

## 实验研究

# 抑郁症大鼠海马-杏仁核 pMAP-2 表达改变及人参皂苷 Rb1 的干预作用

刘继刚<sup>1</sup>, 袁杨<sup>2</sup>, 臧蔚<sup>2</sup>, 刘昊<sup>2△</sup>

**摘要:**目的 观察人参皂苷 Rb1 对抑郁大鼠海马-杏仁核组织磷酸化微管相关蛋白-2(pMAP-2)的影响。方法 将 30 只健康 SPF 级成年雄性 Wistar 大鼠随机均分为对照组、模型组和治疗组。采用慢性不可预见性温和应激(CUMS)结合孤养建立抑郁症大鼠模型(模型组),治疗组在造模的同时灌胃给予人参皂苷 Rb1(药液含原生药 1 g/mL,剂量 1 mL/100 g 体质量,1 次/d);对照组除每天抓取 1 次外,不作其他处理,持续 22 d。采用 Western blot 法检测海马、杏仁核组织微管相关蛋白-2(MAP-2)及 pMAP-2 蛋白表达,Real-time PCR 检测 pMAP-2 mRNA 表达。结果 模型组大鼠海马和杏仁核组织 pMAP-2 蛋白和 mRNA 表达水平以及 pMAP-2/MAP-2 比值均明显低于对照组(均  $P < 0.05$ ),治疗组 pMAP-2 蛋白和 mRNA 表达水平以及 pMAP-2/MAP-2 比值较模型组明显升高,但仍低于对照组(均  $P < 0.05$ )。结论 人参皂苷 Rb1 可能通过抑制 MAP-2 磷酸化水平来发挥抗抑郁作用。

**关键词:**人参皂苷;抑郁症;海马;杏仁核;微管相关蛋白;磷酸化微管相关蛋白-2

中图分类号:R285.5 文献标志码:A DOI:10.11958/20150266

## The change of phosphorylated MAP-2 in hippocampus/amygdala and the influence of ginsenoside Rb1 on it in depressive rat model

LIU Jigang<sup>1</sup>, YUAN Yang<sup>2</sup>, ZANG Yu<sup>2</sup>, LIU Hao<sup>2△</sup>

<sup>1</sup> Department of Stomatology, Zunhua People's Hospital, Zunhua 064200;

<sup>2</sup> Department of Neurology, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology

<sup>△</sup>Corresponding Author E-mail:liuhao938@163.com

**Abstract: Objective** To observe effects of ginsenoside Rb1 on phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (pMAP-2) in hippocampus and amygdala of depressive model rats. **Methods** Thirty male Wistar rats were randomly divided into control group, model group and treatment group. The depression rat model was produced by giving chronic unpredicted mild stress (CUMS). Treatment group was given daily intragastric administration of ginsenoside RB1 (1 g/mL crude drug, 1 mL/100 g body weight) for 22 days during modeling. Western blot assay was used to detect expressions of MAP-2 and pMAP-2 protein, and real-time PCR was used to detect expressions of pMAP-2 mRNA respectively. **Results** The expressions of pMAP-2 protein and mRNA in hippocampus and amygdala were significantly lower in model group than those of control group ( $P < 0.05$ ). The expressions of pMAP-2 protein and mRNA were significantly higher in treatment group than those of model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Ginsenoside Rb1 can play anti-depression role by inhibiting the phosphorylation of MAP-2 in rats.

**Key words:** Ginsenoside; depressive disorder; hippocampus; amygdala; microtubule-associated proteins; pMAP-2

随着生活压力增大和应激事件的不断增多,抑郁症(depression)等精神性疾病的发病率呈现增高趋势<sup>[1]</sup>。反复的应激是导致抑郁症发生的根本原因,但抑郁症的具体发病机制尚未明确。研究发现,抑郁症患者海马、杏仁核等部位存在体积缩小的现象<sup>[2-3]</sup>,这可能与这些部位细胞骨架相关蛋白磷酸化有关<sup>[4]</sup>。人参是我国传统名贵药材,具有补

气、安神、生津、益智等作用。研究表明,人参皂苷(Ginsenoside)活性成分 Rb1 具有明显的抗抑郁作用<sup>[5-6]</sup>,但其具体作用机制尚未明确。本研究通过建立应激性抑郁症大鼠模型,观察人参皂苷 Rb1 对大鼠海马、杏仁核磷酸化微管相关蛋白-2(pMAP-2)的影响,以探讨人参皂苷 Rb1 抗抑郁症的可能机制。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81201048)

