasticity in the hippocampus.

KEY WORDS: volatile oil of Cang Ai; chronic unpredictable mild stress model; brain derived neurotrophic factor; synaptophysin; postsynaptic density protein-95

收稿日期: 2019-03-19

基金项目: 国家自然科学基金(81560740); 云南省应用基础研究重点项目(2017FA045); 云南省应用基础研究计划-中医联合专项(2015FB205-018)

第一作者: 王维, 男, 讲师, E-mail: ivan_ww@163.com

通信作者: 熊磊, 女, 教授, 主要从事芳香中药药理与应用研究, E-mail: xlluck@sina.com

苍艾挥发油是采用苍术、艾叶、藿香、佩兰等气味清香、辛散走串的芳香药物所研制而成的挥发油复方制剂,以下简称 VOCA (Volatile oil of Cang Ai)。前期研究发现,苍艾挥发油能增强正常大鼠情绪相关脑区的功能活动、改善行为绝望动物的动力缺乏、无助状态,提高利血平诱发的抑郁动物的运动能力。为明确 VOCA 的抗抑郁作用及其可能机制,本实验拟采用慢性不可预知温和应激 (Chronic unpredictable mild stress, CUMS) 法制备抑郁样大鼠模型^[1],观察 VOCA 对模型动物抑郁样行为的影响。同时,应激是导致抑郁症发生的要素,海马是应激损伤的敏感区,脑源性神经营养因子 (Brain derived neurotrophic factor, BDNF) 水平降低、神经突触功能失调和结构受损是抑郁症发病的主要机制^[2]。研究将通过检测分析 CUMS 大鼠海马 BDNF 表达、突触囊泡蛋白 (Synaptophysin) 和突触后致密蛋白 95 (Postsynaptic density protein 95, PSD-95) 含量的变化,探析 VOCA 抗抑郁的可能机制。

1 材料

1.1 实验动物

SD 大鼠, SPF 级, 雄性, 40 只, 体质量 180~220 g, 购买于北京华阜康生物科技股份有限公司, 动物许可证号: SCXK (京) 2014-0004。

1.2 受试药物

苍术、艾叶、藿香和佩兰等药材购自云南白药集团中药资源有限公司, 由云南中医药大学中药鉴定教研室杨竹雅副教授鉴定为正品; 苍艾挥发油的制备: 取鉴定合格的药材粉碎后浸泡, 提取挥发油, 得率为 3.6%, 用无水硫酸钠除去挥发油中残留水分后, 封闭放入 4℃ 的冰箱保存备用。实验用时用吐温-80 助溶。

1.3 实验药品和试剂

盐酸氯米帕明片 (购于江苏恩华药业公司); 蛋白提取试剂盒及 BCA 蛋白测定试剂盒, 均购于碧云天生物公司; 兔抗鼠 BDNF 抗体, 兔抗鼠 Synaptophysin、PSD-95 多克隆抗体购自 Abcam 公司; β -Tubulin 抗体、山羊抗兔、山羊抗小鼠二抗购自 Proteintech 公司。

1.4 主要实验仪器和设备

电泳仪及凝胶成像仪均购于美国 Bio-Rad 公司; 切片扫描设备 Nano Zoomer S60 由日本滨松数字公司提供; SMART 行为学检测系统购自 Panlab

Barcelona 公司; 自制雾化给药装置。

2 方法

2.1 模型制备与给药

采用旷场实验及蔗糖偏好实验筛选出合格健康雄性 SD 大鼠 40 只, 随机分成 4 组, 分别为正常对照组、CUMS 模型组、氯米帕明阳性药组 (20 mg/kg)、VOCA 组 (14.6 μ L/kg), 每组 10 只动物。除正常对照组饲养在标准大鼠框 (每笼 5 只) 外, 其余各组大鼠均单独饲养在标准小鼠框, 并按随机顺序给予以下 6 种应激刺激, 持续 42 d, 保证每天应激刺激不重复且无规律性, 避免动物产生适应。6 种应激刺激为: ① 45℃ 恒温温水游泳 5 min; ② 45° 倾斜放置鼠框 7 h; ③ 湿垫料 12 h; ④ 夹尾刺激 1 min; ⑤ 配对居住 12 h; ⑥ 连续光照 36 h。在 CUMS 造模第 15~42 天进行药物干预, 每日 1 次, 连续 28 d。除氯米帕明组灌胃给药外, 其余各组为雾化给药, 模型组给予等容积 0.5% 吐温-80 溶液。所有给药规定在 08:00am—12:00am 之间完成, 实验期间及结束后检测以下指标。

