

温阳、解郁及温阳解郁方对母婴分离结合慢性神经疼痛应激小鼠疼痛敏感性及抑郁样行为的调节作用

左阳¹, 赵永烈², 巩子汉³, 孟丹华³, 余楷杰³,
张艺嘉⁴, 梁文青⁴, 楚天云^{5*}, 岳广欣^{3*}

- (1. 北京中医药大学, 北京 100029;
2. 北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029;
3. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700;
4. 河南中医药大学中医学院, 郑州 453000;
5. 河南省骨科医院, 郑州 453000)

[摘要] 目的:观察母婴分离小鼠给予慢性神经疼痛应激后的行为、痛阈改变,以及血清和中枢抑郁、疼痛相关指标的变化,以温阳方、解郁方、及温阳解郁方进行干预探讨温阳解郁法抗抑郁、改善疼痛敏感的可能机制。方法:以小鼠出生日为PD0,小鼠在出生后随机分为对空白组和母婴分离组,母婴分离组在PD5~14进行8 h·d⁻¹的母婴分离,离乳后将其分为母婴分离组、温阳组、解郁组、温阳解郁组和氟西汀组,每组15只,同时以15只未经母婴分离的同期雄性仔鼠作为空白组。空白组、母婴分离组小鼠于PD21~90以普通发育饲料喂养,余组分别以温阳方二仙汤、解郁方逍遥散、温阳解郁方及氟西汀药混饲料喂养(用药剂量分别为5.84、12.00、16.68 g·kg⁻¹及2.60 mg·kg⁻¹)。于PD91行坐骨神经结扎手术,建立母婴分离+慢性神经病理性疼痛模型。采用旷场实验观察各组小鼠抑郁样行为,测量机械痛阈和温度痛阈检测各组小鼠疼痛敏感性,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清皮质酮(CORT)、P物质及β-内啡肽(β-EP)含量,免疫组化检测杏仁核糖皮质激素受体(GR)和下丘脑β-EP蛋白表达,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测杏仁核糖皮质激素受体基因(Nr3c1)、FKBP5结合蛋白5基因(FKBP5)、代谢型谷氨酸受体5基因(GRM5)及脑源性神经营养因子(BDNF)mRNA的表达量。结果:与空白组比较,母婴分离组小鼠5 min旷场中心停留时间和运动总距离均显著减少($P<0.01$),机械痛阈显著降低($P<0.01$)。血清CORT和β-EP均显著上升($P<0.01$),FKBP5 mRNA表达显著下降($P<0.01$)。下丘脑β-EP表达上升,差异具有明显统计学意义($P<0.05$)。与母婴分离组比较,各给药组5 min旷场中心停留时间均明显增加($P<0.05$, $P<0.01$),温阳组、温阳解郁组和氟西汀组小鼠在5 min旷场运动总距离明显增加($P<0.05$, $P<0.01$),各给药组痛阈均不同程度上调。解郁组小鼠血清CORT显著下降($P<0.01$),β-EP明显下降,但差异无统计学意义;BDNF mRNA显著上升($P<0.01$)。温阳组小鼠Nr3c1及GRM5 mRNA均明显下降($P<0.05$, $P<0.01$)。温阳解郁组小鼠血清CORT明显下降($P<0.05$),Nr3c1、GRM5及BDNF mRNA均下降($P<0.05$, $P<0.01$),差异具有明显统计学意义,各给药组下丘脑β-EP表达水平均有不同程度提升,但差异无统计学意义。温阳组、解郁组和温阳解郁组小鼠杏仁核GR表达水平均明显上升,差异具有明显统计学意义($P<0.05$)。结论:温阳解郁方可通过增强杏仁核GR表达、抑制杏仁核区神经可塑性及兴奋性达到抑制中枢疼痛敏化和调节下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴功能,缓解抑郁行为和改善躯体疼痛过敏的作用。

[关键词] 母婴分离; 温阳解郁方; 杏仁核; 慢性神经疼痛; 抑郁

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R395.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)14-0044-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221339

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220509.1501.002.html>

[网络出版日期] 2022-05-10 10:49

[收稿日期] 2022-03-02

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82174251,81573846);中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目(CI2021A00607);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助自主选题项目(YZ1883,YZ202047,YZ-202107,YZ-202148)

[第一作者] 左阳,在读硕士,从事中医情志病及中医药方证相关基础研究,E-mail:371684129@qq.com

[通信作者] *楚天云,硕士,医师,从事中医药防治慢性疼痛和情志病的临床与基础研究,E-mail:838486410@qq.com;

*岳广欣,博士,研究员,博士生导师,从事中医方证及精神行为病症的中医病理生理基础及防治研究,E-mail:yuegx73@hotmail.com;

Regulatory Effect of Wenyang Prescription, Jieyu Prescription, and Wenyang Jieyu Prescription on Pain Sensitivity and Depression-like Behaviors in Mice Induced by Maternal Separation and Chronic Neuropathic Pain

ZUO Yang¹, ZHAO Yonglie², GONG Zihan³, MENG Danhua³, SHE Kaijie³, ZHANG Yijia⁴,
LIANG Wenqing⁴, CHU Tianyun^{5*}, YUE Guangxin^{3*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Third Affiliated Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

3. Institute of Basic Theories of Traditional Chinese Medicine (TCM), China Academy of
Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

