

# Balb/c 和 129/S1 小鼠的抑郁与气虚证共易感 差异性及其越鞠丸干预作用的分子研究\*

徐联调<sup>1</sup>, 李文佳<sup>1</sup>, 陈茵<sup>1</sup>, 李筱琪<sup>1</sup>, 杨青青<sup>1</sup>,  
吴颖昕<sup>1</sup>, 陈刚<sup>2</sup>, 周欣<sup>1\*\*</sup>

(1. 南京中医药大学 中医脑病研究实验室 南京 210023;

2. 暨南大学 脑病个体化医学跨学科研究所 方证研究中心 广州 510632)

**摘要:**目的 比较 Balb/c 和 129/S1 两品系小鼠在不同抑郁症模型造模后的证候差异,以及越鞠丸对慢性不可预知温和刺激造模后两品系小鼠抑郁证候表型和相关信号通路的影响。方法 分别在 Balb/c、129/S1 两个近交品系小鼠上用社交挫败应激与慢性不可预知应激两种方法造模。用糖水偏爱、陌生环境摄食、强迫游泳等测试的指标用于评判小鼠的抑郁/焦虑样状况,并对小鼠前肢抓力、掌纹血色度和负重游泳进行检测,评判其气虚样证候。将慢性不可预知应激抑郁造模后的两品系小鼠分为模型组、越鞠丸组和氟西汀组,给药一周后进行一系列行为学检测,评判越鞠丸对抑郁症及气虚证候的改善作用,采用蛋白免疫印迹法检测小鼠海马与肌肉 PKA-CREB 信号通路蛋白表达。结果 雄性 Balb/c 和 129/S1 小鼠在两种模型下均表现出糖水偏好显著降低,强迫游泳时间显著延长或社会交互时间显著缩短等抑郁样行为,而 Balb/c 小鼠在抓力及掌纹血色表型上都显示气虚样证候,129/S1 小鼠则未表现出类似证候。越鞠丸可逆转两品系小鼠在慢性不可预知应激造模后的抑郁表型,但无法逆转造模后 Balb/c 小鼠的抓力、掌纹血色度和负重游泳时长的气虚样表型;与模型组相比,两品系小鼠越鞠丸组海马和肌肉 PKA、CREB 磷酸化蛋白表达均明显上调。结论 社交挫败应激与慢性不可预知应激造模后, Balb/c 与 129/S1 两品系鼠均表现出抑郁样行为,只有 Balb/c 小鼠出现气虚样证候。越鞠丸均能逆转两品系小鼠的抑郁样行为,对 Balb/c 小鼠的气虚样证候没有影响,其抗抑郁作用与激活 PKA-CREB 信号通路有关。

**关键词:**抑郁症 证候差异 越鞠丸 社交挫败应激 慢性不可预知应激 PKA-CREB 信号通路

doi: 10.11842/wst.20190907006 文献标识码: A

抑郁症为复杂的心境障碍疾病<sup>[1]</sup>,对个人、社会乃至国家造成巨大的负担<sup>[2]</sup>。约有 30% 患者对经典抗抑郁药的治疗没有反应<sup>[3]</sup>,而投放市场的新药与之前的药物相比,对症状的改善未达到预期的效果,对副作用的改善也不理想<sup>[4]</sup>。抑郁症的病因尚不确定,通常认为神经、遗传、社会等多种因素导致了抑郁症的发生<sup>[5]</sup>。据流行病学调查结果显示,有家族抑郁症史的

人患抑郁症的几率高<sup>[6]</sup>。遗传对动物的应激易感性及抗抑郁作用也有显著影响,例如, Balb/cJ 与 C57BL/6J 小鼠在慢性不可预知应激造模情况下, Balb/cJ 小鼠更易表现出抑郁样症状<sup>[7]</sup>。相较于 ICR 小鼠,越鞠丸在昆明小鼠上表现出更持久的抗抑郁作用<sup>[8]</sup>。

对于抑郁症,中医辨证论治实施个体化治疗。杨焕新<sup>[9]</sup>对 250 例抑郁症患者进行中医体质分类发现,抑

收稿日期:2019-09-07

修回日期:2019-12-13

\* 江苏高校优势学科建设工程资助项目(苏政办发[2018]87号):中西医结合学科,负责人:黄熙;国家自然科学基金委员会项目(No81874374):

基于抑郁症和气虚证应激共易感性的病证结合动物模型研究,负责人:陈刚

\*\* 周欣,博士,主治中医师,主要研究方向:中医神经-精神疾病,仲景理法方药研究。

郁症患者体质主要集中为气郁质占24.8%、气虚质占16.67%，揭示抑郁症与中医体质存在关联性。体质以及相关的证候易感性很大程度上由先天禀赋的遗传物质决定。我们提出抑郁症和各种证候对环境应激反应的差异性，导致了病证表现的差异性，这可以通过抑郁症与特定证候对应激的共易感性予以揭示出来<sup>[10]</sup>。