2.2 指标检测

2.2.1 行为学及体质量变化率、食量和毛态 造模后第 21、28、35、42 天进行体质量变化率 [动物体质量变化率 = (第 21、28、35、42 天的体质量 - 第 1 天的体质量) / 第 1 天的体质量]、食量和毛态检测, 造模给药结束后进行旷场实验及糖水偏好实验。毛态检测方法: 分别从大鼠头、颈、背、腹、尾、前爪、后爪进行评分, 毛态评分标准: 0 分 = 清洁整齐, 1 分 = 色污蓬乱; 获得的分数总和即为毛态检测得分。

2.2.2 免疫荧光检测大鼠海马齿状回区 BDNF 阳性细胞数 行为学指标检测结束后, 麻醉动物并采用 4% 多聚甲醛固定液进行灌注, 灌注结束后, 取大鼠左侧海马放入 10% 中性福尔马林中固定。随后浸洗、脱水、透明、浸蜡、包埋及贴片, 以 2% BSA 封闭, 加入 1% 抗-BDNF 抗体 4℃ 孵育过夜, 室温下复温 1 h, 0.1% 二抗避光 37℃ 孵育 1 h; 镜下观察 DAPI 染色为蓝色, BDNF 染色为绿色, 对海马齿状回区 (DG) 拍照记录, 随机选择 5 个区计阳性细胞数。

2.2.3 Western blot 法测定大鼠海马 Synaptophysin 和 PSD-95 表达 麻醉大鼠后, 取脑并于冰面上剥离双侧海马组织, 用组织裂解液裂解后、匀浆后, 采用 BCA 法测定总蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 取出胶并转膜后, 用 5% 脱脂牛奶封闭, 分

别加入抗 Synaptophysin(1 : 500)、抗 PSD95(1 : 500)和抗 β -Tubulin 抗体,4℃过夜后加相应二抗,室温孵育1 h后,用凝胶成像系统成像,并用 Image J 软件分析实验结果。

2.3 统计学方法

应用 Prism 5.0 软件统计,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采取单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行总体显著性差异判断,方差齐的采用 LSD 法进行组间两两比较;若方差不齐则采用秩和检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

表1 VOCA 对 CUMS 模型大鼠旷场实验的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	总路程/mm	穿行格子数	移动速度/mm	静止时间/s
正常组	31 808.42±8 665.24	64.00±21.04	106.47±29.52	79.07±23.04
模型组	19 216.77±6 965.16 ^{##}	31.70±13.06 ^{##}	64.09±23.23 ^{##}	127.55±46.94 ^{##}
阳性药组	24 339.21±10 547.64	46.30±23.19	81.58±35.85	119.93±36.52
VOCA 组	30 084.28±11 046.32 [*]	59.90±27.38 ^{**}	101.48±36.11 [*]	85.72±25.61 ^{**}

注:与正常组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

3.1.2 VOCA 对 CUMS 模型大鼠蔗糖偏好的影响

与正常组相比,CUMS 模型组大鼠糖水消耗减少;与模型组相比,VOCA 组大鼠蔗糖偏好显著提高($P < 0.05$)。见表2。

表2 VOCA 对 CUMS 模型大鼠蔗糖偏好的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	蔗糖偏好百分比/%
正常组	88.40±5.56
模型组	68.87±16.32
阳性药组	88.96±3.38
VOCA 组	89.71±4.22 [*]

注:与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

表3 VOCA 对 CUMS 模型大鼠体质量变化率的影响($\bar{x} \pm s, \%, n = 10$)

