

温胆汤含药血清抗神经元损伤机制的初步研究

陈诗少 兰 想 袁昱微 何国珍 黎明星 (通讯作者)

广西中医药大学 广西 南宁 530200

【摘要】：目的：探讨温胆汤含药血清抗皮质酮损伤 HT22 细胞的分子机制。方法：选 50 只 SD 大鼠，随机分为对照组和温胆汤低、中、高剂量组，制备相应血清。以皮质酮损伤 HT22 细胞为模型，与血清共培养 24h 后，CCK-8、Western blot 和 Q-PCR 分别检测细胞活力、BDNF 蛋白和 mRNA 的表达水平。结果：模型组（皮质酮损伤组）细胞活力、BDNF 的蛋白和 mRNA 表达水平较正常组明显下降；温胆汤含药血清中剂量组细胞活力、BDNF mRNA 表达水平、各剂量组 BDNF 蛋白表达水平较模型组显著上升。结论：温胆汤含药血清具有抗皮质酮损伤神经元的作用，其机制可能是通过调控 BDNF 的表达来实现。

【关键词】：温胆汤含药血清；HT22 细胞；BDNF

DOI:10.12417/2811-051X.26.05.007

抑郁症是一种情绪障碍类疾病，日益成为全国残疾、自杀和疾病负担增长的主要原因^[1]。现有的抗抑郁治疗存在复发率高等不足^[2]。中医药可辨证论治，在抑郁症治疗中独具优势，近年来已成为抗抑郁研究的热点。

神经营养因子可通过调节神经发生和突触功能，参与治疗抑郁症的过程，而脑源性神经营养因子（BDNF）作为中枢神经系统中含量最丰富的神经营养因子之一，是调节神经元生长与突触功能的重要因子^[3]。

抑郁症属中医“郁证”范畴，以肝郁气滞为核心病机，但痰浊在抑郁症的发病中也占有重要地位^[4]。温胆汤可清热化痰、理气燥湿，温和胆腑少阳之气，有助于恢复全身脏气清灵，使阴气与痰浊形成的抑郁感随之消失^[5]，改善抑郁症，但具体的机制尚不明确。因此，本研究旨在探讨 BDNF 在温胆汤含药血清抗神经元损伤过程中的变化，为抗抑郁中药的机制研究提供实验依据。

1 材料

50 只 SPF 级的 SD 大鼠，7 周龄，雄性，购买自南宁市研成生物科技有限公司，动物许可证：SCXK（京）2019-0010。本实验由广西中医药大学实验动物福利伦理委员会批准（批准号 DW20220513-040）。皮质酮（阿拉丁）、DMEM 高糖培养基（赛默飞世尔科技公司）、胎牛血清 FBS（伟博鑫生物科技有限公司）、0.25%胰蛋白酶（赛默飞世尔科技公司）、青链霉素双抗混合液（赛默飞世尔科技公司）。

2 方法

2.1 温胆汤含药血清的制备

选取 50 只 SPF 级雄性 SD 大鼠，随机分为 4 组：空白组

（n=20）和温胆汤低、中、高剂量组（每组 n=10）。适应一周后给药。空白组给予 20 mg/mL，0.9%氯化钠溶液；含药血清组给予不同浓度的温胆汤水提物（低剂量组 31.5 mg/mL，中剂量组 63 mg/mL，高剂量组 126 mg/mL）。所有灌胃操作均按 1 mL/100 g 体重的标准进行，每日 1 次，连续灌胃 8 天。末次给药后麻醉大鼠，腹主动脉取血，进行两步离心处理：初级离心：3000rpm，10 min（室温），分离血清；二级离心：取上清液转移至灭菌 EP 管，12000 rpm，10 min（4℃）。最终获得的血清分装于预冷 1.5 mL 离心管，标记后置于-80℃超低温冰箱保存备用。

2.2 HT22 细胞培养

HT22 细胞由广西医科大学实验室提供。完全培养基是由 DMEM 加入 10%FBS、1%青霉素（100 U/mL）和链霉素（100μg/mL）来配置，于 37℃、5%CO₂ 中培养。当细胞密度达 80%-90%时进行传代，避免细胞过度融合导致分化或凋亡。

