

白藜芦醇对围绝经期抑郁症模型小鼠行为学影响及机制分析

王睿^{1,2}, 王琪¹, 金明顺³, 陈雪¹, 王伟¹, 张宁¹, 杨德柱¹, 刘建华¹, 王国忠¹, 刘吉成^{1*}
(1. 齐齐哈尔医学院 医药科学研究院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006;
2. 黑龙江中医药大学 中医药研究院, 哈尔滨 150040;
3. 温州医科大学 基础医学院, 浙江 温州 325035)

[摘要] 目的:探讨白藜芦醇(RSV)对围绝经期抑郁症模型小鼠行为学影响,并观察其作用机制。方法:清洁级昆明种小鼠随机分为假手术组,围绝经期抑郁症模型组,氟西汀组(3 mg·kg⁻¹),白藜芦醇低、中、高剂量组(10,20,40 mg·kg⁻¹),每组 10 只。采用小鼠双侧卵巢切除(OVX)联合慢性不可预知性温和应激(CUMS)法制备围绝经期抑郁症动物模型。给药组于每日应激前 1 h 灌胃给药,其余各组给予等体积生理盐水,共计 21 d。观察小鼠一般体征,行阴道上皮角化实验检测动情周期变化,采用旷场实验(OFT),强迫游泳实验(FST)及体重测试(BWM)观察行为学变化,尼氏染色观察海马组织神经元形态学变化,酶联免疫吸附法(ELISA)检测脑组织单胺类递质 5 羟色胺(5-HT),去甲肾上腺素(NE)及多巴胺(DA)含量变化,免疫组织化学法(IHC)检测海马组织雌激素受体 α (ER $_{\alpha}$),ER $_{\beta}$ 免疫反应阳性区域蛋白表达。结果:与假手术组比较,阴道上皮角化实验显示,各 OVX 组小鼠连续 7 d 内检测未见动情周期变化,证明去势成功;行为学显示,围绝经期抑郁症模型组小鼠有抑郁样行为,表现为体重增加缓慢,OFT 自发活动及探索行为减少,FST 行为绝望时间增加($P < 0.01$);尼氏染色显示海马区神经元损伤、萎缩及丢失,尼氏小体数量减少;ELISA 法显示脑组织单胺类递质 5-HT,NE 及 DA 含量减少($P < 0.01$);IHC 法显示海马组织 CA3 区 ER $_{\alpha}$ 及 ER $_{\beta}$,DG 区 ER $_{\beta}$ 免疫蛋白反应阳性区域积分吸光度 IA 值减少($P < 0.01$)。与模型组比较,给予不同剂量白藜芦醇治疗后,均可改善围绝经期抑郁症模型小鼠行为学异常,表现为体重增加迅速,OFT 自发活动及探索行为增加,FST 行为绝望时间减少($P < 0.01$);脑组织 5-HT,NE,DA 含量增加($P < 0.01$);海马组织 CA3 区 ER $_{\alpha}$ 及 ER $_{\beta}$,DG 区 ER $_{\beta}$ 免疫反应蛋白阳性区域 IA 值($P < 0.01$)增加;各剂量组间比较,以中剂量较为明显($P < 0.05$)。结论:补充植物雌激素白藜芦醇可改善围绝经期抑郁症模型小鼠抑郁样行为,其机制与抑制海马神经元损伤、上调脑组织单胺类递质 5-HT,NE,DA 含量及增加海马组织 CA3 区 ER $_{\alpha}$,CA3 及 DG 区 ER $_{\beta}$ 表达有关。

[关键词] 白藜芦醇; 卵巢切除; 雌激素; 围绝经期抑郁症; 神经递质; 受体
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)04-0132-08
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017040132
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161129.1531.042.html>
[网络出版时间] 2016-11-29 15:31

Behavioral Effect and Mechanisms of Resveratrol on Perimenopausal Depression Model in Mice

WANG Rui^{1,2}, WANG Qi¹, JIN Ming-shun³, CHEN Xue¹, WANG Wei¹, ZHANG Ning¹,
YANG De-zhu¹, LIU Jian-hua¹, WANG Guo-zhong¹, LIU Ji-cheng^{1*}
(1. Institute of Medicine, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China;
2. Academy of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;
3. School of Basic Medical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

[收稿日期] 20160520(007)
[基金项目] 黑龙江省自然科学基金面上项目(H2015068);齐齐哈尔市科技攻关项目(SFGG-201561);齐齐哈尔医学院科研基金项目(QY2016B-10)
[通讯作者] 王睿,在读博士,副研究员,从事心境障碍的发病机制及中医药防治研究,Tel:13763517168,E-mail:wrdoctor1975@163.com
[通讯作者] *刘吉成,教授,博士生导师,从事中药药理学研究,Tel:13304621228,Email:jeliu@qmu.edu.cn

