· 基础研究 ·

# 四逆散含药血清对皮质酮损伤 PC12 细胞钙敏感受体相关作用机制研究

莫海欣[1, 2]　张　荣[3]　王　坤[1]　沈崇坤[1]　董钊扬[4]　张　劲[1]　史亚飞[1]

**摘要**　**目的**　探讨四逆散对皮质酮诱导 PC12 细胞损伤的干预作用是否与钙敏感受体（CaSR）以及细胞凋亡密切相关。**方法**　以四逆散含药血清为干预药物，将 PC12 细胞分为空白血清组、皮质酮组、2.5%、5%、10% 含药血清组，MTT 法检测细胞存活率。通过 Annexin Ⅴ /PI 流式细胞分析法、蛋白免疫印迹技术对细胞凋亡率以及 C-Caspase3、C-Caspase9、Bax（6A7）、细胞 Cytochrome C 蛋白进行检测。通过 Annexin Ⅴ /PI 流式细胞分析法检测四逆散含药血清联合 CaSR 激动剂（$GdCl_3$）或 CaSR 抑制剂（NPS2390）各组细胞的凋亡率。**结果**　与空白血清组比较，皮质酮组存活率、CaSR 蛋白表达量降低（$P$<0.01，$P$<0.05）；皮质酮组凋亡率、C-Caspase3、C-Caspase9、Bax（6A7）以及胞浆 Cytochrome C 蛋白表达量增加（$P$<0.01，$P$<0.05）。与皮质酮组比较，含药血清组存活率增加（$P$<0.01），5%、10% 含药血清组 CaSR 蛋白表达量及皮质酮 +NPS2390 组凋亡率增加（$P$<0.01，$P$<0.05）；含药血清组、皮质酮 +$GdCl_3$ 组凋亡率降低（$P$<0.01）和 10% 含药血清组 C-Caspase3、C-Caspase9、Bax（6A7）、胞浆 Cytochrome C 蛋白表达量降低（$P$<0.01）。与皮质酮 +10% 含药血清组比较，皮质酮 +10% 含药血清 +NPS2390 组凋亡率增加（$P$<0.01）。与皮质酮 +$GdCl_3$ 组比较，皮质酮 +10% 含药血清 +$GdCl_3$ 组凋亡率差异无统计学意义（$P$>0.05）。**结论**　四逆散含药血清可以抑制皮质酮诱导的 PC12 细胞凋亡，其作用机制与 CaSR 有关。

**关键词**　PC12 细胞；四逆散；抑郁症；凋亡；钙敏感受体

**Study on the Mechanism of Serum Containing Sini San on CaSR of PC12 Cells Injured by Corticosterone**

MO Hai-xin[1, 2], ZHANG Rong[3], WANG Kun[1], SHEN Chong-kun[1], DONG Zhao-yang[4], ZHANG Jin[1], and SHI Ya-fei[1]　*1 School of Basic Medicine Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510006); 2 Clinical Experimental Center, Jiangmen Central Hospital, Guangdong (529030); 3 International Institute for Translational Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510006); 4 School of Nursing, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510006)*

**ABSTRACT**　**Objective**　To investigate whether the intervention effect of Sini San on corticosterone-induced PC12 cell injury is closely related to calcium sensitive receptor (CaSR) and cells apoptosis. **Methods**　With serum containing Sini San as the intervention drug, PC12 cells were divided into blank serum group, corticosterone group, 2.5%, 5% and 10% medicated serum group, and the cells survival rate was detected by MTT method. The cells apoptosis rate was determined using Annexin Ⅴ /PI with flow cytometry. The expression of C-Caspase3, C-Caspase9, Bax (6A7) and cytoplasmic Cytochrome C protein were detected by Western Blot. The apoptosis rate of each group cells in serum containing Sini

基金项目：国家自然科学基金资助项目（No. 81873271，No. 82074219）；广东省自然科学基金资助项目（No. 2021A1515012572）；广州市科技计划项目（No.202002030009）；广州中医药大学科研团队项目（No.2019KYTD301）

作者单位：1. 广州中医药大学基础医学院（广州 510006）；2. 广东省江门市中心医院中心实验室（广东 529030）；3. 广州中医药大学国际中医药转化医学研究所（广州 510006）；4. 广州中医药大学护理学院（广州 510006）

通讯作者：史亚飞，Tel：020-39356128，E-mail：446750173@qq.com

DOI：10.7661/j.cjim.20211216.194

中国中西医结合杂志

San combined with CaSR agonist（$GdCl_3$）or CaSR inhibitor（NPS2390）was determined by Annexin Ⅴ / PI with flow cytometry. **Results** Compared with the blank serum group，the survival rate and CaSR protein expression in corticosterone group decreased（*P*<0.01，*P*<0.05）. The apoptosis rate，the expression of C-Caspase3，C-Caspase9，Bax（6A7）and cytoplasmic Cytochrome C protein increased in corticosterone group（*P*<0.01，*P*<0.05）. Compared with the corticosterone group，the survival rate of medicated serum groups were increased（*P*<0.01），the CaSR protein expression of the 5%，10% medicated serum groups，and the apoptosis rate of corticosterone + NPS2390 group were increased（*P*<0.01，*P*<0.05）；The apoptotic rate in medicated serum groups and corticosterone+$GdCl_3$ decreased（*P*<0.01），the expression levels of C-Caspase3，C-Caspase9，Bax（6A7）and cytoplasmic Cytochrome C protein were reduced in 10% serum group（*P*<0.01）. Compared with corticosterone + 10% medicated serum group，the apoptosis rate in corticosterone + 10% medicated serum+NPS2390 group increased（*P*<0.01）. There are no significant change in the apoptosis rate in corticosterone+10% medicated serum + $GdCl_3$ group，compared with the corticosterone + $GdCl_3$. **Conclusion** Sini San medicated serum can inhibit the apoptosis of PC12 cells induced by corticosterone，and its effect is related to the CaSR.