组别	第21天	第28天	第35天	第42天
正常组	26.36±3.98	27.26±3.39	34.95±7.31	46.05±5.78
模型组	8.52±4.52 ^{##}	9.48±3.60 ^{##}	9.58±6.73 ^{##}	14.20±6.76 ^{##}
阳性药组	11.36±3.03	12.27±2.58	16.09±4.85 [*]	20.22±5.17 [*]
VOCA 组	12.64±4.37 [*]	15.84±9.23 ^{**}	18.73±4.13 ^{**}	24.75±7.33 ^{**}

注:与正常组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

表4 VOCA 对 CUMS 模型大鼠进食量的影响($\bar{x} \pm s, g, n = 10$)

组别	第21天	第28天	第35天	第42天
正常组	41.55±3.01	40.31±3.56	39.37±4.36	41.45±3.84
模型组	33.31±2.83 ^{##}	31.42±4.15 ^{##}	32.14±3.68 ^{##}	32.61±2.62 ^{##}
阳性药组	36.75±2.22 [*]	36.21±2.85 ^{**}	34.81±1.50	35.46±5.75
VOCA 组	38.53±3.56 ^{**}	37.70±3.08 ^{**}	37.50±1.96 [*]	37.01±3.65 ^{**}

注:与正常组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{**} $P < 0.01$ 。

3.2 VOCA 对 CUMS 模型大鼠海马齿状回区 BDNF 阳性细胞数的影响

3 结果

3.1 VOCA 对 CUMS 模型大鼠行为学的影响

3.1.1 VOCA 对 CUMS 模型大鼠旷场实验的影响

与正常组相比,造模及给药结束后模型组大鼠水平运动总路程、穿行格子数、移动速度明显减少($P < 0.01$),静止时间延长($P < 0.01$);与模型组相比,VOCA 组大鼠水平运动总路程、穿行格子数、移动速度明显增加($P < 0.05 \sim 0.01$),静止时间缩短($P < 0.01$),而阳性药氯米帕明组作用则不及 VOCA 组(表1)。

3.1.3 VOCA 对 CUMS 模型大鼠体质量增幅、食量、毛态的影响

对比正常组,在造模第21、28、35、42天后,模型组体质量增幅和进食量显著降低($P < 0.01$);VOCA 在给药第7、14、21、28天均可显著增加造模动物体质量增幅和进食量($P < 0.05 \sim 0.01$),氯米帕明组大鼠则在给药第21、28天后体质量增幅才显著增加($P < 0.05$)。见表3~4。

对比正常组,在造模第21、28、35、42天后,模型组动物毛态评分明显增加($P < 0.01$),VOCA 组和阳性药组大鼠的毛态评分则均显著低于模型组($P < 0.05 \sim 0.01$)(表5)。

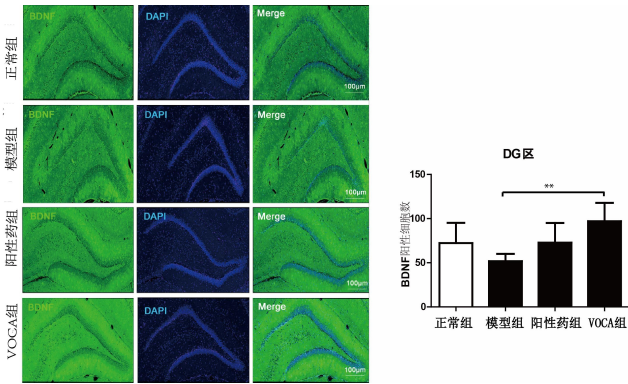
与正常组相比,CUMS 模型组 BDNF 阳性细胞数有降低趋势($P > 0.05$),相较于模型组,VOCA 组

BDNF 阳性细胞数升高 ($P<0.01$), 阳性药氯米帕明组 BDNF 阳性细胞数也有升高趋势, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$) (图 1)。

表 5 VOCA 对 CUMS 模型大鼠毛态的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	第 21 天	第 28 天	第 35 天	第 42 天
正常组	0.67±0.26	0.60±0.51	1.53±0.64	1.80±0.43
模型组	3.17±0.57 ^{##}	3.69±0.75 ^{##}	4.00±0.88 ^{##}	4.26±0.88 ^{##}
阳性药组	2.27±0.59 ^{**}	2.80±0.42 [*]	2.70±0.48 ^{**}	2.72±0.47 ^{**}
VOCA 组	2.13±0.52 ^{**}	2.80±0.42 [*]	2.83±0.39 ^{**}	2.90±0.32 ^{**}

