

温阳解郁汤对皮质酮诱导的抑郁大鼠海马神经可塑性的影响

王鑫鑫¹, 赵杰², 冯振宇², 马小娟², 孟霜², 史敏¹, 周晓荣², 赵建平^{2*}

(1. 山西中医药大学, 太原 030619; 2. 山西省中西医结合医院, 太原 030013)

[摘要] **目的:**通过建立肾虚型抑郁症大鼠模型,观察温阳解郁汤对大鼠海马组织结构的干预作用。**方法:**将105只SD大鼠随机分为正常组,模型组,氟西汀组(4.17 mg·kg⁻¹),逍遥散组(1.88 g·kg⁻¹)及温阳解郁汤低、中、高剂量组(1.25, 2.50, 5.00 g·kg⁻¹),每组15只,除正常组外其他各组采用皮下注射皮质酮诱导抑郁症大鼠模型,造模同时灌胃给药,每天1次,连续28 d。通过糖水偏好实验、新环境进食抑制实验、强迫游泳实验、旷场实验反应大鼠的抑郁状态。苏木素-伊红(HE)染色观察海马神经元形态,尼氏染色检测海马区神经元细胞密度,透射电镜观察海马突触超微结构,免疫组化观察海马神经元突触前标志性蛋白突触小泡蛋白(SYP),突触后标志性蛋白95(PSD95)及凋亡相关蛋白半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)的表达,免疫荧光双标新生神经细胞的标记物溴脱氧核苷尿嘧啶(BrdU),微管相关蛋白(DCX)观察海马神经元凋亡、再生情况。**结果:**温阳解郁汤可改善抑郁大鼠体质量降低的现象,通过行为学检测发现模型组大鼠出现抑郁行为,温阳解郁汤及氟西汀组大鼠抑郁行为得到改善。HE染色结果显示,模型组大鼠海马神经元细胞核固缩、深染,排列稀疏,温阳解郁汤及氟西汀组大鼠神经元细胞明显改善。尼氏染色结果显示,与正常组比较,模型组大鼠细胞密度明显降低($P<0.05$);与模型组比较,温阳解郁汤组、氟西汀组及逍遥散组大鼠细胞密度明显增加($P<0.05$),排列紧凑。电镜结果显示,与正常组比较,模型组大鼠突触活性带长度明显缩短($P<0.05$),突触间隙明显增宽($P<0.05$),致密区厚度明显变薄($P<0.05$);与模型组比较,温阳解郁汤组、氟西汀组及逍遥散组大鼠突触活性带长度明显变短($P<0.05$),突触间隙明显缩小($P<0.05$),致密区厚度明显增厚($P<0.05$)。免疫组化及免疫荧光结果显示,与正常组比较,模型组大鼠海马组织SYP, PSD95, BrdU, DCX的蛋白表达明显降低($P<0.05$), Caspase-3蛋白表达明显增加($P<0.05$);与模型组比较,温阳解郁汤组、氟西汀组及逍遥散组大鼠海马组织SYP, PSD95, BrdU, DCX蛋白表达明显增加($P<0.05$), Caspase-3蛋白表达明显降低($P<0.05$)。**结论:**温阳解郁汤能够促进大鼠海马神经元再生,改善抑郁大鼠抑郁状态。

[关键词] 温阳解郁汤; 抑郁症; 海马神经可塑性; 突触; 超微结构

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R246.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)02-0093-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220237

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211118.1650.004.html>

[网络出版日期] 2021-11-20 7:01

Effect of Wenyang Jieyu Decoction on Hippocampal Neuroplasticity in Depressed Rats Induced by Corticosterone

WANG Xin-xin¹, ZHAO Jie², FENG Zhen-yu², MA Xiao-juan², MENG Shuang², SHI Min¹,
ZHOU Xiao-rong², ZHAO Jian-ping^{2*}

(1. Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China;

2. Shanxi Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Taiyuan 030013, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Wenyang Jieyu decoction (WYJY) on the hippocampal structure of depressed rats with kidney-yang deficiency. **Method:** The 105 SD rats were randomly divided into normal group, model group, fluoxetine group (4.17 mg·kg⁻¹), Xiaoyaosan group (1.88 g·kg⁻¹), and low-,

[收稿日期] 20210810(025)

[基金项目] 山西省应用基础研究计划面上青年基金项目(201901D211530);山西中医药大学科技创新能力培育计划项目(2019PY-014);山西省卫生健康委科研项目(2019085);山西省应用基础研究计划面上自然基金项目(201801D121351)

[第一作者] 王鑫鑫,在读硕士,从事中药临床应用研究,E-mail:1343719090@qq.com

[通信作者] *赵建平,博士生导师,主任药师,从事临床中药学、中药药理学研究,E-mail:4668719@163.com

medium- and high-dose (1.25, 2.50, 5.00 g·kg⁻¹) WYJY groups, 15 in each group. The depression model was induced by subcutaneous injection of corticosterone in rats except for those in the normal group and the rats were orally administered once a day for 28 days. The depression-like behaviors of rats were observed by sucrose preference test, novelty-suppressed feeding test, forced swimming test, and open field test. The morphology of hippocampal neurons was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and the density of hippocampal neurons was detected by Nissl staining. The ultrastructure of hippocampal synapses was observed by transmission electron microscopy (TEM). The expression of synaptophysin (SYP), postsynaptic density-95 (PSD95), and apoptosis-related protein Caspase-3 in hippocampal neurons was observed by immunohistochemistry, and bromodeoxyuridine (BrdU) and doublecortin (DCX) were used to observe the apoptosis and regeneration of hippocampal neurons. **Result:** WYJY could improve weight loss in depressed rats. As revealed by the behavioral tests, the model group showed depression-like behaviors, which were relieved in the WYJY groups and the positive drug groups. HE staining showed that the nuclei of hippocampal neurons in the model group were constricted, deeply stained, and sparsely arranged, while the neurons in the WYJY groups and the positive drug groups were significantly improved. Nissl staining demonstrated that the cell density of the model group was lower than that of the normal group ($P<0.05$). Compared with model group, the groups with drug intervention showed increased cell density ($P<0.05$) and compact arrangement. According to the results in TEM, compared with normal group, the model group showed shortened synaptic active zone ($P<0.05$), widened synaptic cleft ($P<0.05$), and thinned tight zone ($P<0.05$). Compared with model group, the groups with drug intervention showed shortened synaptic active zone ($P<0.05$), narrowed synaptic cleft ($P<0.05$), and thickened tight zone ($P<0.05$). As displayed by the results of immunocytochemistry and immunofluorescence, compared with the normal group, the model group showed decreased protein expression of SYP, PSD95, BrdU, and DCX in the hippocampus ($P<0.05$) and increased protein expression of Caspase-3 ($P<0.05$). Compared with the model group, the groups with drug intervention showed increased protein expression of SYP, PSD95, BrdU, and DCX in the hippocampus ($P<0.05$) and decreased protein expression of Caspase-3 ($P<0.05$). **Conclusion:** WYJY can promote the regeneration of hippocampal neurons in rats and improve the depression of rats.