**KEYWORDS** PC12 cells；Sini San；depression；apoptosis；calcium sensitive receptor

抑郁症是一种常见的精神疾病，主要表现为情绪低落、悲观失望、郁郁寡欢，甚至产生自杀的言行，严重影响患者的工作、学习以及生活。目前，关于抑郁症的发病机制尚未明确，但有研究证实，细胞凋亡与抑郁症的发病密切相关[1-4]。最新研究表明，钙敏感受体（calcium sensitive receptor，CaSR）在突触可塑性和神经信号传导中发挥着重要的作用[5]，它可以促进树突的发育[6]，介导细胞凋亡、增殖以及分化[7]。本课题组前期研究发现，母婴分离联合慢性温和不可预知性应激降低大鼠海马和前额叶皮质中 CaSR 蛋白的表达，而四逆散能增加其 CaSR 蛋白的表达[8]。提示 CaSR 及其介导的信号通路可能将成为抑郁症研究的一个新的重要潜在靶点。卢玉姗[9]研究发现，当 $Ca^{2+}$ 在生理范围，CaSR 对细胞凋亡起抑制的作用，且 $CaSR^{-/-}$ 小鼠神经干细胞的凋亡率高于 $CaSR^{+/+}$ 小鼠神经干细胞的凋亡率。这些研究表明 CaSR 可能参与了抑郁症的发病机制，且可能与细胞凋亡有关，但对于抑郁症中 CaSR 是如何调控细胞凋亡的作用机制尚不明确。

中医学将抑郁症归属于“郁证”范畴[10]。本课题组长期开展抑郁症相关机制研究，发现抑郁症的病机与肝郁密切相关，采用调肝方药干预能够有效地改善抑郁模型大鼠的抑郁样行为[11, 12]。四逆散作为调肝方药的代表方之一，具有透邪解郁，疏肝理脾的功效。本课题组前期发现，四逆散可以改善大鼠的抑郁样行为[8, 13]。

CaSR 在抑郁症脑中枢领域的相关研究报道尤为缺乏，它作为神经科学研究的一个新兴靶点，其参与神经细胞凋亡的机制有待阐明。本研究以皮质酮损伤 PC12 细胞作为体外抑郁模型，从 CaSR 以及细胞凋亡入手，探讨四逆散对皮质酮诱导 PC12 细胞损伤的作用机制。

## 材料与方法

1 动物、细胞 SPF 级 8 周龄雄性 SD 大鼠，动物合格证号：1107261911001291。购于长沙天勤生物技术有限公司，动物许可证号：SCXK（湘）2019-0014，饲养于广州中医药大学中西医结合基础研究中心动物房，本研究经广州中医药大学动物实验伦理委员会审核（No.20200810004）。从中国科学院细胞库购入高分化 PC12 细胞（大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株，目录号：TCR 9）。

2 药物 四逆散由柴胡、芍药、枳实、甘草各 6 g 组成。药材购买自广州中医药大学第一附属医院中药房，药材饮片均经医院药剂科鉴定。药物超纯水煎煮 2 次，合并 2 次滤液，浓缩至含生药 1 g/mL，混匀，分装，于 -20 ℃冰箱储存备用。

3 试剂与仪器 多聚赖氨酸购自美国 Sigma 公司（批号：SLBV4845）；RPMI-1640 培养基（批号：8120192）、PBS 缓冲液（批号：8120388）、胎牛血清（FBS，批号：2275138）购自美国 Gibco 公司（批号分别为：8120192、8120388、2275138）；0.25% 胰蛋白酶购自德国 BioFroxx 公司（批号：EZ6789C134）；MTT 试剂购自广州瑞舒生物科技有限公司；皮质酮（批号：BCBT8610）、$GdCl_3$（批号：0000055829）购自美国 Sigma 公司（批号分别为：BCBT8610、0000055829）；胞质蛋白提取试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司（批号：BB20101）；

Annexin Ⅴ/PI 试剂盒购自美国 BD 公司（批号：0076884）；BCA 蛋白含量检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司（批号：20200630）；SDS-PAGE Loading Buffer（5×）购自北京康为世纪生物科技有限公司（批号：60444）；PVDF 膜购自美国 Millipore 公司（批号：R9NA96863）；预染蛋白 marker 购自美国 Thermo 公司（批号：00686128）；极敏化学发光试剂（批号：1815b02）、Tubulin alpha Ab 抗体（批号：16e9425）、GAPDH Ab 抗体（批号：62u0922）、Calcium Sensing Receptor Ab 抗体（批号：23k9623）、Goat Anti-Rabbit IgG（H+L）HRP（批号：68u6798）均购自美国 Affinity 公司（批号分别为：1815b02、16e9425、62u0922、23k9623、68u6798）；Bax（6A7）抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司（批号：B1820）；Cleaved Caspase-3 抗体（货号：9664S）、Cleaved Caspase-9 抗体（货号：9502S）、Cytochrome C 抗体（货号：11940T）购自美国 Cell Signaling Technology 公司（货号分别为：9664S、9502S、11940T 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司（批号：51Q001100）；NPS2390 购自英国 Tocris 公司（批号：1A/224660）；多功能酶标仪（型号：Enspire 2300）购自美国 Perkin Elmer 公司；垂直电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司（型号：164-5052）；化学发光仪购自上海天能科技有限公司（型号：Tanon5200）；BD Accuri C5 流式细胞仪（型号：BD Accuri C5）购自美国 BD 公司。

