

加味四逆散对慢性心理应激抑郁症 大鼠海马损伤的保护作用

吴丽丽 王文竹 严 灿 徐志伟 史亚飞

(广州中医药大学基础医学院, 广东省广州市机场路 12 号, 510405)

[摘 要] **目的** 观察加味四逆散对慢性心理应激抑郁症大鼠海马损伤的保护作用。 **方法** 采用多种应激源制作慢性心理应激抑郁症大鼠模型。30 只 Wistar 大鼠分为正常组、模型组、中药组。观察各组大鼠海马神经元调亡率,测定海马脑源性神经营养因子(BDNF)及其受体TrkB 蛋白含量及神经元内 Ca^{2+} 浓度。 **结果** 模型组大鼠海马神经元调亡率较正常组增加,海马BDNF 及其受体TrkB 蛋白表达降低,神经元内 Ca^{2+} 浓度升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。中药组可降低海马神经元调亡率,增加BDNF 与TrkB 蛋白表达,降低神经元内 Ca^{2+} 浓度。 **结论** 加味四逆散可能通过上调海马BDNF 的表达,降低胞内 Ca^{2+} ,实现抗抑郁的作用。

[关键词] 加味四逆散;心理应激;抑郁症;海马

The Protective Effect of Modified Sini Powder on Hippocampus Injury in Chronic Stressed Depression Rats

WU Li-li, WANG Wen-zhu, YAN Can, et al.

(College of Fundamental Medical Science, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006)

ABSTRACT **Objective** To investigate the protective effect of Modified Sini Powder (Modified powder for treating cold limbs) on hippocampus injury in chronic stressed depression rats. **Methods** Multi-stressors were adopted to establish the rat model of chronic stressed depression. Totally 30 male Wistar rats were randomly divided into 3 groups: the control group, model group, and Modified Sini Powder group. Hippocampal neuron apoptosis rate, content of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor TrkB protein, and Ca^{2+} concentration in neurons of each group were observed. **Results** Stressed rats in the model group had significantly higher hippocampal neuron apoptosis rate than those in the control group, BDNF and its receptor TrkB were decreased in expression, and Ca^{2+} concentration in neurons was significantly higher ($P<0.05$ or $P<0.01$). In the Modified Sini Powder group, hippocampal neuron apoptosis rate was lowered, BDNF and TrkB protein expression increased, and Ca^{2+} concentration in neurons decreased, the difference was significant in comparison with those of the model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Modified Sini Powder can improve depression by up-regulating the expression of BDNF in hippocampal neurons and decreasing intracellular Ca^{2+} concentration.

Key Words Modified Sini Powder (Modified powder for treating cold limbs); Psychological stress; Depression; Hippocampus

慢性心理应激可以诱导抑郁症,关于抑郁症的发病机制至今尚未完全明了,目前比较一致的观点认为,抑郁症的发生与海马神经元损伤、死亡及神经元再生障碍密切相关^[1,2]。我们以往的研究^[3]表明,加味四逆散对慢性心理应激损伤具有确切的防治效应,对慢性心理应激过程中中枢多种神经递质及其合成酶、神经肽、环核苷酸系统等的紊乱具有显著的调节作用,作用的脑区涉及到下丘脑(包括不同核团)、海马、杏仁核等。本研究将从脑源性神经营养因子(BDNF)及其受体TrkB 表达等角度,进一步观察加味四逆散对慢性心理应激抑郁症海马损伤的保护作用,并探讨其可能的作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF 级 Wistar 大鼠 30 只,雄性,体重 180~220g,广州中医药大学实验动物中心提供,合格证号:2002-009。动物自由饮水与进食,在光暗周期为 12 小时,温度(23 ± 2)℃的安静环境中饲养。大鼠适应性饲养 1 周后,按体重随机分为 3 组:正常组、模型组及中药组,每组 10 只。

