

越鞠甘麦大枣汤增强突触可塑性产生抗抑郁样作用*

周童^{1,2}, 张海楼², 沈家敏², 王薇^{1,2**}, 薛文达^{2**}, 陈刚³

(1. 南京中医药大学 医学院·整合医学学院 南京 210023; 2. 南京中医药大学 中医学院·中西医结合学院 中医脑病重点实验室 南京 210023; 3. 暨南大学中医学院 广州 510632)

摘要:目的 研究越鞠甘麦大枣汤的抗抑郁样作用并分析其对小鼠海马突触可塑性的影响。方法 昆明小鼠随机分为对照组和越鞠甘麦大枣汤组, 给药 24 h 和 7 天后进行悬尾测试(*Tail suspension test, TST*)和强迫游泳测试(*Forced swimming test, FST*)。运用电生理(*electrophysiological experiment*)技术检测小鼠海马区 Schaffe 侧枝-CA1 的长时程增强(*long term potentiation, LTP*), 利用 western blot 方法分析海马脑区 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体(*α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor, AMPAR*)和 N-甲基-D-天冬氨酸受体(*N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR*)相关突触蛋白的表达水平。结果 给药 24 h 和 7 天后, 与对照组小鼠相比, 越鞠甘麦大枣汤给药组小鼠在 TST($P < 0.001$)和 FST($P < 0.01$)中的不动时间均明显降低, 氯胺酮在给药 24 h 后显示出抗抑郁作用, 但到第 7 天不能降低小鼠不动时间, 越鞠甘麦大枣汤显示出更持久的抗抑郁样作用。电生理实验中, 越鞠甘麦大枣汤可增强小鼠海马区的 LTP($P < 0.001$)。Western blot 结果显示, GluR1、NR2B 以及 NR1 的表达水平在给药后均明显增加($P < 0.05$)。结论 越鞠甘麦大枣汤可能通过增强昆明小鼠海马脑区 LTP, 以及增加 AMPA 和 NMDA 受体相关突触蛋白的表达水平以提高突触传递效能, 从而产生抗抑郁样作用。

关键词:越鞠甘麦大枣汤 抗抑郁 LTP AMPA 受体 NMDA 受体

doi: 10.11842/wst.20190517003 中图分类号: R277.7 文献标识码: A

抑郁症是最常见的精神疾病之一, 患有抑郁症的人处于情绪紊乱、睡眠障碍的状态^[1]。目前治疗抑郁的单胺类药物通常起效较慢, 且有大约 1/3 的病人对药物没有反应^[2]。近年来, 氯胺酮已被证明能迅速缓解抑郁症状, 然而氯胺酮具有肝毒性、神经毒性、成瘾性等副作用, 导致其临床应用范围大大减少^[3]。抑郁症许多方面与中医“郁证”中的“情志之郁”比较类似。越鞠丸和甘麦大枣汤是中医治疗“郁证”的经典方。越鞠丸出自《丹溪心法》, 为治六郁证的代表方。方中

香附行气舒肝开郁, 以治气郁; 川芎为血中之气药, 既行气开郁, 又可活血祛瘀, 以治血郁; 苍术燥湿健脾, 以治湿郁; 神曲消食和胃, 以治食郁; 栀子清热泻火, 以治火郁。甘麦大枣汤出自《金匱要略》, 方中用小麦, 取其甘凉之性, 养肝补心, 除烦安神; 甘草甘平, 补养心气, 和中缓急; 大枣甘温质润, 益气和中, 润燥缓急。采用越鞠丸合甘麦大枣汤能够行气解郁、养心安神, 疗效显著^[4]。研究显示越鞠甘麦大枣汤能够通过激活 AKT-mTOR 信号通路, 促进突触后蛋白的表达,

收稿日期: 2019-05-17

修回日期: 2019-11-28

* 国家自然科学基金委员会青年基金项目(No 81603497): 基于 ChIP-Seq 的 CREB 介导越鞠丸快速抗抑郁作用分子机制研究, 负责人: 王薇; 国家自然科学基金委青年基金项目(No 81803748): VIPR2 介导越鞠丸快速抗抑郁机制研究, 负责人: 薛文达; 江苏省教育厅江苏省高校自然科学基金面上基金项目(No 18KJB360009): 越鞠丸增强海马神经新产生抗抑郁作用机制研究, 负责人: 王薇。

** 通讯作者: 王薇, 助理研究员, 主要研究方向: 中医脑病学研究; 薛文达, 助理研究员, 主要研究方向: 中药快速抗抑郁的机制和转化医学。

调节海马神经应激时或损伤后的突触重塑,使得应激导致的神经元损伤得到改善和恢复,从而产生快速的改善产后抑郁样行为的作用^[5]。在正常小鼠上也发现,越鞠甘麦大枣汤与氯胺酮单次灌胃 24 h 后即可缓解抑郁样行为。