4. TCM School, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 453000, China;

5. Henan Provincial Orthopedic Hospital, Zhengzhou 453000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the behavioral and pain threshold alterations, as well as the changes in indexes related to depression and pain in the serum and central system in mice stressed by maternal separation and chronic neuropathic pain, and explore the underlying mechanism of Wenyang prescription (WY), Jieyu prescription (JY), and Wenyang Jieyu prescription (WYJY) in improving depression and pain sensitivity. **Method:** The birth date of mice was recorded as PD0. After birth, the mice were divided into a blank group and an experimental group. The neonatal mice in the experimental group underwent maternal separation in PD5-14 at 8 h·d⁻¹. After ablactation, the mice were divided into a maternal separation group, a WY group (Erxian decoction, 5.84 g·kg⁻¹), a JY group (Xiaoyaosan, 12.00 g·kg⁻¹), a WYJY group (16.68 g·kg⁻¹), and a fluoxetine group (2.60 mg·kg⁻¹), with 15 mice in each group. Meanwhile, 15 male mice of the same age without maternal separation were assigned to the normal control group. Mice in the blank group and the maternal separation group were fed on a regular chow diet in PD21-PD90, while the remaining groups were fed on the corresponding drugs. In PD91, sciatic nerve ligation was performed to induce a model of maternal separation and chronic neuropathic pain. The open field test was used to observe the depression-like behaviors of mice in each group, and the mechanical and temperature pain thresholds were measured to detect the pain sensitivity of mice in each group. The serum levels of corticosterone (CORT), substance P, and β -endorphin (β -EP) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the expression of the glucocorticoid receptor (GR) in the amygdala and β -EP protein in the hypothalamus was detected by immunohistochemistry. The mRNA expression levels of amygdala GR gene (Nr3c1), FK506 binding protein 5 gene (FKBP5), metabolic glutamate receptor 5 gene (GRM5), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Compared with the blank group, the maternal separation group showed reduced stay time and total distance traveled in the 5-min open field test ($P<0.01$), reduced mechanical pain threshold ($P<0.01$), increased serum CORT and β -EP ($P<0.01$), declining FKBP5 mRNA expression ($P<0.01$), and increased hypothalamic β -EP expression ($P<0.05$). Compared with the maternal separation group, the groups with drug intervention showed prolonged stay time ($P<0.05$, $P<0.01$) and up-regulated pain thresholds to different degrees. The total distance traveled in the 5-min open field test increased in the WY group, the WYJY group, and the fluoxetine group ($P<0.05$, $P<0.01$). The JY group showed decreased serum CORT ($P<0.01$), reduced β -EP, and increased BDNF mRNA ($P<0.01$). Nr3c1 and GRM5 mRNA decreased in the WY group ($P<0.05$, $P<0.01$). The WYJY group showed decreased serum CORT ($P<0.05$) and decreased Nr3c1, GRM5, and BDNF mRNA ($P<0.05$, $P<0.01$). The levels of β -EP expression

were elevated to different degrees in the groups with drug intervention, but the differences were not significant. The levels of GR expression in the WY group, the JY group, and the WYJY group increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** WYJY can inhibit central pain sensitization and regulate hypothalamic-pituitary-adrenal gland (HPA) axis function by enhancing the expression of GR in the amygdala and inhibiting neuroplasticity and excitability in the amygdala to relieve depression-like behaviors and improve somatic hyperalgesia.

[Keywords] maternal separation; Wenyang Jieyu prescription; amygdala; chronic neuropathic pain; depression

抑郁症是一种复杂的情绪疾病,也是心理失调的常见病,具有患病率高、复发率高、致残率高的特点。据调查显示,我国每年可能有超过3 000万人患有抑郁障碍^[1],成为我国严重的公共卫生问题。早年不良经历(幼年创伤、父母缺失、虐待等)是抑郁症重要的危险因素,可严重影响机体发育的内环境,极大地增加对抑郁症的易感性,还增加了个体对疼痛的敏感性^[2-4]。有研究显示^[5],疼痛与抑郁共病在临床中极为常见,其中慢性疼痛与重度抑郁共病的发生率超过了50%,且抑郁患者经常会经历更为严重的疼痛^[2],因此ISHAK等^[5]提出疼痛和抑郁应当同时治疗,但目前尚缺乏有效且安全的二者共病的治疗方法。既往研究发现慢性应激可导致基底外侧杏仁核(BLA)神经元增敏及和杏仁核中央核(CeA)之间的突触长时程增强,使杏仁核对伤害性信息的整合增强,从而加剧了神经病理性疼痛^[6-7]。母婴分离作为一种典型的早期应激方式,已成为研究早期生命应激对个体生理、心理发育影响的重要工具^[8],且临床和动物研究均表明^[9-10],母婴分离可造成子代疼痛敏感性的增加,产生抑郁样行为。下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴和神经可塑性改变是主要的研究方向,但具体机制尚未阐述清楚。

从中医病机分析,母婴分离小鼠模型的证型应为阳虚肝郁^[11-12],课题组采用二仙汤和逍遥散组合成的温阳解郁方对母婴分离小鼠动物模型进行干预,发现温阳解郁方对模型小鼠焦虑、抑郁样行为、HPA轴过度激活及神经炎症等方面均有良好的调节作用。因此本实验以母婴分离结合慢性坐骨神经压迫应激法制备慢性神经疼痛模型小鼠,观察温阳方二仙汤、解郁方逍遥散及温阳解郁方对模型小鼠行为学和中枢抑郁及疼痛指标变化的影响,探索母婴分离对小鼠躯体疼痛敏感性的影响及三方的调节作用,并对比三方的干预疗效及作用差异。

1 材料

1.1 动物 选用8周龄,体质量22~24 g,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供的

C57BL/6J小鼠作为种鼠(合格证编号1112511911000161,质检单位为国家实验动物质量检测中心)。于中国中医科学院中医基础理论研究所动物实验中心常规饲养。保持湿度30%~40%,温度20~24℃。实验动物处理遵守中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物伦理委员会的伦理要求。将小鼠按雌-雄4:1的比例进行混居,每日观察,发现雌鼠怀孕即转为单笼饲养。

1.2 药物及试剂 实验所用中药饮片仙茅、炙甘草、淫羊藿、知母、当归、白术、生姜、茯苓、巴戟天、黄柏、薄荷、白芍、柴胡均购自北京仟草中药饮片公司,批号分别为180314005、181022005、181008006、181017004、181109008、181016010、180720012、181101013、180823017、180601013、180524007、180824003、170211003,所有中药饮片由中国中医科学院基础理论研究所柏冬副研究员鉴定均为正品。盐酸氟西汀胶囊(礼来苏州制药有限公司,批号20190029);戊巴比妥钠(北京基谱生物科技有限公司,批号ST3761);羊血清、抗体稀释液、兔抗山羊免疫球蛋白(Ig)G(北京北科慧宇实验器材公司,批号分别为ZLI-9026、2LI-9029、ZB-2010);3,3-二氨基联苯胺四盐酸盐水合物(德国默克公司,批号D5637-5G);皮质酮(CORT)免疫组化试剂盒(美国Vector Laboratories公司,批号PK-6100);抗 β -内啡肽(β -EP)抗体(北京百诺威生物科技有限公司,批号bs-1195R);抗糖皮质激素受体(GR)抗体(美国Thermo Fisher公司,批号PA1-551A);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Proteintech公司,批号10494-1-ap);SV Total RNA Isolation System、GoScrip™ Reverse Transcription System、GoTaq® 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Master Mix(北京Promega公司,批号分别为Z3100、A5001、A6002);P物质、CORT及 β -EP酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(北京北科慧宇实验器材公司,批号分别为MM-0445M2、MM-0061M2、MM-0057M2)。