1.2 仪器与试剂

流式细胞仪(ALTRAEPICS, Beckman Coulter 公司,美国)、德国 Tillvision 图像处理系统。BDNF 及 TrkB 一抗购置英国 Abcam 公司。

1.3 慢性心理应激抑郁症模型的制备

慢性多相性应激原包括:电击足底(30V,电流强度 1.0mA,每隔 1 分钟刺激 1 次,每次持续 10 秒,共 30 次)、冰水游泳(4℃,5 分钟)、夹尾(1 分钟)、禁水(24

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30472256,30500660),广东省自然科学基金资助项目(2004010024),广东省自然科学基金团队项目(粤科基 2005-04)资助

通讯作者:吴丽丽, wulili888@yahoo.com.cn, (020) 36585565

慢性多相性应激原包括:电击足底(30V,电流强度 1.0mA,每隔 1 分钟刺激 1 次,每次持续 10 秒,共 30 次)、冰水游泳(4℃,5 分钟)、夹尾(1 分钟)、禁水(24

小时)、禁食(24 小时)、束缚制动(2 小时/次)、昼夜颠倒。正常组大鼠不施加任何刺激;模型组和中药组大鼠在 21 天内随机施加 7 种应激原,每天 1 种。第 22 天取材。

1.4 药物及给药方法

中药复方加味四逆散由柴胡、白芍、枳壳、枸杞子、干地黄等组成。药材由广州中医药大学第一附属医院药房提供,经药剂科鉴定均为纯正药材。将中药经常规粉碎、煎煮后,置水浴箱内浓缩至含生药 1.69g/ml。药液常温冷却后,置 4℃ 冰箱内保存备用。中药组大鼠在 21 天内于每天早上 8:30 中药灌胃,每次 2ml。正常组和模型组大鼠每天每次灌胃等量蒸馏水。

1.5 观察指标及检测方法

1.5.1 海马神经元凋亡检测 海马神经元急性分离按常规方法。调节细胞浓度至 1×10^{10} /L, 70% 冷酒精 1ml 固定。采用流式细胞仪检测。

1.5.2 海马 BDNF 及其受体 TrkB 蛋白表达检测 大鼠心脏灌流,取脑,常规石蜡包埋,切片,片厚 4μm。切片脱蜡、水化。蒸馏水新鲜配置 3% H₂O₂, 室温 13 分钟以灭活内源性酶。蒸馏水洗 5 分钟 × 3 次。切片置 0.01M 柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)中,微波抗原修复,自然冷却后,PBS 洗涤 5 分钟 × 3 次。滴加正常山羊血清封闭液,37℃ 30 分钟,甩去多余液体。滴加一抗(1:200) 4℃ 过夜,PBS 洗涤 10 分钟 × 3 次。滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG, 37℃ 45 分钟,PBS 洗涤 5 分钟 × 3 次。滴加试剂 SABC, 37℃ 45 分钟,PBS 洗 5 分钟 × 2 次。DAB 显色,苏木素轻度复染,脱水,透明。用封片胶(中性树脂)封片,干燥后显微镜观察结果。试验中设立严格的阴性对照(以 PBS 缓冲液代替一抗)。阳性细胞计数:细胞浆呈棕黄色者为阳性细胞,每只大鼠选取 3 张切片,每张切片随机选取 3 个视野,计数阳性细胞和神经细胞的总数,计算阳性细胞所占的百分率。

1.5.3 海马神经元细胞内游离 Ca²⁺ 浓度检测 海马神经元急性分离,制成细胞悬液,并将其移入 35mm 培养皿,贴壁 10 分钟。细胞贴壁后加入二甲基亚砜溶解的 Fura-2/AM,终浓度 5μmol/L,室温下负载 45 分钟,中间晃动 2 次,用无钙的 HBSS 液冲洗 3 次,去除胞外残余的 Fura-2/AM 后。将盖玻片移至培养皿中,皿中为含有 1.3mmol/L CaCl₂ 的 HBSS 液。将培养皿移至荧光显微镜的载物台,用胶布固定。在 Tillvision 中设置荧光激发方案,交替用 340nm 和 380nm 波长激发,曝光时间为 40ms,每个循环之间的时间间隔为最短。用 Tillvision 软件进行图像分析,记录 340nm 和 380nm 处荧光强度,除去自发荧光后计算出 F₃₄₀/F₃₈₀ 比值,用

