

慢性束缚应激抑郁症大鼠海马 Belin-1、LC3 的表达变化及逍遥散的调节作用

王亭晔 李晓娟 周雪明 潘秋霞 陈家旭

(北京中医药大学中医学院,北京,100029)

摘要 目的:观察慢性束缚应激抑郁症大鼠模型中海马自噬标志蛋白 Belin-1 及 LC3 的表达变化情况,探讨逍遥散对其的调节作用。方法:20 只 Wistar 大鼠随机分为 4 组($n=5$):正常组、模型组、逍遥散组、氟西汀组。采用 21 d 慢性束缚应激方法建立抑郁症大鼠模型,利用免疫组织化学方法检测大鼠海马 CA3 区 Belin-1、LC3 表达情况。结果:Belin-1、LC3 在各组中较正常组均有较明显的表达($P<0.05$)。与模型组相比,逍遥散能明显下调 Belin-1、LC3 的表达($P<0.05$)。结论:慢性束缚应激抑郁症大鼠海马自噬相关蛋白 Belin-1、LC3 表达有变化,提示自噬可能是抑郁症发病机制之一,且逍遥散治疗抑郁症的机制可能与调节自噬标志蛋白 Belin-1、LC3 有关。

关键词 逍遥散;抑郁症;自噬;Beclin-1;LCA

Effects of Xiaoyaosan Decoction on the expression of Belin-1 and LC3 in hippocampus of rats with depression induced by chronic restraint stress

Wang Tingye, Li Xiaojuan, Zhou Xueming, Pan Qiuxia, Chen Jiaxu

(School of Basic Medical Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To observe the effects of Xiaoyaosan Decoction on the expression of Belin-1 and LC3 in hippocampus of rats with depression induced by chronic restraint stress. **Methods:** A total of 20 Wistar rats were randomly divided into 4 groups: the control group, the model group, the Xiaoyaosan (XYS) group and the fluoxetine group. Depression model was established by 21-day chronic restraint stress, and the expression of Belin-1 and LC3 in CA3 of rats' hippocampus was detected by immunohistochemistry. **Results:** There is significant differences between the control group and other groups ($P<0.05$). Xiaoyaosan Decoction could down-regulated the expression of Belin-1 and LC3 ($P<0.05$). **Conclusion:** The expression of Belin-1 and LC3 in hippocampus of rats with depression induced by chronic restraint stress indicated that autophagy may be part of the mechanism of depression. The effect of Xiaoyaosan Decoction on depression could be related to the regulation of Belin-1 and LC3.

Key Words Xiaoyaosan Decoction; Depression; Autophagy; Beclin-1; LCA

中图分类号:R228 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.03.007

随着社会压力的增加,抑郁症的患病率也逐年增加,抑郁症现已成为临床常见的精神疾病之一。抑郁症属于中医郁证、百合病等的范畴,临床表现以情绪低落为主要特征,严重时甚至伴随幻觉妄想和自杀倾向。世界卫生组织于 2001 年将重度抑郁症(Major Depressive Disorder, MDD)列为导致生活残疾的第一大原因。临床及基础研究对于抑郁症的相关机制、治疗方法也逐渐深入。近年研究表明抑郁症患者大脑中海马、杏仁核等部位出现明显的萎缩、体积缩小现象。已有研究提出自噬与抑郁症之间具有联系,海马部位的萎缩及海马神经元的凋亡可能与自噬有关^[1-4]。自噬(autophagy)是一种自我消灭的机制(self-eating mechanism),对于聚集的蛋白质以

及功能失调细胞器是关键的清洁机制^[5]。在维持细胞内环境稳态中起着十分关键的作用。自噬对于大多数组织细胞均有重要作用,其在中枢神经系统中也发挥着重要作用。LC3 与 Beclin-1 是 2 种具有代表性的自噬标志蛋白,LC3 参与自噬体膜的形成^[6], Beclin 1 则是细胞自噬的一个关键调控因子,是自噬体形成不可或缺的条件^[7]。逍遥散作为中医传统方剂,在治疗抑郁症方面也具有较好的疗效,对其治疗抑郁症的相关机制研究也多见报道^[8-9],现已成为治疗抑郁症的常用方剂。

我们课题组在前期研究中通过慢性束缚应激,成功建立了抑郁症大鼠模型的造模方法,且具有较好的稳定性^[10]。本实验通过慢性束缚应激方法建

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81473597;81630104);北京市自然科学基金项目(编号 7152093)

