

加味丹栀逍遥散对抑郁模型大鼠海马内盐皮质激素受体和糖皮质激素受体的影响

郭晓冬¹, 许二平^{2*}, 李琳¹, 姚建平², 卫向龙²

(1. 河南中医学院第一附属医院, 郑州 450008; 2. 河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的: 观察加味丹栀逍遥散对抑郁模型大鼠海马内盐皮质激素受体(MR)和糖皮质激素受体(GR)含量的影响。方法: 将 50 只 Wistar 雄性大鼠随机分为空白对照组、模型组、氟西汀组、加味丹栀逍遥散低剂量组、加味丹栀逍遥散高剂量组, 每组 10 只; 采用孤养结合慢性轻度不可预见性应激的复合模型, 除空白组外, 其余各组均接受不同应激因子刺激 21 d, 建立慢性应激抑郁大鼠模型, 随后分别按氟西汀组 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、加味丹栀逍遥散低、高剂量组 $2.04, 4.08 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 各组均按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig 给药, 空白对照组和模型组 ig $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 生理盐水 1 次/d, 每天应激前灌胃, 从造模第 22 天开始, 至动物处死当天, 共 21 d, 实验周期共 42 d; 采用蛋白印迹法(Western-blot)测定大鼠海马内糖皮质激素受体(GR)和盐皮质激素受体(MR)的蛋白表达。结果: 与空白组比较, 模型组大鼠海马内 GR 的蛋白表达下调而 MR 的蛋白表达升高; 经治疗后, 各组大鼠海马内 GR 的蛋白表达较模型组显著上调($P < 0.05$), 而各组大鼠海马内 MR 的蛋白表达较模型组显著下调($P < 0.05$)。结论: 加味丹栀逍遥散可以通过调节海马内 GR 和 MR 的蛋白表达而起到抗抑郁的作用, 经过药物干预后的模型大鼠海马内 GR 表达升高而 MR 的表达下调, 其抗抑郁的作用机制可能与海马内 GR 和 MR 之间的比例关系失调有关。

[关键词] 加味丹栀逍遥散; 抑郁症模型; 盐皮质激素受体; 糖皮质激素受体

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0119-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110119

Effect of Jiawei Danzhi Xiaoyao Powder on Mineralocorticoid Receptor and Glucocorticoid Receptor in Hippocampus of Depression Rats

GUO Xiao-dong¹, XU Er-ping^{2*}, LI Lin¹, YAO Jian-ping², WEI Xiang-long²

(1. No. 1 Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Zhengzhou 450008, China; 2. Henan University of TCM, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Jiawei Danzhi Xiaoyao powder on the concentration changes of mineralocorticoid receptor (MR) and glucocorticoid receptor (GR) in hippocampus of depression rats. **Method:** Fifty male Wistar rats were evenly randomized into control group, model group, fluoxetine group, modified Jiawei Danzhi Xiaoyao powder low dose, high dose, 10 in each group. Depression model of rat was produced by using chronic unpredictable mild stress stimulation combined with lonely raising for 21 days. From the twenty-second days of models, fluoxetine group $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, modified Jiawei Danzhi Xiaoyao powder low dose $2.04 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, high dose $4.08 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, each of the medication group perfused daily with the medicine which was needed $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, and control group and model group perfused daily with normal saline of a volume the same as the medication group, before the stress of each day. Until all rats were killed, there are 21 days. Use the Western-blot to determine the expression of glucocorticoid receptor (GR) and mineralocorticoid receptor (MR) in the hippocampus of rats. **Result:** Compared with the control group, the down-relation of GR protein expression was

[收稿日期] 20130826(014)

[基金项目] 郑州市科技攻关计划(112PPTS319-6)

[第一作者] 郭晓冬, 硕士, 从事方剂配伍及作用机制规律的研究, Tel:13783603559, E-mail:zhzhgxd@sina.com

[通讯作者] *许二平, 教授, 硕士研究生导师, 从事方剂配伍及作用机制规律的研究, Tel:13607696328, E-mail:xuerping@sina.com

found in hippocampus of model group, but MR protein expression increased. After treatment, the GR protein expression in hippocampus of rats significantly raised ($P < 0.05$) in the model group, and each group MR protein expression in hippocampus of rats from model group significantly lowered ($P < 0.05$). **Conclusion:** Jiawei Danzhi Xiaoyao powder can regulate the GR and MR protein expression in hippocampus and antidepressant effect. Its mechanism of action of antidepressants may be related to the hippocampus in imbalance of the proportion of the relationship between GR and MR.

