学校编码：10384　　分类号_____密级_____

学　　号：24520131153550　　UDC_____

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

基于内源性大麻素系统的柴郁温胆汤抗抑郁症作用机制研究

Research on the Antidepressive Mechanism of Chaiyuwendan Decoction Based on the Endogenous Cannabinoids system

王宏国

指导教师姓名：　陈少东 教授

专 业　名 称：　中医内科学

论文提交日期：　2016 年 04 月

论文答辩时间：　2016 年 05 月

学位授予日期：　2016 年 06 月

答辩委员会主席：_____

评　　阅　　人：_____

2016 年 05 月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（　　陈少东　　）课题（组）的研究成果，获得（　　陈少东　　）课题（组）经费或实验室的资助，在（　　中医系　　）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年　　月　　日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（　　）1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于　　年　　月　　日解密，解密后适用上述授权。

（　　）2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年　　月　　日

厦门大学博硕士论文摘要库

摘 要

目的：

1. 观察柴郁温胆汤抗抑郁大鼠模型的药理效应；

2. 从内源性大麻素系统探讨柴郁温胆汤抗抑郁的作用机制。

方法：

实验分两部分进行。

1. 柴郁温胆汤抗抑郁大鼠模型的药效学实验：实验采用慢性轻度不可预见性应激 21 天复制大鼠抑郁模型。实验动物分为正常组、模型组、柴郁温胆汤组及氟西汀组，给药 21 天。观察大鼠体重变化，根据旷场实验和糖水消耗实验观察抑郁模型大鼠的行为学变化；采用 Elisa 法检测大鼠血清中 5-HT、DA、ACTH、CORT 的含量；采用酶法检测血清中 TG、T-CHO、HDL-C、LDL-C 的含量及血清 ALT、AST 的活性。

2. 基于内源性大麻素系统探讨柴郁温胆汤抗抑郁的作用机制研究：采用 LC-MS/MS 方法检测大鼠海马中内源性大麻素 AEA、2-AG、PEA、OEA 的含量；采用 Western blot 方法检测大鼠海马、前额叶皮质、脂肪中内源性大麻素受体 CB1、CB2 含量；采用 Real-time PCR 检测大鼠海马、前额叶皮质、脂肪中大麻素水解酶 FAAH、MAGL 表达水平。

结果：

1. 柴郁温胆汤抗抑郁大鼠模型的药效学实验：①与正常组相比，模型组大鼠体重、糖水消耗量、旷场水平行驶总路程、大便数量、脂肪含量及血清 5-HT、DA 含量明显或显著减少，休息时间、休息次数及血清 ACTH、CORT、TG、T-CHO 含量显著增加。而血清 HDL-C 含量虽有降低、LDL-C 含量虽有升高，但统计学无差异；②与模型组相比，柴郁温胆汤组大鼠糖水消耗量、旷场水平行驶总路程、大便数量、脂肪含量及血清 5-HT、DA 含量明显或显著增加，休息时间、休息次数及血清 ACTH、CORT、TG、T-CHO、LDL-C 含量明显或显著减少。而体重间无统计学差异，血清 HDL-C 含量虽有升高，但统计学也无差异；③与氟西汀组相比，正常组、模型组、柴郁温胆汤组大鼠血清 ALT、AST 的活性均明显或显著降低。

厦门大学博硕士论文摘要库

2. 基于内源性大麻素系统探讨柴郁温胆汤抗抑郁的作用机制研究：①与正常组相比，模型组大鼠海马中大麻素 AEA、2-AG、PEA、OEA 的含量显著降低；模型组大鼠海马及前额叶皮质中大麻素受体 CB1 的含量显著降低，受体 CB2 的含量显著升高，脂肪中大麻素受体 CB1、CB2 的含量无明显差异；大鼠海马、前额叶皮质中大麻素水解酶 FAAH、MAGL 表达水平显著升高，脂肪中 MAGL 水解酶表达水平显著升高，而 FAAH 水解酶表达水平虽有升高，但无统计学差异；②与模型组相比，柴郁温胆汤组大鼠海马中大麻素 AEA、2-AG、PEA、OEA 的含量显著升高；海马及前额叶皮质中大麻素受体 CB1 的含量显著升高，受体 CB2 的含量显著或明显降低，脂肪中大麻素受体 CB1、CB2 的含量无明显差异；大鼠海马、前额叶皮质中大麻素水解酶 FAAH、MAGL 表达水平显著降低，脂肪中 MAGL 水解酶表达水平显著降低，而 FAAH 水解酶表达水平虽有降低，但无统计学差异。