2.3 筛选温胆汤含药血清各剂量抗皮质酮损伤 HT22 细胞的最佳剂量

细胞在 96 孔板内培养 24h 至细胞完全贴壁后，皮质酮用 DMSO 溶解成 100mM 母液后按 250 μM 的浓度加入不同剂量的温胆汤含药血清培养基中，共同培养 24h 后用 CCK-8 法检测细胞活性，筛选温胆汤抗损伤的最佳剂量。

2.4 WB 检测 HT22 细胞中 BDNF 蛋白的表达水平

6 孔板收样后，用 RIPA 裂解液裂解细胞，离心取上清液，BCA 试剂盒测定蛋白浓度，Western blotting 实验使用 Jess Simple Western System 进行。目标蛋白的表达水平评估依据制造商针对 12-230 kDa Jess 分离模块的标准方法。将蛋白裂解液

作者简介：陈诗少，男（2001 年-），汉族，广西贺州人，在读硕士，研究方向：中医药防治抑郁症。

通讯作者：黎明星，男（1986 年-），汉族，广西南宁人，博士，副教授，研究方向：中医药防治抑郁症与不孕不育。

基金项目：国家自然科学基金（82360921），广西自然科学基金（2023GXNSFAA026244），广西中医药大学大学生创新创业训练（S202510600078，S202510600113，20241060017，S202410600087，S202413643017）。

与缓冲液等试剂混合，终浓度为 $0.9\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。将标品 ($5\mu\text{L}$) 与蛋白样品 ($5\mu\text{L}$) 分别上样至样品板孔中。一抗用抗体稀释缓冲液稀释。HRP 标记的抗兔二抗按 Simple Western 试剂盒说明书操作。后续分离、免疫检测及分析步骤均由仪器自动完成。通过 Compass 软件进行定量，生成数字印迹图像。采用光密度法对目标蛋白面积进行定量分析，结果以相对于对照组的蛋白表达变化表示。

2.5 Q-PCR 检测 HT22 细胞中 BDNF 的 mRNA 的表达水平

6 孔板每孔加入 1mL Trizol 裂解细胞，收样后放入 -80°C 冰箱保存。通过 Q-PCR 法检测各组细胞中 BDNF mRNA 的表达量，相对表达量均采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 表示，引物序列(5'to3')为：BDNF-F: GGCTGACACTTTTGAGCACG; BDNF-R: CTTGACTGCTGAGCATCACC; actin-F: CTAGGCGGACTGTTACTGAGC; actin-R: ATGTTTGCTCCAACCAACTGC。

2.6 数据分析

实验数据呈正态分布，以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 GraphPad Prism 8 进行单因素方差分析、Tukey 事后检验、作图， $P<0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 HT22 细胞生长曲线

实验分别就不同生长时间的 HT22 细胞进行活力检测，由细胞生长状态折线图可知当细胞在板内生长时间为 48h 时，细胞处于对数生长期，当生长时间为 60h 时，细胞生长进入平台期，故选择细胞接种 24h 后加入药物，48h 后进行检测，HT22 细胞生长曲线见图 1。

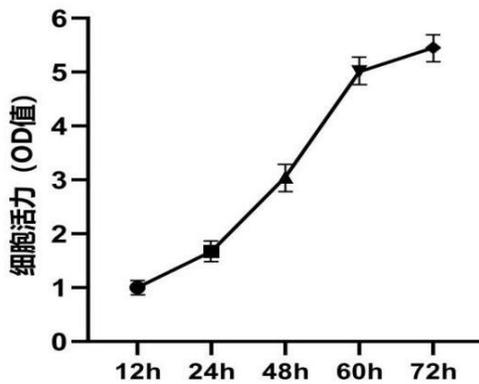


图 1 HT22 细胞生长曲线 (n=5)