前期我们对Balb/c和129/S1两品系小鼠，进行慢性不可预知应激和皮质酮皮下注射分别造模，两个品系小鼠均表现为抑郁样证候，但是Balb/c品系小鼠还出现显著而稳定的气虚样证候<sup>[11]</sup>，提示Balb/c品系小鼠为抑郁症气虚证共易感小鼠，支持遗传因素参与决定疾病与证候差异性。本研究采用慢性不可预知应激与社交挫败应激对Balb/c和129/S1两品系小鼠造模，以确定Balb/c小鼠抑郁症气虚证候共易感性的稳定性。并比较理气方药越鞠丸治疗两个品系抗抑郁和改善证候的差异性，检测其作用与PKA-CREB通路蛋白的相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康雄性Balb/c和129/S1小鼠购于上海斯莱克实验动物有限责任公司(许可证号:SCXK(沪)2017-0004)，饲养在SPF级动物屏障房内，6只一笼，粮水摄入自由，室温 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，相对湿度为50%~60%。正常喂养1周后用于实验。

### 1.2 药物与试剂

越鞠丸(Yueju pill, YJ)购自胡庆余堂(批号:Z33020041)，粉碎成末，用0.9%生理盐水溶解配成0.2 g/ml的药液。上述药液分装在10 mL离心管内， $-20^\circ\text{C}$ 保存。盐酸氟西汀(Fluoxetine, FLX)购于美国Sigma-Aldrich公司。主要试剂:CREB(Cell Signaling Technology, #9197, 1:1000); p-CREB(Cell Signaling Technology, #9198, 1:500); PKA(Cell Signaling Technology, #4782, 1:1000);  $\beta$ -tubulin(Epitomics, 1879-1, 1:2000)，均为兔抗，二抗羊抗兔HRP(正能, 511203)。

### 1.3 仪器

主要仪器:自发活动、强迫游泳、悬尾测试视频分析系统(上海吉量软件公司);拉力计(浙江乐清艾德堡仪器有限公司);体视显微镜(苏州银瑞计量仪器有

限公司);电泳仪(美国Bio-Rad公司);全自动发光显影仪Tannon-5200(上海天能科技有限公司)。

## 1.4 造模方法

### 1.4.1 社交挫败抑郁模型(Social defeat)

造模方法在Golden的基础上略加修改<sup>[12]</sup>。将实验小鼠放入饲养笼内适应3 min后，再放入体型较大及好斗的陌生小鼠，观察到实验小鼠被击败3~4次后(每次造模时间10 min左右，小鼠被击败表现为打翻在地或发出惊叫，实验过程保证实验小鼠不被打伤)，将两鼠分开放于同一笼内饲养(饲养笼用透明板隔开，陌生鼠与实验小鼠置于隔板于两边，使其看到接触不到，但实验小鼠接受陌生小鼠声音及嗅觉的刺激)24小时后，重复以上步骤。刺激同一实验小鼠的陌生鼠不相同。连续刺激21天后，然后进行其他抑郁行为与证候检测，对照组正常饲养。

### 1.4.2 慢性不可预知温和应激抑郁模型(CUMS)

慢性不可预知温和应激操作如下:将Balb/c、129/S1两品系小鼠随机分组。模型组小鼠单笼饲养并每日随机给予一种刺激(湿笼、空笼、 $45^\circ$ 斜笼、24 h禁水、禁食24 h、带孔50 ml管内束缚6 h、两次彻夜光照12 h，连续刺激4周。

## 1.5 给药及分组

慢性不可应激抑郁造模成功后，模型组随机分为3组:模型对照组和空白组均以0.9%生理盐水灌胃，越鞠丸组以越鞠丸0.1 ml/10 g灌胃，氟西汀组以氟西汀注射液0.1 ml/10 g腹腔注射。给药一周结束后进行行为学检测。

## 1.6 行为学测试

### 1.6.1 糖水偏好检验(SPT)

造模前，给予实验小鼠质量分数为2%的蔗糖溶液进行适应三天。造模结束后，小鼠禁水16~18 h后单只置于新笼内。每只小鼠被给予称重过的糖和水各一瓶，1 h后交换放置糖水与纯净水的位置，2 h回收并记录瓶子的重量，计算小鼠糖水摄入占总摄入液体的比值为其糖水偏好度。

### 1.6.2 悬尾测试(TST)

轻提起小鼠，将小鼠尾部大约1 cm处用胶布固定在测试箱钩子上，保持环境安静，使用悬尾测试系统记录小鼠在倒挂6 min内的活动，使用软件采集小鼠在后4 min内累计不动时间。