[Keywords] Wenyang Jieyu decoction; depression; hippocampal neuroplasticity; synapse; ultrastructure

抑郁症表现为情绪低落,兴趣减退或快感缺失,思维迟缓,言语活动减少,严重时会产生无用、无助、无望的“三无症状”,有自杀倾向和自杀行为^[1],是一种常见的精神障碍疾病^[2],可以持久或者反复发作,严重影响个人学习和生活的应对能力。根据世界卫生组织的调查发现2015年全世界抑郁症患者的人数达到3.22亿,在2005至2015年,患抑郁症人数增加了18.4%,预计到2030年,抑郁症将会上升至世界疾病首位^[3]。

抑郁症的发病多伴有海马神经可塑性的损伤^[4]。神经可塑性主要是指中枢神经系统为了主动适应和反应外界环境各种变化,在结构和功能活动上的可修饰性,表现为神经元的萎缩、神经突触减少、神经发生下调等,结构可塑性变化的累积最终会导致神经功能可塑性发生改变,进而影响到学习、记忆、情感等脑的高级功能^[5]。神经病理学研究表明,抑郁症患者海马区域神经细胞萎缩、海马神

经发生降低^[6]。近年来,越来越多的研究表明,抑郁症的发生发展与海马神经可塑性改变密切相关^[7-8],机体在长期应激状态下,会导致下丘脑-垂体-肾上腺皮质(HPA)轴功能失调,糖皮质激素分泌大量增加,从而引起神经递质、神经营养因子和免疫细胞因子释放失调,导致神经细胞元以及神经回路发生结构与功能的改变,最终导致抑郁发生。而几乎所有现行的抗抑郁药物或方法均通过促进成年脑神经元再生而发挥抗抑郁作用^[9],因此判断神经可塑性损伤可能是抑郁症发病机制的最终整合途径。

温阳解郁汤是由清末郑钦安《医法圆通》补坎益离丹化裁而来,具有温阳助肾、开郁安神的功效。本课题组经实验及临床研究发现^[10-12],温阳解郁汤改善慢性轻度不可预见应激模型(CMUS)大鼠的抑郁行为;抑制慢性应激状态下HPA轴的过度激活,降低高糖皮质激素水平对大脑海马组织的损伤;改善抑郁症患者抑郁状态,具有明显的抗抑郁疗效。

为进一步研究温阳解郁汤抗抑郁机制,本实验通过建立皮质酮诱导的大鼠抑郁症模型,分析温阳解郁汤对大鼠海马神经元凋亡、再生、神经元结构与突触可塑性标志性蛋白表达的影响,为温阳解郁汤的临床应用提供实验依据和理论支持。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD雄性大鼠105只,体质量(180±20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号SCXK(京)2016-0011。饲养于山西中医药大学动物实验室内,室温24℃,12h光照昼夜循环,空气流通,适应性喂养7d,期间自由饮食饮水。本实验操作过程中严格遵守实验动物伦理标准,动物实验伦理委员会的编号2020DW111。

1.2 药物及试剂 温阳解郁汤由桂枝、附子各15g,炙甘草10g,生姜、乌梅各30g,大枣5个组成(山西维康堂中药饮片有限公司,批号分别为200601,190301,200601,2001022,190301,200621),由山西中医药大学裴香萍副教授鉴定均为正品;皮质酮粉末(CORT,上海凛恩科技发展有限公司,批号RH248547);氟西汀(毕得医药科技有限公司,批号BNP761);尼氏染色试剂盒(北京雷根生物技术有限公司,批号DK0022),溴脱氧核苷尿嘧啶(BrdU),微管相关蛋白(DCX),半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)一抗(英国Abcam公司,批号分别为ab6326,ab18723,ab184787);SYP一抗(美国Cell Signaling公司,批号36406),突触后标志性蛋白95(PSD95)一抗(美国GeneTex公司,批号GTX133091);广谱二抗,DAB浓缩型试剂盒(上海长岛生物技术有限公司,批号分别为D-3004,FL-6001);DAPI,防淬灭封片剂(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为C1002,P0126);苏木素染液,伊红染液(广州鸿泉生物科技有限公司,批号分别为HQ6001,HQ6002)。

1.3 仪器 FA224型电子分析天平(杭州万特衡器有限公司);PL-S100型超声波清洗器(康士洁超声波科技有限公司);TD25-WS型离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);CX41型正置显微镜(日本Olympus公司);SQ2125型石蜡切片机,PPTHK-21B型摊片机,DM6000型荧光显微镜,BUC7型超薄切片机(德国Leica公司);IMS图象分析系统[基尔顿生物科技(上海)有限公司];HT7700型透射电子显微镜(日本Hitachi公司)。

2 方法

2.1 温阳解郁汤溶液的制备 温阳解郁汤中各药

物按比例称量,加入为药材量10倍的水煎煮3次,每次1h,附子先煎1h,用纱布过滤后,合并滤液浓缩至稠膏状,干燥得干膏24g,粉碎备用,出膏率为18.46%。

2.2 动物分组及给药 通过旷场实验行为学评分筛选105只SD雄性大鼠,按体质量随机分为7组,分别为正常组,模型组,氟西汀组,逍遥散组,温阳解郁汤低、中、高剂量组,每组15只。配置温阳解郁汤低、中、高质量浓度为0.084,0.17,0.34g·mL⁻¹的溶液,氟西汀质量浓度为0.278g·L⁻¹,逍遥散质量浓度为0.13g·mL⁻¹。换算温阳解郁汤低、中、高剂量组大鼠给药剂量分别为1.25,2.50,5.00g·kg⁻¹,分别为临床的等效剂量的1,2,4倍剂量;氟西汀正常组给予盐酸氟西汀4.17mg·kg⁻¹,逍遥散组给予逍遥散溶液1.88g·kg⁻¹,灌胃容量均为15mL·kg⁻¹,正常组及模型组给予等体积蒸馏水,每天1次,连续28d。

2.3 动物模型的制备^[13] 采用反复不定时CORT皮下给药复制动物模型,给药剂量为20mg·kg⁻¹,CORT先用1%DMSO溶解皮质酮后加入含0.1%聚山梨酯-80的生理盐水,超声30min使成均匀混悬液。正常组给予等量相同溶媒,连续注射28d,注射剂量为4mL·kg⁻¹。于实验第0,7,14,21,28天称量体质量,并进行行为学检测。

2.4 检测指标

2.4.1 糖水偏好实验检测大鼠糖水偏好率 在安静的环境中对大鼠进行糖水训练,每笼同时放置2个水瓶,第1天两瓶均装有1%蔗糖水,第2天将其中1瓶蔗糖水换成纯水。禁食禁水24h后,同时给予大鼠定量好的两瓶水,1瓶1%蔗糖水,1瓶纯水,1h后取走称质量计算大鼠糖水偏好率。糖水偏好率=糖水消耗量/(糖水消耗量+纯水消耗量)×100%。

2.4.2 新环境进食抑制实验检测大鼠进食潜伏期 糖水偏好实验结束后进行新环境进食抑制实验。使用50cm×50cm×50cm的试验箱,将食物放置箱底中央一小块白纸上。记录每只大鼠从放入到开始进食的时间,观察5min,计时结束还没有进食,按5min计算。

2.4.3 强迫游泳实验检测大鼠禁止不动时间 在糖水训练的第1天进行大鼠强迫游泳实验。将实验大鼠放入高度为50cm,直径为20cm的圆柱形筒中,水温(24±2)℃,水深约40cm。强迫游泳共进行6min,前2min为适应时间,后4min为记录时间,记录大鼠在水中静止时间(停止挣扎漂浮不动前爪不动或轻微划动保持身体不下沉)。