[**Abstract**] **Objective:** To discuss the effects and mechanisms of resveratrol on perimenopausal depression model in mice. **Method:** Clean-grade Kunming mice were randomly divided into the sham group, the model group, the fluovetine group (3 mg·kg⁻¹) and resveratrol groups (10, 20, 40 mg·kg⁻¹), with 10 mice in each group. The mice were gavaged one hour before the daily stress, while the others were gavaged with physiological saline for consecutively 21 days. The perimenopausal depression model in mice was established by Ovariectomy and chronic unpredictable mild stress (CUMS). The general physical signs of the mice were observed, and experience of vaginal epithelial cells was conducted to detect changes in estrus cycle. The depressed behavior of mice was observed by body weight measurement (BWM), open field test (OFT) and force swimming test (FST). Changes in 5-HT, NE and DA contents in mice brain were detected by ELISA methods. ER_α and ER_β protein expressions in hippocampus were detected by IHC method. **Result:** Compared with the sham group, the mice in OVX group did not show any change in estrous cycle for seven continuous days, indicating the successful modeling. The mice in model group appeared the behavior of depression, their body weight mice were decreased, the scores of horizontal and vertical motion in OFT were decreased, and the behavioral despair time were extended (*P* < 0.01). Nissl's staining showed hippocampus neuron damage, atrophy and loss, and decrease in the number of Nissl bodies. The results of ELISA test showed that the content of 5-HT, NE and DA in brain tissues were decreased (*P* < 0.01); IHC showed that the protein expressions of ER_α and ER_β in hippocampus CA3 area were decreased, and *IA* of ER_β in DG area were decreased. Compared with the model group, after administration with different doses of resveratrol, all of mice in the perimenopausal depression model showed relieve in the abnormalities of behavior, which were characterized by rapid body mass increase, increase in spontaneous activities and exploratory behavior of OFT, reduction in the behavioral despair time of FST (*P* < 0.01), increase in the content of the brain tissue 5-HT, NE and DA (*P* < 0.01), and rise in ER_α and ER_β in hippocampus CA3 area and *IA* of ER_β in DG area (*P* < 0.01). Among each dose group, the medium-dose group was more obvious (*P* < 0.05). **Conclusion:** Phytoestrogens resveratrol can alleviate perimenopausal depression in mice depressive behavior. Its mechanism is correlated with inhibition in neurons injury, up-regulation in the content of monoamine neurotransmitters 5-HT, NE and DA in brain tissues, and increase in the expression in ER_α and ER_β in hippocampus CA3 area and *IA* of ER_β in DG area.

[**Key words**] resveratrol; ovariectomy; estrogen; perimenopausal depression; neurotransmitter; receptor

围绝经期抑郁症是指首发于围绝经期,并以情感障碍、思维迟缓和认知功能减退为特征的一类心境障碍性精神疾病^[1]。研究显示,抑郁症发病与性别有关,女性抑郁症患病率约为男性的 2 倍^[2-3]。女性情感行为受体内性激素水平波动影响,在激素变化的特殊时间点如经前期、妊娠期、产褥期及围绝经期易发抑郁,其中约有 46% 女性在围绝经期患有抑郁症。现已证实,应激为围绝经期抑郁症发病主要诱因,雌激素(estrogen, E) 撤退与围绝经期抑郁症发病关系密切^[4]。女性体内雌激素水平低下与外界环境刺激被认为是围绝经期抑郁症发病内、外 2 个主要因素^[5]。围绝经期抑郁症发病率呈现逐年升高趋势,逐步成为严重影响女性身心健康及家庭和

的公共卫生及社会问题。
雌激素为“天然神经保护因子”,是具有神经调节及神经保护作用的一组甾体类激素^[6]。研究显

示,雌激素可影响神经递质合成、神经元生长、突触形成、神经元棘突密度和神经传导作用^[7],可调控星形胶质细胞和小胶质细胞生长^[8],可促进神经纤维形成并抑制神经元凋亡,进而调节中枢神经系统(central nervous systems, CNS)的结构与功能、调节情绪反应及认知功能^[9]而具有神经保护作用。雌激素抗抑郁症机制与调控单胺类神经递质含量,调控雌激素受体(estrogen receptor, ER)表达有关^[10]。

白藜芦醇(resveratrol, RSV) 又称芪三酚,是一种天然多酚类化合物,主要存在于虎杖、决明、藜芦、葡萄等植物中,现至少已在 21 科,31 属,72 种植物中被发现。白藜芦醇因化学结构与动物体内雌激素的相似性,被称为植物雌激素(phytoestrogen, PE)。研究证实,白藜芦醇具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、心血管保护、抗衰老及神经保护等药理学作用^[11]。尽管国内外学者对白藜芦醇神经保护作用研究颇多,但目前有关其

对围绝经期抑郁症的影响及机制鲜见报道。

本研究采用小鼠双侧卵巢切除 (ovariectomy, OVX) 法联合慢性不可预知性温和应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 法制备围绝经期抑郁症动物模型, 观察白藜芦醇对围绝经期抑郁症模型小鼠行为学影响并探讨作用机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级雌性昆明小鼠, 体重 (20 ± 2) g, 购自黑龙江中医药大学药物安全评价中心, 合格证号 SCXK (黑) 2013-0004。本实验研究均符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。