海马是当今抑郁症研究中的重点关注的脑区之一,并与情绪相关的大脑区域(如杏仁核)形成神经纤维连接。海马也可以调节下丘脑-垂体-肾上腺轴(*The hypothalamic - pituitary - adrenal axis, HPA*),使其更容易受到压力和抑郁的影响^[6]。对抑郁症病人的临床研究显示,其海马组织的体积变小,并且其海马组织中的神经元突触数目明显减少^[7]。长时程增强(*Long-term potentiation, LTP*)指突触传递的增强,是表明突触可塑性的重要功能指标之一^[8]。当暴露于压力的刺激,包括反复束缚和社会失败,会损害小鼠海马的 LTP^[9]。另外,急性应激也可促进海马 PFC 通路 LTP 的诱导^[10]。因而,海马突触可塑性的改变可能是导致抑郁样症状的原因之一^[11]。

诱导 LTP 需要突触前神经元和突触后神经元同时活跃,突触前神经元释放的谷氨酸与突触后神经元上的谷氨酸受体相互作用,包括 NMDA 受体(NMDAR)和 AMPA 受体(AMPA)^[12]。AMPA 由 GluR1-4 四个亚基组成。阻断 AMPAR 可以阻断氯胺酮对小鼠和大鼠的抗抑郁作用,而增强的 AMPAR 信号则促进了这种抗抑郁作用^[13]。药理研究证据证明 AMPAR 亚基 GluR1 的持续上调表达对于 LTP 的诱导增强是必需的^[14]。NMDAR 由功能性亚基 NR1 和调节性亚基 NR2A 和 NR2B 组成^[15]。临床前研究表明抑制 NMDAR 是氯胺酮抗抑郁的机制之一^[16],但是 Wang 等^[17]发现 NMDAR 亚基在抑郁样小鼠海马中的表达降低,接受抗抑郁药之后表达升高,这可能是由于实验动物品系和药物的反应差异性所致。有研究报道称 NMDAR 亚基的增加会诱导 LTP 的水平提高^[18]。因此 NMDAR 及 AMPAR 的功能表达变化也是突触可塑性的重要反映之一。

在本研究中,我们拟采用行为学测试和离体脑片电生理方法来分析越鞠甘麦大枣汤在昆明小鼠中的抗抑郁样作用以及对小鼠海马突触传递的影响,并运用 Western blot 检测 AMPAR 和 NMDAR 突触相关蛋白的表达水平,从而探讨越鞠甘麦大枣汤在昆明小鼠中如何通过影响突触可塑性来缓解抑郁样症状的神经

生物学机制,为临床用药提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级昆明雌性小鼠,7-8 周龄,体质量为 20 g-25 g,购自南京市青龙山动物繁殖场(动物合格证号:SCXK(苏)2014-0002)。实验前小鼠适应饲养环境 1 周,动物房环境温度 22℃-24℃,光/暗循环 12 h,可以自由获取食物和水。

1.2 实验药物

实验用中药材均购于南京中医药大学国医堂门诊,经南京中医药大学中药学院杨连云教授鉴定,均为《中国药典》2010 年版收载品种。越鞠甘麦大枣汤由 100 g 川芎、100 g 神曲、100 g 香附、100 g 栀子、100 g 苍术以及 125 g 炙甘草、250 g 淮小麦、375 g 大枣组成。将药物加入 8 倍体积的纯净水浸泡 30 min,沸后煎煮 1 h,过滤,再加 6 倍体积的纯净水按上述方法煎煮后过滤,合并药液并于 65℃减压旋蒸浓缩。药物的终浓度为 1 g/mL,给药浓度为 10 g/kg。配好的药物分装后于 -20℃ 保存。盐酸氯胺酮(ketamine, Ket)注射液为福建古田制药厂生产(批号:20140301),临用前用生理盐水配成 30 g/L 的药液。

1.3 实验主要试剂和仪器

人工脑脊液(ACSF)(NaCl 124, KCl 5, NaH₂PO₄ 1.25, NaHCO₃ 26, MgSO₄ 2, glucose 10, CaCl₂ 2 mmol/L, pH = 7.4),实验所用试剂均购自中国国药公司。悬尾游泳视频采集设备(上海吉量软件科技有限公司);ANY-maze 动物行为分析系统(美国 Stoelting 公司);旋转蒸发仪(南京金正教学仪器有限公司, RE-852);超声清洗机(上海 Branso 公司, SB5200-型);台式离心机(德国 Hermle 公司, Z-32);电子天平(METTLER 公司, AE100);振动切片机(德国 Leica 公司, VT1200S 型);电极拉制仪(德国 DM 公司);显微操纵仪(美国 Sutter 公司, ROE-200);记录分析软件(美国 Axon 公司, PClamp10.1);放大器(美国 Axon 公司, MultiClamp700B);可编程刺激器(以色列 A.M.P.I 公司, Master-8);隔离器(以色列 A.M.P.I 公司);蠕动泵(中国润泽公司)。