2.4.4 旷场实验检测大鼠行径路程和大鼠得分

在糖水训练的第2天进行旷场实验。安静的室温环境下,将大鼠从同一位置、方向轻放于9格50 cm×50 cm×50 cm的黑色试验箱底板中心位置,让其自由活动,记录大鼠5 min行径路程和大鼠得分,大鼠四肢均穿过的方格数,穿越一格得1分。双前肢抬起次数(至少离地1 cm),双前肢离地1次得1分。2只动物之间用乙醇清洁方箱周壁及底板,避免影响实验结果。

2.4.5 HE染色观察大鼠神经元病理形态学变化

大鼠取材前禁食不禁水12 h,用10%水合氯醛按3 mL·kg⁻¹腹腔注射进行麻醉,腹主动脉取血,取血完成后小心剥离脑组织固定于4%多聚甲醛,固定24 h。流水冲洗,梯度乙醇脱水,浸蜡、包埋、切片。烤片脱蜡,苏木素染色20 min,自来水冲洗,分化液分化,水洗,返蓝液返蓝,水洗,伊红染色15 min,自来水冲洗,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。显微镜下观察海马神经元形态。

2.4.6 尼氏染色检测神经细胞结构变化

将石蜡切片二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,切片置于焦油紫染色液(Cresyl violet stain)56℃浸染1 h,酒精灯上加温使切片冒气泡为止,去离子水冲洗,尼氏染色液分化3 min,无水乙醇迅速脱水,二甲苯透明,中性树脂封固,显微镜下观察分析海马区神经细胞密度。

2.4.7 透射电镜检测突触超微结构

大鼠腹主动脉取血完成后,断头取脑,于冰上3 min内将大鼠海马组织取出并用锋利刀片将海马组织切成米粒大小,投入电镜固定液,4℃固定4 h,漂洗、固定2 h。梯度无水乙醇、丙酮脱水,包埋剂渗透包埋,60℃烤箱聚合48 h,超薄切片机切片50 nm超薄切片,铀铅双染色,透射电子显微镜下观察,采集图像分析,观

察海马突触超微结构。

2.4.8 免疫组化检测 SYP, PSD95, Caspase-3 蛋白表达

将石蜡切片二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,高压抗原修复30 min,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,加3% H₂O₂阻断内源性过氧化物酶,湿盒孵育10 min。PBS清洗,羊血清封闭,一抗(Caspase-3 1:1 000, SYP 1:200, PSD95 1:500)孵育,二抗孵育, DAB染色,自来水冲洗,苏木素复染,0.1%盐酸乙醇分化,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。显微镜下观察 SYP, PSD95 及 Caspase-3 的蛋白表达,分析海马神经元重塑及凋亡情况。

2.4.9 免疫荧光检测 BrdU, DCX 蛋白表达

将石蜡切片65℃恒温烘箱中烤片30 min,二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,自来水冲洗10 min,高压修复15 min,自然冷却后, PBS洗3次,每次3 min。一抗(BrdU 1:250, DCX 1:1 500)4℃孵育过夜,荧光二抗湿盒孵育1 h,防淬灭封片剂与DAPI 1:500稀释封片,荧光显微镜拍片,观察分析海马神经元的再生情况。

2.5 统计学分析

采用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间比较采用单因素方差分析,组间比较采用最小显著性差异法(LSD)-*t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠体质量的影响

与正常组比较,模型组大鼠在给药7, 14, 21, 28 d时体质量均有明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,氟西汀组、逍遥散组以及温阳解郁汤中、高剂量组大鼠体质量在给药4, 21, 28 d时明显升高($P < 0.05$),温阳解郁汤低剂量组体质量在给药28 d时明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 温阳解郁汤对大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 1 Effect of Wenyang Jieyu decoction on body weight of rats ($\bar{x} \pm s, n=15$)

g

组别	剂量/g·kg ⁻¹	体质量				
		0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常		230.23±11.27	268.09±16.01	299.56±22.14	327.13±26.44	356.83±31.35
模型		229.53±7.15	228.81±14.43 ¹⁾	219.43±17.46 ¹⁾	217.62±14.00 ¹⁾	217.95±25.06 ¹⁾
温阳解郁汤	1.25	231.14±11.10	226.56±19.58	230.99±23.05	231.69±23.08	239.50±19.10 ²⁾
	2.50	232.17±7.90	227.69±10.86	243.16±17.79 ²⁾	248.73±18.54 ²⁾	255.99±20.89 ²⁾
	5.00	231.40±6.70	220.85±10.47	236.20±13.88 ²⁾	239.26±12.47 ²⁾	249.83±15.07 ²⁾
氟西汀	4.17×10 ⁻³	234.55±8.76	217.22±10.46	236.31±16.37 ²⁾	232.37±18.67	243.85±15.25 ²⁾
逍遥散	1.88	230.77±7.62	225.96±13.96	236.24±21.76 ²⁾	239.77±25.27 ²⁾	245.20±26.68 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表2~10同)。

3.2 行为学检测结果

3.2.1 对大鼠糖水偏好率的影响 与正常组比较,模型组在给药21,28 d时糖水偏好率明显降低($P<0.05$);与模型组比较,氟西汀组、逍遥散组及温阳解

郁汤高剂量组在给药21,28 d时糖水偏好率明显升高($P<0.05$),温阳解郁汤中剂量组在给药28 d时糖水偏好率明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 温阳解郁汤对大鼠糖水偏好率的影响($\bar{x}\pm s, n=15$)

Table 2 Effect of Wenyang Jieyu decoction on sugar water preference rate in rats ($\bar{x}\pm s, n=15$)

%

组别	剂量/g·kg ⁻¹	糖水偏好率				
		0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常		76.25±2.10	74.27±4.24	74.21±1.70	72.78±1.94	71.73±2.36
模型		75.55±1.42	72.32±0.98	69.99±1.69	66.72±1.95 ¹⁾	60.88±4.60 ¹⁾
温阳解郁汤	1.25	78.38±0.97	75.39±2.21	73.28±4.95	67.96±2.32	64.32±2.05
	2.50	75.46±3.49	74.93±1.48	72.73±1.80	69.39±2.07	68.65±1.84 ²⁾
	5.00	75.04±2.12	74.23±0.89	72.43±1.23	70.38±2.96 ²⁾	69.23±2.90 ²⁾
氟西汀	4.17×10 ⁻³	77.22±1.62	75.24±1.97	72.13±3.24	70.81±0.66 ²⁾	70.75±3.03 ²⁾
逍遥散	1.88	78.34±0.43	75.16±0.77	72.06±1.07	70.98±1.25 ²⁾	68.79±0.61 ²⁾

3.2.2 对大鼠进食潜伏期的影响 与正常组比较,模型组大鼠在给药14,21,28 d时进食潜伏期明显增加($P<0.05$);与模型组比较,温阳解郁汤中、高剂量组大鼠在给药21,28 d时进食潜伏期明显缩短

($P<0.05$),氟西汀组和逍遥散组大鼠在给药14,21,28 d时以及温阳解郁汤低剂量组大鼠在给药28 d时进食潜伏期显著缩短,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表3 温阳解郁汤对大鼠进食潜伏期的影响($\bar{x}\pm s, n=15$)