作者单位:1 遵化市人民医院口腔科(邮编 064200);2 华北理工大学附属医院神经内科

作者简介:刘继刚(1962),男,主治医师,主要从事应激性疾病发生机制研究

<sup>△</sup>通讯作者 E-mail:liuhao938@163.com

## 1 材料与方法

**1.1 动物与试剂** 健康 SPF 级成年雄性 Wistar 大鼠 30 只, 体质量 180~210 g, 实验动物合格证号: SCXK 京 2009-0004, 由华北理工大学实验动物中心提供。适应性饲养 1 周后用于实验。兔微管相关蛋白-2 (MAP-2) 多克隆抗体和兔 pMAP-2 多克隆抗体购自 Santz Cruz 公司, Western blot 相关试剂购自武汉博士德生物工程有限公司, Real-time PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司。人参皂苷 Rb1 购自中国药品生物制品检定所。其他试剂为国产分析纯。

**1.2 实验分组和抑郁症模型的建立** 适应性饲养结束后, 采用随机数字表法将大鼠分为对照组、模型组和治疗组, 每组 10 只。采用慢性不可预见性温和应激 (CUMS) 结合孤养的方法建立抑郁症模型大鼠, 应激包括夹尾 1 min、黑白颠倒、天敌声音 3 min、冰水强迫游泳 15 min、热水强迫游泳 15 min、潮湿垫料、鼠笼倾斜等 11 种。每天给予 1 种应激, 造模共持续 22 d, 具体方法参见文献[3]。治疗组大鼠在造模同时通过灌胃给予人参皂苷 Rb1, 每日 1 次 (药液含原生药 1 g/mL, 剂量: 1 mL/100 g 体质量)。对照组除每天抓取 1 次外, 不作其他处理。

**1.3 Western blot 检测海马、杏仁核 MAP-2 和 pMAP-2 蛋白表达** 每组各取 5 只大鼠, 麻醉后断头取脑, 冰上快速分离海马和杏仁核, 加适量 RIPA 裂解液完全裂解后, 4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。考马斯亮蓝法测定蛋白浓度, 按照 40 μg 蛋白量上样, 进行 10% SDS-PAGE 电泳, 2 h 后 PVDF 膜电转印 (180 mA, 1.5 h), 5% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h, PBST 漂洗后, 加 MAP-2 一抗 (1:500), 4 ℃ 孵育过夜, 加辣根过氧化物酶标记的二抗 IgG (1:2 000) 37 ℃ 孵育 1 h, ECL 显色。同上述方法进行 pMAP-2 和内参照 β-actin 的 Western blot 分析。以目的条带与内参照的光密度比值表示蛋白表达。

**1.4 Real-time PCR 检测 pMAP-2 mRNA 表达** 每组各取 5 只大鼠, 麻醉后断头取脑, 在冰上快速分离海马和杏仁核组织, 提取总 RNA。定量后取 1 μg RNA, 按照试剂盒说明书进行反转录和 PCR 扩增。引物序列: 正义 5'-TGGCTTTCTCATCTCCATCC-3', 反义 5'-CTCACTGCCCCAT TAGTGC-3', 产物大小 357 bp。PCR 扩增条件: 94 ℃ 4 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 25 s, 35 个循环; 72 ℃ 10 min。按照公式  $\Delta Ct = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{管家基因})$ 、 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{实验组}) - \Delta Ct(\text{对照组})$  计算  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (pMAP-2 mRNA 水平)。

**1.5 统计学方法** 应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 计量

资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD-*t* 检验, 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 海马、杏仁核组织中 MAP-2 和 pMAP-2 蛋白表达水平** 模型组海马和杏仁核组织 pMAP-2 蛋白和 pMAP-2/MAP-2 比值均明显低于对照组, 治疗组较模型组升高, 但仍低于对照组 (均  $P < 0.05$ ), 见图 1、表 1。