1.2 药物及试剂 白藜芦醇 (上海源叶, 批号 20140218, 纯度 ≥ 98%), 氟西汀 (苏州礼来制药, 批号 2076AC); 小鼠 5 羟色胺 (5-HT), 去甲肾上腺素 (NE) 及多巴胺 (DA) 试剂盒 (北京诚林生物技术有限公司分装, 批号分别为 20131201, 20131115, 20131215); ER_α, ER_β 多克隆抗体及山羊抗兔免疫球蛋白 G (IgG) (北京博奥森生物技术有限公司, 批号分别为 131101W, 140520, K146819A); 其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 仪器 旷场反应箱 (自制), 强迫游泳水缸 (自制), ECLIPSE SOi 型显微镜 (日本 Nikon 公司), KD-TS3D1 全自动生物组织脱水机 (浙江科迪仪器有限公司), TB-718 型生物组织自动包埋机及 R318 型轮转式切片机 (湖北泰维科技实业有限公司), DT1001 型电子天平 (常熟市意欧仪器仪表有限公司), 5026 型酶联免疫检测仪 (奥地利 Tecan 公司), MR1812 型台式高速低温离心机 (法国 Jouan 公司), PUEELAB PLUS 型超纯水系统 (美国波尔公司), MB-601 型全自动酶标仪 (成都贝斯达仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、模型制备^[12] 及给药 OFT 筛选评分相近、体重均匀小鼠 60 只, 适应性饲养 1 周。饲养条件为, 5 只/笼, 室温 (22 ± 1) °C, 湿度 (50 ± 10) %, 自然光照 (12 h 白天/12 h 黑夜), 自由摄食饮水。根据 SPSS 19.0 统计软件产生随机数字分为 6 组, 分别为假手术组, 围绝经期抑郁症模型组, 氟西汀组 (3 mg · kg⁻¹), 白藜芦醇低、中、高剂量组 (10, 20, 40 mg · kg⁻¹), 每组 10 只。采用小鼠 OVX 联合 CUMS 法制备围绝经期抑郁症动物模型, 其中 Sham 组小鼠仅剪去卵巢旁体积相同脂肪组织。术后常规饲养 7 d 后, 除 Sham 组外, 其余各组给予 CUMS, 方法为禁食 (24 h), 禁水 (24 h), 昼夜颠倒 (12 h/12 h), 冰水游泳 (5 min), 45 °C 环境热烘 (5 min), 夹

尾 (1 min), 潮湿垫料, 电击足底等 7 种刺激, 这 7 种刺激每天随机采取一种, 每天刺激都不规律。各给药于每日应激前 1 h ig 给药, 其余各组给予等体积的生理盐水 ig, 每日每次 0.2 mL, 共计 21 d。

2.2 指标测定

2.2.1 阴道上皮角化实验 7 d 内连续监测各实验组小鼠阴道上皮脱落细胞相, 观察动情周期变化, 以证明去势是否成功。

2.2.2 动物一般体征 每天于应激前观察各组小鼠一般体征, 观察并记录其自由活动及探索行为。

2.2.3 体重测试 (body weight measurement, BWM) 在实验第 1, 21 天分别进行小鼠体重测定。

2.2.4 旷场实验 (open filed test, OFT) 制备小鼠旷场反应箱 (40 cm × 40 cm × 38 cm), 内壁涂黑, 底面平均划分 25 个小格。选取安静场地, 将小鼠放入反应箱中央, 摄像系统记录动物在旷场内 6 min 的行为学表现, 计算水平运动 (3 或 4 只脚同在一个格内计 1 分, 穿越 1 格计 1 分, 沿线行走每 8 cm 计 1 分) 及垂直运动得分 (记录小鼠站立次数; 双前足离地 1 次为 1 分)。2 只动物之间用 75% 乙醇擦拭底部及四壁, 以免“前任者效应”。实验在应激第 1, 21 天 (9:00 ~ 11:00) 各测定 1 次。

2.2.5 强迫游泳实验 (force swimming test, FST) 将小鼠单独置于水深 15 cm 的玻璃缸内 (高 20 cm, 直径 14 cm), 水温 (25 ± 1) °C, 游泳 6 min, 观察记录后 4 min 内小鼠在水中累计不动时间。每只小鼠实验结束后冲洗水缸、换水, 避免对下一只测试小鼠产生影响。实验在应激第 1, 21 天 (9:00 ~ 11:00) 各测定 1 次。

2.2.6 海马组织神经元形态学观察 行为学测试结束后第 2 天, 心脏灌流固定取脑, 石蜡切片脱蜡至水, 经尼氏染色、脱水、透明及封固后, 光镜观察海马组织神经元形态学变化并拍照。

2.2.7 海马组织 ER_α 及 ER_β 蛋白表达 行为学测试结束后第 2 天, 心脏灌流固定取脑, 石蜡切片脱蜡至水。经抗原修复, 灭活, 血清封闭, 孵育一抗, 二抗, DAB 显色, 复染及封固后, 显微镜观察海马组织 CA3 区, DG 区 ER_α 及 ER_β 蛋白表达并拍照。采用 Image Pro Plus 6.0 病理图像分析软件, 测定免疫反应蛋白阳性区域积分吸光度 IA 值。