结论：

1. 采用慢性轻度不可预见性应激的方法可以导致大鼠抑郁样行为学改变，而中药复方柴郁温胆汤具有改善抑郁行为的作用。

2. 柴郁温胆汤具有升高抑郁模型大鼠血清 5-HT、DA 含量，降低 ACTH、CORT 含量的作用。

3. 柴郁温胆汤具有降低抑郁模型大鼠血清 TG、T-CHO、LDL-C 含量的作用。

4. 氟西汀具有升高大鼠血清 ALT、AST 的活性作用，提示氟西汀可能产生炎症损伤的不良反应。

5. 柴郁温胆汤具有提高大鼠海马中大麻素 AEA、2-AG、PEA、OEA 的含量；升高大鼠海马、前额叶皮质中大麻素受体 CB1、降低 CB2 的含量；降低大鼠海马、前额叶皮质中大麻素水解酶 FAAH、MAGL 表达水平，降低脂肪中 MAGL 水解酶表达水平的作用。

关键词：柴郁温胆汤；抑郁症；内源性大麻素系统；作用机制

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Objective：

1. Observe the pharmacological effect of using Chaiyuwendan Decoction to treat rats with depression;

2. To investigate the mechanism of action using Chaiyuwendan Decoction to improve the rat model of depression from Endogenous Cannabinoid System.

Method：

The experiment was divided into two parts.

1. Pharmacodynamics of using Chaiyuwendan Decoction to treat rats with depression: Experiments using 21 days' chronic unpredicted mild stress replication rat model of depression.The experimental animals were divided into 4 groups, control group, model group, Chaiyuwendan Decoction group and Fluoxetine group, administrating 21 days. Observe the changes in body weight of rats, observe the behavioral changes of rats with depression depend on OFT and test of sucrose water consumption; Detecting serum 5-HT, DA, ACTH, CORT's content by Elisa. Relevant methods were used to examine serum TG, T-CHO, LDL-C, HDL-C's volume and serum ALT, AST's activity.

2. Investigating the mechanism of action using Chaiyuwendan Decoction to improve the rat model of depression based on the Endogenous Cannabinoids system: Detecting Endocannabinoids AEA, 2-AG, PEA, OEA's content in rats hippocampus by LC-MS/MS; Detecting Endocannabinoids receptor CB1, CB2's content in rats hippocampus, prefrontal cortex and fats by Western blot; Detecting Endocannabinoids enzymes FAAH, MAGL's gene expression level in rats by real-time PCR.

Results：

1. For Pharmacodynamics of using Chaiyuwendan Decoction to treat rats with depression:①Compared with control group, the model group rat's weight, sucrose water consumption, total distance of the open field, the defecate number, fat, serum 5-HT,DA reduced obviously or substantially, while the rest time and frequency, serum ACTH, CORT, TG, T-CHO increased substantially. Although serum HDL-C reduced, serum LDL-C increased, there was no significant difference;②Compared

厦门大学博硕士论文摘要库

with model group, the Chaiyuwendan Decoction group's sucrose water consumption, total distance of the open field, the defecate number, fat, serum 5-HT, DA increased obviously or substantially, while the rest time and frequency, serum ACTH, CORT, TG, T-CHO, LDL-C reduced obviously or substantially. But there was no significant difference between weight, although serum HDL-C increased, there was no significant difference;③Compared with Fluoxetine group, control group, model group and Chaiyuwendan Decoction group's activity of serum ALT, AST droped obviously or substantially.