Table 3 Effect of Wenyang Jieyu decoction on feeding latency in rats ($\bar{x}\pm s, n=15$)

s

组别	剂量/g·kg ⁻¹	进食潜伏期				
		0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常		93.50±33.23	97.86±32.61	95.57±27.86	105.43±19.34	101.25±22.56
模型		86.25±23.41	101.88±24.03	139.25±25.79 ¹⁾	150.50±29.75 ¹⁾	185.50±19.60 ¹⁾
温阳解郁汤	1.25	82.14±18.60	98.43±22.22	121.00±19.20	135.14±17.58	153.88±26.56 ²⁾
	2.50	75.57±17.11	100.57±23.37	116.43±25.06	121.27±21.42 ²⁾	122.71±24.50 ²⁾
	5.00	78.43±24.42	87.14±15.13	114.71±22.06	115.29±14.68 ²⁾	114.57±27.59 ²⁾
氟西汀	4.17×10 ⁻³	85.75±8.94	98.50±35.58	111.75±17.33 ²⁾	127.50±16.65 ²⁾	130.63±47.26 ²⁾
逍遥散	1.88	86.13±18.60	91.88±20.27	111.38±30.54 ²⁾	127.25±25.21 ²⁾	128.25±23.64 ²⁾

3.2.3 对大鼠禁止不动时间的影响 与正常组比较,模型组大鼠在给药7,14,21,28 d时禁止不动时间明显增加($P<0.05$);与模型组比较,氟西汀组、温阳解郁汤中、高剂量组在给药14,21,28 d时大鼠禁止不动时间明显降低($P<0.05$),逍遥散组在给药21,28 d时以及温阳解郁汤低剂量组在给药28 d时大鼠禁止不动时间明显降低($P<0.05$)。见表4。

氟西汀组和逍遥散组大鼠在给药21,28 d时以及温阳解郁汤低剂量组大鼠在给药28 d时5 min内行径总路程明显增加($P<0.05$)。与正常组比较,模型组大鼠在给药14,21,28 d时旷场得分明显减少($P<0.05$);与模型组比较,氟西汀组和温阳解郁汤中剂量组在给药28 d时旷场得分明显增加($P<0.05$),逍遥散组和温阳解郁汤高剂量组在给药21,28 d时旷场得分明显增加($P<0.05$)。见表5,6。

3.2.4 对大鼠旷场行径路程和大鼠得分的影响

与正常组比较,模型组大鼠在给药7,14,21,28 d时5 min内行径总路程明显减少($P<0.05$);与模型组比较,温阳解郁汤中、高剂量组大鼠在给药14,21,28 d时5 min内行径总路程明显增加($P<0.05$),

3.3 对大鼠海马神经元形态的影响 正常组海马组织神经元细胞体大、丰满、胞浆丰富,细胞核清晰,细胞间排列整齐,界限清楚;与正常组比较,模型组和温阳解郁汤低剂量组海马组织可见大量的

表4 温阳解郁汤对大鼠禁止不动时间的影响 ($\bar{x}\pm s, n=15$)

Table 4 Effect of Wenyang Jieyu decoction on immobile time in rats ($\bar{x}\pm s, n=15$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	禁止不动时间				
		0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常		127.82±29.96	113.54±37.55	103.55±19.75	115.18±29.76	125.82±33.91
模型		123.18±31.53	141.64±23.62 ¹⁾	190.64±21.38 ¹⁾	193.55±19.84 ¹⁾	208.82±24.89 ¹⁾
温阳解郁汤	1.25	123.00±18.06	149.55±22.56	169.91±21.28	174.18±31.18	173.27±36.17 ²⁾
	2.50	144.36±27.30	131.09±28.41	143.18±34.12 ²⁾	117.64±19.14 ²⁾	167.36±34.84 ²⁾
	5.00	125.00±16.03	158.73±20.76	173.55±24.14 ²⁾	155.88±35.87 ²⁾	136.36±35.13 ²⁾
氟西汀	4.17×10 ⁻³	138.36±42.34	155.00±35.03	129.00±24.66 ²⁾	158.82±30.56 ²⁾	169.22±25.25 ²⁾
逍遥散	1.88	138.64±36.13	164.25±27.87	168.91±34.03	155.00±38.34 ²⁾	174.83±33.55 ²⁾

表5 温阳解郁汤对大鼠行径总路程的影响 ($\bar{x}\pm s, n=15$)

Table 5 Effect of Wenyang Jieyu decoction on total distance of rats ($\bar{x}\pm s, n=15$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	总路程				
		0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常		23.95±2.65	28.68±5.90	26.501±3.25	11.96±1.42	12.28±1.27
模型		27.67±3.58	13.94±5.30 ¹⁾	7.66±5.31 ¹⁾	5.99±2.36 ¹⁾	8.01±1.93 ¹⁾
温阳解郁汤	1.25	27.22±3.48	12.32±2.80	9.34±1.62	7.15±2.21	10.74±1.82 ²⁾
	2.50	29.14±4.33	14.79±2.84	12.51±3.04 ²⁾	9.50±2.35 ²⁾	13.08±4.04 ²⁾
	5.00	28.26±4.01	16.00±2.78	11.51±2.96 ²⁾	12.92±4.80 ²⁾	13.79±3.29 ²⁾
氟西汀	4.17×10 ⁻³	29.42±3.26	15.46±4.84	10.01±3.50	9.73±2.80 ²⁾	11.51±1.60 ²⁾
逍遥散	1.88	28.30±3.88	12.55±4.13	10.47±3.50	9.10±4.63 ²⁾	12.30±2.48 ²⁾

表6 温阳解郁汤对大鼠旷场得分的影响 ($\bar{x}\pm s, n=15$)

Table 6 Effect of Wenyang Jieyu decoction on open field score of rats ($\bar{x}\pm s, n=15$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	旷场得分				
		0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常		101.27±27.76	58.25±21.48	80.36±14.00	51.36±9.06	46.72±12.59
模型		108.27±18.82	59.33±12.62	39.00±18.88 ¹⁾	21.45±11.88 ¹⁾	33.00±12.23 ¹⁾
温阳解郁汤	1.25	120.00±33.19	48.00±17.60	35.45±8.81	21.91±11.19	36.43±1.09
	2.50	119.47±24.44	53.00±17.15	42.36±13.43	26.55±18.08	52.20±10.04 ²⁾
	5.00	124.56±30.00	50.93±16.96	47.36±13.71	45.73±17.24 ²⁾	50.44±16.96 ²⁾
氟西汀	4.17×10 ⁻³	114.67±23.65	47.16±18.61	40.82±15.24	25.50±11.98	46.29±5.38 ²⁾
逍遥散	1.88	118.29±26.20	47.08±20.60	38.38±12.86	36.00±15.66 ²⁾	46.36±20.67 ²⁾

神经元细胞核固缩、坏死、深染,排列稀疏,细胞间隙增大,神经纤维排列紊乱;温阳解郁汤中、高剂量组、氟西汀组及逍遥散组与模型组比较有明显改善作用,神经元细胞体大、丰满、圆润,胞浆丰富,细胞核清晰,偶有细胞核深染。见图1。

3.4 对大鼠神经细胞密度的影响 正常组大鼠海马组织细胞密度大,锥体细胞层厚,排列整齐、紧密;正常组比较,模型组大鼠海马组织细胞密度明显减小($P<0.05$),锥体细胞带细胞数量减少,神经元胞膜溶解、破裂、尼氏小体减少、排列中断、紊乱;与