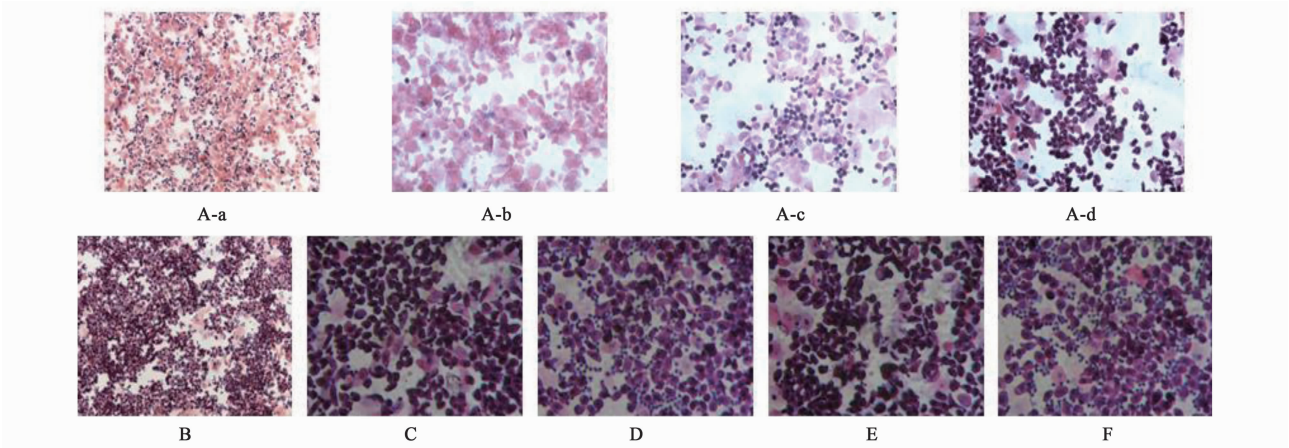
2.2.8 脑组织单胺类递质 5-HT, NE 及 DA 含量测定 行为学测试结束后第 2 天, 断头取脑, 冰台上迅速取小鼠脑组织并称取质量。匀浆, 4 °C, 3 000 r · min⁻¹ 离心 20 min, 静止, 吸取上清, -80 °C 保存。

按照 ELISA 试剂盒说明书操作方法,测定脑组织单胺类神经递质 5-HT,NE 及 DA 的含量。

2.3 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计分析软件对数据进行整理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据差异性检验采用 one-way ANOVA,组间均数两两比较应用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对围绝经期抑郁症模型小鼠阴道上皮脱落



A. 假手术组;B 模型组;C. 氟西汀组;D. 白藜芦醇 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;E. 白藜芦醇 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;F. 白藜芦醇 40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组(图 2 ~ 4 同);a. 发情前期;b. 发情期;c. 发情后期;d. 发情间期

图 1 各组小鼠阴道脱落细胞(HE, $\times 400$)

Fig. 1 Groups of vaginal exfoliated cells in mice(HE, $\times 400$)

3.2 对围绝经期抑郁症模型小鼠一般体征的影响

应激第 1 天,各实验组小鼠皮肤光泽,常梳理毛发,对周围环境嗅查寻觅,自主活动及探索活动正常。随着应激进行,与假手术组比较,围绝经期抑郁症模型组小鼠自主活动及探索行为减少,理毛次数减少,常倦怠不动;白藜芦醇低、中、高剂量(10,20,40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组均可改善小鼠一般活动状态。

3.3 对围绝经期抑郁症模型小鼠行为学影响

表 1 白藜芦醇对围绝经期抑郁症模型小鼠 OFT 水平及垂直运动得分影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of resveratrol on horizontal and venial movement of OFT on perimenopausal depression models in mice($\bar{x} \pm s, n = 10$) 分

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	水平运动		垂直运动	
		1 d	21 d	1 d	21 d
假手术	—	111.60 $\pm$ 6.08	108.30 $\pm$ 7.57	44.00 $\pm$ 6.00	43.10 $\pm$ 5.00
模型	—	110.20 $\pm$ 5.96	73.60 $\pm$ 6.62 ¹⁾	45.10 $\pm$ 5.55	29.20 $\pm$ 2.86 ¹⁾
氟西汀	3	114.56 $\pm$ 6.35	90.56 $\pm$ 6.59 ²⁾	44.22 $\pm$ 6.70	37.89 $\pm$ 2.57 ²⁾
白藜芦醇	10	110.30 $\pm$ 9.21	85.80 $\pm$ 5.80 ²⁾	45.10 $\pm$ 5.19	37.00 $\pm$ 3.09 ²⁾
	20	110.50 $\pm$ 9.24	93.90 $\pm$ 4.23 ^{2,3)}	43.40 $\pm$ 5.36	38.70 $\pm$ 2.87 ^{2,3)}
	40	112.40 $\pm$ 12.11	89.20 $\pm$ 5.25 ²⁾	44.60 $\pm$ 6.57	36.60 $\pm$ 2.95 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;各剂量组间比较³⁾ $P < 0.05$ (表 2 ~ 4 同)。

3.3.2 对围绝经期抑郁症模型小鼠 FST 的影响

细胞的影响 动物阴道脱落细胞相随性周期呈现规律变化,笔者进行阴道上皮角化实验可鉴定小鼠性周期变化,并判定动物去势是否成功。结果显示,与假手术组比较,各围绝经期抑郁症模型组小鼠阴道脱落细胞呈现大量白细胞和少量上皮细胞,7 d 内连续监测无周期性阴道细胞变化,角化细胞百分率(0.10 $\pm$ 0.05)%,证明小鼠去势成功,并可进行下一步实验。见图 1。

