

四逆散对抑郁模型大鼠 HPA 轴、 海马 BDNF 及其受体 TrKB 的影响

彭淑芹¹,徐向东²,赵海霞^{3*}

(1. 山东中医药大学药学院,济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院,济南 250011;
3. 山东中医药大学附属医院,济南 250013)

[摘要] **目的:**探讨四逆散的高、低剂量组对抑郁模型大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA 轴)、海马脑源性神经营养因子(BDNF)及其受体酪氨酸激酶 B(TrKB)表达的影响。**方法:**SD 雄性大鼠 50 只,随机分为正常对照组、模型组、盐酸文拉法辛组(12.5 mg·kg⁻¹)、四逆散高、低剂量组(10,5 g·kg⁻¹)。采用慢性轻度不可预见性刺激造模,同时 ig 给药 21 d 后分别取血、下丘脑和海马。采用放射免疫分析法检测大鼠血浆皮质醇(CORT)、促肾上腺皮质激素(ACTH)及下丘脑中促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)的含量变化,采用免疫组化分析法检测海马 BDNF 及其 TrKB 阳性神经元面密度值的变化。**结果:**与正常组相比,模型组大鼠血浆中 CORT,ACTH 及下丘脑 CRH 的含量明显升高,海马中 BDNF 和 TrKB 的神经面密度值明显降低。与模型组相比,四逆散高、低剂量组可以显著降低抑郁症模型大鼠血浆 CORT,ACTH、下丘脑 CRH 的含量;增加大鼠海马 BDNF 及其 TrKB 阳性神经元面密度值。**结论:**四逆散可明显改善抑郁模型大鼠的抑郁状态,其机制可能是通过 HPA 轴增加海马 BDNF,TrKB 的表达。

[关键词] 四逆散;神经递质;下丘脑;海马;脑源性神经营养因子;酪氨酸蛋白激酶 B
[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)05-0145-04
[doi] 10.11653/syfxj2014050145

Effects of Sini San on HPA Axis and Expression of BDNF and TrKB in Hippocampus of Depression Model Rats

PENG Shu-qin¹, XU Xiang-dong², ZHAO Hai-xia^{3*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250355, China;
2. Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Ji'nan 250011, China;
3. Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Ji'nan 250013, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Sini San on hypothalamic pituitary adrenal axis (HPA axis) and expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tyrosine kinase B (TrKB) in hippocampus of the depression model rats. **Method:** Fifty male SD rats were randomly divide into five groups: control group, model group, Venlafaxine hydrochloride group (12.5 mg·kg⁻¹), two concentration of sinisan groups (10, 5 g·kg⁻¹). The rats accepted 21 days both chronic mild unexpected stimulation and intragastric administration, and then, drawn blood, taken hypothalamus, taken hippocampus. To detect the content changes of the rats' plasma cortisol (CORT), adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and hypothalamic corticotropin releasing hormone (CRH) by the radioimmunoassay. Using the immunohistochemical analysis method to test the positive neurons surface density values' change of the BDNF and TrKB in the hippocampus. **Result:** Compared with the control group, the rats in model group significantly increased the contents of the plasma CORT, ACTH and hypothalamic

[收稿日期] 20130924(002)
[基金项目] 山东省 2011-2012 年度中医药科技发展计划项目(2011-075)
[第一作者] 彭淑芹,硕士,从事中药新药开发及中药炮制原理研究,Tel:18253183663,E-mail:p243949100@163.com
[通讯作者] * 赵海霞,主任药师,博士后,从事中药新药开发及中药炮制原理的研究,Tel:13793188011,E-mail:zhaohx1115@126.com

CRH, and decreased the positive neurons surface density values of the BDNF and TrkB in the hippocampus. Compared with the model group, Sini San high and low dose group could significantly decrease the content of the depression model rats' plasma CORT, ACTH and hypothalamic CRH; and increase positive neurons surface density values of the BDNF and TrkB in the hippocampus. **Conclusion:** Sini San can obviously improve depressive state of the rats, which mechanism may berelated with increasing the expression of BDNF and TrkB in hippocampus by the HPA.