模型组比较,温阳解郁汤低、中、高剂量组、氟西汀组及逍遥散组细胞密度明显增加($P<0.05$),锥体细胞层厚度增加,排列紧凑,尼氏小体增加。见图2,表7。

3.5 对大鼠突触超微结构的影响 正常组和温阳解郁汤高剂量组突触结构完整,突触前膜致密区存在、连续,突触小泡丰富,树突棘基质均匀。与正常组比较,模型组大鼠突触小体质量度肿胀,线粒体大多重度肿胀,基质稀疏,大面积低电子密度水肿区,突触小泡数量较多,但大多破损,游离。活性带

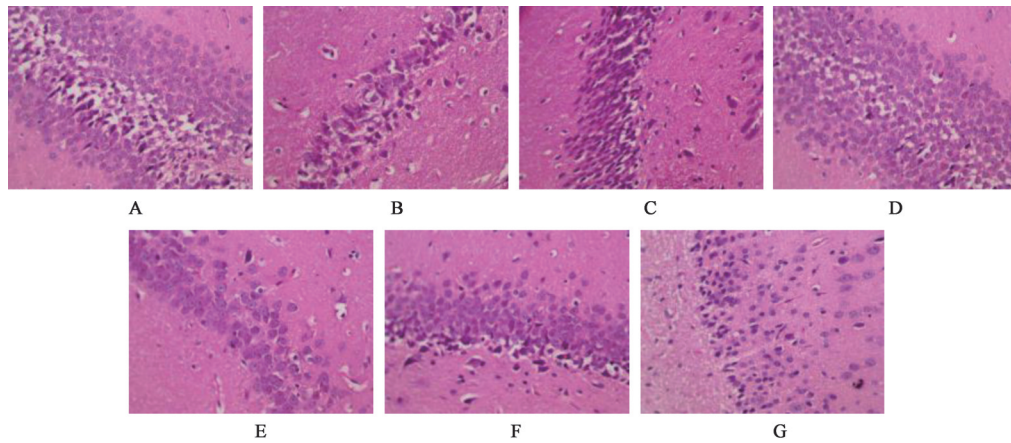


图1 温阳解郁汤对大鼠神经病理形态学变化的影响(HE, ×400)
A. 正常组; B. 模型组; C. 温阳解郁汤低剂量组; D. 温阳解郁汤中剂量组; E. 温阳解郁汤高剂量组; F. 氟西汀组; G. 逍遥散组(图2~7同)

Fig. 1 Effect of Wenyang Jieyu decoction on pathophysiological change of rats (HE, ×400)

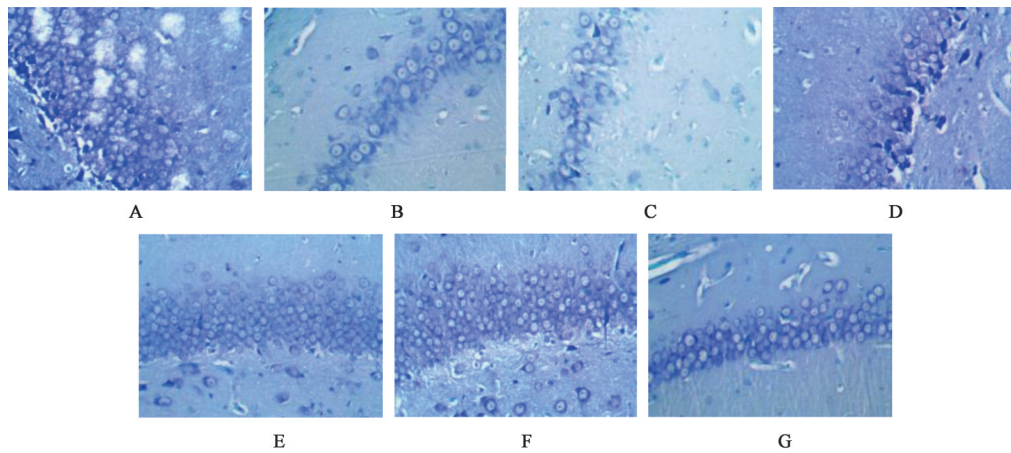


图2 温阳解郁汤对大鼠神经元细胞密度的影响(尼氏染色, ×400)

Fig. 2 Effect of Wenyang Jieyu decoction on rat neuron cell density (Nissl, ×400)

表7 温阳解郁汤对大鼠神经细胞阳性率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Wenyang Jieyu decoction on positive rate of rat nerve cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	细胞阳性率/%
正常		30.00±2.64
模型		11.11±1.06 ¹⁾
温阳解郁汤	1.25	13.90±1.15 ²⁾
	2.50	17.66±1.61 ²⁾
	5.00	24.69±1.01 ²⁾
氟西汀	4.17×10 ⁻³	21.61±3.20 ²⁾
逍遥散	1.88	15.36±1.11 ²⁾

长度和致密区厚度明显变小($P<0.05$),突触间隙明显增宽($P<0.05$);与模型组比较,温阳解郁汤中、高剂量组、氟西汀组和逍遥散组海马突触有明显改善,突触小体电子密度有所降低,突触数量增加不明显,但前后膜边界相对清晰完整,活性带长度和致密区厚度明显增大($P<0.05$),突触间隙明显变窄

($P<0.05$)。见图3,表8。

3.6 对大鼠海马组织 PSD95, SYP, Caspase-3 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠海马组织中 PSD95, SYP 蛋白的表达明显减少($P<0.05$), Caspase-3 蛋白表达明显升高($P<0.05$);与模型组比较,温阳解郁汤低、中、高剂量组、氟西汀组和逍遥散组海马组织中 PSD95, SYP 蛋白的表达明显增加($P<0.05$), Caspase-3 蛋白表达明显降低($P<0.05$)。见图4~6,表9。

3.7 对大鼠海马组织 BrdU, DCX 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠海马组织中 DCX 蛋白的表达明显降低, BrdU 阳性细胞表达明显减少($P<0.05$);与模型组比较,温阳解郁汤中、高剂量组及氟西汀组和逍遥散组海马组织中 DCX 蛋白的表达明显升高($P<0.05$),温阳解郁汤低、中、高剂量组、氟西汀组和逍遥散组海马组织中 BrdU 阳性细胞表达明显增加($P<0.05$)。见图7,表10。

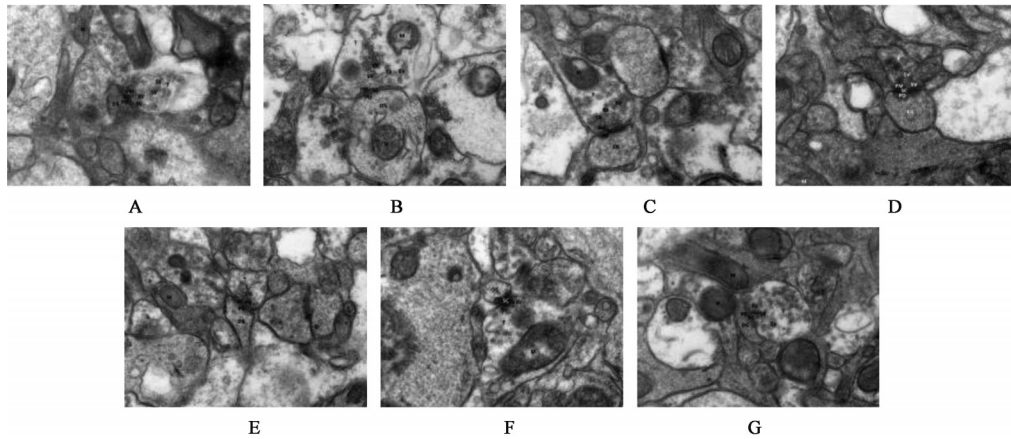


图3 温阳解郁汤对大鼠突触超微结构的影响(电镜,×20 000)