3.3.1 对围绝经期抑郁症模型小鼠 OFT 水平及垂直运动得分的影响

造模第 1 天,各组小鼠 OFT 水平及垂直运动得分比较无显著性差异。造模第 21 天,与假手术组比较,围绝经期抑郁症模型组小鼠 OFT 水平及垂直运动得分下降($P < 0.01$);与围绝经期抑郁症模型组比较,白藜芦醇低、中、高剂量组小鼠 OFT 水平及垂直运动得分增加($P < 0.01$),其中以中剂量较为显著($P < 0.05$)。见表 1。

造模第 1 天,各组小鼠 FST 不动时间比较无显著性

差异。造模第 21 天,与假手术组比较,围绝经期抑郁症模型组小鼠 FST 行为绝望不动时间增加 ($P < 0.01$);与围绝经期抑郁症模型组比较,白藜芦醇低、中、高剂量组小鼠 FST 不动时间减少 ($P < 0.01$),其中以中剂量较为显著 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.3.3 对围绝经期抑郁症模型小鼠体重的影响

表 2 白藜芦醇对围绝经期抑郁症模型小鼠体重和 FST 不动时间的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of resveratrol on body weight and behavioral despair time of FST on perimenopausal depression models in mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	FST 不动时间/s		体重/g	
		1 d	21 d	1 d	21 d
假手术	—	130.20 $\pm$ 8.80	127.80 $\pm$ 7.22	22.40 $\pm$ 1.84	28.90 $\pm$ 3.78
模型	—	136.00 $\pm$ 4.76	158.00 $\pm$ 8.45 ¹⁾	21.80 $\pm$ 2.15	23.50 $\pm$ 2.88 ¹⁾
氟西汀	3	136.89 $\pm$ 8.54	140.44 $\pm$ 10.98 ²⁾	22.44 $\pm$ 1.42	27.00 $\pm$ 1.87 ²⁾
白藜芦醇	10	130.50 $\pm$ 8.39	146.00 $\pm$ 10.73 ²⁾	22.20 $\pm$ 1.40	31.30 $\pm$ 2.67 ²⁾
	20	135.90 $\pm$ 6.84	135.60 $\pm$ 6.90 ^{2,3)}	21.60 $\pm$ 1.51	30.70 $\pm$ 2.91 ^{2,3)}
	40	132.60 $\pm$ 9.11	144.30 $\pm$ 9.82 ²⁾	21.80 $\pm$ 1.87	28.60 $\pm$ 2.32 ²⁾

3.4 对围绝经期抑郁症模型小鼠海马组织形态学影响 假手术组海马组织 CA3 区,DG 区神经元分层明显,排列规则,胞膜结构完整,胞质丰富,胞核明显,形态结构正常。与假手术组比较,围绝经期抑郁症模型组小鼠海马组织 CA3 区,DG 区神经元分层不清,排列紊乱,胞膜皱缩或不清,神经元萎缩、数量

造模第 1 天,各组小鼠体重比较无显著性差异。造模第 21 天,与假手术组比较,围绝经期抑郁症模型组小鼠体重增加缓慢 ($P < 0.01$);与围绝经期抑郁症模型组比较,白藜芦醇低、中、高剂量组小鼠体重增加 ($P < 0.01$),其中以中剂量组较为显著 ($P < 0.05$)。见表 2。

减少或丢失,核染色质浓集、可见核固缩,尼氏体数量明显减少、消失。与围绝经期抑郁症模型组小鼠比较,白藜芦醇低、中、高剂量组小鼠海马组织 CA3 区、DG 区神经元分层较明显、部分可见完整的细胞膜,除偶见细胞核缩小外,胞核内染色质分布较为均匀,尼氏体略有减少。见图 2。

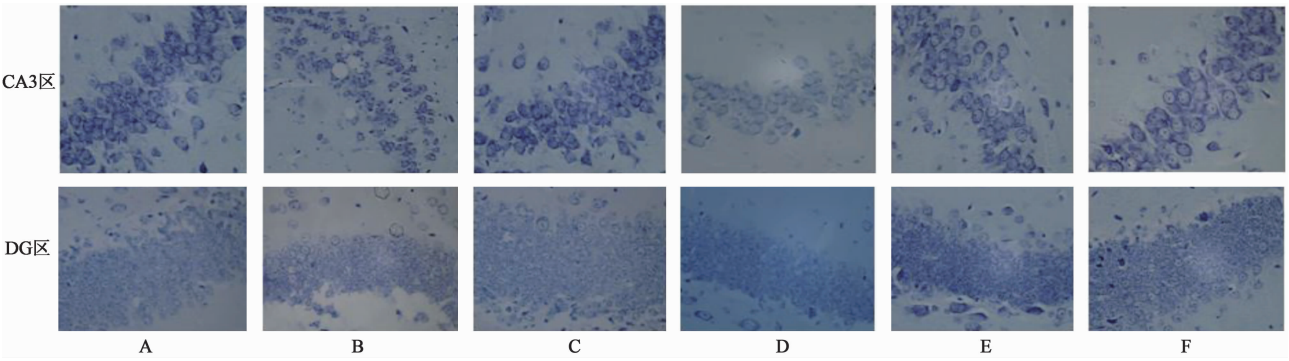


图 2 白藜芦醇对围绝经期抑郁症模型小鼠海马组织神经元形态学影响(尼氏染色,×400)