1.3 仪器 YLS-12A型鼠尾光照测痛仪(淮北正华生物仪器设备有限公司);BME-404型机械阈值测试器(天津伯尔尼科技有限公司);vs120-s6型数字切片扫描仪(日本Olympus公司);CM1950型冰冻切片机(德国Leica公司);3K15型高速冷冻离心机(德国Sigma公司);C1000型Real-time PCR仪(美国Bio-Rad公司);MB-102型恒温金属浴(杭州博日科技股份有限公司);100TVL型摄像机(日本Sony公司);FLx800™型发光酶标仪(美国BioTek公司)。

2 方法

2.1 分组与造模 孕鼠分娩后保持每窝仔鼠4~7只,以仔鼠出生日为PD0天,将PD0仔鼠随机分为空白组(15只)和母婴分离组(75只)。于PD5~14对MS组小鼠进行母婴分离,分离时仔鼠移至孵育箱内(32℃),8h后放回母鼠身边,连续10d。空白组处理同上,每次分离时间小于10min。末次母婴分离结束后,所有仔鼠与母鼠共同饲养至PD20离乳。离乳后将母婴分离组小鼠随机分为母婴分离组、温阳组、解郁组、温阳解郁组和氟西汀组共5组,每组15只。在PD21~90,空白组和母婴分离组仔鼠常规饲料喂养,温阳组以二仙汤药混饲料喂养,解郁组以逍遥散药混饲料喂养,温阳解郁组以温阳解郁方药混饲料喂养,氟西汀组以氟西汀药混饲料喂养。

于PD91对所有实验小鼠按照文献[13]方法进行坐骨神经结扎手术(CCI),建立慢性神经病理性疼痛模型。在坐骨神经干近端分叉处上方5mm处开始,采用3段结扎法,间距约2mm,以小鼠左后下肢轻微颤抖为准。空白组小鼠仅暴露坐骨神经后即缝合,不进行结扎,术后各给药组继续给予相应的药混饲料干预。

2.2 药物制备及给药 实验所用的中药复方逍遥散(柴胡15g,当归15g,白芍15g,白术15g,茯苓15g,生姜5g,薄荷5g,炙甘草7.5g)和二仙汤(仙茅9g,淫羊藿9g,巴戟天9g,当归9g,知母4.5g,黄柏4.5g)分别出自《太平惠民和剂局方》和《中医方剂临床手册》,温阳解郁方为二仙汤和逍遥散的合方(当归取逍遥散中使用剂量)。所有中药复方均以10倍、8倍量水煎煮2次,将2次滤液混合浓缩至膏状,得出各方出膏率分别为25.4%、26.9%、27.3%。真空干燥脱水制成药粉,4℃保存。以《药理实验方法学》为准,小鼠和人用药量按体质量换算为1:0.11,二仙汤(温阳方)、逍遥散(解郁方)、温阳解郁方的临床用量(以70kg体质量成人计算)分别为45、92.5、128.5g·d⁻¹,氟西汀成人(70kg)临床

用量为20mg·d⁻¹,得温阳组、解郁组、温阳解郁组、氟西汀组给药剂量分别为二仙汤5.84g·kg⁻¹·d⁻¹、逍遥散12g·kg⁻¹·d⁻¹、温阳解郁方16.68g·kg⁻¹·d⁻¹和盐酸氟西汀2.60mg·kg⁻¹·d⁻¹。各给药组采用药混饲料的方式进行干预,按成年小鼠5g·d⁻¹摄食总量制作药混饲料。各组药粉/饲料比为二仙汤23.36g·kg⁻¹、逍遥散48.00g·kg⁻¹、温阳解郁方66.72g·kg⁻¹,氟西汀10.4g·kg⁻¹,将药粉混合入饲料粉末中,加纯净水搅拌混合后压成条状,60℃烘干备用。

2.3 指标检测

2.3.1 机械刺激诱发的小鼠缩足阈值测定 坐骨神经结扎术后35d,将小鼠放置于的底部为灰色铁丝网的活动箱内适应30min,待小鼠活动停止,无理毛行为后,用电子测痛仪的压力探针刺激小鼠的患侧足底中心部位皮肤,记录引起小鼠反射性缩足、抬足、逃避等反应时的数值。每只小鼠重复测量2~3次,取平均值。

2.3.2 温度热痛阈测定(小鼠甩尾潜伏期) 坐骨神经结扎术后35d,固定小鼠,将小鼠鼠尾后2/3紧贴光照测痛仪校准光源上方,启动光源使发出刺激性强光,当小鼠尾巴抬起或移动时光源熄灭,记录时间,每只小鼠重复测量2~3次,取平均值。

2.3.3 旷场实验 实验室内适应30min后将小鼠放入旷场箱(40cm×40cm×60cm)中心位置,设中心点附近20cm×20cm方形区域为中央区,记录小鼠5min内小鼠运动总路程和中央区停留时间,每次实验开始前用75%乙醇清洁旷场箱。

2.3.4 动物取材 行为学实验结束后2h,以2%戊巴比妥钠(0.02g·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,每组随机选取4只,从左心尖部进针,以生理盐水冲洗血液,用4%多聚甲醛灌注,断头取脑后固定于4%多聚甲醛溶液中,以30%蔗糖溶液脱水。各组剩余小鼠麻醉后迅速断头,取血,血液在4℃静置2h,于离心机上(4℃,3500r·min⁻¹,离心半径8.1cm)离心30min后收集上清液,于-20℃储存待测。冰上取脑,根据文献[14]对杏仁核定位并分离,液氮速冻后-80℃冰箱内保存。

