

· 实验研究 ·

民族药铁包金基于 FGF2/FGFR1 通路改善抑郁样行为的作用机制研究[※]

● 李成付¹ 张秋萍¹ 万慧琪² 许光辉² 易立涛³

摘要 目的:观察民族药铁包金对脂多糖(LPS)诱导的抑郁样行为的干预作用,并探讨其基于 FGF2/FGFR1 信号通路的分子作用机制。方法:将 150 只 SPF 级雄性小鼠随机分成 3 批,每批分成 5 组,即模型组、铁包金低剂组(2 g/kg)、铁包金中剂组(4 g/kg)、铁包金高剂组(8 g/kg)、氟西汀组(20 mg/kg),各组给药 1 h 后分别进行强迫游泳实验(FST)、悬尾实验(TST)及开场实验(OFT)。另取 60 只 SPF 级雄性小鼠随机分成 6 组,即正常对照组、模型对照组、铁包金低剂组(2 g/kg)、铁包金中剂组(4 g/kg)、铁包金高剂组(8 g/kg)、氟西汀组(20 mg/kg),各组持续给予相应药物 7 d,最后一次给药后注射 LPS,采用糖水偏好实验和 FST 评价动物抑郁样行为。采用 Western Blot 方法测小鼠海马组织中成纤维细胞生长因子 2(FGF2)、磷酸化及总成纤维细胞生长因子受体 1(FGFR1)的含量。结果:铁包金可以缩短小鼠强迫游泳和悬尾不动时间,对小鼠自发活性行为则没有影响,提示铁包金具有良好的抗抑郁效果。同时,铁包金能够显著增加 LPS 抑郁小鼠糖水偏好值,减少小鼠游泳不动时间;并可显著增加小鼠大脑海马 FGF2 表达量,提高 FGFR1 磷酸化水平。结论:铁包金具有抗抑郁作用,其作用机制与激活大脑海马 FGF2/FGFR1 信号通路相关。

关键词 铁包金;抑郁症;成纤维细胞生长因子 2;成纤维细胞生长因子受体 1

抑郁症是一种常见的精神性疾病,临床表现主要是情绪低落,患者往往愁眉苦脸,感受情绪能力差,对身边事物没有兴趣,从日常生活中体验不到快乐。世界卫生组织指出目前抑郁症影响全球 1.2 亿人,已成为全球第二大负担疾病。抑郁症的发病率和复发率较高,治疗药物价格相对昂贵,对患者家庭和社会产生了相当沉重的经济压力。因此,迫切需要价格低廉、疗效好的抗抑郁药物。

铁包金始载于《岭南采药录》,并为《广西中药材

标准(1990)》所收录,该标准收录的铁包金是鼠李科勾儿茶属植物细叶勾儿茶 *Berchemia lineata* (L.) DC. 的干燥根,主要分布于我国南部的广西、福建、广东、海南等省区。其性味淡、涩、平,具有固肾益气、镇咳消滞、止血止痛等多种功效,用于肿瘤、精神病、心脏病等多种疾病的治疗。关于铁包金的报道主要集中于对其化学成分的研究,而对其药理活性的研究较少。张国利分离到槲皮素、异鼠李素、槲皮素-7-二甲醚、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、大黄素-鼠李糖苷、异乔木萜醇和 β-谷甾醇^[1];沈玉霞则分离得到 9 个黄酮类化合物,4 个蒽醌类化合物,4 个木脂素类化合物和 1 个萜类化合物^[2];曾晓君分离得到数个甾醇类化合物和几个黄酮衍生物^[3]。药理学研究资料则较少,仅发现铁包金具有抗炎镇痛、抗肝损伤和抗肿瘤等活性。因此,进一步拓展铁包金的药理活性,有助于进一步开发民族药铁包金的应用价值。本文首次通过行为

[※]基金项目 福建省卫生教育联合攻关计划项目(No.2019-WJ-38);厦门市科技计划(No.3502Z20179012;No.3502Z20179013)

• 作者单位 1.厦门市中医院(福建 厦门 361009);2.厦门市医药研究所(福建 厦门 361008);3.华侨大学(福建 厦门 361021)