Fig. 2 Effect of resveratrol on morphology in hippocampus area on perimenopausal depression models in mice(Nissl, ×400)

3.5 对围绝经期抑郁症模型小鼠海马组织 ER α 及 ER β 蛋白表达影响 与假手术组比较,围绝经期抑郁症模型组小鼠海马组织 CA3 区 ER α 免疫反应阳性区域 IA 值减少 ($P < 0.01$),DG 区未见明显变化,CA3 区及 DG 区 ER β 免疫反应阳性区域 IA 值减少 ($P < 0.01$);与围绝经期抑郁症模型组比较,白藜芦醇低、中、高剂量组小鼠海马组织 CA3 区 ER α 免疫反应阳性区域 IA 值增加 ($P < 0.01$),DG 区未见明显变化;CA3 区及 DG 区 ER β 免疫反应阳性区域 IA

值增加 ($P < 0.01$),其中以中剂量较为显著 ($P < 0.05$)。见图 3,4 及表 3。

3.6 对围绝经期抑郁症模型小鼠脑组织单胺类递质 5-HT,NE,DA 含量影响 与假手术组比较,围绝经期抑郁症模型组小鼠脑组织单胺类递质 5-HT,NE,DA 含量减少 ($P < 0.01$);与围绝经期抑郁症模型组比较,白藜芦醇低、中、高剂量组小鼠脑组织 5-HT,NE,DA 含量增加 ($P < 0.01$),其中以中剂量组较为显著 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

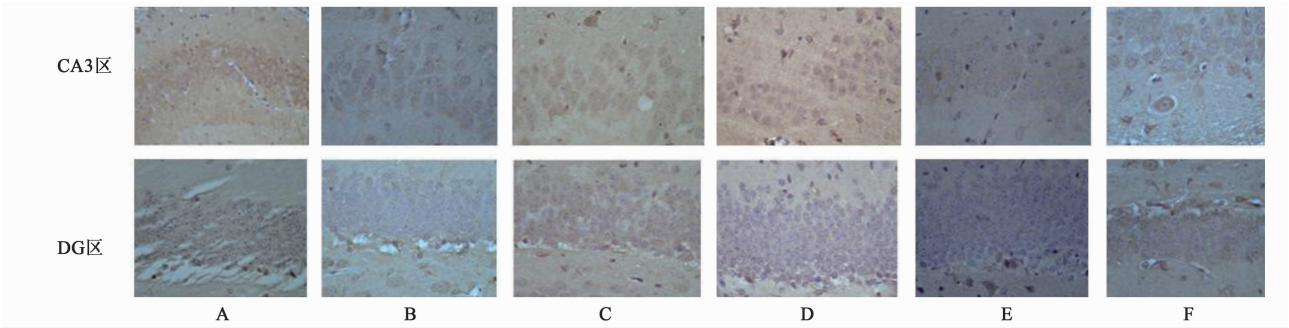


图 3 白藜芦醇对围绝经期抑郁症模型小鼠海马组织 ER α 免疫反应阳性区域蛋白表达影响(免疫组化, ×400)

Fig.3 Effect of resveratrol on ER α protein expression in hippocampus CA3 and DG district on perimenopausal depression models in mice (IHC, ×400)

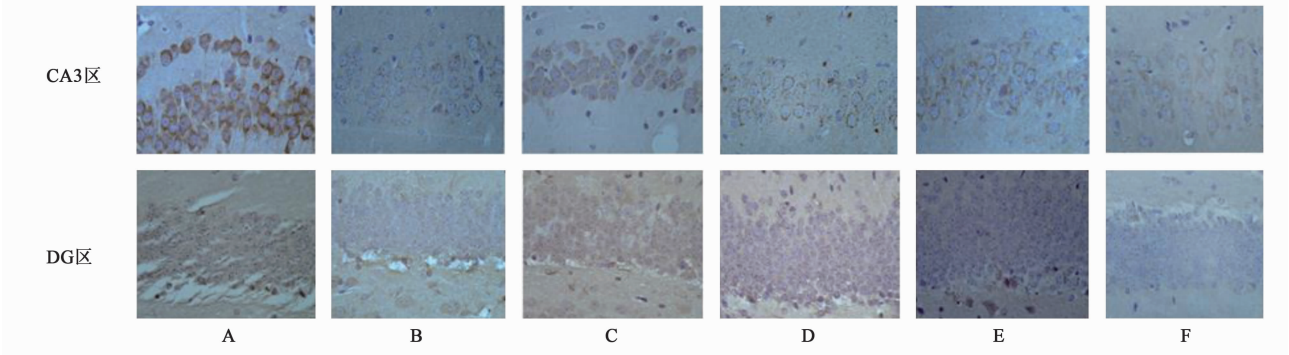


图 4 白藜芦醇对围绝经期抑郁症模型小鼠海马组织 ER β 免疫反应阳性区域蛋白表达影响(免疫组化, ×400)

Fig.4 Effect of resveratrol on ER β protein expression in hippocampus CA3 and DG district on perimenopausal depression models in mice (IHC, ×400)