此比值代表 Ca²⁺ 浓度。

1.6 统计学方法

所有计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 加味四逆散对大鼠海马神经元凋亡的影响

表 1 示,与正常组比较,模型组细胞凋亡率明显增加($P < 0.05$);中药组可明显降低海马神经元凋亡率,保护海马神经元,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠海马神经元凋亡率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	海马神经元凋亡率
正常组	10	9.25 ± 3.26
模型组	10	19.23 ± 2.89 *
中药组	10	8.55 ± 7.65 △

与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$

2.2 加味四逆散对海马 BDNF 及其受体 TrkB 蛋白表达的影响

表 2 示,与正常组比较,模型组大鼠海马 BDNF 与 TrkB 蛋白表达水平明显降低($P < 0.01$)。中药组可明显增加 BDNF 与 TrkB 蛋白表达水平,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠海马 BDNF 和 TrkB 阳性细胞率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	BDNF 阳性细胞率	TrkB 阳性细胞率
正常组	10	63.39 ± 20.46	61.17 ± 14.65
模型组	10	5.67 ± 8.80 *	31.91 ± 16.71 *
中药组	10	38.40 ± 6.46 *△	55.53 ± 7.43 △

与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.01$

2.3 加味四逆散对海马单个神经元内游离 Ca²⁺ 浓度的影响

表 3 示,与正常组比较,模型组大鼠海马神经元内游离 Ca²⁺ 浓度明显升高($P < 0.01$),而中药组能明显降低慢性心理应激抑郁症大鼠海马神经元内游离 Ca²⁺ 浓度($P < 0.01$)。

表 3 各组大鼠海马单个神经元内游离 Ca²⁺ 浓度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞数	Ca ²⁺ 浓度
正常组	62	959.093 ± 65.841
模型组	84	1003.779 ± 27.758 *
中药组	103	974.464 ± 83.117 △

与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.01$

3 讨论

BDNF 属肽类生长因子家族成员之一,主要分布在中枢神经系统,其中以大脑皮质、海马等部位较多。

BDNF 具有促进中枢和外周神经系统神经的存活和神经纤维的延长,提高突触可塑性和阻止损伤神经元胞体萎缩,促进受损的红核脊髓神经元和皮质脊髓神经元轴突再生等作用^[4,5]。研究表明,BDNF 及其受体 TrkB 参与某些类型抑郁症的病理生理过程和抗抑郁的治疗^[6],BDNF 现已成为抗抑郁药研究的药理学作用靶点之一。大量的研究已证实,持久的应激都可导致 BDNF 在海马表达的降低,而 BDNF 下调可能参与慢性应激对海马的损伤,促进细胞凋亡。给予神经营养因子可提高已受损神经元的存活,Ohara 等(1994)利用脑室内注射外源性 BDNF,发现足量的 BDNF 能够对海马神经元缺血损伤后的死亡起保护作用。神经营养因子促进细胞存活是通过抑制细胞凋亡通路实现的^[7]。胞内 Ca²⁺ 超载是细胞凋亡的主要原因,胞内 Ca²⁺ 的聚积,将激活内源性酶的活性,引发一系列的反应,最终导致神经细胞 DNA 发生断裂、细胞凋亡。海马和皮层细胞培养的结果证实 BDNF 可以诱导钙结合蛋白表达,防止病理性 Ca²⁺ 大量内流,稳定细胞内 Ca²⁺ 浓度,从而起到保护神经元的作用^[8]。