2.3.5 ELISA检测血清P物质、CORT、及β-EP水平 血清P物质、CORT、及β-EP采用ELISA检测,具体操作严格按照试剂盒说明。

2.3.6 Real-time PCR检测各组小鼠杏仁核Nr3c1、GRM5、FKBP5及BDNF mRNA表达水平 使用SV Total RNA分离纯化系统,严格按照说明书提取杏仁核组织总RNA。使用核酸定量分析仪测定

RNA浓度及纯度,当吸光度 A_{260}/A_{280} 在1.8~2.0,说明RNA纯度质量合格。首链cDNA合成严格按照Thermo反转录试剂盒说明书进行。PCR扩增体系参照Promage试剂盒说明书设置,扩增条件为95℃预变性2 min,95℃变性15 s,60℃退火60 s,40个循环,以GAPDH作为内参基因,采用样点拟合法分析结果得到的基因 C_t 值,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量。引物由生工生物工程(上海)有限公司设计合成,序列见表1。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Nr3c1	上游 AGCTCCCCCTGGTAGAGAC	230
	下游 GGTGAAGACGCAGAAACCTTG	
GRM5	上游 GCTGTGAGATAAGAGATTCCTGC	113
	下游 ACTCCCACTATGGGTTTCTTGG	
FKBP5	上游 GTCCAAAGCCTCAGAGTCGTTT	137
	下游 AGCCTTTCTCATTGGCACTGTC	
BDNF	上游 AGTGCCGAAC TACCCAGTCGTA	135
	下游 CTTATGAATCGCCAGCCAATTC	
GAPDH	上游 AGGTCCGGTGTGAACGGATTTG	123
	下游 TG TAGACCATGTAGTTGAGGTCA	

2.3.7 免疫组化法检测小鼠下丘脑 β -EP及杏仁核GR表达水平 使用包埋剂将4%多聚甲醛固定后的大脑包埋,进行冰冻切片。厚度为30 μ m。脑组织切片按照免疫组化实验步骤进行染色。10%羊血清封闭1 h,一抗(GR 1:400, β -EP 1:200)4℃孵育18 h,二抗(兔抗山羊IgG 1:200)常温下孵育4 h,免疫组化步骤间以磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3×5 min,最后DAB进行显色20 min,以PBS冲洗中止显色,贴片。贴片梯度乙醇脱水,二甲苯透明,最后中性树胶封片。在数字切片扫描仪下10倍放大采集图像。测量阳性指标并计算平均积分吸光度AA,以平均光密度反映视野内所有阳性细胞的平均反应强度。

2.4 统计学方法 统计表数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用SPSS 20.0软件,对数据进行统计分析。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)比较各数据,各组数据进行方差齐性检验,方差齐性一致的组进行两两比较采用最小显著性差异法(LSD),方差不齐的组间比较采用Dunnnett-t检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 温阳、解郁及温阳解郁方对各组小鼠旷场中心区停留时间及运动总路程变化的影响 与空白组比较,母婴分离组小鼠在5 min中心区域停留时间和运动总路程均显著下降($P < 0.01$);与母婴分离组比较,温阳组小鼠5 min内在旷场中心区停留时间及运动总路程均明显增加($P < 0.05$);解郁组小鼠5 min内在旷场中心区停留时间明显增加($P < 0.05$),5 min内在旷场中运动总路程有增加趋势,但差异无统计学意义;温阳解郁组小鼠5 min内在旷场中心区停留时间及运动总路程均显著增加($P < 0.01$);氟西汀组小鼠5 min内在旷场中心区停留时间及运动总路程也均显著增加($P < 0.01$)。见表2。

表2 温阳解郁方对各组小鼠旷场实验中5 min中央区活动时间和运动总路程的影响($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 2 Effect of Wenyang Jieyu prescription on total movement distant and time spend in central zone in 5 min of mice in open field test ($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	5 min中心区停留时间/s	5 min运动总路程/mm
空白组		23.37±4.73	7 480.46±694.10
母婴分离组		11.42±3.08 ²⁾	5 437.09±675.00 ²⁾
温阳组	5.84	16.85±4.78 ³⁾	6 181.63±519.70 ³⁾
解郁组	12.00	17.21±4.66 ³⁾	5 666.51±482.30
温阳解郁组	16.68	22.00±3.90 ⁴⁾	6 333.23±420.20 ⁴⁾
氟西汀组	0.002 6	21.68±5.07 ⁴⁾	6 614.34±659.00 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与母婴分离组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表3-表6同)

3.2 温阳、解郁及温阳解郁方对各组小鼠机械痛阈值和温度痛阈的影响 与空白组比较,母婴分离组机械痛阈显著下降($P < 0.01$),温度痛阈有明显的下降趋势,但差异无统计学意义;与母婴分离组比较,温阳组小鼠机械痛阈及温度痛阈都有上升趋势,但差异无统计学意义;解郁组小鼠的机械痛阈显著上升($P < 0.01$);温度痛阈有上升趋势,差异无统计学意义;温阳解郁组小鼠机械痛阈及温度痛阈都有上升趋势,差异无统计学意义;氟西汀组小鼠的机械痛阈无明显变化,温度痛阈有上升趋势,但差异无统计学意义。见表3。

3.3 温阳、解郁及温阳解郁方对各组小鼠血清P物质、CORT及 β -EP含量的影响 与空白组比较,母婴分离组小鼠血清P物质差异无统计学意义,CORT及 β -EP水平均显著上升($P < 0.01$)。与母婴分离组比较,温阳组小鼠血清P物质及 β -EP水平差异无统

表3 温阳解郁方对各组小鼠痛阈值的影响 ($\bar{x}\pm s, n=15$)

Table 3 Effect of Wenyang Jieyu prescription on pain threshold of mice ($\bar{x}\pm s, n=15$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$	机械痛阈值	温度痛阈值
空白组		10.40±1.14	11.49±1.09
母婴分离组		7.12±1.06 ²⁾	9.37±1.85
温阳组	5.84	8.41±1.18	10.56±1.96
解郁组	12.00	9.54±1.38 ⁴⁾	10.94±1.75
温阳解郁组	16.68	8.37±1.04	10.94±1.09
氟西汀组	0.002 6	7.33±1.17	10.34±2.66