4　方法

4.1　细胞皮质酮模型建立　造模方法参考文献[14]，在皮质酮孵育细胞 24 h 与 48 h 的条件下，分别设立 0、50、100、200、400、600、800 μmol/L 组，每组设置 3 个复孔。种板前一天使用多聚赖氨酸包被培养板，把处于对数生长期的细胞以 2 500 个/孔的密度接种于 96 孔板，种板 24 h 细胞贴壁，再待 2 h 后，分别给予不同浓度的皮质酮，皮质酮分别孵育 24、48 h，使用 MTT 法对细胞存活率进行测定，检测波长 490 nm。

4.2　四逆散含药血清制备　大鼠适应性饲养于 SPF 级动物房 1 周，按体重随机分为空白组和给药组。空白组给予蒸馏水灌胃，给药组给予四逆散灌胃，两组均按照 1 mL/100 g 进行 3 天 7 次灌胃。末次给药 1 h 后，经麻醉以后，腹主动脉取血，室温静置 2 h，3 000 r/min 离心 10 min，把同组大鼠的血清进行混合，在 56 ℃条件下水浴灭活 30 min，过滤，分装，于 -80 ℃冰箱储存备用。

4.3　MTT 检测 PC12 细胞存活率　将细胞分成空白血清、皮质酮、2.5%、5%、10% 含药血清 5 个组。种板 24 h 后，空白血清组与皮质酮组培养基更换为含 10% 大鼠空白血清培养基，2.5% 含药血清组培养基更换为含 7.5% 大鼠空白血清以及 2.5% 大鼠含药血清的培养基，5% 含药血清组培养基更换为含 5% 大鼠空白血清以及 5% 大鼠含药血清的培养基，10% 含药血清组培养基更换为含 10% 大鼠含药血清培养基。给予大鼠血清 2 h 以后，皮质酮组、2.5%、5%、10% 含药血清组均给予皮质酮处理，共孵育 48 h，使用 MTT 法对细胞存活率进行测定，检测波长 490 nm。

4.4　Annexin Ⅴ/PI 流式细胞分析法检测 PC12 细胞凋亡率　（1）把处于对数生长期的细胞以 12 万个/孔的密度接种于 6 孔板，后续处理同 4.3。（2）取处理完毕的细胞，PBS 清洗 1 次，胰酶消化细胞，1 500~2 000 r/min 离心 5 min。（3）去除上清，PBS 再清洗 1 次，再次离心。（4）阴性组使用 PBS 重悬，实验组使用 1×buffer 重悬。（5）阴性组不加任何荧光试剂，实验组使用 5 μL FITC 进行染色，20~25 min 后，实验组使用 3 μL PI 进行染色。（6）细胞混匀过滤后，使用流式细胞仪检测。

4.5　蛋白免疫印迹（Western Blot）检测 PC12 细胞凋亡蛋白以及 CaSR 蛋白　（1）把处于对数生长期的细胞以 12 万个/孔的密度接种于 6 孔板，后续处理同 4.3。（2）①全蛋白提取：PBS 清洗 2~3 次，使用蛋白裂解液对细胞进行裂解，冰上摇床裂解 30 min，把细胞刮取下来，转移至 EP 管中，冰上摇床再次裂解 30 min，4 ℃，13 400~14 000×$g$ 条件下离心 25 min，取上清。②胞浆蛋白提取：收集培养基，PBS 清洗 2~3 次，使用胰酶对细胞进行消化，终止消化，收集细胞悬液，1 500 r/min 离心 5 min。除去培养基，使用 PBS 清洗细胞 2 次，1 500 rpm 离心 5 min。除去 PBS，加入胞浆蛋白提取液，振荡。4 ℃ 16 000×$g$ 离心 5 min，收集上清。（3）BCA 定量，加热变性。（4）制作 SDS-PAGE 分离胶以及浓缩胶，进行 SDS-PAGE 电泳。（5）电转：把蛋白从凝胶转移至 PVDF 膜上。（6）1×TBST 洗膜，5% 脱脂牛奶封闭。（7）1×TBST 洗膜，一抗 4 ℃孵育过夜。（8）1×TBST 洗膜，二抗室温孵育 1 h，1×TBST 洗膜。（9）ECL 发光，使用 Iamage J 软件处理计算条带灰度值。

4.6　Annexin Ⅴ/PI 流式细胞分析法检测 PC12

细胞凋亡率　在空白血清、皮质酮、皮质酮 +10% 含药血清组 3 组分别加入 NPS2390 和 $GdCl_3$，将其分为 6 个组：空白血清组、皮质酮组、皮质酮 +10% 含药血清组、空白血清 +NPS2390/$GdCl_3$ 组、皮质酮 +NPS2390/$GdCl_3$ 组、皮质酮 +10% 含药血清 +NPS2390/$GdCl_3$ 组。种板 24 h 后，空白血清 +NPS2390/$GdCl_3$、皮质酮 +NPS2390/$GdC_{l3}$、皮质酮 +10% 含药血清 +NPS2390/$GdCl_3$ 组给予 NPS2390/$GdCl_3$ 处理。2 h 后，除空白血清组以及空白血清 +NPS2390/$GdCl_3$ 组外，其他组给予皮质酮刺激，共孵育 48 h。之后的处理操作同 4.4。