学模型评价铁包金的抗抑郁作用,并从成纤维细胞生长因子 2(FGF2)/成纤维细胞生长因子受体 1(FGFR1)信号通路探索其抗抑郁作用机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 ICR 小鼠,SPF 级,体重(26±2)g,10 周龄,购自上海斯莱克动物中心,实验动物许可证:SCXK(沪)2017-005。小鼠 10 只/笼,室温(22±2)°C,光暗周期为 12 h/12 h(光照时间 07:00—19:00),自由获得饲料与饮水,适应环境 1 W 后开始实验。

1.2 药物及试剂 盐酸氟西汀(购自常州四药制药有限公司)用磷酸盐缓冲液(pH7.4)溶解;LPS(美国 Sigma-Aldrich 公司)用磷酸盐缓冲液(pH7.4)溶解。FGF2 抗体购买自美国 Santa Cruz 公司。磷酸化 FGFR1 抗体、FGFR1 抗体购买自美国 Abcam 公司。

1.3 铁包金粉末制备 铁包金 2018 年采集于广西,经厦门市中医院陈雪梅主任药师鉴定为鼠李科勾儿茶属植物细叶勾儿茶 *Berchemia lineata* (L.) DC. 的干燥根。采用液氮低温粉碎铁包金之后,用 0.5% 的 CMC-Na 制备混悬液。

2 方法

2.1 急性给药实验 雄性 ICR 小鼠 150 只,适应性喂养 1 W 后,将小鼠随机分为三批。每批分为以下 5 组(n=10):模型对照组(生理盐水),铁包金低剂组(2 g/kg),铁包金中剂组(4 g/kg),铁包金高剂组(8 g/kg),阳性对照氟西汀组(20 mg/kg)。按以上分组灌胃给药,给药 1 h 后,分别进行强迫游泳实验、悬尾实验和开场实验。

2.1.1 强迫游泳实验 在(25±2)°C 下,将小鼠放置在充满 40 cm 水的透明玻璃容器(高 20 cm,直径 14 cm)中游泳。除了小鼠试图使头部保持在水面之上所必需的动作以外,小鼠没有试图逃脱的时间被记录为不动时间。实验持续 6 min,统计最后 4 min 内的不动时间。

2.1.2 悬尾实验 将小鼠尾巴距尾尖约 1 cm 处悬挂在长、宽和高分别是 25 cm、25 cm 和 30 cm 的装置中,头部朝下悬挂,距离底部约 5 cm,总记录时间为 6 min,统计小鼠后 4 min 内总不动时间,即小鼠完全没有挣扎的状态。

2.1.3 开场实验 将小鼠置入一个长宽均为 40 cm、高为 30 cm 的白色旷场内,底板也为白色,且其底部划分为 25 块相等的正方形(8×8 cm),每次将小鼠放在正中央格子后开始计时,每次计时 3 min,监测指标

为小鼠跨格次数及仅后肢站立的直立次数。

2.2 脂多糖(LPS)实验 雄性 ICR 小鼠 60 只,适应性喂养 1 W 后,将小鼠随机分为以下 6 组(n=10):正常对照组(生理盐水),模型对照组(生理盐水),铁包金低剂组(2 g/kg),铁包金中剂组(4 g/kg),铁包金高剂组(8 g/kg),氟西汀组(20 mg/kg)。按以上分组持续灌胃给药 7 d,最后 1 次给药 1 h 后,除正常对照组外,其余组的小鼠腹腔注射 0.83 mg/kg LPS^[4],进行糖水偏好实验及强迫游泳实验,之后处死动物取大脑海马组织。

2.2.1 糖水偏好实验 按照之前的文献^[5]进行适当的更改。在测试之前,对小鼠进行糖水训练。将两瓶 1% 蔗糖溶液在每个笼子上放置 24 h,然后用一瓶纯水代替一瓶 1% 蔗糖溶液 24 h,期间,12 h 时对水瓶更换一次位置。适应后,剥夺水食 12 h,之后开始正式实验。在测试过程中,将小鼠置于单独的笼子中,小鼠可以分别在两个瓶子中自由饮用 1% 蔗糖溶液和水。在实验开始 12 h 后,将 1% 蔗糖溶液和水互换位置。24 h 后,记录消耗的蔗糖溶液和水的重量,并计算糖水偏好值。