计学意义, CORT水平均有下降趋势, 但差异均无统计学意义; 解郁组小鼠血清P物质有上升趋势, β -EP水平有明显下降趋势, 但差异无统计学意义, CORT水平显著下降($P<0.01$); 温阳解郁组小鼠血清P物质有上升趋势, β -EP水平有明显的下降趋势, 但差异无统计学意义, CORT水平明显下降($P<0.05$); 氟西汀组小鼠血清P物质有上升趋势, CORT及 β -EP水平变化不明显, 三者差异均无统计学意义。见表4。

3.4 温阳、解郁及温阳解郁方对各组小鼠杏仁核Nr3c1、FKBP5、GRM5及BDNF mRNA表达的影响
与空白组比较, 母婴分离组小鼠FKBP5 mRNA表达显著下降($P<0.01$), Nr3c1 mRNA表达有上升趋势, BDNF mRNA表达量有降低趋势, 但差异均无统

表5 温阳解郁方对各组小鼠杏仁核Nr3c1、FKBP5、GRM5及BDNF mRNA表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Wenyang Jieyu prescription on expression of Nr3c1, FKBP5, GRM5 and BDNF mRNA in amygdala of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$	FKBP5	Nr3c1	GRM5	BDNF
空白组		2.56±0.36	2.64±1.92	1.06±0.19	3.59±0.36
母婴分离组		0.78±0.47 ²⁾	4.25±1.10	1.02±0.08	2.93±0.26
温阳组	5.84	0.68±0.04	0.36±0.07 ⁴⁾	0.76±0.04 ³⁾	1.82±0.17
解郁组	12.00	0.79±0.04	1.47±0.72	1.18±0.07	3.17±0.06 ⁴⁾
温阳解郁组	16.68	1.13±0.07	0.75±0.82 ³⁾	0.34±0.02 ⁴⁾	1.45±0.69 ⁴⁾
氟西汀组	0.002 6	0.35±0.09	5.45±1.03	0.55±0.06 ⁴⁾	4.73±0.46 ⁴⁾

3.5 温阳、解郁及温阳解郁方对母婴分离小鼠下丘脑 β -EP及杏仁核GR表达水平的影响
与空白组比较, 母婴分离组小鼠下丘脑 β -EP表达明显上升($P<0.05$), 杏仁核GR表达未见明显差异。与母婴分离组比较, 温阳组小鼠下丘脑 β -EP表达差异无统计学意义, 杏仁核GR表达明显上升($P<0.05$); 解郁组小鼠下丘脑 β -EP有升高趋势, 杏仁核GR表达明显上升($P<0.05$); 温阳解郁组小鼠下丘脑 β -EP有升高趋

表4 温阳解郁方对各组小鼠血清中P物质、CORT及 β -EP含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Wenyang Jieyu prescription on content of substance P, CORT and β -EP in serum of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

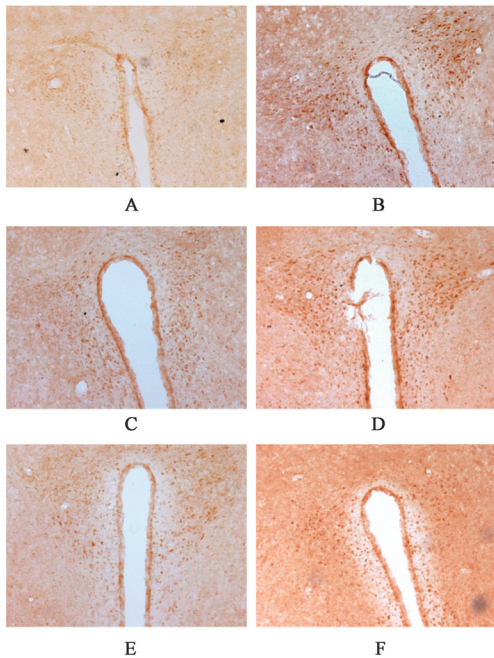
组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$	P物质/ $ng\cdot L^{-1}$	CROT/ $\mu g\cdot L^{-1}$	β -EP/ $ng\cdot L^{-1}$
空白组		54.78±15.56	43.32±12.39	31.33±5.01
母婴分离组		58.21±9.45	105.38±15.01 ²⁾	50.29±7.33 ²⁾
温阳组	5.84	58.18±5.63	84.22±5.94	47.52±8.24
解郁组	12.00	64.01±10.72	63.01±8.38 ⁴⁾	35.80±7.82
温阳解郁组	16.68	64.51±16.32	74.91±8.83 ³⁾	38.27±5.25
氟西汀组	0.002 6	62.23±13.09	97.66±33.04	47.13±2.62

计学意义; 与母婴分离组比较, 温阳组小鼠FKBP5 mRNA差异无统计学意义, Nr3c1及GRM5 mRNA均明显下降($P<0.05, P<0.01$), BDNF mRNA表达量有降低趋势。解郁组小鼠FKBP5 mRNA表达水平无明显差异, Nr3c1 mRNA明显下降, 但差异无统计学意义, BDNF mRNA表达量显著下降($P<0.01$); 温阳解郁组小鼠FKBP5 mRNA表达水平有上升趋势, Nr3c1、GRM5及BDNF mRNA表达量均明显下降($P<0.05, P<0.01$); 氟西汀组小鼠FKBP5 mRNA表达水平有下降趋势, Nr3c1 mRNA有上升趋势, GRM5 mRNA表达水平显著下降($P<0.01$), BDNF表达水平显著上升($P<0.01$)。见表5。

势, 杏仁核GR表达明显上升($P<0.05$); 氟西汀组小鼠下丘脑 β -EP差异无统计学意义, 杏仁核GR表达有下降趋势。见图1和图2、表6。

4 讨论

有研究报道, 超过60%的焦虑或抑郁症患者存在躯体疼痛症状, 而慢性疼痛患者有超过50%伴随有焦虑或抑郁^[15], 因此这两种情况经常同时发生, 甚至彼此加剧。目前用于治疗抑郁并存慢性疼痛