1.4 方法

1.4.1 药物剂量和持续性筛选

将小鼠随机分为两组:对照组和越鞠甘麦大枣汤

组,对照组单次灌胃生理盐水1次,前期研究中对越鞠甘麦大枣汤组设置不同剂量(5 g/kg、7.5 g/kg、10 g/kg、12.5 g/kg、15 g/kg)进行单次灌胃给药1次。30 min后进行悬尾测试,2 h后进行强迫游泳测试。实验结果显示越鞠甘麦大枣汤剂量为10 g/kg时可显著降低小鼠不动时间^[9],因而本研究选用10 g/kg作为越鞠甘麦大枣汤的使用剂量。

1.4.2 实验动物分组

将小鼠随机分为三组:对照组、中药越鞠甘麦大枣汤组、西药氯胺酮组。对照组给予灌胃生理盐水1次,越鞠甘麦大枣汤组灌胃给予越鞠甘麦大枣汤1次(剂量为10 g/kg),氯胺酮组以西药氯胺酮注射液(0.1 mL/10 g)给予腹腔注射。于单次给药24 h和7天后进行悬尾测试和强迫游泳测试。

1.4.3 悬尾测试

TST是使用一个计算机系统进行的,该系统允许六只动物一次被录像和测试。在隔音和视觉隔离的房间里,一只老鼠被悬挂于距离桌面30 cm的支架上,测试的总持续时间(6 min)可分为激动期和静止期。6 min测试的最后4 min的总不动时间用行为学分析软件(ANY-maze, USA)计算。

1.4.4 强迫游泳测试

将老鼠被从笼子里移走,分别放入一个透明的玻璃水槽(40厘米高,20厘米直径),里面装满30厘米的水(22-23℃),允许它们游泳6 min。在测试结束时,这些动物被从水中移出,用纸巾擦干,然后放回到笼子里。当老鼠漂浮在水中而不挣扎的时候,它们就被认为是静止的,它们只有做运动时,才能使它们的头保持在水面上。在6 min测试期的最后4 min内,用软件记录下不动时间。

1.4.5 脑片切片制备

小鼠灌胃给予越鞠甘麦大枣汤,用异氟醚麻醉并处死。迅速取脑,淹没在冰凉的人工脑脊液(ACSF)中,ACSF中提前半小时通入混合气体(95% O₂/5% CO₂)。用振动组织切片机切取海马背片(400 Mm)。在电生理记录前,将切片在32℃ ACSF中孵育至少60 min。

1.4.6 海马脑片长时程增强作用(LTP)记录

脑片孵育结束后转移至灌流槽的载玻片上,用盖网固定,以1-2 mL/min持续灌流脑片,并持续给予混合气体(95% O₂/5% CO₂)。用镍铬电极刺激Schaffer侧枝连合通路,玻璃记录电极填充ACSF后放置在CA1

区域来记录兴奋性突触后场电位。连接MultiClamp 700B放大器,稳定的基线记录维持至少10 min。然后,在Schaffer侧支通路上施加高频刺激(HFS; 100 pulses, 100 Hz)。引起场电位幅度变化要大于40%并随后记录60 min,保持相同强度的刺激。

1.4.7 蛋白免疫印迹(Western blot)检测小鼠海马GluR1、NR1、NR2A、NR2B、PSD95蛋白表达

将海马组织称重后,置于含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的Ripa缓冲液中。采用蛋白质A280法测定蛋白质浓度,然后用SDS-PAGE电泳分离蛋白裂解物,电泳结束后,湿转法将蛋白转至PVDF膜上,转膜结束后,3% BSA溶液室温封闭膜1 h,分别用NR1(Cell Signaling Technology, 5704S, 1: 1000)、NR2A(Cell Signaling Technology, 2972S, 1: 1000)、NR2B(Cell Signaling Technology, 4207S, 1: 1000)、PSD95(Cell Signaling Technology, 3409S, 1: 1000)、GluR1(Cell Signaling Technology, 13185S, 1: 1000)以及兔抗 β -tubulin(proteintech, 11224-1-AP, 1: 8000)的一抗于4℃下孵育过夜。然后用TBST缓冲液漂洗10 min,重复3次后,加入二抗(1:8000),于室温下孵育1 h后加入Tanon发光液显色。采用全自动化学发光图像分析系统(Tanon-5200)进行显影分析。

1.5 统计分析

应用SPSS20.0统计分析软件对多组间数据进行单因素方差分析,两组间数据比较采用T检验分析。

2 结果

2.1 越鞠甘麦大枣汤单次给药能够产生抗抑郁作用

悬尾测试结果显示,与对照组相比,单次给予越鞠甘麦大枣汤或者氯胺酮24 h后,能够显著减少小鼠的不动时间($F(2, 45) = 18.79, P < 0.001$,图1A),表现出抗抑郁样作用;与对照组相比,单次给予越鞠丸7天后,同样能够显著减少小鼠的不动时间,但是单次给予氯胺酮7天后,不能逆转小鼠的抑郁样行为($F(2, 45) = 17.67, P < 0.001$,图1B)。在强迫游泳测试结果中,单次给予越鞠甘麦大枣汤或氯胺酮24 h后,同样能够显著减少小鼠的不动时间($F(2, 45) = 7.079, P < 0.01$,图1C),表现出抗抑郁样作用;与悬尾结果一致,单次给药7天后,越鞠甘麦大枣汤能够显著减少小鼠的不动时间,而氯胺酮不能产生这种作用($F(2, 45) = 7.304, P < 0.01$,图1D)。这些结果均提示我们越鞠甘