[**Key words**] Sini San; neurotransmitter; hypothalamic; hippocampi; BDNF; TrkB

抑郁症属于情感性障碍疾病,发病多与患者心理素质及社会因素有密切关系。近年来,随着生活节奏的加快,人们生活、工作、学习等压力明显增大,发病率呈现逐渐增高的趋势,WHO 预测到 2020 年抑郁症将成为仅次于缺血性心脏病而位居第二的致残疾病^[1]。

抑郁症属于中医“郁证”范畴。中医理论认为抑郁症的发生主要与机体情志不畅,气机紊乱,心、肝、脾三脏功能失调等有关^[2],但是它的具体病理机制目前尚不完全明确。近年来,大量的研究表明抑郁症的发病率和下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)失调之间存在着一定的关系,并发现糖皮质激素循环和糖皮质激素受体对 HPA 轴功能具有负反馈作用^[3]。有研究表明^[4],HPA 轴亢进的抑郁症患者,脑源性神经营养因子(BDNF)及其受体酪氨酸蛋白激酶 B(TrkB)在海马中具有较高的表达。同时,重症抑郁症患者死后海马 BDNF 的表达和海马 TrkB 的表达显著降低。因此,HPA 轴和海马 BDNF,TrkB 的表达在抑郁症的发病中扮演了重要的角色。在治疗抑郁症的过程中,它们可以作为药物疗效的重要检测指标。

四逆散由柴胡、芍药、枳实和炙甘草组成,具有透邪解郁、疏肝理脾的功效,是中医临床上调治情志活动的经典名方。本实验利用慢性应激制造大鼠肝郁气滞型抑郁模型,通过检测血浆中皮质醇(CORT)、促肾上腺皮质激素(ACTH)的含量、下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)的含量、BDNF 和 TrkB 的表达来探讨四逆散治疗抑郁症的主要作用机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级健康 SD 雄性大鼠 50 只,质量 180~200 g,由山东中医药大学动物实验中心提供,批号为 SCXK(鲁)20090001。

1.2 药物 四逆散由柴胡、枳实、芍药、炙甘草组成,比例为 1:1:1:1,购于山东中医药大学附属医院,并经张学顺教授鉴定。取四逆散各 180(共 30

副)g,加 10 倍量的水浸泡 1 h 后煎煮,沸腾后文火煎 40 min,过滤;第 2 次加 8 倍量的水煎煮,水沸后用文火煎 40 min,过滤,合并滤液,常压浓缩至含原生药材 0.5,1.0 g·mL⁻¹煎出物,冷却后密封,4℃保存备用。盐酸文拉法辛胶囊(苏州第四制药有限公司,批号 20120206)。

1.3 试剂 ACTH 放射免疫分析试剂盒(北京福瑞生物工程公司,批号 20121103),CORT 放射免疫分析试剂盒(北京福瑞生物工程公司,批号 20121105),CRH 放射免疫分析试剂盒(北京福瑞生物工程公司,批号 20121107),兔抗 BDNF,兔抗 TrkB,SAB 免疫组化试剂盒,DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程公司)。

1.4 仪器 TC-512 型切片机(德国 Lezi 公司),DT5-3 型低速自动平衡离心机(北京时代北利离心机有限公司),电子秤(赛多利斯科学仪器有限公司),DW-86L628 型海尔超低温保存箱(-80℃,青岛海尔特种电器有限公司),BCD-186K 型 4℃冰箱(海信北京电器有限公司)。

2 方法

2.1 分组 对 SD 雄性大鼠进行标记,称重,随机分为正常组、模型组、盐酸文拉法辛组、四逆散低剂量组和四逆散高剂量组。适应性饲养 1 周后开始造模。

2.2 造模 在造模的 21 d 之内,正常组不接受任何刺激;其余各组轮流接受 7 种不同的刺激,分别为 24 h 禁食,24 h 禁水,4℃冷水游泳,45℃热刺激,夹尾 1 min,高速水平震荡 30 min,电击足底(电压 50 mV,每隔 30 s 刺激 1 次,每次持续 10 s,共 15 次)。每天 1 种刺激,相同的刺激不连续出现。造模的同时,对各组大鼠进行灌胃处理,正常组(0.9%生理盐水 10 mL·kg⁻¹)、模型组(0.9%生理盐水 10 mL·kg⁻¹)、盐酸文拉法辛组(12.5 mg·kg⁻¹)、四逆散低剂量组(5 g·kg⁻¹)、四逆散高剂量组(10 g·kg⁻¹)。各组每天灌胃 1 次,连续 21 d。