5　统计学方法　应用 SPSS 20 软件进行数据分析，数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用单因素方差分析，如果方差齐，则使用 *LSD* 进行组间比较；如果方差不齐，则使用 *Dunnett's T3* 法进行组间比较。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结　果

1　细胞皮质酮模型建立（表 1）　当皮质酮作用 PC12 细胞 24 h，与 0 μmol/L 组比较，50、100 μmol/L 组细胞存活率下降，但差异无统计学意义（$P>0.05$），200 μmol/L 组 PC12 细胞存活率下降至 80.24%（$P<0.05$），400、600、800 μmol/L 组 PC12 细胞存活率均显著下降（$P<0.01$）。当皮质酮作用 PC12 细胞 48 h，与 0 μmol/L 组比较，50、100、200、400、600、800 μmol/L 组 PC12 细胞存活率均下降显著（$P<0.01$）。其中，当 200 μmol/L 皮质酮作用于 PC12 细胞 48 h，细胞存活率为 58.17%，该造模浓度以及时间用于后续的体外实验。

**表 1**　不同浓度皮质醇对细胞存活率的影响　（%，$\bar{x} \pm s$）

| 皮质酮浓度（μmol/L） | *n* | 存活率 | |
|---|---|---|---|
| | | 24 h | 48 h |
| 0 | 3 | 100.00 ± 0.54 | 100.00 ± 1.67 |
| 50 | 3 | 83.46 ± 3.07 | 73.41 ± 1.00** |
| 100 | 3 | 82.70 ± 8.20 | 63.50 ± 0.13** |
| 200 | 3 | 80.24 ± 3.27* | 58.17 ± 0.37** |
| 400 | 3 | 68.08 ± 2.65** | 39.05 ± 0.34** |
| 600 | 3 | 59.56 ± 0.91** | 37.67 ± 0.21** |
| 800 | 3 | 44.62 ± 0.68** | 32.87 ± 1.00** |

注：与 0 μmol/L 组同期比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$

2　各组 PC12 细胞存活率比较（表 2）　与空白血清组比较，皮质酮组 PC12 细胞存活率下降（$P<0.01$）；与皮质酮组比较，2.5%、5%、10% 含药血清组 PC12 细胞存活率均上升（$P<0.01$）。根据实验结果，初步确定后续实验四逆散含药血清的低中高剂量组：2.5%、5%、10% 含药血清组。

**表 2**　各组 PC12 细胞存活率比较（%，$\bar{x} \pm s$）

| 组别 | *n* | 存活率 |
|---|---|---|
| 空白血清 | 4 | 100.00 ± 5.78 |
| 皮质酮 | 4 | 62.73 ± 4.72* |
| 2.5% 含药血清 | 4 | 73.75 ± 3.55△ |
| 5% 含药血清 | 4 | 84.85 ± 2.21△ |
| 10% 含药血清 | 4 | 90.92 ± 0.47△ |

注：与空白血清组比较，*$P<0.01$；与皮质酮组比较，△$P<0.01$

3　各组 PC12 细胞凋亡率比较（图 1，表 3）　与空白血清组比较，皮质酮组细胞凋亡率增加（$P<0.01$）；与皮质酮组比较，2.5%、5%、10% 含药血清组细胞凋亡率均减少（$P<0.01$）。

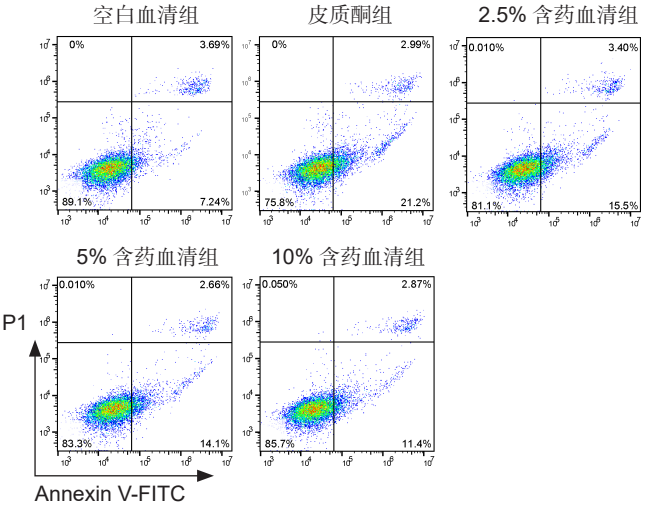



**图 1**　各组 PC12 细胞凋亡率比较

**表 3**　各组 PC12 细胞凋亡率比较　（%，$\bar{x} \pm s$）

| 组别 | *n* | 凋亡率 |
|---|---|---|
| 空白血清 | 3 | 9.96 ± 0.98 |
| 皮质酮 | 3 | 22.40 ± 1.72* |
| 2.5% 含药血清 | 3 | 17.03 ± 1.72△ |
| 5% 含药血清 | 3 | 15.49 ± 1.31△ |
| 10% 含药血清 | 3 | 12.69 ± 1.44△ |

注：与空白血清组比较，*$P<0.01$；与皮质酮组比较，△$P<0.01$

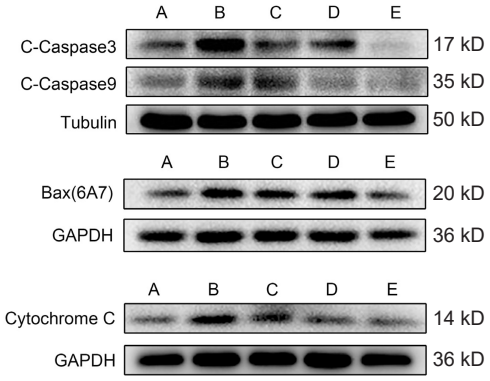
4　各组 PC12 细胞凋亡蛋白比较（图 2，表 4）　与空白血清组比较，皮质酮组细胞 C-Caspase3 蛋白表达量增加（$P<0.01$）；与皮质酮组比较，2.5%、5%、10% 含药血清组细胞 C-Caspase3 蛋白表达量降低（$P<0.05$，$P<0.01$）。