Fig. 3 Effect of Wenyang Jieyu decoction on synaptic ultrastructure in rats (TEM, ×20 000)

表8 温阳解郁汤对大鼠突触超微结构参数的影响(̄x±s, n=3)

Table 8 Effect of Wenyang Jieyu decoction on synaptic ultrastructure in rats (̄x±s, n=3)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	活性带长度	突触间隙	致密区厚度
正常		380.94±18.96	10.82±0.72	39.16±6.52
模型		161.99±17.09 ¹⁾	20.22±3.87 ¹⁾	19.46±5.44 ¹⁾
温阳解郁汤	1.25	172.15±18.43	8.79±2.94 ²⁾	25.46±3.31
	2.50	191.96±8.82 ²⁾	12.89±5.17 ²⁾	28.36±1.82 ²⁾
	5.00	212.60±6.02 ²⁾	8.55±2.70 ²⁾	31.68±3.06 ²⁾
氟西汀	4.17×10 ⁻³	200.53±10.86 ²⁾	11.14±2.00 ²⁾	31.75±3.31 ²⁾
逍遥散	1.88	191.94±12.07 ²⁾	10.50±2.47 ²⁾	29.74±3.85 ²⁾

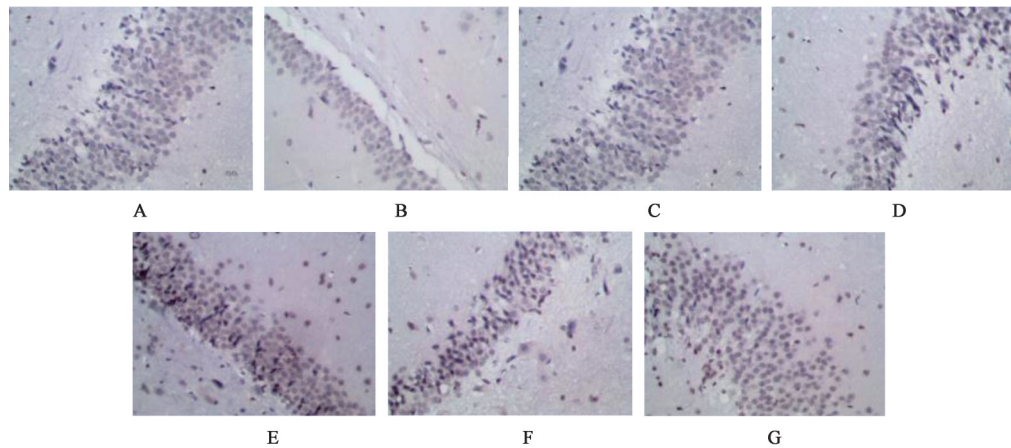


图4 温阳解郁汤对大鼠海马组织 PSD95 蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 4 Effect of Wenyang Jieyu decoction on PSD95 protein expression in rat hippocampus (IHC, ×400)

4 讨论

中医学将抑郁症归于情志疾病中的郁证,一些医家逐渐从阴阳的角度进行抑郁症的辨证分析,通过对抑郁常见情绪症状和中医论治规律的整理辨析,认识到脏腑阳气亏虚是抑郁常见症状的共同病理基础,益气温阳是其治疗的基础。《黄帝内经·灵枢·行针》云:“多阳者,多喜;多阴者,多怒”,也从侧面反映阳气与情志之间的关系^[14]。温阳解郁汤由附子、桂枝、乌梅、炙甘草、大枣、生姜6味中药组成。

方中附子为君药,辛热,能补坎中真阳,上助心阳,中温脾阳;桂枝、生姜为臣药,辛通心阳,温肝阳,补肝用;炙甘草、大枣为佐药,甘缓其中,合辛甘化阳、酸甘化阴之意;生姜、大枣温中焦,助脾阳;乌梅为使药,统领阳药入肝,温补肝阳,使肝中阳气得以升发,又可敛肝气、养肝血以柔肝。诸药合用,复肾阳、补肝阳、暖心阳、运脾阳,收纳微阳于肾,伏虚火于中,缓解因长期生活压力、精神紧张导致的肾精受损、阳气不足。

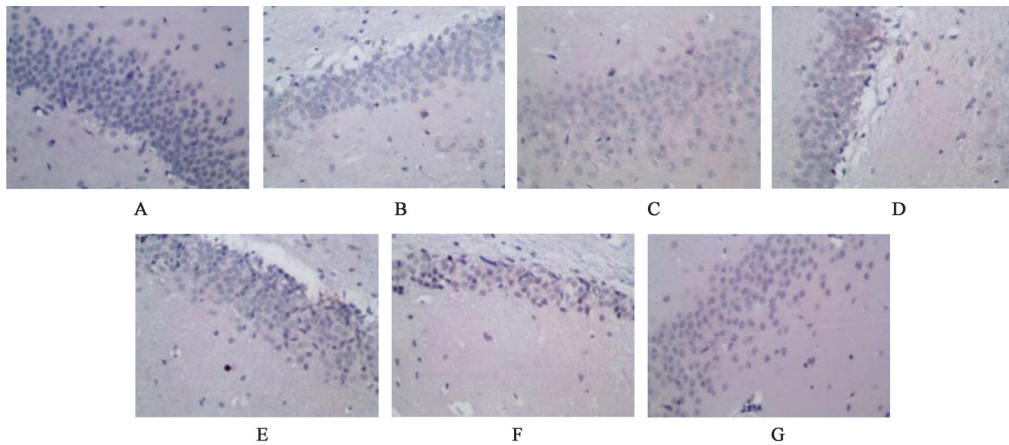


图5 温阳解郁汤对大鼠海马组织中SYP蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 5 Effect of Wenyang Jieyu decoction on expression of SYP protein in hippocampus of rats (IHC, ×400)

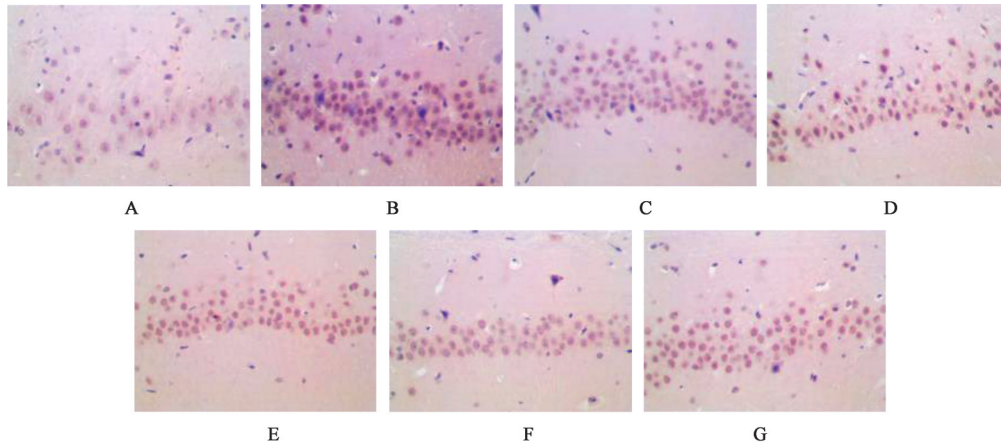


图6 温阳解郁汤对大鼠海马组织Caspase-3蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 6 Effect of Wenyang Jieyu decoction on Caspase-3 protein expression in hippocampus of rats (IHC, ×400)