2. For Investigating the mechanism of action using Chaiyuwendan Decoction to improve the rat model of depression based on the Endogenous Cannabinoids system: ①Compared with control group, the model group rat hippocampus's content of the endocannabinoids AEA, 2-AG, PEA, OEA droped substantially; The endocannabinoids receptor CB1's content droped substantially, while CB2's lifted in rats' hippocampus and prefrontal cortex, there was no significant difference in fat; The endocannabinoids enzymes FAAH, MAGL's gene expression level increased substantially in rats' hippocampus and prefrontal cortex, MAGL's gene expression level increased substantially in rats'fat, though FAAH's gene expression level increased, there was no significant difference; ②Compared with model group, the Chaiyuwendan Decoction group's content of the endocannabinoids AEA, 2-AG, PEA, OEA increased substantially in rats' hippocampus; The endocannabinoids receptor CB1's content lifted substantially, while CB2's droped obviously in rats' hippocampus and prefrontal cortex, while there was no significant difference in fat; The endocannabinoids enzymes FAAH, MAGL's gene expression level reduced substantially in rats' hippocampus and prefrontal cortex, MAGL's gene expression level reduced substantially in rats'fat, though FAAH's gene expression level reduced, there was no significant difference.

Conclusion：

1. It can lead to depression-like behavioral changes in rats using chronic unpredicted mild stress method, while Chinese medicine Chaiyuwendan Decoction can improve this behavior.

2. Chaiyuwendan Decoction can increased the rats'content of serum 5-HT, DA with depression,while reduced the ACTH, CORT.

厦门大学博硕士论文摘要库

3. Chaiyuwendan Decoction can reduced the rats'content of serum TG, T-CHO, LDL-C with depression.

4. Fluoxetine can increased the rats' activity of serum ALT, AST with depression, it may lead to adverse reactions of inflammatory damage in rats.

5. Chaiyuwendan Decoction can increased content of the endocannabinoids AEA, 2-AG, PEA, OEA in rats' hippocampus; Lifted the endocannabinoids receptor CB1's content, reduced CB2 receptor's; Reduced the endocannabinoids enzymes FAAH, MAGL's gene expression level in rats' hippocampus and prefrontal cortex, reduced MAGL's gene expression level in rats'fat.

Keywords: Chaiyuwendan Decoction；Depression；Endogenous Cannabinoids System；Mechanism

厦门大学博硕士论文摘要库

英文缩略词表

中文名称	英文全名	英文缩写
慢性轻度不可预见性应激	Chronic Unpredictable Mild Stress	CUMS
内源性大麻素系统	Endogenous Cannabinoid System	ECS
内源性大麻素	Endocannabinoids	eCBs
大麻素受体	Cannabinoid Receptor	CBR
Δ9-四氢大麻酚	Δ9-Tetrahydrocannabinol	Δ9-THC
N-花生四烯酰乙醇胺	N-Arachidonoylethanolamine	AEA
2-花生四烯酰甘油	2-Arachidonoylglycerol	2-AG
N-十六酰胺乙醇	N-Palmitoylethanolamine	PEA
N-油酰乙醇胺	N-Oleoylethanolamine	OEA
脂肪酸酰胺水解酶	Fatty Acid Amide Hydrolase	FAAH
单酰基甘油脂肪酶	Monoacylglycerol Lipase	MAGL
5-羟色胺	5-Hydroxytryptamine	5-HT
多巴胺	Dopamine	DA
促肾上腺皮质激素	Adrenocorticotropic Hormone	ACTH
皮质酮	Corticosterone	CORT
甘油三酯	Triglyceride	TG
总胆固醇	Total Cholesterol	T-CHO
高密度脂蛋白胆固醇	High Density-Cholesterol	HDL-C
低密度脂蛋白胆固醇	Low Density-Cholesterol	LDL-C
丙氨酸氨基转移酶	Alanine Aminotransferase	ALT
天冬氨酸氨基转移酶	Aspartate Aminotransferase	AST