与空白血清组比较，皮质酮组细胞 C-Caspase9 蛋白表达量上升（$P<0.01$）；与皮质酮组比较，2.5% 含药血清组细胞 C-Caspase9 蛋白表达量稍微减少，差异无统计学意义（$P>0.05$），5%、10% 含药血清

表 4　各组 PC12 细胞凋亡蛋白比较（$\bar{x} \pm s$）

| 组别 | $n$ | C-Caspase3/Tubulin | C-Caspase9/Tubulin | Bax（6A7）/GAPDH | Cytochrome C/GAPDH |
|---|---|---|---|---|---|
| 空白血清 | 3 | 0.35 ± 0.19 | 0.64 ± 0.15 | 0.61 ± 0.11 | 0.68 ± 0.12 |
| 皮质酮 | 3 | 1.02 ± 0.09* | 0.94 ± 0.02* | 0.91 ± 0.02* | 0.93 ± 0.05* |
| 2.5% 含药血清 | 3 | 0.75 ± 0.07△ | 0.82 ± 0.07 | 0.81 ± 0.03 | 0.81 ± 0.07 |
| 5% 含药血清 | 3 | 0.53 ± 0.15△△ | 0.58 ± 0.11△△ | 0.72 ± 0.08△ | 0.75 ± 0.02 |
| 10% 含药血清 | 3 | 0.15 ± 0.05△△ | 0.38 ± 0.14△△ | 0.50 ± 0.12△△ | 0.45 ± 0.17△△ |

注：与空白血清组比较，*$P$<0.01；与皮质酮组比较，△$P$<0.05，△△$P$<0.01




注：A 为空白血清组；B 为皮质酮组；C 为 2.5% 含药血清组；D 为 5% 含药血清组；E 为 10% 含药血清组

图 2　各组 PC12 细胞凋亡蛋白比较

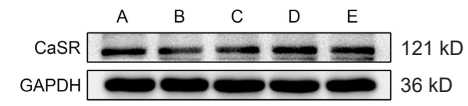
组细胞 C-Caspase9 蛋白表达量下降（$P$<0.01）。

与空白血清组比较，皮质酮组细胞 Bax（6A7）蛋白表达量增加（$P$<0.01）；与皮质酮组比较，2.5% 含药血清组细胞 Bax（6A7）蛋白表达量轻微下降，差异无统计学意义（$P$>0.05），5%、10% 含药血清组细胞 Bax（6A7）蛋白表达量降低（$P$<0.05，$P$<0.01）。

与空白血清组比较，皮质酮组细胞胞浆中 Cytochrome C 蛋白表达量上升（$P$<0.05）；与皮质酮组比较，2.5%、5% 含药血清组细胞胞浆中 Cytochrome C 蛋白表达量稍微减少，差异无统计学意义（$P$>0.05），10% 含药血清组细胞胞浆中 Cytochrome C 蛋白表达量下降（$P$<0.01）。

5　各组 PC12 细胞 CaSR 蛋白比较（图 3，表 5）与空白血清组比较，皮质酮组细胞 CaSR 蛋白表达量降低（$P$<0.05）；与皮质酮组比较，2.5% 含药血清组细胞 CaSR 蛋白表达量轻微增加，但差异无统计学意义（$P$>0.05），5%、10% 含药血清组细胞 CaSR 蛋白表达量显著增加（$P$<0.01，$P$<0.05）。

6　NPS2390 与四逆散联合使用对细胞凋亡的影响（图 4，表 6）　与空白血清组比较，皮质酮组细胞凋亡率增加（$P$<0.01）；与皮质酮组比较，皮质酮 +10% 含药血清组细胞凋亡率降低（$P$<0.01），皮质酮 +NPS2390 组细胞凋亡率增加（$P$<0.05）；与皮质




注：A 为空白血清组；B 为皮质酮组；C 为 2.5% 含药血清组；D 为 5% 含药血清组；E 为 10% 含药血清组

图 3　各组 PC12 细胞 CaSR 蛋白表达

表 5　各组 PC12 细胞 CaSR 蛋白表达比较（$\bar{x} \pm s$）

| 组别 | $n$ | CaSR/GAPDH |
|---|---|---|
| 空白血清 | 3 | 0.75 ± 0.10 |
| 皮质酮 | 3 | 0.57 ± 0.07* |
| 2.5% 含药血清 | 3 | 0.66 ± 0.02 |
| 5% 含药血清 | 3 | 0.75 ± 0.14△ |
| 10% 含药血清 | 3 | 0.81 ± 0.04△△ |