注: 与正常组比较, ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较, ^{**} $P<0.01$ 。

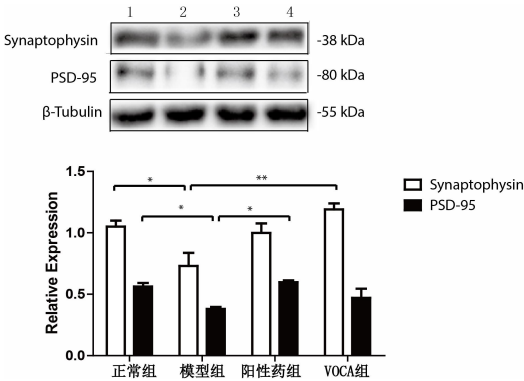


注: 与模型组比较, ^{**} $P<0.01$ 。 $\bar{x}\pm s, n=10$ 。

图 1 VOCA 对 CUMS 模型大鼠海马齿状回区 BDNF 阳性细胞数的影响

3.3 VOCA 对 CUMS 模型大鼠海马 Synaptophysin 和 PSD-95 蛋白表达的影响

与正常组相比, 模型组大鼠海马突触 Synaptophysin 和 PSD-95 蛋白表达量均明显下降 ($P<0.05$); 相较于模型组, VOCA 组大鼠海马 Synaptophysin 含量增加 ($P<0.01$), 突触后 PSD-95 蛋白表达无显著变化; 阳性药氯米帕明则可显著增加 PSD-95 的含量 ($P<0.05$) (图 2)。



注: 1. 正常组; 2. 模型组; 3. 阳性药组; 4. VOCA 组。

与模型组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。 $\bar{x}\pm s, n=10$ 。

图 2 VOCA 对 CUMS 模型大鼠海马 Synaptophysin 和 PSD-95 蛋白表达的影响

4 讨论

抑郁症动物模型有多种制备方法, 常用的有应

激抑郁、药物致郁、孤养致郁和脑损伤致郁等^[3]。慢性应激是抑郁症的主要诱因, 动物经反复应激后会出现类似人类抑郁症的快感缺失、食欲低下等核心症状^[4], 故本研究采用该模型来研究挥发油的抗抑郁作用和机制。实验发现, VOCA 能增加模型大鼠水平运动总路程、运动速度, 减少大鼠的静止时间, 说明其对模型的运动和探索能力降低有改善作用; VOCA 可逆转 CUMS 动物糖水偏爱率降低、增加动物的食量和体质量, 说明 VOCA 能改善模型动物的快感缺失和食欲低下; VOCA 能改善模型大鼠的毛态, 说明 VOCA 可能有改善动物的自理能力, 且作用优于氯米帕明。

研究发现, 抑郁症的发病机制与海马萎缩、海马神经元缺失、前额叶和海马的突触连接减少等有关^[5], 是海马神经元在不良应激的诱导下神经可塑性发生变化的结果^[6]。BDNF 作为神经营养因子家族的一员, 广泛分布于中枢神经系统, 其中海马和皮质的含量最高。BDNF 不仅能促进和改变神经的生长、发育和生存, 而且也是调节神经可塑性的重要因子^[7]。BDNF 可通过与其特异性受体 TrkB 结合, 进一步激活下游 Ras-ERK、PI3K/AKT 和 PLC γ 信号通路增加突触的数目、调节突触形成^[8]。突触连接是神经元间信息交流的主要形式, 是神经可塑性的主要部位^[9]。突触可塑性主要表现为突触的形态、结构、数量及其功能的变化^[10-11], 突触部位的某些蛋白质在突触可塑性中起到非常关键作用。其中, Synaptophysin 是位于突触囊泡膜上的蛋白, 与突触的形成和囊泡循环有密切联系^[12], 其表达量反应突触发生和突触密度情况^[13]。因此, 该蛋白常作为突触前膜的特异性标志^[14]。PSD-95 是突触后膜上的脚手架蛋白, 其含量最高, 作用最关键, 主要出现在成熟的兴奋性谷氨酸能突触中^[15-16], 是突触后膜上的受体活动和稳定性所不可或缺的蛋白, 是突触后特异性标志物之一^[17]。本研究发现, CUMS 模