### 1.6.3 强迫游泳测试(FST)

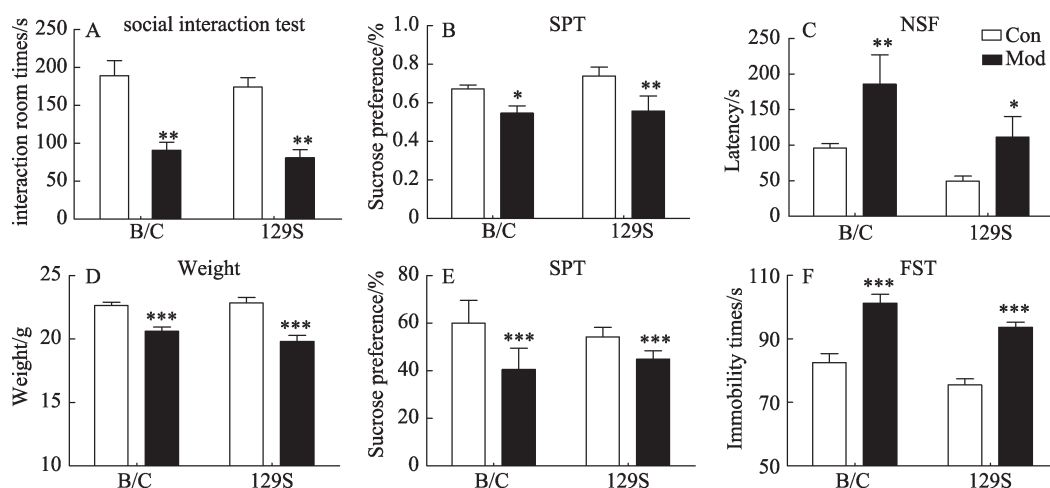


图1 造模后 Balb/c 与 129/S1 两品系小鼠的抑郁样行为(ABC 为社交挫败造模后行为;DEF 为慢性不可预知应激造模后行为)

注:与同品系对照组(Con)比,\* $p < 0.05$ ,\*\* $p < 0.01$ ,\*\*\* $p < 0.001$ 。n = 8 - 12

将小鼠投入灌水的玻璃缸中,水温在 23~25℃,测试在安静环境中进行,使用测试系统记录小鼠在缸中 6 min 的游泳情况,并采集后 4 min 内小鼠漂浮于水面上放弃挣扎时间。

#### 1.6.4 新奇环境摄食抑制测试(NSF)

小鼠禁食禁水 16~18 小时,小鼠在中央放置称量好食物的笼内自由探索与摄食 10 min。小鼠放入笼子起至其初次啃食食物的时间为进食潜伏时间,记录称重每只小鼠 10 min 内的食物总消耗量。

#### 1.6.5 抓力测试(Grip Strength)

左手将拉力计上的挂钩勾在网格上,右手拉住鼠尾使小鼠在网格上均匀拖行,在拉力计上读出该小鼠的最大抓力,3 次重复测试值算得平均值为该小鼠的抓力。

#### 1.6.6 前爪掌纹血色比值测试(Degree of Redness)

在方肇勤的方法<sup>[13]</sup>基础上,轻轻抓取小鼠并将右前爪置于体视显微镜拍摄,使用 Photoshop 软件抓取前爪第二三掌趾肉垫间脉络血色的 R、G、B 值,以 R/(R + G + B) 的比值作为前爪掌纹脉络血色度评价指标。

#### 1.6.7 负重游泳测试(Exhausted Swim Test)

小鼠尾部的 1~3 cm 处施加小鼠体重的 12% 重量后,记录从小鼠被放入水中至沉入水中 8 s 的时间为小鼠沉没潜伏期。由于此测试中情感性影响较大,在气虚评判中,可作为次要指标。

#### 1.7 蛋白免疫印迹法(WB)

实验小鼠脱椎处死后立即取脑部海马组织并剥离肌肉组织,低温下研碎样品提取蛋白并测定浓度。

凝胶电泳分离蛋白质并转至 PVDF 膜上。丽春红显色后切得目的条带,清水洗 10 分钟并无丽春红残留后于 3% BSA 封闭 1 h,洗去封闭液后在目的条带并加入相应抗体,4℃ 过夜。分别回收抗体后 TBST 重复洗 3 次,洗涤完毕放入二抗室温静置 1 h。回收二抗并重复以上清洗步骤,最后用滤纸吸去条带多余液体,置于 ECL 发光底物中显色,显影并采集条带灰度值。

#### 1.8 统计学方法

用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析,多组间数据采用单因素方差法,两品系小鼠空白对照组和模型组数据采用双因素方差法,数据以 mean ± sem 表示, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 社交挫败应激造模与慢性不可应激造模结束后, Balb/c 和 129/S1 两品系小鼠均表现为抑郁样证候

21 天社交挫败造模结束后,两品系小鼠均出现社会交互时间显著下降( $p < 0.01$  图 1A),糖水偏好度下降( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  图 1B),摄食潜伏期显著延长( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$  图 1C)。与正常组相比, Balb/c 和 129/S1 模型组小鼠体重显著减轻( $p < 0.001$  图 1D),糖水偏好度显著下降( $p < 0.001$  图 1E),在强迫游泳测试中,两品系小鼠的挣扎不动时间显著增长,表现为不可逃避环境下绝望状态( $p < 0.001$  图 1F)。