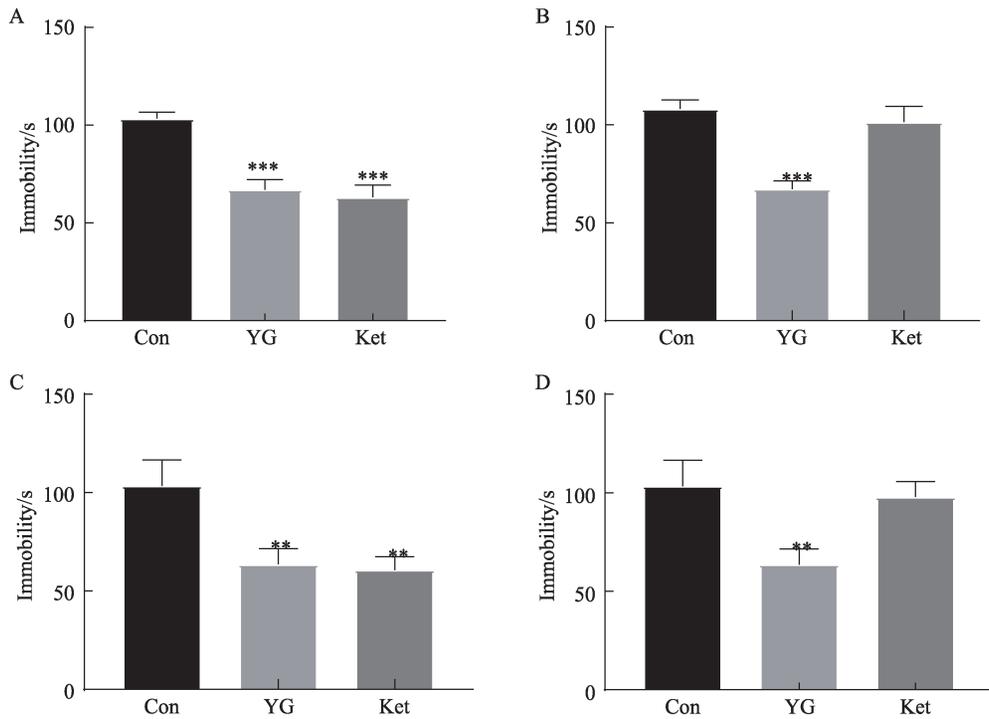


图1 越鞠甘麦大枣汤在不同时间点的抗抑郁作用($\bar{x} \pm s, n = 16$)

注:单次给予越鞠甘麦大枣汤和氯胺酮24 h和7 d后,小鼠不动时间发生变化,越鞠甘麦大枣汤的持续抗抑郁效果更好。Con:对照组, YG:越鞠甘麦大枣汤组, Ket:氯胺酮组。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Con。

麦大枣汤能够产生更持久的抗抑郁样作用。

2.2 小鼠给药后海马脑片的LTP记录

给予HFS来诱发LTP,结果显示给药组小鼠的斜率显著增加,提示给予HFS后均能在小鼠中诱发Schaffe侧枝-CA1的神经元突触传递的明显增强。其中,给药24 h后,越鞠甘麦大枣汤组小鼠较对照组的平均fEPSP斜率显著升高($P < 0.001$)(图2A);同样在给药7天后,和对照组相比,给药组小鼠的平均fEPSP斜率也显著升高($P < 0.001$)(图2B)。

2.3 越鞠甘麦大枣汤对小鼠海马组织中相关突触蛋白表达的影响

研究显示,给予越鞠甘麦大枣汤24 h($P < 0.01$)和7天($P < 0.05$)后,小鼠AMPA亚基GluR1表达水平均显著升高,氯胺酮组小鼠GluR1表达水平在给药24 h后升高($P < 0.01$),而7天后与对照组相比没有显著差异(图3A,3B)。给药24 h后,NMDAR亚基NR2A表达水平较对照组明显下降($P < 0.05$)(图3C),而在给药7天后, NR2A表达水平较对照组没有统计学差异(图3D)。NMDAR亚基NR2B表达水平在给药24 h后较对照组均明显升高($P < 0.05$),但是氯胺酮组给药7天后不能上调NR2B的表达(图3E,3F)。同样越鞠甘麦