2.2.2 强迫游泳实验 同 2.1.1。

2.2.3 组织提取 强迫游泳实验后,摘小鼠眼球快速放光血液。然后断头处死小鼠,快速取出海马,立即用液氮冻结。组织样本在-80 °C 下贮存至分析完成。

采用 RIPA 裂解液对海马组织进行匀浆,随后于层析柜振荡器中振荡 15 min,之后将匀浆液以 12000 r/min 的速率离心 5 min,取上清液测定蛋白浓度。蛋白溶液在加入上样缓冲液后,进行 SDS-PAGE 电泳并转膜。5% 小牛血清蛋白封闭 1 h 后,加入相应抗体(1:1000)孵育过夜,之后加入连接 HRP 的二抗并孵育 1 h。最后采用 ECL 显影液于化学发光成像仪中曝光成像。

2.3 数据分析 所有的数据用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 16.0 软件进行数据分析。统计差异用单因素方差分析结合 Tukey 检验。 $P < 0.05$ 代表差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 急性给药实验

3.1.1 铁包金对小鼠游泳不动时间的影响 给药 1 h 后,低、中、高剂量的铁包金均能显著降低小鼠的游泳不动时间($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$),同时阳性药氟西汀也可显著降低小鼠的游泳不动时间($P < 0.05$)。

见表1。

表1 铁包金对小鼠强迫游泳实验中不动时间的影响(n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	不动时间(s)
模型对照组	140.3±16.2
铁包金低剂组	96.3±8.5*
铁包金中剂组	85.2±9.3*
铁包金高剂组	75.3±6.3**
氟西汀组	91.7±9.6*

注:与模型对照组比较,*P<0.05,**P<0.01

3.1.2 铁包金对小鼠悬尾不动时间的影响 给药1 h后,低、中、高剂量的铁包金均能显著降低小鼠的悬尾不动时间(P<0.05或P<0.01),同时阳性药氟西汀也可显著降低小鼠的悬尾不动时间(P<0.01)。见表2。

表2 铁包金对小鼠悬尾实验中不动时间的影响(n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	不动时间(s)
模型对照组	106.6±8.6
铁包金低剂组	70.6±8.2*
铁包金中剂组	68.3±5.5*
铁包金高剂组	51.3±8.3**
氟西汀组	56.2±8.7**

注:与模型对照组比较,*P<0.05,**P<0.01

3.1.3 铁包金对自发活动的影响 给药1 h后,低、中、高剂量铁包金及氟西汀对小鼠跨格次数和直立次数均没有显著性影响。见表3。

表3 铁包金对小鼠开场实验中自发活动的影响(n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	跨格次数	直立次数
模型对照组	61.5±7.3	24.5±3.6
铁包金低剂组	64.2±4.6	27.4±6.7
铁包金中剂组	59.7±6.4	18.5±5.8
铁包金高剂组	62.4±7.2	23.1±4.7
氟西汀组	61.1±5.7	21.1±4.5

3.2 LPS实验

3.2.1 铁包金对LPS小鼠糖水偏好值的影响 与正常对照组相比,模型对照组小鼠糖水偏好值显著降低(P<0.01)。低、中、高剂量铁包金均可显著增加小鼠糖水偏好值(P<0.05, P<0.01, P<0.01)。同时,氟西汀组也可增加小鼠糖水偏好值(P<0.01)。见表4。

3.2.2 铁包金对LPS小鼠游泳不动时间的影响 与正常对照组相比,模型对照组小鼠不动时间显著增加(P<0.01)。中、高剂量铁包金可显著降低小鼠不动时间(P<0.05)。同时,氟西汀组也可降低小鼠不动时间(P<0.05)。见表5。