注：与空白血清组比较，*$P$<0.05；与皮质酮组比较，△$P$<0.05，△△$P$<0.01

酮 +10% 含药血清组比较，皮质酮 +10% 含药血清 +NPS2390 组细胞凋亡率增加（$P$<0.01）。

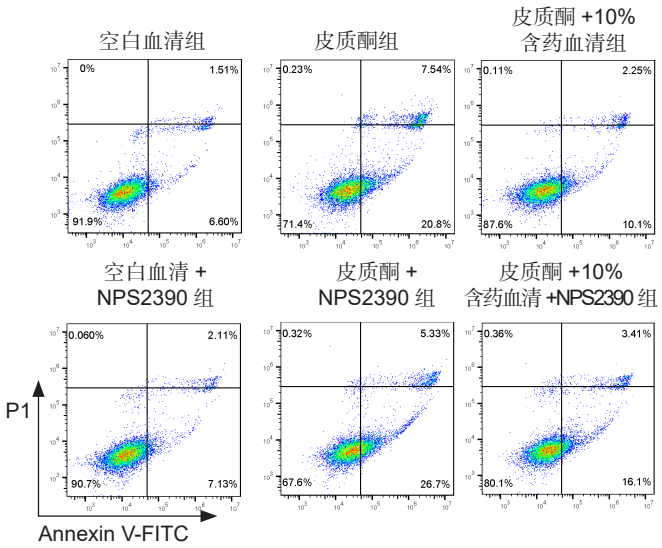



图 4　各组 P12 细胞凋亡结果

7　$GdCl_3$ 与四逆散联合使用对细胞凋亡的影响（图 5，表 7）　与空白血清组比较，皮质酮组细胞凋亡率增加（$P$<0.01）；与皮质酮组比较，皮质酮 +10% 含药血清组与皮质酮 +$GdCl_3$ 组细胞凋亡率均降低（$P$<0.01）；与皮质酮 +$GdCl_3$ 组比较，皮质酮 +

表 6 各组细胞凋亡率比较 （%，$\bar{x} \pm s$）

| 组别 | $n$ | 凋亡率 |
|---|---|---|
| 空白血清 | 3 | 8.74 ± 0.59 |
| 皮质酮 | 3 | 28.03 ± 0.36* |
| 皮质酮 +10% 含药血清 | 3 | 12.48 ± 0.16△△ |
| 空白血清 +NPS2390 | 3 | 9.31 ± 0.08 |
| 皮质酮 +NPS2390 | 3 | 32.84 ± 0.70△ |
| 皮质酮 +10% 含药血清 +NPS2390 | 3 | 19.53 ± 0.23▲ |

注：与空白血清组比较，*$P$<0.01；与皮质酮组比较，△$P$<0.05，△△$P$<0.01；与皮质酮 +10% 含药血清组比较，▲$P$<0.01

10% 含药血清 +$GdCl_3$ 组细胞凋亡率无显著变化，差异无统计学意义（$P$>0.05）。

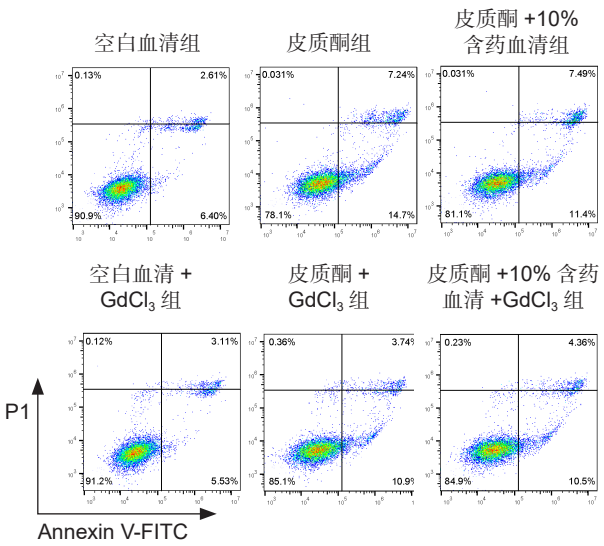



图 5 各组 P12 细胞凋亡结果

表 7 各组细胞凋亡率比较 （%，$\bar{x} \pm s$）

| 组别 | $n$ | 凋亡率 |
|---|---|---|
| 空白血清 | 3 | 9.14 ± 0.13 |
| 皮质酮 | 3 | 22.54 ± 1.71* |
| 皮质酮 +10% 含药血清 | 3 | 19.23 ± 1.13△ |
| 空白血清 +$GdCl_3$ | 3 | 8.90 ± 0.50 |
| 皮质酮 +$GdCl_3$ | 3 | 14.34 ± 1.22△ |
| 皮质酮 +10% 含药血清 +$GdCl_3$ | 3 | 14.74 ± 1.14 |

注：与空白血清组比较，*$P$<0.01；与皮质酮组比较，△$P$<0.01

## 讨 论

抑郁症是一种由多种因素导致的心境障碍。中学医认为抑郁症多与“郁”有关，由肝失疏泄、情志调畅不当所致。四逆散出自《伤寒论》，具有疏肝解郁、畅达阳气的功效，研究发现其能够从 5- 羟色胺、神经营养、可塑性等多方面来改善大鼠抑郁样行为[8, 13, 15]。前期动物研究发现抑郁大鼠海马及前额叶存在 CaSR 异常表达，四逆散能够上调 CaSR 的表达来改善大鼠抑郁样行为[8]。本研究采用体外细胞模型来进一步验证四逆散含药血清对皮质酮损伤的 PC12 细胞的保护作用是否与 CaSR 调控凋亡有关。

体外细胞模型是研究抑郁症发病机制的重要方法之一。高分化的 PC12 细胞作为一种常用的神经细胞株，它来源于可移植的鼠嗜铬细胞瘤，是具有神经内分泌细胞特征和糖皮质激素受体的细胞系[16]，常作为抑郁症体外实验的应激对象[17-19]。本实验采用的 PC12 细胞具有细长突触且相互连接成网状，属于高分化 PC12 细胞，可以直接用于后续实验研究。皮质酮模型是抑郁症常用的体外模型，应用广泛且稳定。皮质酮模型模拟了当机体应激时，激活下丘脑 – 垂体 – 肾上腺轴（HPA axis），释放糖皮质激素（包括皮质酮），选择性损伤海马神经元[20]。研究表明皮质酮可诱导 PC12 细胞损伤，从而在体外实验中模拟抑郁症的发病机制，并且这种损伤可以被抗抑郁药物缓解。本研究发现，当 200 μmol/L 皮质酮作用于 PC12 细胞 48 h，细胞存活率为 58.17%，表明了皮质酮造模成功。