### 2.2 社交挫败应激造模与慢性不可应激造模结束后, Balb/c 品系小鼠表现气虚样证候, 129/S1 则无此证候

社交挫败造模后, Balb/c 品系小鼠前爪最大抓力

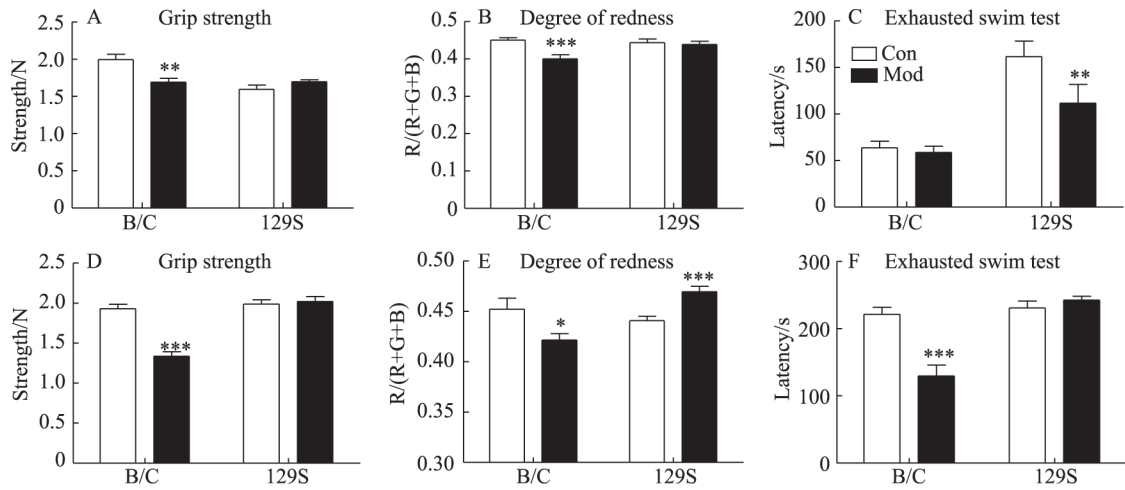


图2 造模后Balb/c与129/S1两品系小鼠的气虚证候表型(ABC为社交挫败造模后行为;DEF为慢性不可预知应激造模后行为)  
注:模型组与该品系对照组(Con)比,\* $p < 0.05$ ,\*\* $p < 0.01$ ,\*\*\* $p < 0.001$ 。n = 8 - 12

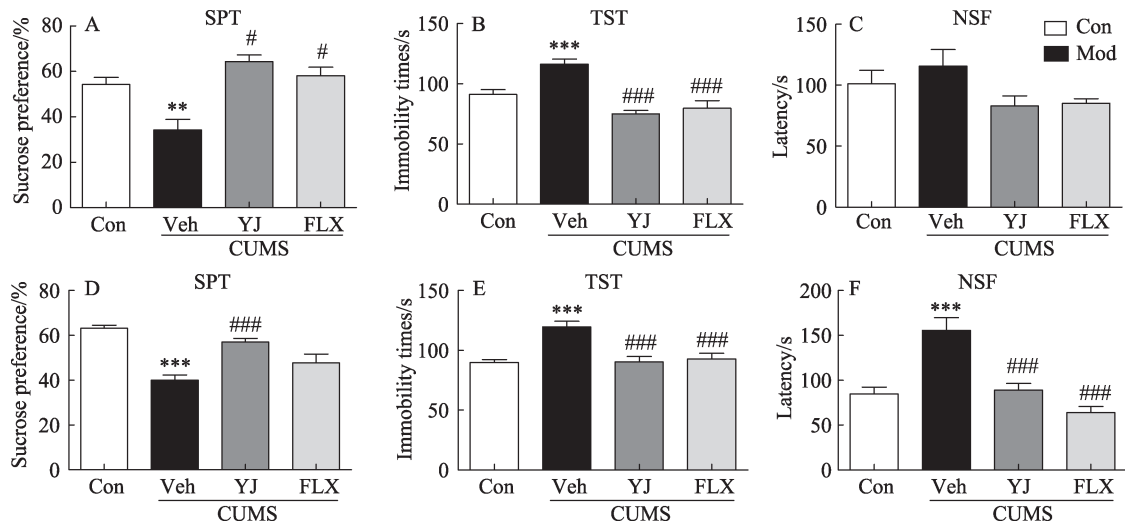


图3 越鞠丸给药对CUMS造模后小鼠抑郁证候的影响,(ABC为Balb/c,DEF为129/S1)

注:与空白对照组(Con)比,\*\* $p < 0.01$ \*\*\* $p < 0.001$ ;与模型对照组(Mod)比,# $p < 0.05$ ,### $p < 0.001$ 。n = 8 - 12

显著减弱( $p < 0.01$ 图2A),掌纹血色度表现为显著下降( $p < 0.001$ 图2B),在负重游泳时长上无显著变化( $p > 0.05$ 图2C);而造模后129/S1鼠在抓力、爪色上无显著变化( $p > 0.05$ 图2AB),负重游泳潜伏期显著缩短( $p < 0.01$ 图2C)。慢性不可预知应激造模后,Balb/c鼠前爪抓力同样显著下降( $p < 0.001$ 图2D),掌纹血色度表现为下降( $p < 0.01$ 图2E),负重游泳沉浸潜伏期显著下降( $p < 0.001$ 图2F);造模后的129/S1鼠在抓力与负重游泳时间上无显著变化( $p > 0.05$ 图2DF),而掌纹血色度显著上升( $p < 0.001$ 图2E)。