注: A. 空白组; B. 母婴分离组; C. 温阳组; D. 解郁组; E. 温阳解郁组; F. 氟西汀组(图2同)

图1 温阳解郁方对各组小鼠下丘脑β-EP表达的影响(免疫组化, ×100)

Fig. 1 Effect of Wenyang Jieyu prescription on expression of β-EP in hypothalamus of mice in each group (IHC, ×100)

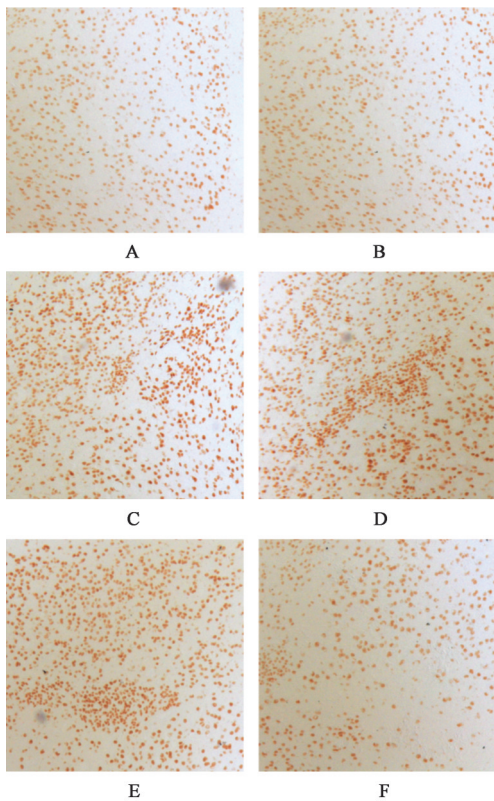


图2 温阳解郁方对各组小鼠杏仁核GR表达的影响(免疫组化, ×100)

Fig. 2 Effect of Wenyang Jieyu prescription on expression of GR in amygdala of mice in each group (IHC, ×100)

表6 温阳解郁方对各组小鼠下丘脑β-EP及杏仁核GR表达的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 6 Effect of Wenyang Jieyu prescription on expression of β-EP in hypothalamus and GR in amygdala of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	下丘脑β-EP AA	杏仁核GR AA
空白组		0.038 9±0.007 6	0.036 9±0.010 5
母婴分离组		0.066 2±0.006 8 ¹⁾	0.033 2±0.004 8
温阳组	5.84	0.069 6±0.014 3	0.077 4±0.002 8 ³⁾
解郁组	12.00	0.073 6±0.013 3	0.065 2±0.006 3 ³⁾
温阳解郁组	16.68	0.075 0±0.014 1	0.066 0±0.007 5 ³⁾
氟西汀组	0.002 6	0.068 2±0.016 2	0.028 5±0.002 9

的药物差别很大,尚未有较为统一的共识,同时存在极大的药物滥用等安全风险^[5]。与西药比较,中医药有禁忌症较少、无明显成瘾性、不良反应较小、停药后不易复发等诸多优点。动物研究及临床治疗都显示,经典名方二仙汤和逍遥散都对焦虑、抑郁有明显的改善和治疗效果^[16-17]。二仙汤以仙茅、淫羊藿为主药以温肾益精,辅以巴戟天和当归以助温阳养血之效,佐以知母和黄柏既滋肾阴又可防仙茅与淫羊藿温燥太过,因此二仙汤全方有温肾益精、滋阴潜阳之效。逍遥散以柴胡为君,主疏肝解郁以调畅气机,养血之当归和敛阴之白芍共为臣药,以养血敛阴,柔肝缓急,佐以健脾祛湿之茯苓、白术,益气补中之甘草,使中州得以运化有权,再加少许薄荷和生姜为使药,使肝经之郁热得透,中州得温,因此逍遥散全方有疏肝解郁,养血健脾之效。朱丹溪有云“天主生物,故恒于动,人有此生,亦恒于动,其所以恒于动,皆相火之为也”,“相火易起,五性生厥阳之火相扇则妄动矣”,因此相火应为生长发育及情志发生发展的核心。另外《黄帝内经》中:“阳者卫外而为固也”以及张介宾《类经附翼》中言:“天之大宝,只此一丸红日;人之大宝,只此一息真阳”,强调了个体生存依赖于肾中元阳充足,阳气是机体抵御外界刺激的主要屏障,而幼儿时期阳气稚弱,受到刺激时阳气易于折伤,继而影响脏腑机能和正常情志的发生发展。相火作为推动脏腑机能、激发正常情志活动的根本,一旦受损,不能维持机体正常的气机升降活动,首先可导致肝失疏泄,日久可致心肾不交,心火失制而肾水失于温阳,出现精神低迷或由于气郁化火而极易产生情绪波动,易激惹的高敏感性表现。结合既往研究^[12],课题组基于对母婴分离模型阳虚肝郁的病机特点,将二仙

汤和逍遥散组合为温阳解郁方,以滋水涵木为主,兼调心、脾,以达到补肾益精,引火归元,交通心肾,气血同调,阴阳并补的效果。

母婴分离动物模型可用于研究早期生命应激对个体的影响^[8]。本实验采用母婴分离结合成年坐骨神经结扎应激的方式以期模拟遭受早年应激的人类成年后患慢性神经性疼痛时所出现情绪低落和自主活动减少的抑郁样表现。探索早期生命应激导致痛觉过敏的作用机制。旷场实验通过观察小鼠在旷场箱中的自发活动、探索行为、紧张恐惧状态和对新异环境的警觉性,不仅可以了解小鼠的抑郁情况和对外界的情绪反应,也可用于测试动物中枢神经系统的“兴奋”或“抑郁”状态^[18]。温度痛觉和机械痛觉测定则可以评估小鼠痛阈水平。实验结果表明,母婴分离组小鼠5 min内整个旷场区域的活动路程、中心区域停留时间均显著下降,说明小鼠的活动性下降,一方面在新环境中警觉性更强,另一方面其探索行为受到抑制,提示小鼠对新异环境认知能力差、启动活动的潜伏期延长,表现出抑郁样行为。而机械及温度痛阈值的降低,说明小鼠存在躯体疼痛过敏,提示造模成功。