3.2 温胆汤含药血清各剂量组对皮质酮诱导 HT22 细胞损伤的改善效果

与空白组比较，模型组细胞活力显著下降 ($P<0.01$)；与模型组相比，温胆汤含药血清中剂量组可显著提升细胞活力 ($P<0.05$) 见图 2。

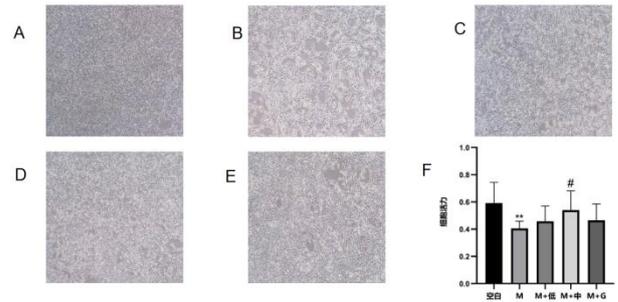


图 2 各组 HT22 细胞生长状态(n=6)

A: 空白组; B: 模型组(M); C: 模型+低剂量组(M+低); D: 模型+中剂量组(M+中); E: 模型+高剂量组(M+高); F: 细胞活力柱状图; 与空白组比较, $*P<0.05$, $**P<0.01$; 与模型组比较 $\#P<0.05$ 。

3.3 各剂量组血清对皮质酮损伤 HT22 细胞中 BDNF 蛋白表达水平的影响

如图所示，与空白组相比，模型组 BDNF 蛋白表达水平降低；与模型组相比，温胆汤含药血清各剂量组 BDNF 蛋白的表达水平提升，见图 3。

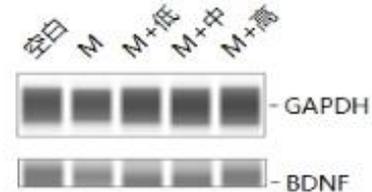


图 3 对各剂量组含药血清处理的皮质酮损伤 HT22 细胞进行 Jess 分析。检测指标包括 GAPDH、BDNF。

3.4 温胆汤含药血清各剂量组对皮质酮损伤 HT22 细胞中 BDNF 的 mRNA 表达水平的影响

与空白组相比，模型组 BDNF mRNA 表达量显著降低 ($P<0.05$)；与模型组相比，温胆汤含药血清中剂量组可显著提升 BDNF mRNA 的表达水平 ($P<0.05$)，见图 4。

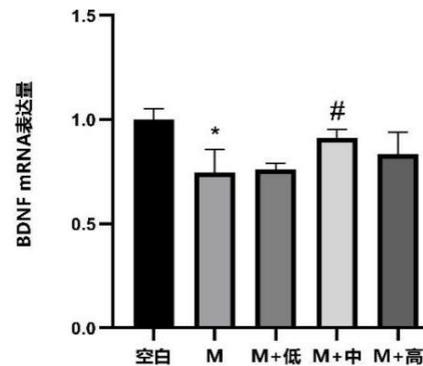


图 4 各组 HT22 细胞 BDNF 的 mRNA 表达水平的影响 (n=3)，与空白组比较, $*P<0.05$, $**P<0.01$;与模型组比较 $\#P<0.05$, $\#\#\#P<0.01$ 。

4 讨论

抑郁症在中医属“郁证”，中医病机以肝郁气滞、肝失疏泄为核心，然临床证型多变、病机复杂，虽以肝郁气滞为基础，但痰浊在抑郁症的发病中也占有重要地位^[4]。长期情绪压抑、悲伤导致肝气郁结。肝郁气滞，运化失常继而化生痰浊。研究表明，痰浊因素在抑郁症患者中属于常见因素^[6]。温胆汤出自《三因极一病证方论》，为中医经典化痰名方。温胆汤不仅能够清热化痰、理气燥湿，更能温和胆腑少阳之气，使少阳胆枢正常运行，有助于恢复全身脏气清灵，使阴气与痰浊形成的抑郁感随之消失^[5]，从而对抑郁症起到治疗效果。