### 2.3 越鞠丸可以改善CUMS后Balb/c小鼠和129/S1小

鼠的抑郁样行为。

CUMS造模结束后,Balb/c与129/S1模型组小鼠呈现出糖水偏好显著降低,悬尾不动时间显著升高的抑郁样状态( $p < 0.001$ ,图3ABDE),在新奇环境摄食行为中,Balb/c模型组小鼠摄食潜伏期无显著变化(图3C),而129/S1小鼠造模后的摄食潜伏期显著增长,呈焦虑样表现。给药一周后行为学结果显示,越鞠丸与氟西汀给药能够逆转造模引起Balb/c小鼠在糖水偏好度、悬尾不动时间时间的变化( $p < 0.001$ 图3AB),降低Balb/c小鼠在新奇环境摄食的潜伏期,但未达到显著性( $p = 0.06$ 图3C)。越鞠丸给药均能逆转129/S1小鼠造模后在糖水偏好、悬尾不动时间与新奇环境摄食潜



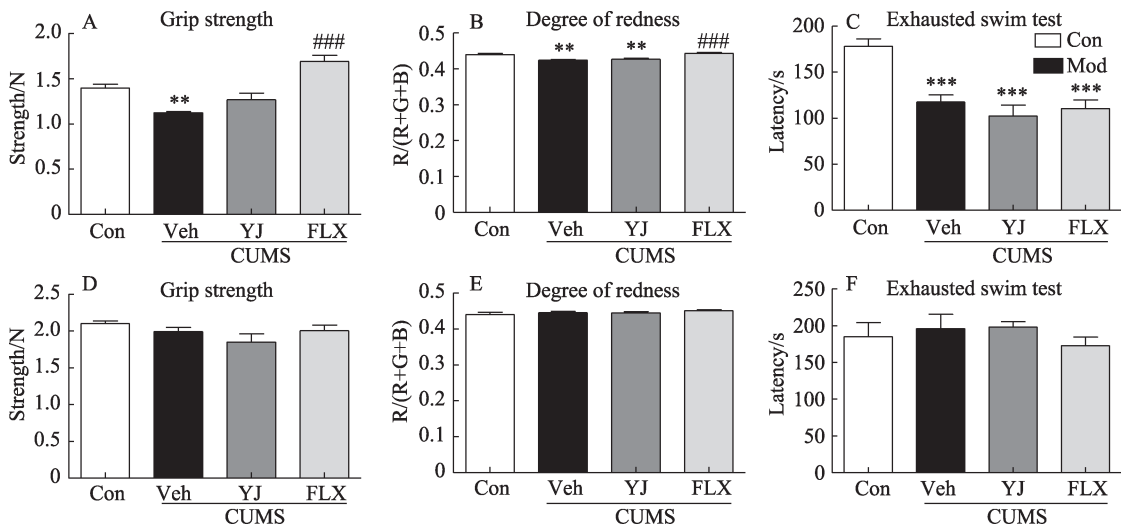


图4 越鞠丸给药对CUMS造模后小鼠气虚证候的影响,(ABC为Balb/c,DEF为129/S1)