本实验结果表明,慢性心理应激抑郁症大鼠存在大量的海马神经元凋亡,慢性应激可引起 BDNF 下调,抑郁症大鼠海马 BDNF、TrkB 阳性细胞减少,由此抑制凋亡通路的细胞因子减少,促进神经元凋亡的发生。中药复方加味四逆散能明显降低慢性心理应激抑郁症大鼠海马神经元凋亡率,增加海马 BDNF、TrkB 阳性细胞数。此外,加味四逆散能明显降低海马神经元内游离 Ca²⁺ 浓度。由此可以认为,加味四逆散可以通过上调海马 BDNF 的表达,降低胞内 Ca²⁺ 超载,进而防止应激性神经元损伤与神经元再生障碍,实现抗抑郁的作用。

(上接第 335 页)

乙经》:“阳厥凄凄而寒,……善呕,三里主之。”《针灸大全》:“胃气不足呕吐,取足三里。”本研究结果显示,针刺足三里在胃镜检查即刻疼痛、进镜反应、进镜情况、检查即刻反应等方面均优于对照组。在检查结束后 1~7 天总分两组差异无统计学意义。而现代研究亦可提供有力的证明,研究发现^[3],针刺对胃功能的调控作用具有一定的经络和穴位特异性,下巨虚与足三里同属足阳明胃经穴,电针下巨虚及非经非穴点,幽门括约肌压力无明显变化,而足三里穴的疗效却非常明显。用其预防胃镜检查中的副反应经临床验证具有很好疗效,如镇静、消炎、止痛,避免了麻醉药物的过敏反应;减少了插镜时咽部损伤的并发症;缓解消化道各肌群痉挛,

但目前的实验结果还无法判断 BDNF 是否是加味四逆散的直接作用靶点,尚需进一步深入研究。

参考文献

[1]Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, et al. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. J Neurosci, 2000, 20(24):9104~9110.

[2]Kempermann G. Regulation of adult hippocampal neurogenesis-implications for novel theories of major depression. Bipolar Disord, 2002, 4(1): 17~33.

[3]严灿,徐志伟. 肝主疏泄调畅情志功能的中枢神经生物学机制探讨. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(5):459~462.

[4]Ikeda O, Murakami M, Ino H, et al. Acute up-regulation of BDNF expression resulting from experimentally induced injury in the rat spinal cord. Acta Neuropathol, 2001, 102(3):239~245.

[5]Hiebert GW, Khodarahmi K, McGraw J, et al. Brain-derived neurotrophic factor applied to the motor cortex promotes sprouting of corticospinal fibers but not regeneration into a peripheral nerve transplant. J Neurosci Res, 2002, 69(2): 160~168.

[6]宋煜青,周东丰. 抗抑郁药与信号转导的研究进展. 中华精神科杂志, 2002, 35(2):119~121.

[7]Duman RS, Malberg J, Nakagawa S, et al. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. Biol Psychiatry, 2000, 48(8):732~739.

[8]Brandoli C, Sanna A, De Bernardi MA, et al. Brain-derived neurotrophic factor and basic fibroblast growth factor downregulate NMDA receptor function in cerebellar granule cells. Neurosci, 1998, 18(19):7953~7961.

(收稿日期:2006-12-30;修回日期:2007-06-22)

[编辑:邓媛]

减少腺体分泌,且简便易行,不受药物与环境影响,适应症广,成本低廉,值得临床推广应用。

参考文献

[1]徐灿霞,邹惠芳,沈守荣,等. 胃镜检查中应激反应的临床对照分析. 中国心理卫生杂志, 2003, 17(12):822~813.

[2]姚希贤. 临床消化病学. 天津:天津科学技术出版社, 1999: 437.

[3]孙大勇,黄裕新,褚自宏,等. 电针对犬幽门括约肌压力的影响及与胃粘膜组织中脑肠肽的关系. 世界华人消化杂志, 1999, 9(11):997~998.

(收稿日期:2007-05-18;修回日期:2007-09-24)

[编辑:邓媛]