3.2.3 铁包金对小鼠海马 FGF2及FGFR1表达水平

表4 铁包金对LPS小鼠糖水偏好值的影响(n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	糖水偏好值(%)
正常对照组	79.6±5.5
模型对照组	53.7±4.7##
铁包金低剂组	70.5±8.5*
铁包金中剂组	80.5±6.7**
铁包金高剂组	81.5±6.3**
氟西汀组	79.5±5.8**

注:与正常对照组比较,##P<0.01;与模型对照组比较,*P<0.05,**P<0.01

表5 铁包金对LPS小鼠游泳不动时间的影响(n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	不动时间(s)
正常对照组	79.7±9.3
模型对照组	128.6±12.7##
铁包金低剂组	93.2±12.3
铁包金中剂组	66.3±9.6*
铁包金高剂组	62.3±7.8*
氟西汀组	65.8±7.5*

注:与正常对照组比较,##P<0.01;与模型对照组比较,*P<0.05

的影响 与正常对照组相比,模型对照组小鼠 FGF2及磷酸化FGFR1水平显著降低(P<0.05)。中、高剂量铁包金可显著增加LPS小鼠海马 FGF2表达水平(P<0.05, P<0.01)。低、中、高剂量铁包金均可显著增加LPS小鼠海马FGFR1磷酸化水平(P<0.05, P<0.05, P<0.01)。同时,氟西汀也可以增加 FGF2及磷酸化FGFR1水平(P<0.01, P<0.01)。见图1。

4 讨论

中医认为肝主疏泄,性喜条达,情绪郁闷及情绪暴怒等精神刺激,均可使肝失疏泄,气机不畅,以致忧思郁怒,肝气郁结,因此中医主要是从消郁结着手治疗抑郁症。《广西中药材标准》记载民族药铁包金具有镇咳消滞的功效,此功效正适合郁证“气机郁滞”之病机,因此本文首次对铁包金是否具有抗抑郁作用展开了研究。

本实验首先采用强迫游泳实验和悬尾实验来观察铁包金是否具有改善小鼠绝望状态的作用。结果发现,铁包金显著降低了小鼠游泳和悬尾不动时间。与此同时,在开场实验中,铁包金对小鼠自发活动行为没有影响,表明铁包金降低不动时间的作用与神经兴奋性没有关系,即铁包金具有抗抑郁作用。随后,本实验采用LPS诱导的抑郁模型再次评价了铁包金的抗抑郁作用。LPS诱导的炎症抑郁模型广泛地被用于与炎症相关的机制研究^[6]。结果表明,LPS显著降低了小鼠的糖水偏好值和增加了小鼠的游泳不动时

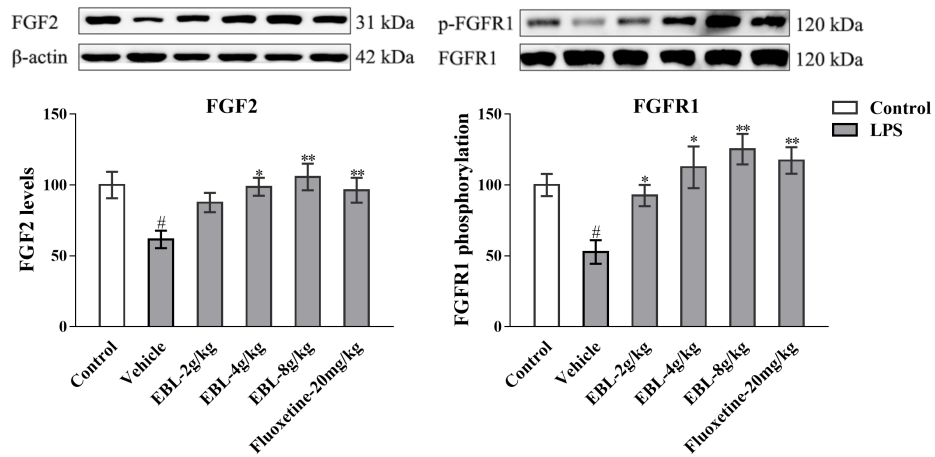


图1 铁包金对LPS小鼠FGF2及FGFR1表达水平的影响(n=5)