注:与空白对照组(Con)比,\* $p < 0.05$ ,\*\* $p < 0.01$ ,\*\*\* $p < 0.001$ 。n = 8 - 12

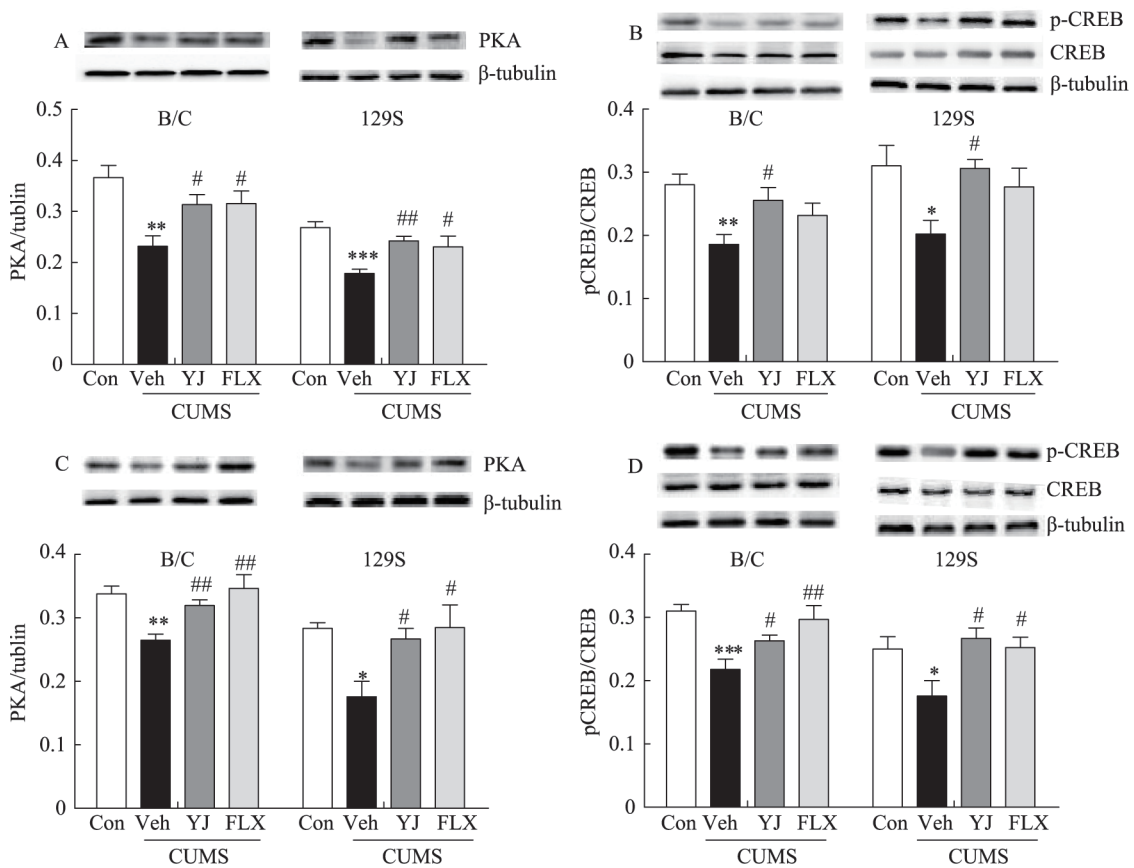


图5 越鞠丸给药对CUMS造模后Balb/c和129/S1小鼠PKA-CREB信号通路的影响,AB为海马组织,CD为肌肉组织)

注:与空白对照组(Con)比,\* $p < 0.05$ ,\*\* $p < 0.01$ ,\*\*\* $p < 0.001$ ;与模型对照组(Mod)比,# $p < 0.05$ ,## $p < 0.01$ 。n = 8 - 12

伏期的变化( $p < 0.001$ 图3DEF),改善其抑郁焦虑样行为。给予氟西汀不能逆转129/S1小鼠的糖水偏好( $p > 0.05$ 图3D),但都能逆转其悬尾不动时间与新奇

环境摄食的指标( $p < 0.001$ 图3EF)。

#### 2.4 越鞠丸未能逆转CUMS应激后Balb/c小鼠的气虚

样证候,对129/S1小鼠在气虚样指标上无影响。

CUMS造模结束后,进行气虚样行为检测发现,Balb/c模型组小鼠前爪抓力显著减弱( $p < 0.01$ 图4A),掌纹血色度表现为显著降低( $p < 0.01$ 图4B),负重游泳沉没潜伏时间显著缩短( $p < 0.001$ 图4C),而进行一周越鞠灌胃给药后,并不能逆转小鼠在这些气虚证候的指标( $p > 0.05$ 图4ABC),故越鞠丸无法改善Balb/c小鼠的气虚样证候,相比于模型组,氟西汀组小鼠抓力和爪色显著上升( $p < 0.001$ )负重游泳潜伏期无变化( $p > 0.05$ 图4C)。CUMS造模后,129/S1小鼠在抓力、掌纹血色度、负重游泳潜伏期气虚证候上无显著变化,越鞠丸与氟西汀给药对其气虚证候均无影响。

### 2.5 越鞠丸给药对CUMS造模后Balb/c和129/S1小鼠海马与肌肉中PKA、p-CREB和CREB蛋白表达的影响

Western Blot的结果显示,CUMS造模结束后,Balb/c和129/S1小鼠海马与肌肉中PKA与p-CREB蛋白表达均显著下降(图5ABCD),在用越鞠丸和氟西汀治疗后均能上调CUMS造模后Balb/c和129/S1小鼠海马PKA与p-CREB蛋白的表达(图5AB);越鞠丸均能使造模后两品系小鼠肌肉中PKA、p-CREB蛋白表达显著上调,而氟西汀治疗能显著提高两品系小鼠肌肉PKA蛋白水平,不能显著上升p-CREB蛋白水平(图5CD)。

## 3 讨论

慢性不可预知应激模型较真实的模拟人类现实生活及社会自然环境中所遭遇的不可预知因素的影响<sup>[14]</sup>,社交挫败能模拟人类社会中的社会心理应激,常用于抑郁症及应激易感机制研究<sup>[15-16]</sup>。本研究采用这两种造模方法对Balb/c和129/S1小鼠进行抑郁造模,CUMS造模后两品系小鼠均出现糖偏爱显著降低以及强迫游泳中挣扎不动时间延长失乐绝望的抑郁样表型,SD造模后,Balb/c和129/S1两品系小鼠均表现为不欲进行社会交互与糖水偏爱度下降的抑郁样表型。Balb/c品系小鼠均表现气虚样证候,而129/S1品系均没有表现气虚样证候。两品系抑郁小鼠在给与越鞠丸后,都能产生抗抑郁作用,均能改善外周海马和肌肉的PKA-CREB信号通路蛋白表达。