凋亡又称为程序性细胞死亡。本研究发现四逆散含药血清干预后，皮质酮损伤下的 PC12 细胞的存活率增高，细胞凋亡率及相关蛋白 C-Caspase3、C-Caspase9、Bax（6A7）以及胞浆 Cytochrome C 表达下降，这些结果表明四逆散含药血清可能通过抑制细胞线粒体凋亡从而对皮质酮损伤下的 PC12 细胞发挥保护作用。类似的报道如刘静等[21]研究发现四逆散含药血清通过降低细胞凋亡率来减轻皮质酮对 PC12 细胞的损伤。此外，四逆散的君药柴胡的有效成分柴胡皂苷 D 以及柴胡总皂苷均可以通过抑制线粒体凋亡从而发挥其抗抑郁作用[22, 23]，这些结果进一步支持了四逆散含药血清对皮质酮损伤 PC12 细胞的保护作用可能与抑制细胞线粒体凋亡途径有关。

CaSR 属于 G 蛋白偶联受体[24]，主要分布在甲状旁腺、骨组织、胃肠道、肾脏、心血管等部位[25]。Brown EM 等[26]学者于 1993 年首先从牛甲状旁腺克隆出 CaSR。另外，CaSR 在大脑皮层、海马、丘脑等多个脑区均有表达[27]，且参与神经元的生长、迁移、分化、损伤以及神经传递[28]。本研究发现，皮质酮能够降低 PC12 细胞 CaSR 蛋白表达水平，而四逆散含药血清可以提高其表达水平，该结果与笔者前期体内研究结果一致，即抑郁模型大鼠的海马以及前额叶皮质 CaSR 表达水平下降，四逆散可以提高其表达水平[8]。

CaSR 与凋亡的关系研究起步较晚，但受到了日益的关注，为相关疾病的治疗提供了新的思路。卢玉珊[9]

研究发现，CaSR 的缺失可以促进神经干细胞凋亡。在前述实验的基础上，本研究进一步采用 CaSR 激动剂（$GdCl_3$）与 CaSR 抑制剂（NPS2390）来验证 CaSR 是否参与了皮质酮诱导的 PC12 细胞凋亡以及四逆散含药血清对皮质酮损伤的 PC12 细胞的保护作用。结果显示，与皮质酮组相比，皮质酮 +NPS2390 组细胞凋亡率上升，皮质酮 +$GdCl_3$ 组细胞凋亡率降低，提示 CaSR 可能参与了皮质酮诱导的 PC12 细胞凋亡。有学者进一步发现 CaSR 可通过线粒体通路、死亡受体通路、内质网通路三条 Caspase 相关凋亡通路来调节神经元凋亡 [29]。在此基础上，通过在皮质酮 +10% 含药血清组内分别加入 NPS2390 以及 $GdCl_3$，发现皮质酮 +10% 含药血清 +NPS2390 组比皮质酮 +10% 含药血清组细胞凋亡率高，皮质酮 +10% 含药血清 + $GdCl_3$ 组细胞凋亡率无显著变化，提示抑制 CaSR 对四逆散含药血清抗凋亡作用产生影响，CaSR 可能参与四逆散含药血清对皮质酮损伤的 PC12 细胞的保护作用。此外，结合凋亡蛋白 Western Blot 检测结果分析，发现 CaSR 可能是通过线粒体途径参与皮质酮诱导的 PC12 细胞凋亡以及四逆散含药血清对皮质酮损伤的 PC12 细胞的保护作用，具体机制有待进一步研究探讨。

综上所述，四逆散含药血清可以有效地抑制皮质酮诱导的 PC12 细胞凋亡，而 CaSR 可能参与四逆散含药血清对皮质酮损伤的 PC12 细胞的保护作用。本研究证实了中医调肝方药对于皮质酮诱导的 PC12 细胞损伤的改善具有一定的作用 [11，12]。

**利益冲突：**本研究不存在利益冲突。

## 参 考 文 献


［1］ Zhao L，Ren H，Gu S，et al. rTMS ameliorated depressive-like behaviors by restoring HPA axis balance and prohibiting hippocampal neuron apoptosis in a rat model of depression[J]. Psychiatry Res，2018，269：126–133.

［2］ Zhao F，Zhang C，Xiao D，et al. *Radix scutellariae* ameliorates stress-induced depressive-like behaviors via protecting neurons through the TGFbeta3-Smad2/3-Nedd9 signaling pathway[J]. Neural Plast，2020，2020：8886715.

［3］ 张蓝 . 二仙汤的神经保护作用和对抑郁症的治疗作用 [D]. 合肥：安徽医科大学，2020.

［4］ 陈曦，曹慧，胡力 . 橙皮苷对抑郁症大鼠海马神经细胞凋亡、GR 及 NR2B 的影响 [J]. 中国药师，2020，23（11）：2118–2122.

［5］ Ruat M，Traiffort E. Roles of the calcium sensing receptor in the central nervous system[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab，2013，27（3）：429–442.