通信作者:陈家旭,男,教授,博士研究生导师,北京市朝阳区北三环东路 11 号北京中医药大学中医学院中医诊断系 83 号信箱,邮编:100029, Tel: (010)64286656, E-mail: chenjx@bucm.edu.cn

立抑郁症大鼠模型,观察抑郁症大鼠海马自噬标志蛋白 Belin-1、LC3 的表达变化以及中药复方逍遥散对其的调节作用,探讨慢性束缚应激抑郁症大鼠海马相关自噬蛋白表达变化,为揭示抑郁症的发病机制及逍遥散的治疗机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 20 只,4 周龄,体质量(170 ± 20)g。购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号:SCXK(京)2012-0001,实验在北京中医药大学屏障环境动物实验室进行[SYXK(京)2011-0024]。

1.1.2 试剂与仪器 试剂:PBS 溶液(Solarbio),4%多聚甲醛溶液(0.1 μmol/L 的 PBS 溶液配制,pH 为 7.4),Anti-Belin 1 antibody ab62557, Anti-LC3A/B anti body ab58610(abcam);抗体稀释液(北京中杉金桥生物技术有限公司);羊抗兔二抗工作液(北京中杉金桥生物技术有限公司);二甲苯(北京化工厂),无水乙醇(北京化工厂)。

仪器:大鼠束缚架:自制 T 型束缚台:底座宽 10 cm、长 20 cm、厚 2.8 cm,上端束缚台长 22 cm,最宽处 6.6 cm,前端有固定头部的小架和适合四肢放置的凹槽,上端束缚台有两条可调节的粘贴软带。显微镜 Nikon E200(Nikon,Japan),正置智能型显微镜及采集系统(奥林巴斯(中国)有限公司)

1.2 方法

1.2.1 动物与分组 大鼠均在 SPF 级动物实验室饲养。适应性饲养 1 周后,按照体重随机分为 4 组:正常组、模型组、逍遥散组、氟西汀组,每组 5 只。

1.2.2 药物制备 实验所用逍遥散源于《太平惠民和剂局方》,按照原方比例购买柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、炙甘草、薄荷、生姜共 4 200 g 原药材。上述药材均购于北京同仁堂有限公司。严格按照制备工艺制成逍遥散干浸膏备用,使用时用生理盐水按照所需浓度进行配制。盐酸氟西汀胶囊(生产厂:Patheon France;分包装厂:礼来苏州制药有限公司;批号:0955A),规格 20 mg/粒(成人用量为 20 mg/d),给药时按大鼠用量进行换算。

1.2.3 模型制备 抑郁症大鼠模型的建立采用本课题所建立的稳定的 21 d 慢性束缚应激方法,即将模型组、逍遥散组及氟西汀组大鼠每日在随机时间点进行束缚,每次 3 h,连续束缚 21 d,正常组不进行束缚,仅在相同的时间段内禁食禁水。

1.2.4 药物干预 在慢性束缚应激造模开始后,逍

遥散组大鼠每日灌服逍遥散,氟西汀组每日灌服盐酸氟西汀,按人体用药大鼠等效剂量换算后作为大鼠用药量^[9]。大鼠用逍遥散的量 = 6.17(系数) × 生药/60 kg(一般成人体质量) × 药物提取率(实际干粉量/实际生药量),计算得出本实验中逍遥散组大鼠的给药量为 3.854 g/(kg · d),1 次/d,给药体积为 1 mL/100 g 体质量。氟西汀组大鼠给药量为。模型组与正常组大鼠灌服等量生理盐水作为对照。

1.2.5 免疫组化检测 各组大鼠在 21 d 束缚结束之后,随机选取 5 只用 4%多聚甲醛灌注固定后制备大脑石蜡切片。切片脱蜡、水化后,滴加 3% H₂O₂ 去离子水室温静置 10 min 阻断内源性过氧化物酶,用 PBS 溶液冲洗 2 min × 3 次,进行抗原修复后 PBS 溶液浸泡 3 min × 3 次,室温下用羊血清孵育 30 min。滴加一抗 50 μL 4 ℃ 过夜,室温复温 1 h 后用 PBS 溶液冲洗 3 min × 3 次;滴加二抗 50 μL,室温孵育 10 min,PBS 溶液冲洗 3 min × 3 次。在显微镜下滴加 DAB 工作液显色,镜检控制直至显色满意后流水冲洗终止显色反应。将切片置于苏木素中复染,常规脱水透明后封片。每只动物选取 3 张切片,每张切片随机选取 3 个视野进行观察。计数每个视野有棕黄色颗粒的阳性细胞,取其均值进行统计分析。