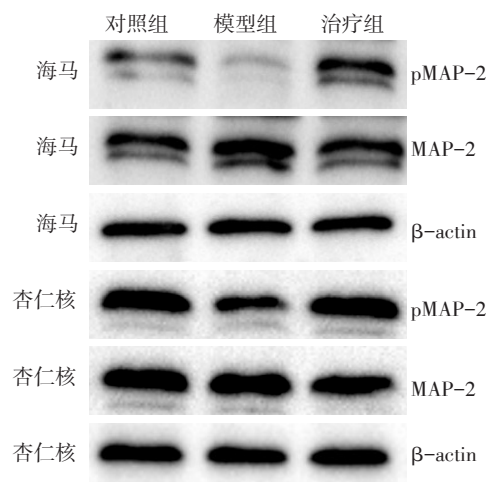


Fig.1 Expressions of pMAP-2 and MAP-2 protein detected by Western blot assay

图 1 Western blot 检测海马和杏仁核 MAP-2、pMAP-2 蛋白表达

**2.2 大鼠海马、杏仁核组织中 pMAP-2 mRNA 的表达** 模型组大鼠海马和杏仁核 pMAP-2 mRNA 相对表达量均明显低于对照组, 治疗组较模型组升高, 但仍低于对照组 (均  $P < 0.05$ ), 见表 2。

## 3 讨论

抑郁症发病机制及治疗研究成为当前研究的热点内容<sup>[7]</sup>。由于受到伦理学限制, 对抑郁症的基础研究往往通过建立抑郁症动物模型进行, CUMS 能模仿人类生活中遭遇的各种应激。研究表明, CUMS 应激大鼠能较好地表现出抑郁症的核心临床症状, 是被普遍接受的抑郁症大鼠模型<sup>[8]</sup>。有学者对抑郁

Tab. 1 Comparison of MAP-2 and pMAP-2 protein expressions in three groups

表 1 3 组大鼠海马、杏仁核组织 MAP-2 和 pMAP-2 蛋白表达水平比较

( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

组别	pMAP-2		MAP-2		pMAP-2/MAP-2	
	海马	杏仁核	海马	杏仁核	海马	杏仁核
对照组	0.94±0.11	1.17±0.09	1.05±0.12	1.12±0.15	0.90±0.11	1.04±0.10
模型组	0.18±0.02 <sup>a</sup>	0.62±0.07 <sup>a</sup>	1.18±0.20 <sup>a</sup>	1.02±0.12 <sup>a</sup>	0.15±0.03 <sup>a</sup>	0.61±0.04 <sup>a</sup>
治疗组	0.43±0.05 <sup>ab</sup>	1.01±0.06 <sup>ab</sup>	0.71±0.08 <sup>ab</sup>	1.03±0.08 <sup>a</sup>	0.61±0.04 <sup>ab</sup>	0.98±0.09 <sup>ab</sup>
<i>F</i>	7.68 <sup>*</sup>	11.35 <sup>*</sup>	8.77 <sup>*</sup>	6.49 <sup>*</sup>	14.92 <sup>*</sup>	8.53 <sup>*</sup>

\* $P < 0.05$ ; <sup>a</sup>与对照组比较, <sup>b</sup>与模型组比较,  $P < 0.05$

Tab. 2 Result of pMAP-2 mRNA expressions in three groups

表 2 3 组大鼠海马、杏仁核组织 pMAP-2 mRNA

表达水平比较 ( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

组别	海马	杏仁核
对照组	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	0.38±0.04 <sup>a</sup>	0.27±0.05 <sup>a</sup>
治疗组	0.75±0.11 <sup>ab</sup>	0.50±0.04 <sup>ab</sup>
<i>F</i>	9.57 <sup>**</sup>	7.29 <sup>*</sup>

\* $P < 0.05$ ; <sup>a</sup>与对照组比较, <sup>b</sup>与模型组比较,  $P < 0.05$ 

症患者海马等部位体积减少原因进行研究,结果表明这可能与这些部位神经凋亡增强以及神经细胞骨架蛋白改变有关<sup>[4,9-10]</sup>。微管相关蛋白(microtubule-associated proteins, MAPs)特别是 MAP-2 能调节微管的聚合状态,在维持神经元形态和突触可塑性方面起主要作用<sup>[11]</sup>。本课题组既往研究表明,抑郁症大鼠 pMAP-2 出现先降低后增高的现象<sup>[9]</sup>。本研究结果表明,抑郁症大鼠海马和杏仁核组织中的 pMAP-2 表达均较对照组显著降低,可以推测在抑郁症发病过程中,MAP-2 的磷酸化是引起抑郁症患者海马、杏仁核体积缩小的一个重要因素。

祖国传统医学对抑郁症有独到认识。中医认为,抑郁症是情志不舒,肝气郁结,渐致五脏不和、化火、生痰、瘀阻、耗气、伤阴等而致,多采用疏肝理气法对其进行治疗<sup>[12]</sup>。人参是一味名贵中药,具有补气、安神、生津、益智等作用。有研究表明,人参的活性成分人参皂苷 Rb1 具有明显的抗抑郁作用<sup>[5-6]</sup>;孙秀萍等<sup>[13]</sup>研究亦表明,人参总皂苷能明显减轻抑郁小鼠行为学症状,但其抗抑郁的具体作用机制仍不清楚。本研究结果表明,对抑郁症模型大鼠给予人参皂苷 Rb1 干预后,大鼠海马和杏仁核组织 pMAP-2 蛋白和 mRNA 相对表达量均明显升高,提示人参皂苷 Rb1 可能通过抑制 MAP-2 磷酸化发挥抗抑郁作用,其具体机制有待于进一步深入研究。