大枣汤组小鼠的NMDAR亚基NR1表达水平在24 h和7天两个时间点上均明显高于对照组($P < 0.05$)(图3G,3H),下游突触蛋白PSD95的表达水平在给药后同样增加显著($P < 0.05$)(图3I,3J),而氯胺酮在单次给药24 h后可上调NR1或PSD95的表达,但是7天后不能上调NR1或PSD95的表达(图3G,3H,3I,3J)。

3 讨论

在实验室之前的研究中我们发现越鞠丸单次灌胃给药发挥快速抗抑郁样作用,并可以持续至5天。而甘麦大枣汤有养心安神,补脾和中的效果,常加味或配伍其他方剂使用,常配伍的方剂如逍遥散、四逆散等。该方对于不同中医证型的抑郁症治疗效果均较显著。另外赵志宇等^[19]通过对甘麦大枣汤进行拆方分析,发现其抗抑郁活性成分为一种具有较强抗氧化作用的黄酮类化合物——甘草苷。甘草苷可以改善抑郁模型快感缺乏的症状和绝望行为。因此将越鞠丸与甘麦大枣汤两方合用,疏肝与健脾并施,养血与安神并举,心肝脾三脏并调,在治疗抑郁症时可以发挥更好的作用。通过小鼠模型实验发现,越鞠甘麦大枣汤单次灌胃24 h后即可缓解抑郁样行为,而在此模

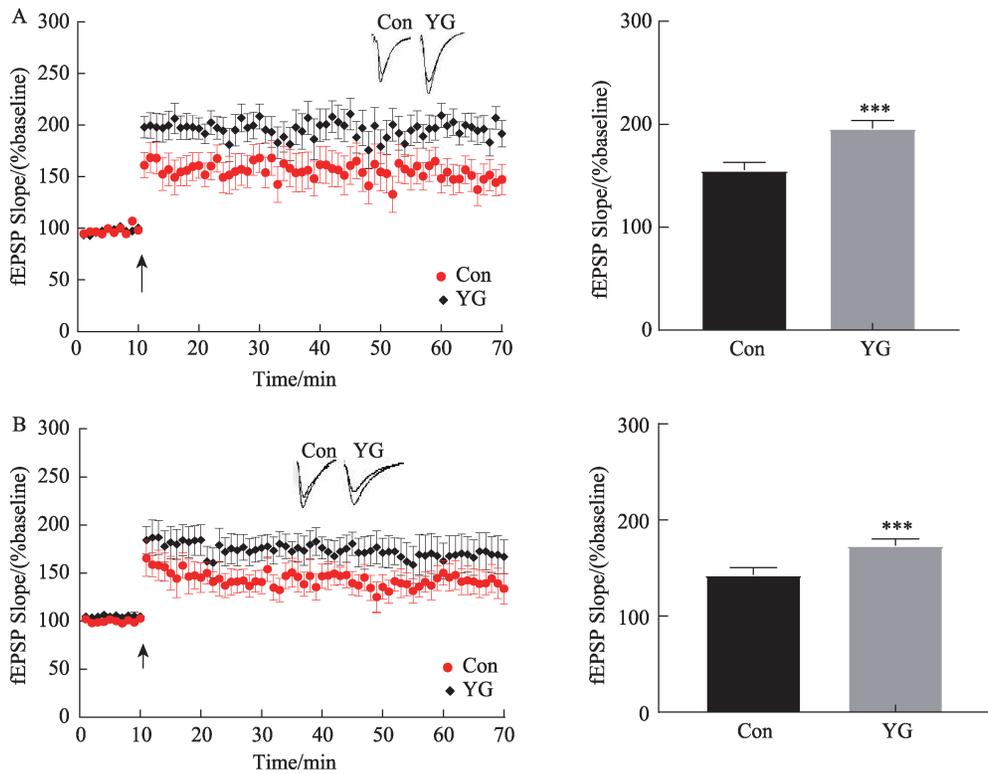


图2 小鼠给药后海马区不同时间点的LTP比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注: 基线记录10 min后给予高频刺激, 并记录60 min。数据点代表fEPSP斜率百分比。Con: 对照组, YG: 越鞠甘麦大枣汤组。*** $P < 0.001$ vs Con。