间,表明LPS诱导了小鼠的快感缺失和绝望等抑郁行为,铁包金给药之后,显著增加了糖水偏好值和降低了不动时间,表明铁包金具有较好的抗抑郁作用。

FGF是一类生长因子蛋白质家族,包含多个结构相似的多肽。在成年大脑中,FGF2主要在脑室下区和齿状回高度表达,高浓度的FGF2可以促进神经细胞增殖以及促进多能神经干细胞分化,维持成年小鼠的神经发生^[7]。因此激活FGF2信号通路对中枢神经系统疾病具有潜在的治疗作用^[8]。同时有报道指出,神经炎症下调了FGF2-ERK1/2信号通路。外源FGF2可以防止神经炎症引起的ERK1/2磷酸化减少,减轻海马神经发生中神经炎症引起的损伤,从而缓解了神经炎症诱导的抑郁样行为^[9-10]。本实验中,LPS模型组小鼠海马FGF2含量明显低于正常组,说明LPS抑制了小鼠海马FGF2的表达。给予中剂量和高剂量铁包金之后,可增加海马FGF2的表达;与之相对应的是,LPS模型组小鼠海马FGFR1磷酸化程度明显低于正常组,说明LPS抑制了小鼠海马FGFR1的磷酸化。给予铁包金之后,均可增加海马FGFR1的磷酸化。以上结果说明铁包金可以激活海马FGF2/FGFR1信号通路,从而产生抗抑郁作用。

综上所述,铁包金单次及多次给药均可缓解绝望及快感缺失等抑郁症状,能够逆转LPS诱导的小鼠抑郁样行为。同时本实验探讨了铁包金的抗抑郁作用机制与FGF2/FGFR1信号通路的活化相关,但是实验没有对铁包金有效成分进行分离,未对FGF2/FGFR1下游信号蛋白进行检测,也没有对铁包金如何通过FGF2/FGFR1通路调节小胶质细胞和神经炎症进行深入研究。其后续研究将对抗抑郁新药的开发具有重

要的意义。

参考文献

- [1]张国利. 铁包金化学成分研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2011.
- [2]沈玉霞. 铁包金化学成分的研究[D]. 武汉:中南民族大学,2011.
- [3]曾晓君,胡颖,文晓琼,等. 瑶药铁包金化学成分研究[J]. 中药材,2012,35(2):223-225.
- [4]YI LT, ZHU JX, DONG SQ, et al. miR-34a induces spine damages via inhibiting synaptotagmin-1 in depression[J]. Neurobiol Stress, 2020, 13(10):243-251.
- [5]LIU MY, YIN CY, ZHU LJ, et al. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice[J]. Nat Protoc, 2018, 13(7):1686-1698.
- [6]CHEN M, ZHANG QP, ZHU JX, et al. Involvement of FGF-2 modulation in the antidepressant-like effects of liquiritin in mice[J]. Eur J Pharmacol, 2020, 54(881):273-297.
- [7]KIN K, YASUHARA T, KAMEDA M, et al. Cell encapsulation enhances antidepressant effect of the mesenchymal stem cells and counteracts depressive-like behavior of treatment-resistant depressed rats[J]. Mol Psychiatry, 2020, 25(6):1202-1214.
- [8]TURNER CA, WATSON SJ, AKIL H. Fibroblast Growth Factor 2 Sits at the Interface of Stress and Anxiety[J]. Biol Psychiatry, 2016, 80(6):419-421.
- [9]RAJENDRAN R, GIRALDO-VELASQUEZ M, STADELMANN C, et al. Oligodendroglial fibroblast growth factor receptor 1 gene targeting protects mice from experimental autoimmune encephalomyelitis through ERK/AKT phosphorylation[J]. Brain Pathol, 2018, 28(2):212-224.
- [10]TANG MM, LIN WJ, ZHANG JT, et al. Exogenous FGF2 reverses depressive-like behaviors and restores the suppressed FGF2-ERK1/2 signaling and the impaired hippocampal neurogenesis induced by neuroinflammation[J]. Brain Behav Immun, 2017, 66(11):322-331.

(收稿日期:2020-01-24)

(本文编辑:金冠羽)