HPA轴不仅是调节机体应激反应的重要功能系统,还具有整合疼痛、记忆以及情绪体验等作用^[19],其功能异常是抑郁症发病的重要因素^[20]。而生命早期应激可显著影响HPA轴功能,使HPA轴调节功能出现异常,介导认知、行为及对疼痛的感知出现异常^[21]。在应激状态下,HPA轴激活,下丘脑室旁核(PVN)分泌促肾上腺皮质激素释放因子,作用于垂体释放促肾上腺皮质激素(ACTH),最终刺激肾上腺皮质产生和释放糖皮质激素(GC,人类为皮质醇,啮齿类动物为皮质酮)。大量释放的GC则通过与海马体、前额叶皮质、杏仁核核等高位中枢中的盐皮质激素受体(MR)和糖皮质激素受体(GR)结合激活负反馈回路来对HPA轴产生反馈性抑制的作用。研究表明,早期生命应激可对HPA轴功能产生深远的影响,导致以海马为主的负反馈调节中枢MR和GR表达下降或功能异常,出现二者不能完成介导内源性GC对HPA轴的负反馈抑制调节,最终导致抑郁症的发生。所以MR和GR功能障碍被认为是影响HPA轴持续亢进的重要原因之一^[22]。FK-506结合蛋白作为GR的伴侣蛋白,可与GR形成复合体,竞争性的抑制GR与GC的结合,因此FK-506结合蛋白的过度表达可导致GR敏感性下降以及GC的升高^[23],也是HPA轴反馈机制损害

的原因之一。此外, β -EP是一种由下丘脑合成和分泌的神经肽,主要参与欣快感、奖赏等情绪调节,以及参与免疫反应、神经内分泌的控制等,由前阿片肽、促肾上腺皮质激素及其他衍生物分裂产生,因此 β -EP的分泌和释放受到HPA轴的调控,且与ACTH的分泌有伴行趋势^[24]。有研究发现抑郁症患者血浆中存在较高水平的 β -EP^[25]。在动物模型中,也发现 β -EP分泌的增加与抑郁行为有关^[26]。因此 β -EP的水平对焦虑、抑郁等精神障碍也有一定标识意义。本次实验发现,母婴分离组小鼠血清CORT、 β -EP和下丘脑 β -EP表达水平均显著上升,结合既往研究^[11],提示母婴分离组小鼠HPA轴过度激活,调节能力受损,同时FKBP5 mRNA水平下降,Nr3c1 mRNA表达上升,但杏仁核区GR蛋白表达未见明显上升,提示母婴分离组小鼠的FK-506结合蛋白表达可能上升,但杏仁核GR蛋白的表达下降,使杏仁核区GR信号减弱,不能对HPA轴起到负反馈抑制作用。

此外,HPA轴的激活使相关应激激素产生和释放增加,并与神经系统内广泛存在的相应受体相互所用,从而对神经系统功能进行调节,可导致躯体疼痛状态的改变^[27]。而杏仁核作为边缘系统中应激反应的执行中枢^[26],主要通过BLA接受来自上皮质区的感官信息,并从臂旁核直接投射伤害性信息,而高度整合的应激-情感相关信息随后被传输到CeA,参与调节情绪与疼痛相关的行为^[6]。此外,BLA还与多种脑功能疾病高度相关,如BLA神经元的兴奋性参与了痛觉过敏的发病机制^[28],而从前扣带回皮质到BLA的直接神经元投射在调节情绪功能(如恐惧学习)中则起着关键作用^[29]。因此杏仁核可能是慢性疼痛与抑郁共病的关键脑区之一,其形态和功能的改变可能是构成慢性疼痛潜在基础。谷氨酸是大脑内重要的兴奋性神经递质,在疼痛从外周到中枢的疼痛传递过程起主导作用,并参与了中枢的疼痛致敏^[30]。代谢型谷氨酸受体(mGluRs)是谷氨酸的发挥作用的基础之一^[31]。而mGluR5是中枢内丰富表达的一种mGluRs,可调控突触可塑性、神经兴奋性及疼痛信息传递等多种活动。研究发现,mGluR5的激活可促进BDNF的表达^[32],并参与了疼痛通路中枢敏化的诱导和维持^[30]。BDNF则在BLA神经元增敏及BLA与CeA之间的突触长时间增强发挥重要作用,可使杏仁核对伤害性信息的整合增强,从而加剧了神经病理性疼痛,导致焦虑、抑郁情绪或行为的反应加重。此外BDNF在神经病

理性疼痛和炎性疼痛的产生和维持中也起到重要作用^[33]。

温阳解郁方一方面可通过增加杏仁核 GR 蛋白的表达,通过负反馈调节降低 HPA 轴的过度激活,降低母婴分离组小鼠的 CORT 水平,另一方面可通过降低 GRM5 及 BDNF mRNA 表达,抑制杏仁核神经元兴奋性达到抗焦虑抑郁的治疗作用。本次实验结果显示,与母婴分离组比较,温阳解郁组小鼠的旷场中央区活动时间及运动总路程均显著增加,痛阈水平有所提高,血清 CORT 水平显著下降,杏仁核 GR 蛋白表达增加,杏仁核 Nr3c1、GRM5 及 BDNF mRNA 表达下降,同时提示在母婴分离模型小鼠阳虚肝郁证中,应以肾阳不足为本,而肝郁为促进因素,肾在志为恐,肾阳的充足与否可能对机体恐惧系统有重要的影响。因此在综合疗效及药理作用上较温阳组和解郁组改善效果更加全面。

综上,母婴分离小鼠在接受坐骨神经结扎应激后,表现出焦虑与抑郁样行为,血清 CORT 及 β -EP 水平显著升高,杏仁核 GR 蛋白表达异常。温阳解郁方可通过增强杏仁核 GR 表达加强 HPA 轴的负反馈调节,并抑制杏仁核区神经可塑性和兴奋性调节恐惧神经回路,改善母婴分离+慢性神经疼痛小鼠的抑郁样行为及躯体痛觉过敏。其综合疗效优于单纯的二仙汤和逍遥散。为早期生命应激后慢性疼痛合并抑郁等相关病症提供早期防治思路和实验依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 张思玮. 防治抑郁症,是时候采取行动了[N]. 中国科学报,2022-02-24.