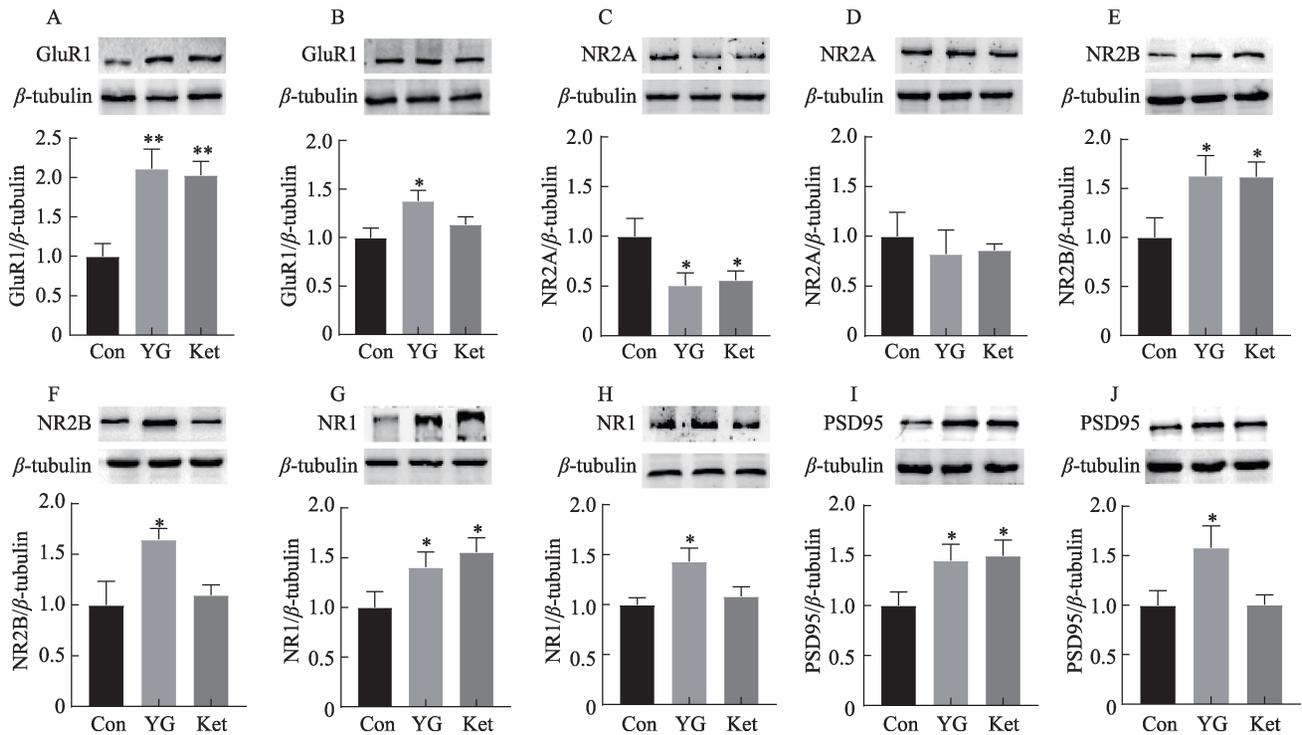


图3 小鼠海马GluR1、NR2A、NR2B、NR1、PSD95蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注: 单次给予小鼠越鞠甘麦大枣汤和氯胺酮24 h和7天后, 相关蛋白表达水平改变, 越鞠甘麦大枣汤的作用效果更持久。A, C, E, G, I分别是给药24 h后, B, D, F, H, J分别是给药7天后。Con: 对照组, YG: 越鞠甘麦大枣汤组, Ket: 氯胺酮组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Con。

型上,常规单胺类药物至少需要7天以上处理时间才能产生作用。并且越鞠甘麦大枣汤单次给药后的抗抑郁样作用能够持续到7天,比单方越鞠丸的抗抑郁样作用更加持久。

与此同时,我们发现小鼠海马区 Schaffe 侧枝-CA1 的 LTP 在给药后 24 h 至第 7 天都显著增强。进一步我们检测了小鼠海马组织中 AMPA 受体及 NMDA 受体相关蛋白的表达,发现 GluR1、NR2B、NR1、PSD95 蛋白表达水平明显增加,提示越鞠甘麦大枣汤可能是通过增强突触可塑性来产生抗抑郁作用。

抑郁症的发病机制复杂多样,目前神经可塑性假说得到更广泛认同。该假说认为,抑郁症主要是由相关脑区的神经可塑性在应对应激时降低所引起的。调节神经递质、增加神经营养因子和神经系统可塑性的水平,从而逆转下丘脑-垂体-肾上腺轴的功能障碍并发挥神经保护作用,是抗抑郁的基础^[20]。LTP 是突触传递以及神经可塑性的重要表现形式。电生理数据显示在急性应激动物的关键脑区,谷氨酸能突触表现出 LTP 诱导损伤^[21]。也有研究显示,许多药物成分是通过影响谷氨酸能突触来体现其抗抑郁作用的^[22]。本研究的电生理实验也证实,在给予高频刺激诱发 LTP 后,越鞠甘麦大枣汤组小鼠的平均 fEPSP 斜率明显上升,表明越鞠甘麦大枣汤能够增强小鼠海马的突触传递。另外,很多研究证明 AMPA 受体和 NMDA 受体对于兴奋性和抑制性突触传递是必不可少的,LTP 的诱导与 AMPA 受体和 NMDA 受体的表达增加有关^[23]。此外,海马区 NMDA 受体依赖的突触可塑性被认为是抗抑郁的关键机制^[24]。我们研究发现,给予越鞠甘麦大枣汤后,小鼠 AMPA 受体亚基 GluR1 的表达增加,提示我们 GluR1 的增加是诱导 LTP 增强的必需条件。与此同时,给药组小鼠较对照组小鼠的 NMDA 受体亚基