1.3 统计学方法 数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。运用 SPSS 20.0 软件,对数据做正态性检验和方差齐性检验,两项均符合,采用单因素方差分析(One-Way,ANOVA)进行统计计算。若数据不正态或方差不齐,则采用 K 个独立样本的非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠海马 CA3 区 Beclin-1 表达情况 实验结果表明,除正常组外其他 3 组均可见 Beclin-1 在大鼠海马 CA3 区有明显阳性表达,正常组有少量表达。与正常组相比,其他 3 组大鼠海马 CA3 区 Beclin-1 表达增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组相比,逍遥散组与氟西汀组表达量有减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。具体见表 1、图 1。

表 1 大鼠海马 CA3 区 Beclin1 阳性表达情况

组别	Beclin 1($\bar{x} \pm s$)
正常组	10.67 ± 1.16
逍遥散组	21.17 ± 1.47 * [△]
模型组	27.60 ± 1.51 *
氟西汀组	22.50 ± 1.87 * [△]

注:与正常组相比,* $P < 0.05$,与模型组相比,[△] $P < 0.05$ 。

2.2 大鼠海马 CA3 区 LC3 表达情况 实验结果表

明,除正常组外其他 3 组均可见 LC3 在大鼠海马 CA3 区有阳性细胞表达,正常组有少量表达。与正常组相比,其他 3 组大鼠海马 CA3 区 LC3 表达增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组相比,逍遥散组与氟西汀组表达量有减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2、图 2。

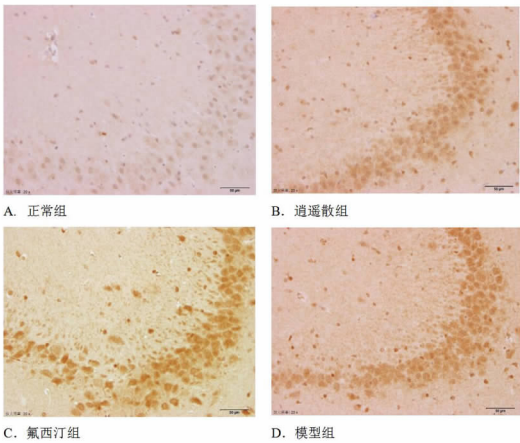


图 1 大鼠海马 CA3 区 Beclin1 免疫组化结果(×400)

表 2 大鼠海马 CA3 区 LC3 阳性细胞数的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	LC3A/B 阳性细胞数($\bar{x} \pm s$)
正常组	10.25 ± 1.26
逍遥散组	19.45 ± 1.71 * Δ
模型组	28.67 ± 1.67 *
氟西汀组	19.06 ± 1.61 * Δ

注:与正常组相比,* $P < 0.05$,与模型组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

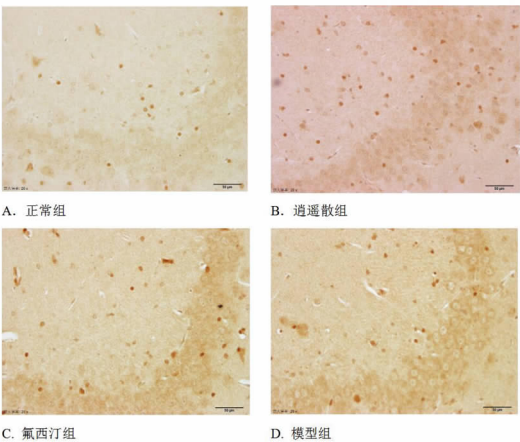


图 2 大鼠海马 CA3 区 LC3A/B 免疫组化结果(×400)

3 讨论

正常细胞的生长发育需要一个对蛋白质合成和降解之间的平衡进行调节的过程,真核细胞具有 2 种主要的降解途径:泛素蛋白酶体途径和自噬(Autophagy)途径。自噬可分为大自噬(Macroautophagy)、小自噬(Microautophagy)、分子伴侣介导的自噬(Chaperon-mediated Autophagy,CMA)等类型^[11]。不同类型的自噬其发生过程不同,参与的蛋白分子