#### 参考文献

- [1] Wu ZQ, Wang J, Li ZL, et al. An investigation of mental health status for college students[J]. J Psychiatry, 2015, 28(6): 413-416. [吴震卿, 王菊, 李稚林, 等. 在校大学生精神卫生现状研究[J]. 精神医学杂志, 2015, 28(6): 413-416]. doi: 10.3969/j.issn.2095-9346.2015.06.004.
- [2] Colle R, Chupin M, Cury C, et al. Depressed suicide attempters have smaller hippocampus than depressed patients without suicide attempts[J]. J Psychiatr Res, 2015, 61(1): 13-18. doi: 10.1016/j.jpsychires.2014.12.010.
- [3] Wijeratne C, Sachdev S, Wen W, et al. Hippocampal and amygdala volume in an older bipolar disorder sample[J]. Int Psychogeriatr,

2013, 25(1): 54-60. doi: 10.1017/S1041610212001469.

- [4] Sui ZX. The Research of structural changes and mechanism on hippocampal neurons of the depression rats [D]. Hebei: North China University of Science and Technology, 2015. [隋竹欣. 抑郁大鼠海马神经元结构改变及机制研究[D]. 河北: 华北理工大学, 2015].
- [5] Huang Q, Chu SF, Zhang JT, et al. Effects of Ginsenoside Rg1 on anti-depression and synaptic ultrastructure [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2013, 29(8): 1124-1127. [黄倩, 楚世峰, 张均田, 等. 人参皂苷 Rg1 的抗抑郁作用及对突触超微结构的影响[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(8): 1124-1127]. doi: 10.3969/j.issn.1001-1978.2013.08.019.
- [6] Liu H, Xu AJ, Qin LJ, et al. Influence of ginsenoside Rb1 on 5-HT level and expression of 5-HT1A receptor in hippocampus of depressive rats [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2014, 25(11): 2565-2567. [刘昊, 徐爱军, 秦丽娟, 等. 人参皂苷 Rb1 对抑郁症大鼠海马 5-HT 及 5-HT1A 受体表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(11): 2565-2567]. doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2014.11.001.
- [7] Duman RS, Kehne JH. Depression [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2007, 6(2): 85-86.
- [8] Li Q, Yang D, Wang J, et al. Reduced amount of olfactory receptor neurons in the rat model of depression [J]. Neurosci Lett, 2015, 603(1): 48-54. doi: 10.1016/j.neulet.2015.07.007.
- [9] Sui ZX, Li Z, Liu H, et al. Investigation on the expression of microtubule-associated protein pMAP-2 and p-Tau in the hippocampus of rats with depression [J]. Chinese Journal of Neuroanatomy, 2015, 31(2): 175-180. [隋竹欣, 李珍, 刘昊, 等. 抑郁大鼠海马微管相关蛋白 pMAP-2 和 p-Tau 表达的研究[J]. 神经解剖学杂志, 2015, 31(2): 175-180]. doi: 10.11670/1000-7547.201502009.
- [10] Tian YX, Wang HT, Li R, et al. Increased apoptosis in amygdala neurons of depression model rats [J]. Basic & Clinical Medicine, 2011, 31(8): 879-883. [田艳霞, 王海涛, 李冉, 等. 抑郁模型大鼠杏仁核神经元凋亡增加[J]. 基础医学与临床, 2011, 31(8): 879-883].
- [11] Pereno GL, Beltramino CA. Timed changes of synaptic zinc, synaptophysin and MAP2 in medial extended amygdala of epileptic animals are suggestive of reactive neuroplasticity [J]. Brain Res, 2010, 1328(1): 130-138. doi: 10.1016/j.brainres.2010.01.087.
- [12] Zhou QY, Liu HY. Study of Chinese medicine treat depression [J]. Journal of Changchun University of Traditional Chinese Medicine, 2013, 29(1): 88-89. [周庆莹, 刘宏岩. 中医治疗抑郁症研究[J]. 长春中医药大学学报, 2013, 29(1): 88-89].
- [13] Sun XP, Li TF, Shi Z, et al. Study of antidepressant-like effects of combination of ginseng total saponins and polygala tenuifolia total glycosides in mice [J]. Chin J Comp Med, 2012, 22(6): 30-36. [孙秀萍, 李腾飞, 石哲, 等. 人参总皂苷和远志总苷配伍对小鼠抗抑郁作用[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(6): 30-36]. doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.06.008.

(2015-11-04 收稿 2016-03-18 修回)

(本文编辑 陈丽洁)