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

摘 要 I
Abstract III
英文缩略词表 VI
目 录 VII
Table of Contents XI
第一章 前言 1
1.1 抑郁症概述 1
1.1.1 抑郁症简介 1
1.1.2 抑郁症的发病机制 1
1.1.3 抑郁症的治疗 3
1.2 内源性大麻素系统概述 4
1.2.1 内源性大麻素系统简介 4
1.2.2 内源性大麻素 4
1.2.3 内源性大麻素受体 5
1.2.4 内源性大麻素的合成与分解 6
1.3 立题依据 7
第二章 柴郁温胆汤抗抑郁模型大鼠的药效研究 9
2.1 实验材料 9
2.1.1 实验动物 9
2.1.2 实验药物 9
2.1.3 动物饲料 9
2.1.4 主要仪器 10
2.1.5 主要试剂 10
2.2 实验方法 11
2.2.1 分组及造模 11
2.2.2 动物给药 13
2.2.3 动物行为学检测 13
2.2.3.1 糖水消耗实验 13
2.2.3.2 旷场实验（OFT） 13

厦门大学博硕士论文摘要库

2.2.3.2.1 实验原理.....13
2.2.3.2.2 实验装置.....13
2.2.3.2.3 实验方法与步骤.....14
2.2.3.2.4 观察指标.....14
2.2.3.2.5 注意事项.....15
2.2.4 标本留取.....15
2.2.5 神经递质的检测.....16
2.2.5.1 单胺类神经递质的检测.....16
2.2.5.1.1 血清 5-HT 含量的测定（Elisa 法）.....16
2.2.5.1.2 血清 DA 含量的测定（Elisa 法）.....18
2.2.5.2 HPA 轴神经递质的检测.....19
2.2.5.2.1 血清 ACTH 含量的测定（Elisa 法）.....19
2.2.5.2.2 血清 CORT 含量的测定（Elisa 法）.....19
2.2.6 脂质相关指标检测.....20
2.2.6.1 血清甘油三酯（TG）含量测定（GPO-PAP 酶法）.....20
2.2.6.2 血清总胆固醇（T-CHO）含量测定（COD-PAP 法）.....21
2.2.6.3 血清高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）含量测定（直接法）.....23
2.2.6.4 血清低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）含量测定（直接法）.....24
2.2.7 炎症损伤相关指标检测.....26
2.2.7.1 血清谷丙转氨酶（ALT/GPT）活性测定（微板法）.....26
2.2.7.2 血清谷草转氨酶（AST/GOT）活性测定（微板法）.....28
2.2.8 统计分析.....29
2.3 实验结果.....29
2.3.1 柴郁温胆汤对抑郁大鼠模型行为学的影响.....29
2.3.1.1 大鼠体重.....29
2.3.1.2 糖水消耗实验.....31
2.3.1.3 旷场实验（Open Field Test, OFT）.....32
2.3.2 柴郁温胆汤对抑郁大鼠模型单胺类神经递质的影响.....35
2.3.2.1 各组大鼠血清 DA、5-HT 含量的比较.....35
2.3.2.2 各组大鼠血清 ACTH、CORT 含量的比较.....36
2.3.3 柴郁温胆汤对抑郁大鼠模型脂质的影响.....37
2.3.3.1 各组大鼠脂肪含量的比较.....37