2.3 体重测量 每周测量 1 次体重。

2.4 取血浆及其处理 从大鼠股动脉取血 2 mL,置于带有标号的肝素抗凝管中,37 ℃ 温浴 2 h 后进行离心($3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,20 min),取上清液(血浆),-80 ℃ 冰冻保存,采用放射免疫分析法(RIA)测定 ACTH 和 CORT 含量。

2.5 取下丘脑和海马及其处理 从大鼠股动脉取完血后,对大鼠进行开颅取脑,取出下丘脑和海马,放入-80 ℃ 保存箱中。日后用 10% 甲醛固定,石蜡包埋,Leitz 石蜡切片机切片。

2.6 免疫组化法 常规脱蜡至水,3% 过氧化氢孵育 10 min,以消除内源性过氧化物酶的活性,蒸馏水冲洗,5 min×3 次。微波热修复,PBS 冲洗 3 min×3 次。滴加 BSA 封闭液封闭,室温孵育 30 min。滴加一抗,BDNF 一抗稀释为 1:100,TrkB 稀释为 1:200,4 ℃ 过夜。PBS 冲洗,3 min×3 次。滴加二抗生物素化羊抗兔 IgG,37 ℃ 孵育 30 min。PBS 冲洗 3 min

×3 次。DAB 显色剂显色,室温下 20 min,蒸馏水中止反应。脱水,透明、封片。用 10×40 倍光学显微镜下观察所有标本,在 10×10 方格参照体积内计数阳性染色细胞截面与方格横线的变点数,各切片海马 CA₂ 区和 DG 区阳性细胞面密度值^[5]。

2.7 统计学处理 实验结果均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 SPSS 17.0 软件中的方差分析(ANOVA)进行检验, $P<0.05$ 表示差异有显著性。

3 结果

3.1 大鼠血浆 CORT,ACTH 及下丘脑 CRH 含量变化 模型组大鼠血浆中皮质醇 CORT,ACTH 和 CRH 明显高于正常组($P<0.01$)。经治疗后,盐酸文法拉辛组和四逆散高、低剂量组大鼠血浆中的 CORT,ACTH 及下丘脑 CRH 含量明显低于模型组($P<0.05$),同时也与正常组有显著性差异($P<0.05$),见表 1。

表 1 四逆散对抑郁模型大鼠血浆 CORT、ACTH 及下丘脑 CRH 含量变化($\bar{x}\pm s,n=10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	血浆		下丘脑
		CORT/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	ACTH/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	CRH/ $10^3\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
正常	-	8.86 ± 1.26	46.71 ± 8.91	1.21 ± 0.16
模型	-	$15.26\pm3.19^{2)}$	$101.91\pm16.88^{2)}$	$1.86\pm0.27^{2)}$
盐酸文拉法辛	12.5×10^{-3}	$11.54\pm1.31^{1,3)}$	$60.56\pm9.21^{1,3)}$	$1.31\pm0.18^{3)}$
四逆散	5	$12.78\pm1.21^{1,3)}$	$81.31\pm11.21^{1,3)}$	$1.51\pm0.16^{3)}$
	10	$10.54\pm1.12^{4)}$	$61.40\pm9.91^{4)}$	$1.36\pm0.13^{4)}$

注:与正常组相比¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组相比³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表 2~3 同)。