[**Key words**] depression; Jiawei Danzhi Xiaoyao powder; mineralocorticoid receptor; glucocorticoid receptor

抑郁症是一种以显著而持久的心境低落为主要表现的情感性障碍综合征,临床以情绪低落,兴趣减低,思维迟缓,言语动作减少,睡眠障碍,思虑过度为主要表现,常伴有全身多系统的与客观检查不相符的多种多样的躯体不适,严重者可出现自杀念头和行为,具有高患病率、高复发率、高疾病负担率及高自杀率的精神疾患。随着社会的发展,竞争的加剧,其发病率呈上升趋势,且发病呈现出低龄化的特点,已经成为当今社会严重危害人们身心健康、生活质量和社会职业功能的重大精神心理生理疾病^[1]。本实验以临床运用加味丹栀逍遥散能有效改善抑郁症状为基础,结合抑郁症独特的发病机制——肝脑同病,作为研究的切入点,旨在观察抑郁模型大鼠海马内盐皮质激素受体(MR)和糖皮质激素受体(GR)的含量变化,从而探讨加味丹栀逍遥散疏肝解郁、健脑益智抗抑郁的可能作用机制。

1 材料

1.1 药物 加味丹栀逍遥散是临床经验方,依据明代薛立斋的《内科摘要》中加味逍遥散(丹栀逍遥散)的用量并结合临床经验而组方,由柴胡、当归、芍药、茯苓、炒白术、牡丹皮、炒栀子、炙甘草、石菖蒲、远志等药物组成,中药购于河南中医学院第三附属医院中药房,按成年人 60 kg 体重剂量的 2,4 倍分别水煎煮浓缩至生药 0.204, 0.408 g·mL⁻¹。4℃ 冰箱保存备用。盐酸氟西汀片(常州四药制药有限公司,生产批号 20100623NO.294),根据“按人与动物等效剂量的折算方法”^[3]。

1.2 试剂与仪器 小鼠抗大鼠 MR 抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号 G1904),兔抗大鼠 GR 抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号 I1208), β -actin 抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号 80900705),自制的敞箱和电击仪, HY-5 型回旋振荡器(金坛市天竞实验仪器厂), FA2004A 型电子天平(上海精天电子仪器有限公司), DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂), SK-30 型高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司), D-140 型

图像记录分析系统(大连竞迈仪器有限公司)等。

1.3 动物 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 50 只,体重(180±20)g,由山东省动物实验中心提供,许可证号 SCXK(鲁)2008-0002。

2 方法

2.1 动物分组与模型复制 大鼠经过 1 周的适应性喂养,对每只大鼠进行敞箱实验(open-field test)和糖水消耗训练及实验。对敞箱实验水平运动和垂直运动总得分低于 30 分或高于 120 分的大鼠予以剔除。根据敞箱实验结果编号,随机分为 5 组,每组 10 只,分为空白对照组、模型组、氟西汀组、加味丹栀逍遥散低、高剂量组。大鼠抑郁动物模型为慢性轻度不可预见性应激结合孤养的复合模型^[4-5],并结合预实验结果加以改进。以健康雄性 Wistar 大鼠为造模对象,模型制作的应激处理参照文献改进如下:电击足底(20 V 电压,每次持续 10 s,延迟 10 s,20 次,共 3 次)、冰水游泳(4℃,持续 5 min,共 3 次)、热刺激(45℃,持续 5 min,共 3 次)、水平震荡(速率 1 次/s,5 min,共 3 次)、夹尾(持续 1 min,共 3 次)、禁水(24 h,共 3 次)、禁食(24 h,共 3 次)、昼夜颠倒(共 2 次)、潮湿垫料(共 2 次)、束缚(持续 5 h,共 3 次)、明暗循环(频闪照射 120 次/min,12 h,共 3 次)、通宵照明(共 3 次)、合笼(共 3 次)、禁水禁食(24 h,共 3 次)、休息(共 2 次),将以上不同应激因子在实验全程中应用,顺序随机,使大鼠不可预见刺激的发生,平均每种刺激使用最多不超过 3 次,相邻 2 d 的刺激不能重复,同时配合单笼(正常组除外)饲养,共刺激 42 d。

2.2 给药方法 盐酸氟西汀组 2.5 mg·kg⁻¹、加味丹栀逍遥散低、高剂量组 2.04, 4.08 g·kg⁻¹,各组均按 10 mL·kg⁻¹ 给药,空白对照组和模型组按 10 mL·kg⁻¹ 生理盐水 ig, 1 次/d,每天应激前 ig 给药,从造模第 22 天开始,至动物处死当天,共给药 21 d,给药期间,各造模组大鼠均继续给予刺激。

2.3 标本的制备及检测 各组动物末次造模结束

后,禁水禁食 24 h,10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,大鼠腹主动脉采血后,立即断头,迅速在冰块上剥离大脑,分离海马,称重后放入组织冻存管中,用液氮罐转移,-70 ℃ 冰箱保存备用待测。采用蛋白印迹法(Western-blot)测定大鼠海马内糖皮质激素受体(GR)和盐皮质激素受体(MR)的蛋白表达。