［6］ Vizard TN，O'Keeffe GW，Gutierrez H，et al. Regulation of axonal and dendritic growth by the extracellular calcium-sensing receptor[J]. Nat Neurosci，2008，11（3）：285–291.

［7］ Diez-Fraile A，Lammens T，Benoit Y，et al. The calcium-sensing receptor as a regulator of cellular fate in normal and pathological conditions[J]. Curr Mol Med，2013，13（2）：282–295.

［8］ Shen CK，Cao KR，Cui SN，et al. SiNiSan ameliorates depression-like behavior in rats by enhancing synaptic plasticity via the CaSR-PKC-ERK signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother，2020，124：109787.

［9］ 卢玉姗 . 钙敏感受体调控神经干细胞增殖、凋亡、迁移和分化 [D]. 南京：南京医科大学，2011.

［10］ 蔺晓源，孟盼，龙红萍，等 . 抑郁症”脑郁”病机探讨及应用 [J]. 中国中医药信息杂志，2020，27（3）：10–13.

［11］ 袁玉梅，史亚飞，韩霞，等 . 加味四逆散对青少期复合应激大鼠行为学及海马与皮质中 5-HT、5-HIAA 含量的影响 [J]. 广州中医药大学学报，2017，34（1）：70–75.

［12］ 史亚飞，杨苾，郭丽丽，等 . 加味四逆散对青少期应激结合成年后诱导抑郁大鼠行为学、海马 CA1 区 5-HT_（1A）R 表达的影响 [J]. 中华中医药学刊，2018，36（10）：2378–2382.

［13］ Cao KR，Shen CK，Yuan YM，et al. SiNiSan ameliorates the depression-like behavior of rats that experienced maternal separation through 5-HT1A receptor/CREB/BDNF pathway[J]. Front Psychiatry，2019，10：160.

［14］ Sasaki K，El Omri A，Kondo S，et al. Rosmarinus officinalis polyphenols produce anti-depressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation[J]. Behav Brain Res，2013，238：86–94.

［15］ 李耀洋，尚立芝，毛梦迪，等 . 四逆散对抑郁大鼠 BDNF/TrKB，5-HT/5-HT1AR 及 HPA 轴的影响 [J].

中国实验方剂学杂志，2021，27（24）：40–48.

[16] Terada K，Kojima Y，Watanabe T，et al. Inhibition of nerve growth factor-induced neurite outgrowth from PC12 cells by dexamethasone：signaling pathways through the glucocorticoid receptor and phosphorylated Akt and ERK1/2[J]. PLoS One，2014，9（3）：e93223.

[17] He XL，Zhu YJ，Wang M，et al. Antidepressant effects of curcumin and HU-211 coencapsulated solid lipid nanoparticles against corticosterone-induced cellular and animal models of major depression[J]. Int J Nanomedicine，2016，11：4975–4990.

[18] Gao SL，Li WT，Zou W，et al. H2S protects PC12 cells against toxicity of corticosterone by modulation of BDNF-TrkB pathway[J]. Acta Biochim Biophys Sin（Shanghai），2015，47（11）：915–924.

[19] Li ZY，Li QZ，Chen L，et al. HPOB，an HDAC6 inhibitor，attenuates corticosterone-induced injury in rat adrenal pheochromocytoma PC12 cells by inhibiting mitochondrial GR translocation and the intrinsic apoptosis pathway[J]. Neurochem Int，2016，99：239–251.

[20] 贺邵华 . 细胞模型与 CUMS 抑郁大鼠的相关性及 β 细辛醚保护作用研究 [D]. 广州：广州中医药大学，2019.

[21] 刘静，蔡皓，段煜，等 . 四逆散及醋炙品组方含药血清对 CORT 致 PC12 细胞损伤的保护作用研究 [J]. 南京中医药大学学报，2020，36（3）：339–345.

[22] Li ZY，Jiang YM，Liu YM，et al. Saikosaponin D acts against corticosterone-induced apoptosis via regulation of mitochondrial GR translocation and a GR-dependent pathway[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry，2014，53：80–89.

[23] Li ZY，Guo Z，Liu YM，et al. Neuroprotective effects of total saikosaponins of Bupleurum yinchowense on corticosterone-induced apoptosis in PC12 cells[J]. J Ethnopharmacol，2013，148（3）：794–803.

[24] Conigrave AD，Ward DT. Calcium-sensing receptor（CaSR）：pharmacological properties and signaling pathways[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab，2013，27（3）：315–331.

[25] Smajilovic S，Yano S，Jabbari R，et al. The calcium-sensing receptor and calcimimetics in blood pressure modulation[J]. Br J Pharmacol，2011，164（3）：884–893.

[26] Brown EM，Gamba G，Riccardi D，et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca（2+）-sensing receptor from bovine parathyroid[J]. Nature，1993，366（6455）：575–580.

[27] Mudo G，Trovato-Salinaro A，Barresi V，et al. Identification of calcium sensing receptor（CaSR）mRNA-expressing cells in normal and injured rat brain[J]. Brain Res，2009，1298：24–36.

[28] Bandyopadhyay S，Tfelt-Hansen J，Chattopadhyay N. Diverse roles of extracellular calcium-sensing receptor in the central nervous system[J]. J Neurosci Res，2010，88（10）：2073–2082.

[29] 朱立仓 . CaSR 在 TBI 后 Caspase 依赖性神经元凋亡中的作用研究 [D]. 新疆：石河子大学，2020.

（收稿：2021–07–23　在线：2022–02–02）

责任编辑：赵芳芳

中国中西医结合杂志　中国中西医结合杂志　中国中西医结合杂志　中国中西医结合杂志　中国中西医结合杂志