临床抑郁病人表现出多种中医证候,除气郁证候外,气虚是常见的证候之一。研究的结果表明,Balb/c小鼠遗传体质具有气虚易感性:在不同的应激模型

下,Balb/c小鼠都稳定呈现出了气虚样的表现,而气虚非易感性的129/S1小鼠则无此表现,尽管两个品系的小鼠都表现出抑郁样的行为,即Balb/c小鼠在应激后同时表现出抑郁(病)与气虚(证)易感性,可以作为研究抑郁伴随气虚的病证机制及其治疗稳定可靠的模式动物。129/S1小鼠在两种方法造模后都出现抑郁样行为,SD后负重游泳时间下降及CUMS爪色上升,可能为气郁致血行不畅甚至瘀阻而使爪色度上升,也可能气郁化火,灼伤津液,使其抗疲劳能力不足,此现象在以往皮质酮模型中也类似<sup>[11]</sup>,但是在CUMS模型中都没有,提示不同的模型条件对证候也一定的影响。尽管如此,Balb/c的气虚证候在所有的模型中,都表现出较好的稳定性,显示遗传对证候的基础性作用。

越鞠丸出自《丹溪心法》,理气行气剂,为治疗郁证代表方。临床证据表明越鞠丸能够治疗气郁体质及兼夹体质抑郁症患者<sup>[17-18]</sup>。本实验研究结果显示,给予慢性不可应激造模后的两小鼠越鞠丸治疗一周后,越鞠丸均能改善两品系小鼠的抑郁证候,即使Balb/c小鼠表现出气虚证候抑郁症。大量研究结果表明PKA-CREB信号通路与抑郁症有关<sup>[19-20]</sup>。越鞠丸可以通过调节PKA及CREB蛋白来达到治疗抑郁症的作用<sup>[8][21]</sup>。本研究对Balb/c小鼠海马蛋白表达的结果显示,PKA与p-CREB蛋白表达量在模型组显著下调,而给予越鞠丸治疗后能逆转该下调,在129/S1品系得到的蛋白表达结果与Balb/c品系一致,提示PKA及CREB蛋白的变化是越鞠丸在Balb/c与129/S1品系小鼠上起抗抑郁作用的共同基础。由于肌肉与气虚行为的密切关系,我们也检测肌肉PKA-CREB信号,发现Balb/c品系确实下降。比较意外的是越鞠丸可以逆转该下降,尽管对抓力行为没有作用。而且129/S1品系也在造模后下降,并被越鞠丸逆转,提示肌肉PKA信号与抑郁的关系比证候的更密切,还需要进一步研究。

从遗传学的角度,气虚体质是具有气虚易感性的遗传体质类型,在病理条件下,与非气虚体质比,易于出现气虚证候的症状与体征。在不同的疾病病因诱导下,气虚体质者都可以呈现出气虚证候,即使疾病类型各有不同,这是中医异病同治的生物学基础之一。某种程度而言,气虚体质是气虚证候的必要条件,气虚体质产生气虚证候一般还需要疾病环境的诱导。以行气解郁为主要功效的越鞠丸可以逆转两品

系小鼠在 CUMS 造模后的抑郁样行为,却不能逆转 Balb/c 小鼠的气虚样证候;而之前的研究<sup>[22]</sup>显示益气药四君子汤只能逆转 Balb/c 小鼠的抑郁伴气虚样行为,而对 129/S1 没有作用。提示越鞠丸对抑郁症具有治病的特点,其作用不是通过改善气虚证候来实现的,符合中医理论预期。反之,四君子汤对抑郁症的治疗,是通过对气虚证候的干预实现的,无气虚证候

也就没有治疗效果,同样符合中医理论。从实验上证明了中医辨证论治的科学性与必要性。本研究对不同遗传背景的小鼠进行 CUMS 和 SD 方法造模,结果支持 Balb/c 品系小鼠是抑郁伴气虚样证候的良好模型,有利于促进相关药物开发和机制等探索。下一步将进行深入刻画该抑郁伴气虚模型更为细致的病证特点和相关生物学基础。