厦门大学博硕士论文摘要库

2.3.3.2 各组大鼠血清 TG、T-CHO 含量的比较 38
2.3.3.3 各组大鼠血清 HDL-C、LDL-C 含量的比较 39
2.3.4 各组大鼠血清炎症损伤相关指标的比较 40
2.4 实验讨论 41
2.4.1 柴郁温胆汤的药物组成及组方特点 41
2.4.2 抑郁症动物模型的选择 44
2.4.2.1 环境应激模型 44
2.4.2.2 社会应激模型 44
2.4.2.3 神经生化模型 45
2.4.2.4 转基因动物模型 45
2.4.2.5 其他动物模型 45
2.4.3 抑郁症与脂质代谢间的相互影响 45
2.4.4 氟西汀的炎性损伤作用 46
第三章 基于内源性大麻素系统的柴郁温胆汤抗抑郁作用机制研究 47
3.1 内源性大麻素 AEA、2-AG、PEA、OEA 含量的测定 47
3.1.1 实验材料 47
3.1.1.1 实验仪器 47
3.1.1.2 主要实验试剂 47
3.1.2 实验方法 47
3.1.2.1 脂类的提取 47
3.1.2.2 LC-MS/MS 条件 48
3.1.3 统计分析 49
3.1.4 实验结果 50
3.2 内源性大麻素受体 CB1、CB2 含量的测定 52
3.2.1 实验材料 52
3.2.1.1 实验仪器 52
3.2.1.2 主要实验试剂 52
3.2.2 实验步骤 53
3.2.3 统计分析 54
3.2.4 实验结果 55
3.2.4.1 大鼠海马中 CB1、CB2 受体相对含量 55
3.2.4.2 大鼠前额叶皮质中 CB1、CB2 受体相对含量 56

厦门大学博硕士论文摘要库

3.2.4.3 大鼠脂肪中 CB1、CB2 受体相对含量.....57
3.3 内源性大麻素分解酶 FAAH、MAGL 含量的测定 58
3.3.1 实验材料.....58
3.3.1.1 实验仪器.....58
3.3.1.2 主要实验试剂.....58
3.3.2 实验步骤.....58
3.3.3 统计分析.....60
3.3.4 实验结果.....61
3.3.4.1 大鼠海马中 FAAH、MAGL 酶的含量.....61
3.3.4.2 大鼠前额叶皮质中 FAAH、MAGL 酶的含量.....62
3.3.4.3 大鼠脂肪中 FAAH、MAGL 酶的含量.....63
3.4 实验讨论.....64
3.4.1 内源性大麻素系统与抑郁症.....64
3.4.1.1 内源性大麻素系统的抗抑郁作用.....64
3.4.1.2 抗抑郁治疗对内源性大麻素系统的调节作用.....65
3.4.2 从内源性大麻素系统探讨柴郁温胆汤抗抑郁的作用机制.....66
结 论.....68
参考文献.....69
致 谢.....77
硕士期间发表的文章.....78

厦门大学博硕士论文摘要库

Table of Contents

Abstract in Chinese ..... Ⅰ
Abstract ..... Ⅲ
Abbreviations ..... Ⅵ
Contents in Chinese ..... Ⅶ
Table of Contents ..... Ⅺ
Chapter 1 Introduction 1
1.1 Depression 1
1.1.1 About Depression 1
1.1.2 Pathogenesis theory of Depression 1
1.1.3 Treatment of Depression 3
1.2 Endogenous Cannabinoid System 4
1.2.1 About Endogenous Cannabinoid System 4
1.2.2 Endocannabinoids 4
1.2.3 Endocannabinoids Receptor 5
1.2.4 Synthesis and Decomposition of Endocannabinoids 6
1.3 Background 7
Chapter 2 Pharmacodynamic experiment to explore the effect of using Chaiyuwendan Decoction to treat rats with depression 9
2.1 Experimental material 9
2.1.1 Experimental animal 9
2.1.2 Experimental medicine 9
2.1.3 Animal feed 9
2.1.4 Main instruments 10
2.1.5 Main reagent 10
2.2 Experiment methods 11
2.2.1 Allocation of groups and Modeling 11
2.2.2 Animal administration 13
2.2.3 Animal behavioral tests 13
2.2.3.1 Test of Sucrose water consumption 13
2.2.3.2 Open Field Test 13
2.2.3.2.1 Principle 13
2.2.3.2.2 Experimental device 13