表9 温阳解郁汤对大鼠海马组织PSD95 SYP, Caspase-3蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 9 Effect of Wenyang Jieyu decoction on PSD95 SYP and Caspase-3 protein expression in hippocampus of rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PSD95	SYP	Caspase-3
正常		0.133±0.015	0.187±0.010	0.175±0.021
模型		0.100±0.010 ¹⁾	0.100±0.004 ¹⁾	0.285±0.007 ¹⁾
温阳解郁汤	1.25	0.125±0.007 ²⁾	0.139±0.012 ²⁾	0.225±0.021 ²⁾
	2.50	0.127±0.006 ²⁾	0.173±0.009 ²⁾	0.200±0.010 ²⁾
	5.00	0.130±0.010 ²⁾	0.185±0.185 ²⁾	0.190±0.014 ²⁾
氟西汀	4.17×10 ⁻³	0.133±0.060 ²⁾	0.187±0.010 ²⁾	0.192±0.015 ²⁾
逍遥散	1.88	0.127±0.007 ²⁾	0.181±0.015 ²⁾	0.195±0.050 ²⁾

海马神经可塑性假说是抑郁症发病重要机制之一,神经可塑性改变涉及多个脑区包括前额叶、海马、杏仁核和伏隔核发生变化,导致脑神经环路功能障碍,出现抑郁症状。其中海马不仅是管理学习记忆以及调控人类相关情绪的重要脑部结构,也是应激反应的高级调节中枢。神经病理学研究显示,抑郁症患者海马区域神经细胞萎缩、海马神经发生降低^[6],从而证实抑郁症的发病与海马结构关系密切。研究发现脑部的神经环路连接终生都

在重组和修饰^[15],突触是维持神经系统正常功能的基础,负责神经信号的传递,突触前膜释放神经递质经突触间隙与突触后膜上相应受体结合,发挥生理功能,突触对信息传递和处理能力是可以变化的“即具有可塑性”,这种可塑性是大脑学习和记忆的基础。不良的或长时间应激会改变神经可塑性和分子和细胞标记引起海马神经元萎缩、坏死及凋亡。

本研究采用皮下注射皮质酮建立抑郁症大鼠模型,造模28 d后,与模型组比较温阳解郁汤组大

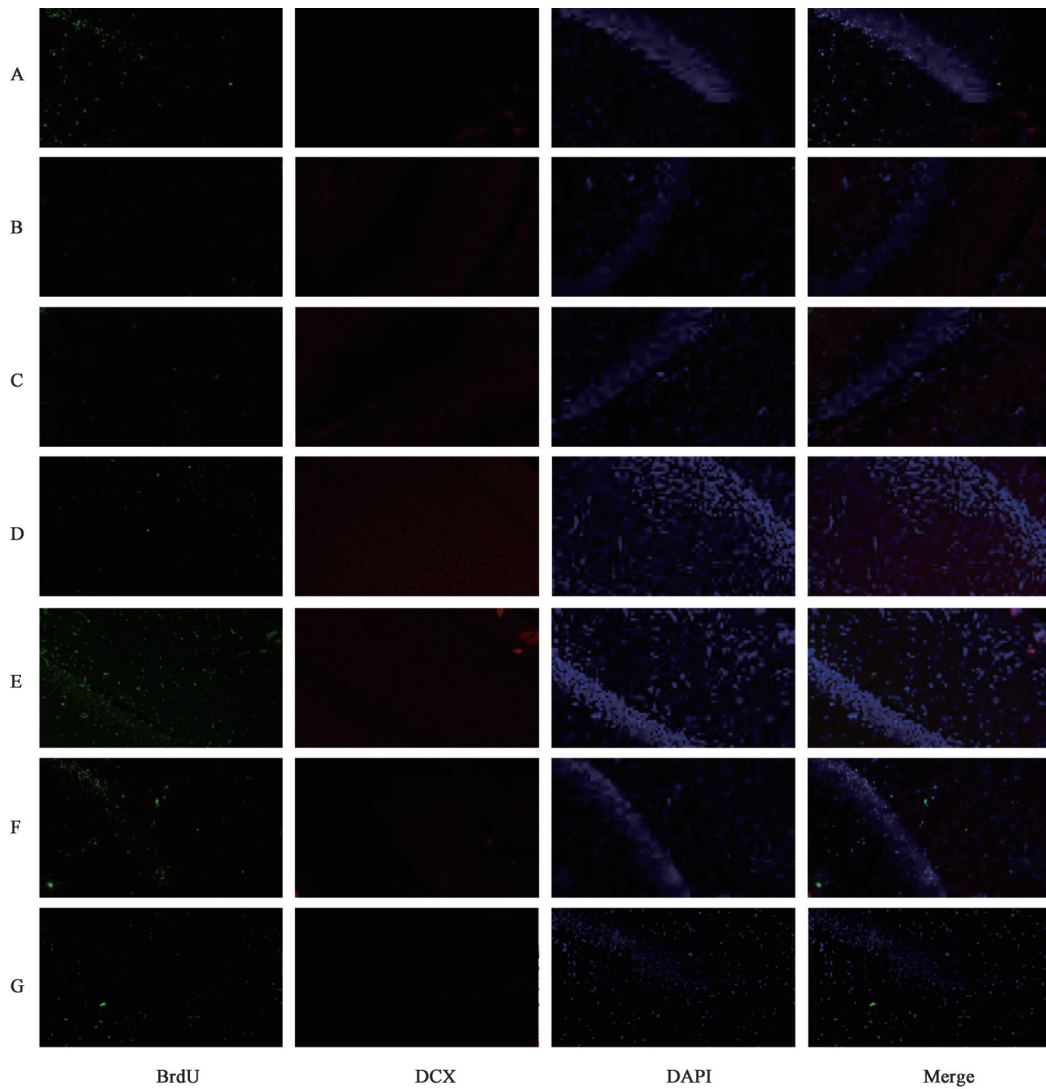


图7 温阳解郁汤对大鼠海马组织 BrdU/DCX 荧光表达的影响 (免疫荧光, $\times 100$)

Fig. 7 Effect of Wenyang Jieyu decoction on BrdU/DCX fluorescence expression in hippocampus of rats (IF, $\times 100$)