型大鼠海马齿状回 BDNF 阳性细胞数减少,海马组织中 Synaptophysin 和 PSD95 蛋白表达降低,这与以往的研究相符,VOCA 给药后可显著增加齿状回 BDNF 表达和突触前 Synaptophysin 的蛋白含量,对突触后 PSD95 的蛋白表达没有显著影响,由此我们推测 VOCA 对抗大鼠慢性不可预见应激抑郁的机制可能与增加 BDNF 含量进而增加突触囊泡膜蛋白表达从而改善突触传递效能有关。

参考文献:

- [1] JANNE G, ROBERT M, FISKE E, et al. Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions[J]. *Physiol Behav*, 2005, 84(4): 571-577.
- [2] LI XL, YUAN YG, XU H, et al. Changed synaptic plasticity in neural circuits of depressive-like and escitalopram-treated rats[J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2015, 8(10): 1-12.
- [3] WANG Q, TIMBERLAKE MA, PRALL K, et al. The recent progress in animal models of depression[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2017, 77: 99-109.
- [4] CONGLI H, YING L, HONG W, et al. Re-Evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress[J]. *PLoS ONE*, 2017, 12(9): 1-15.
- [5] WEI L, TONGTONG G, YASHU L, et al. The role of neural plasticity in depression: From hippocampus to prefrontal cortex[J]. *Neural Plast*, 2017, 2017:1-11.
- [6] SON H, BANASR M, CHOI M, et al. Neuritin produces antidepressant actions and blocks the neuronal and behavioral deficits caused by chronic stress[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2012, 109(28): 11378-11383.
- [7] VON BOHLEN UND HALBACH O, VON BOHLEN UND HALBACH V. BDNF effects on dendritic spine morphology and hippocampal function[J]. *Cell Tissue Res*, 2018, 373(3): 729-741.

- [8] MELO CV, MELE M, CURCIO M, et al. BDNF regulates the expression and distribution of vesicular glutamate transporters in cultured hippocampal neurons[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(1): e53793.
- [9] AMTUL Z, ATTA-UR-RAHMAN. Neural plasticity and memory: Molecular mechanism[J]. *Rev Neurosci*, 2015, 26(3): 253-268.
- [10] DUMAN RS, AGHAJANIAN GK. Synaptic dysfunction in depression: Potential therapeutic targets[J]. *Science*, 2012, 338(6103): 68-72.
- [11] MCEWEN BS, EILAND L, HUNTER RG, et al. Stress and anxiety: Structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress[J]. *Neuropharmacol*, 2012, 62(1): 3-12.
- [12] ANJA B, ANNE D, INGEID P, et al. The synaptophysin-synaptobrevin complex: A hallmark of synaptic vesicle maturation[J]. *J Neurosci*, 1999, 19(6): 1922-1931.
- [13] GLANTZ LA, GILMORE JH, HAMER RM, et al. Synaptophysin and postsynaptic density protein 95 in the human prefrontal cortex from mid-gestation into early adulthood[J]. *Neuroscience*, 2007, 149(3): 582-591.
- [14] KWON SE, CHAPMAN ER. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons[J]. *Neuron*, 2011, 70(5): 847-854.
- [15] AKIRA Y, MARTHA CP. Postsynaptic localization of PSD-95 is regulated by all three pathways downstream of TrkB signaling[J]. *Front Synaptic Neurosci*, 2014, 6(6): 1-6.
- [16] WON S, INCONTRO S, NICOLL RA, et al. PSD-95 stabilizes NMDA receptors by inducing the degradation of STEP61[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2016, 113(32): E4736-E4744.
- [17] CATTS VS, DERMINIO S, HAHN CG, et al. Postsynaptic density levels of the NMDA receptor NR1 subunit and PSD-95 protein in prefrontal cortex from people with schizophrenia[J]. *NPJ Schizophrenia*, 2015, 1(1): 15037.

(编辑:董宇)