## 参考文献

- 1 季建林. 精神医学[M], 第一版. 上海: 复旦大学出版社, 2003: 108.
- 2 Lé, J-Ppine, Briley M. The increasing burden of depression[J]. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2011, (2011): 3.
- 3 Trivedi MH, Rush AJ, Wisniewski SR, et al. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR\*D: implications for clinical practice. *Am J Psychiatry*. 2006, 163 (1): 28-40.
- 4 Krishnan V, Nestler EJ. Animal models of depression: molecular perspectives. *Curr Top Behav Neurosci*. 2011.
- 5 Rataj E, Kunzweiler K, Garthus-Niegel S. Extreme weather events in developing countries and related injuries and mental health disorders - a systematic review. *BMC Public Health*. 2016, 16(1): 1020.
- 6 沈渔村. 精神病学[M]. 第三版. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 555.
- 7 Malki K, Mineur YS, Tosto MG, et al. Pervasive and opposing effects of Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) on hippocampal gene expression in BALB/cJ and C57BL/6J mouse strains. *BMC Genomics*. 2015.
- 8 Xue W, Wang W, Gong T, et al. PKA-CREB-BDNF signaling regulated long lasting antidepressant activities of Yueju but not ketamine[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26331.
- 9 杨焕新, 于艳红, 乔明琦. 抑郁症与中医九种体质的关系探讨[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(06): 2048-2050.
- 10 陈刚, 周欣, 薛文达, 吴颖昕. 全基因组关联分析在中医证候研究中的应用展望[J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(01): 141-143.
- 11 周欣, 薛文达, 李守雪, 张海楼, 夏宝妹, 曲森, 陈刚, 唐启盛. 不同抑郁症模型下证候差异的品系依赖性研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18(02): 151-156.
- 12 Golden SA, Covington HE 3rd, Berton O, Russo SJ. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat Protoc*. 2011, 6 (8): 1183-91.
- 13 方肇勤, 潘志强, 卢文丽, 刘小美, 管冬元, 梁超. 大鼠和小鼠辨证论治标准的建立和用途[J]. 中西医结合学报, 2009, 7(10): 907-912.
- 14 Zhang JC, Li SX, Hashimoto K. R (-)-ketamine shows greater potency and longer lasting antidepressant effects than S (+) -ketamine. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014.
- 15 Krishnan V, Han MH, Graham DL, et al. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*. 2007, 131(2): 391-404.
- 16 Anacker C, Luna VM, Stevens GS, et al. Hippocampal neurogenesis confers stress resilience by inhibiting the ventral dentate gyrus. *Nature*. 2018, 559(7712): 98-102.
- 17 朱智羽, 郭闫葵. 中医辨证下的抑郁症病因病机及治疗概述[J]. 中医药临床杂志, 2019, 31(04): 788-791.
- 18 张煜萱, 崔博, 邹之璐, 任荔, 陈刚. 越鞠丸治疗气郁体质抑郁症患者及改善血清 BDNF 水平的临床对照研究[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(05): 960-963.
- 19 Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry*. 2001, 50(4): 260-5.
- 20 Breuillaud L, Rossetti C, Meylan EM, et al. Deletion of CREB-regulated transcription coactivator 1 induces pathological aggression, depression-related behaviors, and neuroplasticity genes dysregulation in mice. *Biol Psychiatry*. 2012, 72(7): 528-36.
- 21 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[J]. *Neural Plast*, 2017, 2017: 9160515.
- 22 陈茵, 邹之璐, 何骁隼, 周欣, 黄志恒, 李筱琪, 李文佳, 张煜萱, 陈刚. 抑郁症气虚证候模型小鼠的药物反证与分子信号研究[J]. 南京中医药大学学报, 2018, 34(02): 147-151.

## The differences of common susceptibility to depression-like phenotypes and qi deficiency syndromes in Balb/c and 129/S1 mice and the molecules of the intervention effect of Yueju pills

Xu Liantiao<sup>1</sup>, Li Wenjia<sup>1</sup>, Chen yin<sup>1</sup>, Li Xiaoqi<sup>1</sup>, Yang Qingqing<sup>1</sup>, Wu Haoxin<sup>1</sup>, Chen Gang<sup>2</sup>, Zhou Xin<sup>1</sup>  
(1. Chinese medicine encephalopathy research laboratory, school of Basic Biomedical; Science, Nanjing  
University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Institute of interdisciplinary research in  
individualized medicine of encephalopathy, Jinan university, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** Objective To compare the differences of the syndrome of the two strains of Balb/c and 129/S1 mice in different depression models, and the effect of Yueju pill on the phenotype of depression and the related molecular pathways of the two-strain mice after suffered chronic unpredictable and mild stress (CUMS). Methods social defeat stress (SD) and CUMS were used to induce depression on Balb/c and 129/S1 inbred mice. Through sucrose preference test, forced swimming test, novelty suppressed feeding test to assess depressive/anxiety-like behavior in mice, and forelimb grasp strength, claw color and exhausted swim of mice were tested to evaluate the qi deficiency syndrome. Model mice of CUMS were divided into model group, Yueju pill group and fluoxetine group. After one week of administration, a series of behavioral tests were conducted to evaluate the improvement effect of Yueju pill on depression and qi deficiency syndrome. Western Blot was used to detect the protein expression of the PKA-CREB signaling pathway in the muscle and hippocampus tissue of mice. Results male Balb/c and 129/S1 mice showed significantly reduced sucrose preference, significantly prolonged forced swimming time or significantly shortened social interaction time and other depressive behaviors under the two models, while Balb/c mice showed qi deficiency syndrome in grasping strength degree of claw color phenotype, while 129/S1 mice showed no similar syndrome. Behavioral results further showed that Yueju pill could reverse the depression phenotype of mice of both strains after CUMS, but could not reverse the qi-deficiency phenotype of Balb/c mice. At the protein level, we observed that compared with the depressed mice, the expression of PKA and CREB phosphorylated protein in hippocampus and muscle in the two strains of Yueju pill group was significantly up-regulated. Conclusion In the SD and CUMS depression models, both Balb/c and 129/S1 mice showed depression-like behaviors, and only Balb/c mice showed qi deficiency syndrome. Yueju pill can reverse the depression-like behavior of the two strains of mice after CUMS, it cannot effectively reverse the syndrome of qi deficiency in Balb/c mice, and the antidepressant effect of Yueju pill is related to the activation of the PKA-CREB signaling pathway.

**Keywords:** Depression, Syndrome differences, Yueju pill, Social defeat stress, Chronic unpredictable stress, The PKA-CREB signaling pathway

(责任编辑: 闫 群, 责任译审: 钱灵姝)