厦门大学博硕士论文摘要库

2.2.3.2.3 Experimental methods and procedures 14
2.2.3.2.4 Outcome Measures 14
2.2.3.2.5 Attentions 15
2.2.4 Sampling methods 15
2.2.5 Neurotransmitter Measurement 16
2.2.5.1 Monoamine neurotransmitter measurement 16
2.2.5.1.1 Serum 5-HT measurement 16
2.2.5.1.2 Serum DA measurement 18
2.2.5.2 HPA axis related neurotransmitter measurement 19
2.2.5.2.1 Serum ACTH measurement 19
2.2.5.2.2 Serum CORT measurement 19
2.2.6 Lipid related indexes measurement 20
2.2.6.1 Serum TG measurement 20
2.2.6.2 Serum T-CHO measurement 21
2.2.6.3 Serum HDL-C measurement 23
2.2.6.4 Serum LDL-C measurement 24
2.2.7 Inflammatory injury related indexes measurement 26
2.2.7.1 Serum ALT measurement 26
2.2.7.2 Serum AST measurement 28
2.2.8 Statistical analysis 29
2.3 Results 29
2.3.1 Behavioral effect of using Chaiyuwendan Decoction to treat rats with depression model 29
2.3.1.1 Weight of different groups of rats 29
2.3.1.2 Test of Sucrose water consumption 31
2.3.1.3 Open Field Test 32
2.3.2 Monoamine neurotransmitter effect of using Chaiyuwendan Decoction to treat rats with depression model 35
2.3.2.1 Serum DA,5-HT of rats in different groups 35
2.3.2.2 Serum ACTH,CORT of rats in different groups 36
2.3.3 Lipid effect of using Chaiyuwendan Decoction to treat rats with depression model 37
2.3.3.1 The fat of rats in different groups 37
2.3.3.2 Serum TG,T-CHO of rats in different groups 38
2.3.3.3 Serum HDL-C,LDL-C of rats in different groups 39
2.3.4 Serum inflammatory injury related indexes in different groups 40

厦门大学博硕士论文摘要库

2.4 Discussion.....41

2.4.1 Drug composition and prescription characteristics of Chaiyuwendan Decoction.....41

2.4.2 Selecting an animal model of depression.....44

2.4.3 Interaction between depression and lipid metabolism.....45

2.4.4 The inflammatory injury of fluoxetine.....46

Chapter 3 Reserrch on the Antidepression Mechanism of Chaiyuwendan Decoction Based on the Endogenous Cannabinoids system.....47

3.1 Endocannabinoids AEA, 2-AG, PEA, OEA measurement.....47

3.1.1 Experimental material.....47

3.1.1.1 Experimental instruments.....47

3.1.1.2 Main Experimental reagent.....47

3.1.2 Experiment methods.....47

3.1.2.1 Extraction of lipids.....47

3.1.2.2 Condition of LC-MS/MS.....48

3.1.3 Statistical analysis.....49

3.1.4 Results.....50

3.2 Endocannabinoids Receptor CB1, CB2 measurement.....52

3.2.1 Experimental material.....52

3.2.1.1 Experimental instruments.....52

3.2.1.2 Main Experimental reagent.....52

3.2.2 Experimental procedure.....53

3.2.3 Statistical analysis.....54

3.2.4 Results.....55

3.2.4.1 The CB1, CB2 receptor protein relative expression in the rats hippocampus.....55

3.2.4.2 The CB1, CB2 receptor protein relative expression in the rats prefrontal cortex.....55

3.2.4.3 The CB1, CB2 receptor protein relative expression in the rats fat.....55

3.3 Endocannabinoids enzymes FAAH, MAGL measurement.....58

3.3.1 Experimental material.....58

3.3.1.1 Experimental instruments.....58

3.3.1.2 Main Experimental reagent.....58

3.3.2 Experimental procedure.....58

3.3.3 Statistical analysis.....60

厦门大学博硕士论文摘要库

Degree papers are in the “Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on http://etd.calis.edu.cn/ and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.

2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库