皮质酮水平异常升高可导致 HPA 轴功能紊乱，诱发多种神经系统损伤^[7]，故实验采用皮质酮损伤 HT22 细胞，模拟抑郁症中神经递质失衡和炎症损伤的病理过程。HT22 细胞系是一种源自小鼠海马神经元的永生细胞系，因其易于培养和稳定性高的特点，目前被广泛应用于抑郁症及其他神经退行性疾病的研究领域^[8-9]。本研究实验结果显示温胆汤含药血清能有效改善皮质酮诱导的细胞损伤，其中中等剂量组的效果最为显

著。

神经营养因子可通过调节神经可塑性、神经发生以及突触功能，参与抑郁症抗神经元损伤的病理生理过程，因此抑郁的治疗可能通过恢复神经营养因子水平改善神经元损伤，从而治疗抑郁症^[3]。大脑功能的正常发挥依赖于大量神经元组成的神经网络之间的相互作用^[10]。研究表明，在抑郁症的发生过程中，神经营养因子 BDNF 作为神经元存活的重要中介，参与神经系统的可塑性调控，是抗神经元损伤的重要标志物^[11]。本研究以 BDNF 为切入点查看温胆汤抗神经元损伤的分子机制，实验设置了空白对照组、模型组及不同浓度温胆汤含药血清治疗组，以考察其对 BDNF 表达的影响。Western blot 和 Q-PCR 结果表明，与正常对照组相比，模型组 BDNF 表达水平显著下降；而经温胆汤含药血清处理后，中剂量组的 BDNF 的 mRNA 表达水平、各剂量组的蛋白表达均较模型组明显上调。

综上所述，温胆汤含药血清可通过上调 BDNF 的表达来改善皮质酮诱导的神经元损伤效应。

参考文献:

- [1] Hsieh CR, Qin X. Depression hurts, depression costs: The medical spending attributable to depression and depressive symptoms in China. *Health Econ*. 2018 Mar; 27(3):525-544.
- [2] Eaton WW, Shao H, Nestadt G, Lee HB, Bienvu OJ, Zandi P. Population-based study of first onset and chronicity in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2008 May; 65(5):513-20.
- [3] Zhu K Y, Xu S L, Choi C Y, et al. Kai-Xin-San, a Chinese Herbal Decoction Containing Ginseng Radix et Rhizoma, Polygalae Radix, Acori Tatarinowii Rhizoma, and Poria, Stimulates the Expression and Secretion of Neurotrophic Factors in Cultured Astrocytes[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, (2013-10-3), 2013, 2013:731385.
- [4] 门奕年, 黄珍, 于明直, 等. “怪病多痰”病机观下抑郁症与慢性疲劳综合征的相关性[J]. *世界中医药*, 2023, 18(19):2777-2780.
- [5] 文誉坤, 田苗, 陈春妹, 张福利. 温胆汤治疗抑郁症临床及实验研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2022, 24(09):114-118.
- [6] 熊霞军, 胡志希, 钟森杰, 等. 基于数据挖掘的抑郁症中医证候分布及用药规律分析[J]. *中医药导报*, 2020, 26(14):148-151.
- [7] 刘永斌, 夏利平, 裴林国, 等. 孕期尼古丁暴露所致成年子代雌鼠代谢综合征易感的宫内起源机制[J]. *中国生育健康杂志*, 2017, 28(03):205-211.
- [8] ZHANG Y, ZHANG Y, JIN X F, et al. The Role of Astragaloside IV against Cerebral Ischemic Reperfusion Injury. Suppression of Apoptosis via Promotion of P62-LC3-Autophagy[J]. *Molecules*, 2019, 24(9):1838.
- [9] ZHANG H, YE J, SHI Z, et al. Quantitative analyses of the global proteome and phosphoproteome reveal the different impacts of propofol and dexmedetomidine on HT22 cells[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:46455
- [10] REN J, CHOI H, CHUNG K, et al. Label-free volumetric optical imaging of intact murine brains[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(4):46306.
- [11] HARA Y. Brain plasticity and rehabilitation in stroke patients[J]. *J Nippon Med Sch*, 2015, 82(1):4-13.