[2] TAN X, ZHANG L, WANG D, et al. Influence of early life stress on depression: From the perspective of neuroendocrine to the participation of gut microbiota [J]. Albany, 2021, 13(23): 25588-25601.

[3] KNOX D, STOUT-OSWLD S A, TAN M, et al. Maternal separation induces sex-specific differences in sensitivity to traumatic stress [J]. Front Behav Neurosci, 2021, 15: 766505.

[4] CARLONI E, RAMOS A, HAYES L N. Developmental stressors induce innate immune memory in microglia and contribute to disease risk [J]. Int J Mol Sci, 2021, doi: 10. 3390/ijms222313035.

[5] ISHAK W W, WEN R Y, NAGHDECHI L, et al. Pain and depression: A systematic review [J]. Harv Rev Psychiatry, 2018, 26: 352-363.

[6] LIU L Y, ZHANG R L, CHEN L, et al. Chronic stress increases pain sensitivity via activation of the rACC-BLA pathway in rats [J]. Exp Neurol, 2019, 313: 109-123.

[7] MJ L, LY L, L C, et al. Chronic stress exacerbates neuropathic pain via the integration of stress-affect-related information with nociceptive information in the central nucleus of the amygdala [J]. Pain, 2017, 158(4): 717-739.

[8] 张献强,孙浩然,孙延超,等. 母婴分离模型的常见行为范式评价及研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(5): 114-119.

[9] 李旭阳. 母婴分离对新生儿疼痛反应及神经行为的影响[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(95): 61.

[10] 孙鸿燕,董文斌,姜林,等. 母婴分离对新生鼠成年后内脏疼痛敏感性影响及机制研究[J]. 中华妇幼临床医学杂志:电子版, 2014, 10(1): 26-28.

[11] 岳广欣,张玲,卢贺起,等. 温阳解郁法对母婴分离小鼠行为模式及HPA轴功能的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(1): 42-46.

[12] 李娜,巫鑫辉,高静静,等. 早年不良经历对阳虚体质形成的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(4): 489-491.

[13] 李永丰,任维,刘一辉. CB1受体通过钾离子通道介导外周镇痛作用[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(4): 660-666.

[14] FRANKLIN K B J, PAXINOS G. Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates, compact[M]. Elsevier Science, 2019: 99-105.

[15] 申敬,罗元普. 中药治疗慢性疼痛并发抑郁症和焦虑症的效果研究[J]. 中国卫生标准管理, 2021, 12(21): 104-107.

[16] 周雪明,尹雅静,常卓,等. 逍遥散对抑郁大鼠海马CA1区PI3K/Akt信号通路的调节作用研究[J]. 中医药学报, 2022, 50(1): 12-17.

[17] 徐雪娇,李天英,范文栋,等. 中药复方治疗抑郁症的研究概况[J]. 医学综述, 2021, 27(18): 3687-3693.

[18] CUI H, DU X, LIU C, et al. Visfatin promotes intervertebral disc degeneration by inducing IL-6 expression through the ERK/JNK/p38 signalling pathways [J]. Adipocyte, 2021, 10(1): 201-215.

[19] 黄铭发,许婷,危智盛,等. 早期母婴分离对大鼠成年后抑郁易感性和海马GluR1表达的影响[J]. 广东医学, 2016, 37(13): 1913-1916.

[20] 霍瑞恒. mGluR5拮抗剂MPEP调控MAPK信号通路对子痫前期脑损伤的研究[D]. 大连:大连医科大学, 2019.

[21] FUENTES I M, CHRISTINSON J A. The influence of

- early life experience on visceral pain [J]. *Front Syst Neurosci*, 2018, 12:2.
- [22] BASE C W, MARTINS C M, TOFOLI S M, et al. Early life stress in depressive patients: HPA axis response to GR and MR agonist [J]. *Front Psychiatry*, 2014, 5:2.
- [23] TYRKA A R, RIDOUT K K, PARADE S H, et al. Childhood maltreatment and methylation of FK506 binding protein 5 gene (FKBP5) [J]. *Dev Psychopathol*, 2015, 27(4Pt2): 1637-1645.
- [24] 程华,李瑞俊,梁小玲,等. 康复期重度烧伤患者抑郁的血浆 β -内啡肽水平表达[J]. *医学理论与实践*, 2013, 26(8):985-986.
- [25] 桂艳鸾,吴纪园. 白癜风患者焦虑抑郁状态与血浆 β -内啡肽水平相关性研究[J]. *现代医药卫生*, 2021, 37(7): 1123-1125.
- [26] SAVIC D, KNEZEVIC G, MATIC G, et al. Posttraumatic and depressive symptoms in β -endorphin dynamics [J]. *J Affect Disord*, 2015, 181: 61-66.
- [27] 赵婕,谢健. 抑郁症和慢性疼痛药物治疗[J]. *医药导报*, 2019, 38(5):622-625.
- [28] 李留安,杨晓静,杜改梅,等. HPA轴应激应答反应产生的中枢调节机制[J]. *中国兽医杂志*, 2010, 46(6): 65-66.
- [29] ALLSOP S A, WICHMANN R, MILLS F, et al. Corticoamygdala transfer of socially derived information gates observational learning [J]. *Cell*, 2018, 173(6): 1329-1342.
- [30] PEREIRA V, GOUDENT C. Emerging trends in pain modulation by metabotropic glutamate receptors [J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11:464.
- [31] SHARP B M. Basolateral amygdala and stress-induced hyperexcitability affect motivated behaviors and addiction [J]. *Transl Psychiatry*, 2017, 7: e1194.
- [32] 付波,翁谢川,王静,等. 慢性神经痛对抑郁状态以及中枢多巴胺神经元电生理的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2016, 32(5):403-407.
- [33] 赵锁,蔡国洪,朱媛媛,等. mGluR5参与小鼠睡眠剥夺快速抗抑郁作用的机制研究[J]. *神经解剖学杂志*, 2019, 35(3):251-257.

[责任编辑 孙丛丛]