也不同,Belin-1、LC3 是自噬过程中 2 种常见的自噬体标志物^[6]。Beclin 1 是酵母自噬相关基因 Atg6/Vps30 的哺乳动物同源基因,是首个被鉴定的介导哺乳动物自噬的基因,其最主要的作用在于调控自噬体膜的合成^[12]。LC3 参与了自噬体膜的形成,包括 2 种可相互转化的形式即 LC3-I 和 LC3-II。细胞内新合成的 LC3 经过加工,成为胞质可溶形式的 LC3-I,后者经泛素化加工修饰,与自噬体膜表面的 PE 结合,成为膜结合形式的 LC3-II。LC3-II 定位于前自噬体和自噬体,是自噬体的标志分子,随自噬体膜的增多而增加^[13]。MAP1LC3A、MAP1LC3B、MAP1LC3C 是大鼠 Map1LC3 的 3 种亚型,这 3 种亚型在不同的人类组织中存在不同的表达模式,研究表明 MAP1LC3 的 3 种亚型在翻译后修饰中存在差异^[14]。针对抑郁症发病机制的相关研究表明抑郁症患者存在海马神经元凋亡的情况,自噬能对应激状态下的神经元起到保护作用,实验研究表明在化学诱导的长期抑郁症细胞模型中存在 LC3-II 这一自噬标志物的上调^[15]。抗抑郁药阿米替林(AMI)和选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂西酞普兰(CIT)能增加自噬标志物 LC3-II 和 Beclin1 在抑郁症患者体内的表达^[16]。

已有文献报道证明发生抑郁症时海马神经元接受的应激能导致自噬发生^[17],且氟西汀能下调慢性不可预知应激(CUMS)抑郁大鼠细胞自噬关键基因 Beclin1 和 LC3 的 mRNA 及蛋白表达^[18]。提示自噬现象与抑郁症的发生关系紧密在本实验中,通过慢性束缚应激造模方法建立抑郁症大鼠模型,采用氟西汀作为阳性对照药验证抑郁症模型。在成功建立慢性束缚应激抑郁症大鼠模型后,采用逍遥散干预。实验结果证明在慢性束缚应激抑郁症大鼠海马 CA3 区 2 个自噬标志蛋白 Beclin-1、LC3 表达均较正常组明显增多,说明在抑郁症大鼠海马存在自噬现象,提示自噬可能是抑郁症的发病机制之一,且 Beclin1 和 LC3 在其海马自噬中发挥作用。在课题组前期研究已发现中药传统方剂逍遥散对于抑郁症有较好的治疗效果,试验中采用逍遥散干预治疗之后发现逍遥散能下调慢性束缚应激抑郁症大鼠海马 CA3 区 Beclin-1 和 LC3 的表达,提示逍遥散治疗抑郁症的机制可能是通过调节 2 个自噬标志蛋白从而抑制自噬现象。然而本实验仍有不足之处,未通过电镜观察海马神经元超微结构改变直观地观察模型大鼠海马部位的神经元凋亡以及自噬现象。同时在本实验基础上运用 RT-PCT 及 Western Blotting 测定海马 Be-

lin-1、LC3 基因及蛋白表达变化情况能更清晰地从多角度多层次说明自噬相关蛋白 Belin-1、LC3 在慢性束缚应激抑郁症大鼠海马中的变化,从而揭示其与自噬在抑郁症发病机制中的作用。希望在今后的工作中能进一步完善研究。

参考文献

[1] Amico F, Meisenzahl E, Koutsouleris N, et al. Structural MRI correlates for vulnerability and resilience to major depressive disorder[J]. J Psychiatry Neurosci, 2011, 36(1): 15-22.

[2] A Neumeister, S Wood, O Bonne, et al. Reduced hippocampal volume in unmedicated, remitted patients with major depression versus control subjects[J]. Biol Psychiatry, 2005, 57(8): 935-937.

[3] Villanueva, R. Neurobiology of major depressive disorder[J]. Neural Plast, 2013, 2013: 873278.

[4] Ahdidan, J, LB Hviid, MM Chakravarty, et al. Longitudinal MR study of brain structure and hippocampus volume in major depressive disorder[J]. Acta Psychiatr Scand, 2011, 123(3): 211-219.

[5] Mizushima N. and M. Komatsu, Autophagy: renovation of cells and tissues[J]. Cell, 2011, 147(4): 728-741.

[6] 朱琪, 林芳. 自噬的分子标志物[J]. 药科学报, 2016(1): 33-38.

[7] Matsunaga K1, Saitoh T, Tabata K, et al. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages[J]. Nat Cell Biol, 2009, 11(4): 385-396.

[8] Liang Y., XL Guo, JX Chen, et al. Effects of the chinese traditional prescription xiaoyaosan decoction on chronic immobilization stress-induced changes in behavior and ultrastructure in rat hippocampus[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 984797.