3.2 大鼠海马 BDNF 阳性神经元面密度值的变化 与正常组相比,模型组大鼠海马 BDNF 阳性神经元面密度值比较低($P<0.01$);四逆散低剂量组海马 BDNF 阳性神经元面密度值高于模型组($P<0.05$),低于正常组($P<0.05$),均有统计学意义;盐酸文法拉辛组和四逆散高剂量组海马 BDNF 阳性神经元面密度值明显高于模型组($P<0.01$),见表 2。

表 2 四逆散对抑郁模型大鼠海马 BDNF 阳性神经元面密度值的影响($\bar{x}\pm s,n=10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	海马 CA ₂ 区	海马齿状回区
正常	-	0.51 ± 0.17	0.49 ± 0.16
模型	-	$0.26\pm0.12^{2)}$	$0.23\pm0.88^{2)}$
盐酸文拉法辛	12.5×10^{-3}	$0.47\pm0.13^{4)}$	$0.35\pm0.12^{4)}$
四逆散	5	$0.34\pm0.11^{1,3)}$	$0.31\pm0.09^{1,3)}$
	10	$0.44\pm0.13^{4)}$	$0.36\pm0.10^{4)}$

3.3 大鼠海马 TrkB 阳性神经元面密度值的变化 模型组海马 TrkB 阳性神经元面密度值均小于正常组,有显著性差异($P<0.01$);四逆散低剂量组的海马 TrkB 阳性神经元面密度值高于模型组($P<$

0.05),低于正常组($P<0.05$);盐酸文法拉辛组和四逆散高剂量组海马 TrkB 阳性神经元面密度值明显高于模型组,有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 3 四逆散对抑郁模型大鼠海马 TrkB 阳性神经元面密度值的影响($\bar{x}\pm s,n=10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	海马 CA ₂ 区	海马齿状回区
正常	-	0.49 ± 0.11	0.41 ± 0.14
模型	-	$0.23\pm0.12^{2)}$	$0.21\pm0.06^{2)}$
盐酸文拉法辛	12.5×10^{-3}	$0.40\pm0.15^{4)}$	$0.38\pm0.17^{4)}$
四逆散	5	$0.30\pm0.14^{1,3)}$	$0.27\pm0.13^{1,3)}$
	10	$0.38\pm0.16^{4)}$	$0.35\pm0.12^{4)}$

4 讨论

目前有关抑郁症的动物模型主要分为两类:一类属于药物诱发的模型,包括育亨宾增强、5-HTP 诱发抑郁行为、利血平拮抗等;另一类为改变环境条件诱发的抑郁模型,如束缚、嗅球切除、行为绝望等。慢性应激抑郁模型是将几种不同的应激因子(如禁食、禁水、电击、强迫游泳等)在实验全程中的应用,顺序随机,是动物不能预料刺激的发生,是目前国内

外文献中广泛使用的模型,本实验采用了此种造模方法,具有一定的科学性与可靠性^[6]。

抑郁症的病因十分复杂,其发病机制尚未完全阐明。有研究表明,应激刺激可以使下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(HPA 轴)功能亢进,从而促进 CRH, ACTH 和 CORT 的分泌,致使下丘脑和血浆中的 CRH,ACTH,CORT 含量增加,这也与本实验结果一致。若机体长期处于应激状态,HPA 轴功能持续亢进,将严重影响人体的身心健康,使机体出现抑郁症状^[7]。

海马是中枢神经系统中 CORT 含量最多的部位,血浆中含有过量的 CORT,过高水平的 CORT 能自由通过血脑屏障,海马受过量的 CORT 影响,导致海马神经元萎缩死亡。研究发现 TrKB 是 BDNF 高亲和力和受体^[8]。当 BDNF 与 TrKB 结合启动细胞内信号转导途径,从而产生相应分子对神经元的保护及促进再生作用^[10]。BDNF 只有通过与 TrKB 的特异结合,才能启动一系列底物磷酸化,从而发挥其生物学效应。BDNF 及其受体 TrKB 广泛分布于中枢神经系统,尤以大脑皮质及海马区域含量最高,在周围系统,如心、肺、骨骼肌也有低水平表达,对神经元的生存、生长、分化维持神经元功能和再生修复等多方面具有重要影响^[11]。有实验研究表明^[12],抑郁症动物 BDNF 及其 TrKB 的表达水平明显降低,用抗抑郁药治疗后可以上调抑郁动物的 BDNF 和 TrKB 的低表达水平。