NR2B 和 NR1 表达均显著增加,提示我们形成 LTP 的过程中 NMDAR 起到重要作用。但是我们发现 NMDA 受体亚基 NR2A 并没有出现与其他亚基一致的变化,甚至给药组的 NR2A 表达较对照组在 24 h 后出现显著下降,7 天后无统计学差异。Kiyama 等^[25]研究发现在 NR2A 基因敲除小鼠中,LTP 的平均幅度与野生型小鼠相比有所下降,但是提高刺激的强度之后仍然可以诱导出与野生型小鼠水平相当的饱和 LTP,从而提示我们 NR2A 亚基可能并非 LTP 诱导形成所必需的。另外 PSD95 是突触后致密蛋白,为突触后膜的受体活动和稳定性所必需,是突触可塑性的重要标志^[26]。PSD95 的蛋白水平在给药 24 h 和 7 天后显著增加,提示我们给予越鞠甘麦大枣汤后小鼠的突触可塑性增强。另外我们发现单次给予越鞠甘麦大枣汤和氯胺酮后,越鞠甘麦大枣汤的抗抑郁样作用比氯胺酮更加持久,我们推测越鞠甘麦大枣汤抗抑郁样作用之所以能够持续到 7 天,是其增强了神经突触的传递作用,激活了持久抗抑郁的相关分子机制,从而增加了神经营养因子的表达,持续改善神经元细胞的受损状态,这些提示我们越鞠甘麦大枣汤作为中药在抗抑郁方面的优势。

本研究通过行为学测试来分析越鞠甘麦大枣汤在昆明小鼠中的快速与持久的抗抑郁样作用,并利用电生理学方法来研究越鞠甘麦大枣汤对小鼠海马脑区长时程增强的影响,并在分子机制上验证产生长期增强作用和抗抑郁的基础,探讨越鞠甘麦大枣汤增强突触效能的快速性和持久性上的神经生物学机制。下一步应继续研究越鞠甘麦大枣汤对于长时程增强的影响是通过 NMDA 还是 AMPA 电流的变化,同时进一步阐明影响治疗效果的潜在机制和基因变异,为治疗抑郁症的有效个体化药物提供新的线索。

参考文献

- 1 Menard C, Hodes G E, Russo S J. Pathogenesis of depression: Insights from human and rodent studies. *Neuroscience*, 2016, 321: 138-162.
 - 2 Trivedi M H, Rush A J, Wisniewski S R, et al. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. *American Journal of Psychiatry*, 2006, 163(1): 28-40.
 - 3 Blier P, Zigman D, Blier J. On the safety and benefits of repeated intravenous injections of ketamine for depression. *Biological Psychiatry*, 2012, 72(4): e11-2.
 - 4 薛长连,王发为,于有山.越鞠甘麦大枣汤治疗郁证. *人民军医*, 1992(8): 62-63.
 - 5 夏宝妹,陈畅,张海楼,等.越鞠甘麦大枣汤对产后抑郁小鼠海马 AKT/mTOR 信号通路的影响. *中国药理学通报*, 2016, 32(1): 119-122.
 - 6 Anacker C, Cattaneo A, Musaelyan K, et al. Role for the kinase SGK1 in stress, depression, and glucocorticoid effects on hippocampal neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(21): 8708-13.
- 6 [*Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Materia-World Science and Technology*]