[9] Zhou Y., L Lu, Z Li, et al. Antidepressant-like effects of the fractions

of Xiaoyaosan on rat model of chronic unpredictable mild stress[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 137(1): 236-244.

[10] 岳利峰, 丁杰, 陈家旭, 等. 肝郁脾虚证大鼠模型的建立与评价[J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(6): 396-400.

[11] Yorimitsu, T. and D. J. Klionsky. Autophagy: molecular machinery for self-eating[J]. Cell Death Differ, 2005, 12(Suppl 2): 1542-1552.

[12] 张雨晴, 张丽慧, 魏尔清, 等. Beclin 1 在凋亡和自噬中的调节作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2015, 31(4): 331-338.

[13] Dancourt, J., T. J. Melia. Lipidation of the autophagy proteins LC3 and GABARAP is a membrane-curvature dependent process[J]. Autophagy, 2014, 10(8): 1470-1471.

[14] H He, Y Dang, F Dai, et al. Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B [J]. J Biol Chem, 2003, 278(31): 29278-29287.

[15] Jia, J., Le W. Molecular network of neuronal autophagy in the pathophysiology and treatment of depression[J]. Neurosci Bull, 2015, 31(4): 427-434.

[16] J Zschocke, N Zimmermann, B Berning, et al. Antidepressant drugs diversely affect autophagy pathways in astrocytes and neurons——dissociation from cholesterol homeostasis[J]. Neuropsychopharmacology, 2011, 36(8): 1754-1768.

[17] M Shehata, H Matsumura, R Okubo-Suzuki, et al. Neuronal stimulation induces autophagy in hippocampal neurons that is involved in AMPA receptor degradation after chemical long-term depression[J]. J Neurosci, 2012, 32(30): 10413-10422.

[18] 沈忠飞, 王志坚, 潘巍巍, 等. 氟西汀调控 CUMS 抑郁大鼠海马突触重塑[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(9): 1642-1647.

(2017-02-20 收稿 责任编辑: 洪志强)

(上接第 508 页)

肝郁脾虚证的生物学基础及逍遥散防治肝郁脾虚证及抗慢性应激的作用机制。

参考文献

[1] 陈玉龙, 尹素改, 陈蔚文. 中医药研究应用基因芯片技术相关文献分析[J]. 中医学报, 2010, 9(5): 1023-1025.

[2] 嵇波, 陈家旭, 鲁兆麟. 对逍遥散临床应用的思考[J]. 北京中医药大学学报, 2001, 24(5): 4-7.

[3] 俞芹. 临床应用逍遥散的体会[J]. 世界中医药, 2009, 4(1): 40-41.

[4] 王恺. 逍遥散合温胆汤加减治疗心脏神经官能症 60 例[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 194-195.

[5] 张海男, 胡随瑜, 陈泽奇, 等. 抑郁症常见中医证候类型第一轮专家问卷分析[J]. 湖南医科大学学报, 2002, 27(6): 519-521.

[6] 唐启盛, 曲淼, 包祖晓, 等. 抑郁症中医证候规律及诊疗标准制定的研究[J]. 北京中医药大学学报, 2011, 2(34): 77-81.

[7] 尹冬青. 抑郁症中医证候分型诊断量表及证候特征研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.

[8] 邓中甲. 方剂学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 85.

[9] Adrian Alexa and Jorg Rahnenfuhrer (2010). topGO: topGO: Enrichment analysis for Gene Ontology[Z]. R package version 2.8.0.

[10] 向铮, 王贤亲, 刘婷, 等. 基于网络生物学方法的中药药理作用机制研究思考与探索[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2): 146-151.

[11] 管艳, 张辉, 张玮, 等. 慢性乙型病毒性肝炎肝肾阴虚证与湿热蕴结证患者外周血的差异基因表达谱分析[J]. 中西医结合学报, 2012, 10(7): 751-756.

[12] 罗和古, 丁杰, 岳广欣, 等. 大鼠肝郁脾虚证的代谢组学研究[J]. 中西医结合学报, 2007, 5(3): 307-313.

[13] 苏式兵, 胡义扬, 赵立平, 等. 慢性乙型病毒性肝炎中医证候生物学基础的研究思路[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(2): 252-255.

[14] Wang Z, Du Q, Wang F, et al. Microarray analysis of gene expression on herbal glycoside recipes improving deficient ability of spatial learning memory in ischemic mice[J]. J Neurochem, 2004, 88(6): 1406-1415.

(2017-02-20 收稿 责任编辑: 洪志强)