表 3 白藜芦醇对围绝经期抑郁症模型小鼠海马组织 ER α 和 ER β 蛋白 IA 表达影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of resveratrol on ER α and ER β protein IA expression in hippocampus CA3 and DG district on perimenopausal depression models in mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ mg·kg ⁻¹	ER α		ER β	
		CA3	DG	CA3	DG
假手术	—	60 029. 54 ± 5 105. 73	25 789. 41 ± 2 744. 02	89 144. 50 ± 1 949. 17	79 744. 50 ± 1 685. 85
模型	—	16 461. 70 ± 1 287. 52 ¹⁾	23 063. 76 ± 2 874. 96	43 699. 96 ± 3 100. 06 ¹⁾	42 513. 52 ± 1 955. 49 ¹⁾
氟西汀	3	38 882. 59 ± 1 106. 46 ²⁾	26 321. 15 ± 3 643. 84	51 496. 45 ± 1 824. 86 ²⁾	52 496. 45 ± 4 160. 31 ²⁾
白藜芦醇	10	26 393. 89 ± 4 382. 97 ²⁾	25 397. 57 ± 2 322. 78	47 530. 25 ± 2 380. 71 ²⁾	47 730. 24 ± 1 807. 89 ²⁾
	20	43 447. 26 ± 3 319. 19 ^{2,3)}	25 159. 86 ± 1 989. 13	68 345. 95 ± 2 565. 61 ^{2,3)}	62 881. 35 ± 2 059. 85 ^{2,3)}
	40	30 951. 59 ± 2 615. 38 ²⁾	26 083. 90 ± 4 788. 89	57 791. 85 ± 2 317. 29 ²⁾	54 191. 85 ± 1 477. 16 ²⁾

表 4 白藜芦醇对围绝经期抑郁症模型小鼠脑组织单胺类递质类含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of resveratrol on content of monoamines neurotransmitter in brain tissue area on perimenopausal depression models in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	5-HT	NE	DA
假手术	—	180. 80 ± 5. 09	237. 30 ± 20. 16	104. 30 ± 8. 68
模型	—	113. 90 ± 10. 16 ¹⁾	147. 70 ± 11. 62 ¹⁾	77. 70 ± 8. 12 ¹⁾
氟西汀	3	158. 33 ± 9. 39 ²⁾	214. 22 ± 23. 05 ²⁾	95. 22 ± 8. 50 ²⁾
白藜芦醇	10	139. 20 ± 4. 59 ²⁾	210. 10 ± 15. 65 ²⁾	96. 50 ± 5. 23 ²⁾
	20	159. 00 ± 4. 83 ^{2,3)}	235. 40 ± 8. 62 ^{2,3)}	106. 90 ± 10. 90 ^{2,3)}
	40	145. 20 ± 8. 12 ²⁾	207. 20 ± 10. 75 ²⁾	99. 90 ± 7. 96 ²⁾

4 讨论

研究显示,女性雌激素水平波动与抑郁症易感程度相关,也可能是围绝经期抑郁症的触发点^[4]。因此,探讨应激、雌激素、单胺类神经递质、雌激素受体与 CNS 疾病的相互作用及关系具有重要作用。

白藜芦醇为天然多酚类化合物,具有 PE 活性。基础研究表明,白藜芦醇可通过促进神经再生、抑制神经细胞凋亡、降低兴奋性氨基酸活性、抑制氧化应激、清除自由基及类雌激素作用等机制而具有神经保护作用^[13],多用于脑卒中模型、老年痴呆模型、脊髓损伤模型等动物疾病的治疗,但有关其抗抑郁的研究较少。

围绝经期抑郁症动物模型成功制备是模拟临床上围绝经期抑郁症患者症状及临床表现,从而研究其病因、发病机制及研发抗抑郁药物的必要条件。围绝经期抑郁症为抑郁症一特殊类型,因其发病机制生理特殊性 & 病理复杂性,使本病在科学研究中动物模型复制与单纯抑郁症模型有一定区别。本研究中,依据女性体内雌激素水平低下与外界环境刺激被认为是围绝经期抑郁症发病内、外 2 个主要因素理论基础,采用小鼠双侧 OVX 联合 CUMS 法制备围绝经期抑郁症动物模型。结果显示,该方法较大程度模拟了围绝经期抑郁症的核心症状和相似病因,可操作性强,2 种模型在造模效果上不互相干扰,测试动物行为学变化,结果判定该模型成功制备是可行的。

动物行为学变化,是评价一个模型制作是否成功的标志,也是判定药物是否有效的标准。本研究通过 OFT 测试小鼠水平及垂直运动得分,判定动物“自发活动及探索行为”,通过 FST, BWM 测试小鼠游泳不动时间及体重变化,评价动物“行为绝望”及“快感缺失”程度,进一步验证围绝经期抑郁症模型制备是否成功。结果显示,雌激素低下及慢性应激可诱发小鼠抑郁样行为,表现为动物自发活动及探索行为减少、行为绝望及快感缺失;给予不同剂量白藜芦醇后,可改善小鼠行为学异常,表明白藜芦醇具有抗围绝经期抑郁症作用。

动物抑郁样行为的出现,必定有其脑部病理形态学损伤及神经内分泌改变的物质基础。海马为脑边缘系统之一,与学习、记忆、情绪及下丘脑-垂体-肾上腺素轴(hypothalamic pituitary adrenal axis,HPAA)调节密切相关^[14],对负性情绪高度敏感且易损伤。“海马神经可塑性障碍”为近年来有关抑郁症发病机制的最具突破性的理论。有研究指出,