本实验结果显示,抑郁模型大鼠海马内的 BDNF 和 TrKB 的阳性神经元数量下降,从神经生化方面佐证了抑郁症模型的复制成功。四逆散可以降低血浆 CORT,ACTH 和下丘脑 CRH 的含量,使 HPA 轴的功能趋于正常;同时,四逆散可以增加海马 BDNF 和 TrKB 的表达。据报道许多抗抑郁药对抑郁症的治疗作用是通过 HPA 轴发挥作用,因此,HPA 轴正常状态的恢复可能与慢性应激性抑郁的恢复有关^[13]。四逆散是调和肝脾的基础方,临床常用来治疗肝脾气郁证,在本实验中它与盐酸文法拉辛产生类似的抗抑郁作用^[14]。因此,笔者推测四逆散可能是通过调节 HPA 轴功能状态,提高海马组织 BDNF 和 TrKB 的表达水平来达到抗抑郁作用的。

[参考文献]

[1] 郭晓云. ω-3 多不饱和脂肪酸对 CMS 抑郁症大鼠模型神经生化及海马基因表达的影响[D]. 上海:复旦大学,2007.

[2] 吴丽丽,徐志伟,严灿,等. 逍遥散和丹栀逍遥散抗抑郁作用的实验研究[J]. 中医研究,2003,16(3):14.

[3] Aihara M,Ida I,Yuuki N,et al. HPA axis dysfunction in unmedicated major depressive disorder and its normalization by pham acother-apy correlates with alteration of neural activity in prefrontal cortex and limbic/paralinbic regions [J]. Psychiatry Res,2007,155(3):245.

[4] Murakamis,Imbeh,Morikawa Y,et al. Chronic stress,as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly [J]. Neurosci Res,2005,53(2):129.

[5] 靳玮,宋春风,吕佩源,等. 反复缺血再灌注制备小鼠血管性痴呆模型的评价[J]. 疑难病杂志,2008,3(7):131.

[6] 王哲,胡随瑜,宋炜熙,等. 白松片对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及血浆 CORT、ACTH 的影响[J]. 中国临床心理学杂志,2004,12(2):185.

[7] 陈宝忠,姚丹,于鸿飞,等. 归脾汤对抑郁模型大鼠血中 ACTH 及 CORT 含量的影响 [J]. 中医药学报,2010,38(4):19.

[8] Skup M, Dwornik A, Macias M, et al. Long-term locomotor training up regulates TrKB(FL) receptor-like proteins, brain derived neurotrophic factor, and neurotrophin 4 with different to pographies of expressionin oligodendroglia and neurons in the spinal cord[J]. Exp Neurol,2002,176(2):289.

[9] Yan Q,Rosenfeld R D,Matheson C R,et al. Expression of brain derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system[J]. Neuroscience,1997,78(2):431.

[10] Sugimoto T, Kuroda H, Horii Y, et al. Signal transduction pathways through TRK2A and TRK2B recaptors in human neuroblastoma cells [J]. Jpn J Cancer Res,2001,92(2):152.

[11] 张春虎,邓颖,胡随瑜,等. 柴胡疏肝散对抑郁模型大鼠海马、杏仁核、额叶 BDNF 及其受体 TrKB 的影响 [J]. 中国中西医结合杂志,2012,34(2):5.

[12] Yulug B, Ozan E, Gonl A S, et al. Brain-derived neurotrophic factor stress and depression am inireview [J]. Brain Res Bull,2009,78(6):267.

[13] 刘丽琴,罗艳,张瑞睿,等. 人参皂苷对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及 HPA 轴、BDNF 的影响[J]. 中国中药杂志,2011,36(10):1342.

[14] 毛庆秋,黄真. 中药治疗抑郁症的作用机制研究进展 [J]. 中国中药杂志,2007,32(10):877.

[责任编辑 聂淑琴]