表10 温阳解郁汤对大鼠海马组织 DCX, BrdU 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 10 Effect of Wenyang Jieyu decoction on DCX and BrdU protein expression in hippocampus of rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	DCX	BrdU 阳性细胞含量/%
正常		0.557 \pm 0.027	35.62 \pm 1.11
模型		0.399 \pm 0.009 ¹⁾	13.39 \pm 1.34 ¹⁾
温阳解郁汤	1.25	0.424 \pm 0.069	19.51 \pm 1.02 ²⁾
	2.50	0.488 \pm 0.003 ²⁾	21.62 \pm 0.53 ²⁾
	5.00	0.538 \pm 0.059 ²⁾	27.72 \pm 1.27 ²⁾
氟西汀	4.17 $\times 10^{-3}$	0.484 \pm 0.011 ²⁾	31.73 \pm 1.20 ²⁾
逍遥散	1.88	0.479 \pm 0.016 ²⁾	22.32 \pm 1.80 ²⁾

鼠体质量明显升高,糖水偏好率增加,进食潜伏期及强迫游泳禁止不动时间缩短,5 min 行走路程与旷场得分增加,差异均具有统计学意义;HE 染色观察发现温阳解郁汤能够明显改善抑郁大鼠海马神经

元细胞核固缩、深染,排列稀疏等现象;尼氏染色发现温阳解郁汤组大鼠海马组织细胞密度、锥体细胞带细胞数量明显增加,神经元细胞有序排列。说明温阳解郁汤能够保护大鼠神经细胞,明显改善抑郁症大鼠抑郁状态。

突触可塑性的损伤可导致多种中枢神经系统疾病的发生^[16-17],突触的可塑性由突触相关蛋白调控^[18-19]。SYP 是一种突触素,为突触前膜的标记蛋白,在突触重塑的过程中其表达明显升高^[20]。PSD95 为突触后致密物中含量最丰富的结构蛋白,在神经元成熟及突触形成过程中十分重要,参与调控神经元突触可塑性^[21]。Caspase-3 在细胞凋亡中起着不可替代的作用,其活化是细胞凋亡的重要标志^[22]。BrdU 是一种 DNA 前体物质,可参与 DNA 的合成(S 期),通过 BrdU 染色标记具有增值能力的细胞,检测神经元的增殖状态^[23]。DCX 是神经元迁徙

和分化所必需的,标记新生神经元的胞质和突起,DCX染色标记出生后3周左右的细胞^[24]。本研究通过电镜观察、免疫荧光、免疫组化等实验方法从不同角度检测了大鼠突触损伤情况,发现突触结构与突触可塑性标志蛋白的表达均有明显的变化,证实了温阳解郁汤可逆转突触损伤,促进神经元再生发挥抗抑郁的疗效。

综上所述,本研究发现温阳解郁汤增加了抑郁模型大鼠突触表达,修复突触损伤;上调SYP, PSD95, BrdU, DCX蛋白表达,促进海马神经元再生;下调Caspase-3蛋白表达,抑制海马神经细胞的凋亡;明显改善抑郁症模型大鼠抑郁样行为,维持海马神经细胞正常形态。表明温阳解郁汤的抗抑郁疗效与调控海马神经可塑性有关,但其发生机制尚不明确,仍需进一步研究明确影响海马神经可塑相关途径。该研究为课题组进一步相关实验奠定理论基础,是明确温阳解郁汤抗抑郁机制的重要环节。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] YUAN Y Y, MIN H S, LAPANE K L, et al. Depression symptoms and cognitive impairment in older nursing home residents in the USA: a latent class analysis [J]. *Am J Geriatr Psychiatry*, 2020, 35 (7): 769-778.

[2] 王静,孔令茵,雷炳业,等. 抑郁症的脑复杂网络研究进展[J]. *中国医学物理学杂志*, 2020, 37 (6): 780-785.

[3] World Health Organization. Depression and other common mental disorders: global health estimates[R]. Geneva: WHO, 2017.

[4] 贾朋丽. 基于Wnt/ β -catenin信号通路电针抗抑郁及海马神经重塑作用机制研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2019.

[5] 连嘉惠,张治楠,梁丽艳,等. 抑郁状态下海马突触可塑性变化及相关机制[J]. *医学综述*, 2019, 25(13): 2541-2547.

[6] BOLDRINI M, SANTIAGO A N, HEN R, et al. Hippocampal granule neuron number and dentate gyrus volume in antidepressant-treated and untreated major depression[J]. *Neuropsychopharmacol*, 2013, 38 (6): 1068-1077.

[7] 李姿蓉,韩远山,吴梦瑶,等. 复方柴金解郁片通过改善海马神经元突触功能发挥抗抑郁作用[J]. *DCM*, 2020, 3(2): 80-95.

[8] 卢骏,许隽,俞斐. 厚朴酚对抑郁模型大鼠海马神经可塑性的影响[J]. *中草药*, 2018, 49(20): 4844-4850.

[9] WAINWRIGHT S R, GALEA L. The neural plasticity

theory of depression: assessing the roles of adult neurogenesis and PSA-NCAM within the hippocampus [J]. *Neural Plast*, 2013. doi: 10. 1155/2013/805497.

[10] 冯振宇,刘慧宇,赵杰. 温阳解郁汤对抑郁模型大鼠的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21 (6): 99-102.

[11] 冯振宇,赵杰,刘慧宇. 温阳解郁汤对抑郁模型大鼠HPA轴的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(12): 4304-4307.

[12] 赵杰,彭涛,马艳苗. 温阳解郁汤治疗抑郁症30例临床观察[J]. *山西中医*, 2011, 27(7): 15-16.

[13] ZHAO Y, MA R, SHEN J, et al. A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 581 (1/2): 113-120.

[14] 陈贵喜,郭立中. 郭立中教授从扶阳论治抑郁症经验探讨[J]. *浙江中医药大学学报*, 2018, 42 (3): 224-227.

[15] 孙奕,张志珺. 海马神经元再生及可塑性与抑郁症[J]. *国际精神病学杂志*, 2007, 34(3): 144-147.

[16] KAVALALI E T, MONTEGGIA L M. Targeting homeostatic synaptic plasticity for treatment of mood disorders[J]. *Neuron*, 2020, 106(5): 715-726.

[17] KANDOLA A. Physical activity and depression: towards understanding the antidepressant mechanisms of physical activity[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2019, 107: 525-539.

[18] 刘婷,张蕊,吴粉毅,等. 亚精胺改善年龄相关认知障碍的研究进展[J]. *中国现代应用药学*, 2020, 37 (12): 1527-1531.

[19] 周荣易,马丙祥,韩新民,等. 黄芩苷对注意缺陷多动障碍动物模型生长状态的影响及对CaMK II, ERK1/2的调控作用[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(6): 1220-1226.

[20] 连嘉惠,张治楠,梁丽艳,等. 抑郁状态下海马突触可塑性变化及相关机制[J]. *医学综述*, 2019, 25(13): 2541-2547.

[21] 王雪岩,郭易楠,阴赫宏. PSD-95的生物学功能与应用研究进展[J]. *临床和实验医学杂志*, 2018, 17 (18): 2015-2017.

[22] 彭智远,刘旺华,曹雯. 脑缺血再灌注损伤细胞凋亡机制的研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(8): 1957-1961.

[23] MOORE N. Homogeneous repair of nuclear genes after experimental stroke [J]. *J Neurochem*, 2002, 80 (1): 111-118.

[24] KARA N, NARAYANAN S, BELMAKER R H, et al. Chronic lithium treatment enhances the number of quiescent neural progenitors but not the number of DCX-positive immature neurons [J]. *Int J Neuropsychoph*, 2015, 18(7): 7.

[责任编辑 孙丛丛]