“应激→海马神经元损伤及再生数量减少→神经可塑性障碍”可能是抑郁症发生的关键环节,抑郁症发病实质为易感人群(基因)在强烈持久应激条件下使神经内分泌反应(HPAA)由量变到质变(脑损伤)的恶性循环过程^[15-16]。以往研究揭示“单胺类神经递质缺乏”在抑郁症致病机制及临床抗抑郁药物治疗中具有重要作用。基于此,观察小鼠海马组织形态学变化及脑组织单胺类神经递质表达,结果显示,与假手术组比较,围绝经期抑郁症模型小鼠海马组织神经元损伤或数量减少,脑组织单胺类递质 5-HT, NE, DA 含量减少,而给予 PE 白藜芦醇治疗后,可改善脑组织损伤性变化及单胺类神经递质含量。

研究证实,女性围绝经期抑郁症与雌激素减少呈现相关性。雌激素具有神经保护作用,雌激素与 ER 结合通过基因组及非基因组机制调控靶基因的调控与表达,调节 CNS 形态结构与功能,调节与生殖、认知及情绪反应有关的脑区,并具有抗抑郁作用^[16]。有研究表明,CNS 中 ER 分布广泛,其中 ER α 主要与性行为及神经内分泌相关,ER β 则与情绪及认知行为相关^[17-18]。本研究显示,与假手术组比较,围绝经期抑郁症模型组小鼠海马组织 CA3 区 ER α 表达, DG 区 ER α , ER β 表达减少,而给予白藜芦醇治疗后,可改善上述脑区 ER 表达。

综上所述,植物雌激素白藜芦醇因化学结构与动物雌激素的相似性而具有抗围绝经期抑郁症活性,其神经保护机制可能通过抑制小鼠海马神经元损伤、上调脑组织单胺类神经递质 5-HT, NE, DA 含量,上调海马组织相关区域 ER 表达而实现的。但具体有关白藜芦醇植物雌激素活性与单胺类神经递质,ER 之间相互作用的机制与联系尚需进一步探讨。

[参考文献]

[1] Weber M T, Maki P M, McDermott M P. Cognition and mood in perimenopause: a systematic review and meta-analysis[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2014, 142(7): 90-98.

[2] Karaoulanis S E, Rizouli K A, Rizoulis A A, et al. Lack of association of acute phase response proteins with hormone levels and antidepressant medication in perimenopausal depression[J]. BMC Psychiatry, 2014, 14(6): 164-169.

[3] Borrow A P, Cameron N M. Estrogenic mediation of serotonergic and neurotrophic systems: implications for female mood disorders[J]. Prog Neuropsychopharmacol

Biol Psychiatry,2014,54(5):13-25.

[4] 王晓滨. 坤宁安对围绝经期慢性应激抑郁大鼠行为的影响及作用机制研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2010.

[5] Borrow A P, Cameron N M. Estrogenic mediation of serotonergic and neurotrophic systems; implications for female mood disorders[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry,2014,5(54):13-25.

[6] Baudry M, BI X, Aguirre C. Progesterone-estrogen interactions in synaptic plasticity and neuroprotection[J]. Neuroscience,2013,6(239):280-294.

[7] Johann S, Beyer C. Neuroprotection by gonadal steroid hormones in acute brain damage requires cooperation with astroglia and microglia[J]. Steroid Biochem Mol Biol,2013,137(9):71-81.

[8] Manthey D, Behl C. From structural biochemistry to expression profiling: neuroprotective activities of estrogen[J]. Neuroscience, 2006,138(3):845-850.

[9] 杨福中,雌二醇和氟西汀对抑郁症大鼠模型行为及 5-HT 递质系统的影响[D]. 上海:复旦大学,2007.

[10] YANG L C, ZHANG Q G, ZHOU C F, et al. Extra nuclear estrogen receptors mediate the neuroprotective effects of estrogen in the rat hippocampus[J]. PLoS One,2010,5(5):e9851.

[11] 张艳茹,贺永贵,伊红丽,等. 白藜芦醇神经系统保护作用的研究进展[J]. 河北联合大学学报:医学版, 2014,16(2):162-164.

[12] 蔡熙,黄晖,王岚. 围绝经期动物模型的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(10):71-73.

[13] 陈玉斌. 一: iNOS 在高脂饮食诱导的学习记忆缺失中的作用及机制研究;二: 白藜芦醇苷对鱼藤酮诱导帕金森病的保护作用及机制研究[D]. 广州:南方医科大学,2013.

[14] 柴丽,赵博. 抑郁症与 HPA 轴关系及中药干预的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 268-271.

[15] 张黎明,李云峰,宫泽辉. 神经元再生:抑郁症治疗的新策略[J]. 生理科学进展,2005,36(2):109-112.

[16] 王真真,张有志,宫泽辉,等. 抑郁症治疗的新靶点和新策略[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2010,24(5): 364-370.

[17] Kim J H, Lee B J, Bae J N, et al. Relationship of oestrogen receptor status to depressive symptoms and quality of life in breast cancer patients[J]. Acta Neuropsychiatr,2013,25(5):283-288.

[18] 时彦菊,鞠大宏,于智敏,等. 中医药对雌激素受体相关疾病调节作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(15):208-212.

[责任编辑 周冰冰]