- 7 Sousa N, Lukoyanov N V, Madeira M D, *et al.* Erratum to "Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement". *Neuroscience*, 2000, 101(2): 483.
- 8 Quan M N, Tian Y T, Xu K H, *et al.* Post weaning social isolation influences spatial cognition, prefrontal cortical synaptic plasticity and hippocampal potassium ion channels in Wistar rats. *Neuroscience*, 2010, 169(1): 214-22.
- 9 Artola A, von Frijtag J C, Fermont P C, *et al.* Long-lasting modulation of the induction of LTD and LTP in rat hippocampal CA1 by behavioural stress and environmental enrichment. *European Journal of Neuroscience*, 2006, 23(1): 261-72.
- 10 Goto Y, Grace A A. Alterations in medial prefrontal cortical activity and plasticity in rats with disruption of cortical development. *Biological Psychiatry*, 2006, 60(11): 1259-67.
- 11 Duman R S, Aghajanian G K. Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science*, 2012, 338(6103): 68-72.
- 12 Li N, Lee B, Liu R J, *et al.* mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science*, 2010, 329(5994): 959-64.
- 13 Zarate C A, Singh J B, Carlson P J, *et al.* A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Archives of General Psychiatry*, 2006, 63(8): 856-64.
- 14 Koike H, Chaki S. Requirement of AMPA receptor stimulation for the sustained antidepressant activity of ketamine and LY341495 during the forced swim test in rats. *Behavioural Brain Research*, 2014, 271: 111-5.
- 15 Yashiro K, Philpot B D. Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology*, 2008, 55(7): 1081-94.
- 16 Lumsden E W, Troppoli T A, Myers S J, *et al.* Antidepressant-relevant concentrations of the ketamine metabolite (2R,6R)-hydroxynorketamine do not block NMDA receptor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, doi: 10.1073/pnas.1816071116.
- 17 Wang B, Wu Q, Lei L, *et al.* Long-term social isolation inhibits autophagy activation, induces postsynaptic dysfunctions and impairs spatial memory. *Experimental Neurology*, 2019, 311: 213-224.
- 18 Yang Y, Ju W, Zhang H, *et al.* Effect of Ketamine on LTP and NMDAR EPSC in Hippocampus of the Chronic Social Defeat Stress Mice Model of Depression. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2018, 12: 229.
- 19 赵志宇, 王卫星, 郭洪祝. 甘草苷对慢性应激抑郁模型大鼠的抗抑郁作用. *中国临床康复*, 2006, 10(27): 69-72.
- 20 Zou Z, Chen Y, Shen Q, *et al.* Neural Plasticity Associated with Hippocampal PKA-CREB and NMDA Signaling Is Involved in the Antidepressant Effect of Repeated Low Dose of Yueju Pill on Chronic Mouse Model of Learned Helplessness. *Neural Plasticity*, 2017, 2017: 9160515.
- 21 Wong T P, Howland J G, Robillard J M, *et al.* Hippocampal long-term depression mediates acute stress-induced spatial memory retrieval impairment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(27): 11471-6.
- 22 Noh K, Lee H, Choi T Y, *et al.* Negr1 controls adult hippocampal neurogenesis and affective behaviors. *Molecular Psychiatry*, 2019, doi: 10.1038/s41380-018-0347-3.
- 23 Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 2001, 11(3): 327-35.
- 24 Zhuo M. Plasticity of NMDA receptor NR2B subunit in memory and chronic pain. *Molecular Brain*, 2009, 2: 4.
- 25 Kiyama Y, Manabe T, Sakimura K, *et al.* Increased thresholds for long-term potentiation and contextual learning in mice lacking the NMDA-type glutamate receptor epsilon1 subunit. *Journal of Neuroscience*, 1998, 18(17): 6704-12.
- 26 Mardones M D, Jorquera P V, Herrera Soto A, *et al.* PSD95 regulates morphological development of adult-born granule neurons in the mouse hippocampus. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2019, doi: 10.1016/j.jchemneu.2019.04.009.

Yueju Ganmai Dazao Decoction Enhances Synaptic Plasticity and Produces Antidepressant-like Effect

Zhou Tong^{1,2}, Zhang Hailou², Shen Jiamin², Wang Wei^{1,2}, Xue Wenda², Chen Gang³

(1. School of Medicine & Holistic Integrative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Key Laboratory of Integrative Medicine for Brain Diseases, School of Basic Biomedical Science, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China 3. School of traditional Chinese Medicine, Jinan University, Guangzhou, 510632, China)

Abstract: Objective To research the antidepressant-like effect of Yueju Ganmai Dazao decoction and analyze the

effect of Yueju Ganmai Dazao decoction on hippocampal synaptic plasticity in mice. **Methods** Kunming mice were randomly divided into two groups: control group and Yueju Ganmai Dazao decoction group. 24 h and 7 d later, the Tail suspension test (*Tail suspension test, TST*) and the Forced swimming test (*Forced swimming test, FST*) were performed. The long-term potentiated (*long term potentiation, LTP*) of Schaffe lateral branch-CA1 in hippocampus of mice was detected by electrophysiological experiment. The expression levels of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-oxazolonic acid receptor (*α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor, AMPAR*) and N-methyl-d-aspartic acid receptor (*N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR*) related synaptic proteins in hippocampus of mice were analyzed by western blot. **Results** Compared with the control group, the immobility time of the Yueju Ganmai Dazao decoction group was significantly lower than that of the control group in TST ($P < 0.001$) and in FST ($P < 0.01$). The immobility time of mice was significantly lower than the naive mice after ketamine treatment, but could not affected after 7 days. The results of electrophysiological experiments showed that the LTP in hippocampus of mice was increased by Yueju Ganmai Dazao decoction treatment ($P < 0.001$). And the expressions of GluR1, NR2B and NR1 were all increased significantly by administration of Yueju Ganmai Dazao decoction. **Conclusion** Yueju Ganmai Dazao decoction may improve the synaptic transmission efficiency by increasing the LTP and enhancing the expression levels of AMPA receptor- and NMDA receptor-related synaptic proteins in hippocampus of Kunming mice, thus produce an antidepressant-like effect.

Keywords: Yueju Ganmai Dazao decoction, antidepressant, long-term potentiation, AMPAR, NMDAR

(责任编辑: 闫 群, 责任译审: 钱灵姝)