2.4 统计方法 以 SPSS 17.0 FOR Windows 统计软件包作为统计工具,各项指标结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据比较若符合正态分布采用完全随机设计资料单因素方差分析两两样本比较,其中方差齐者采用 LSD 法检验,方差不齐者采用 Dunnett's T_3 法检验。 $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

3 结果

加味丹栀逍遥散对抑郁模型大鼠海马内 GR 和 MR 蛋白表达 模型组大鼠海马内 GR 蛋白表达较空白对照组显著下调($P < 0.05$),而模型组大鼠海马内 MR 的蛋白表达较空白对照组显著升高($P < 0.05$);经治疗后,各组大鼠海马内 GR 蛋白表达较模型组显著上调($P < 0.05$),而各组大鼠海马内 MR 的蛋白表达较模型组显著下调($P < 0.05$),结果初步表明,加味丹栀逍遥散可以通过调节海马内 GR 和 MR 的蛋白表达而起到抗抑郁的作用。见表 1。

表 1 加味丹栀逍遥散对抑郁模型大鼠海马内 GR 和 MR 蛋白表达变化的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$) $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	GR	MR
对照	-	0.817 ± 0.332	0.327 ± 0.018
模型	-	0.237 ± 0.197 ¹⁾	0.789 ± 0.062 ¹⁾
氟西汀	2.5×10^{-3}	0.747 ± 0.055 ²⁾	0.458 ± 0.029 ²⁾
加味丹栀	4.08	0.687 ± 0.054 ²⁾	0.488 ± 0.140 ²⁾
	2.04	0.526 ± 0.013 ²⁾	0.546 ± 0.021 ²⁾

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

近年来,皮质类固醇受体系统对下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA轴)的调控作用是研究的焦点,随着对抑郁症研究的不断深入,大家一致认为下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA轴)功能亢进是抑郁症最明显的神经内分泌改变,是导致抑郁症发生的基本病因。所以皮质类固醇受体与抑郁症的关系也成为研究的重点。皮质类固醇激素受体分为糖皮质激素受体(GR)和盐皮质激素受体(MR)两种,两种受体的分布有较大差别,GR广泛分布于大脑各区,而MR主要集中在海马、外侧隔核、杏仁核、嗅核等边缘区域,且尤以海马最为丰富,虽然两种受体的分布差异较大,但是GR和MR可共存于海马的CA1,CA2,CA3

亚区和齿状回等边缘区域。海马内MR丧失了对盐皮质激素(醛固酮)的选择作用,所以GC同时与GR和MR两种受体结合,而且,MR和GR与GC的结合力差别很大,GC与MR的亲合力约是与GR的10倍,低水平的GC首先与MR结合,只有高水平的GC才能在MR饱和后与GR结合,但是MR在海马内的含量却比GR的含量低很多。所以说MR是高亲和力而低容量的GC受体系统,而GR为低亲和力而高容量的GC受体系统^[6]。

海马是MR和GR的共存区域,二者共同参与了HPA轴的生理调节。在正常的应激条件下,海马中MR与低水平的GC的结合已经接近饱和,它的结合参与HPA轴的基础水平的负反馈调节,维持HPA轴的基础活性;而GR是在应激过程中起主要调节作用的受体^[7],除了参与HPA轴的昼夜节律调节外,还参与高水平GC的负反馈调节,抑制HPA轴过度兴奋,使应激状态的HPA轴功能恢复到基础水平。

海马对HPA轴的调控作用是GR和MR通过调节下丘脑室旁核(PVN)来实现的。损毁和电刺激海马研究提示:海马总体上对HPA活动起到抑制作用。切除背部海马或切断穹窿研究显示:其能提高生理性节律低谷期的基础HPA活动水平,尤其可升高早晨的CRH mRNA和血管加压素(AVP mRNA)表达。皮质酮的调节受到MR和GR的双重调节。正常水平的皮质酮一般只激活MR,MR结合占优势时,海马维持兴奋性,经过跨突触信号传导抑制性投射至下丘脑室旁核(PVN),抑制基础性HPA活动。相反,随着刺激的持续,皮质酮分泌的不断增多,MR的结合接近饱和,此时开始激活GR,GR在应激后的GC的生理节律上升期不断被占领结合,激活的GR抑制了海马的信号输出,导致PVN神经元的去抑制,GC再通过负反馈效应作用于PVN。两类受体调节的功能是相互联系的。研究显示:MR缺陷将使皮质酮反应更快速的出现,并产生更明显的GR介导效应,说明MR和GR介导的效应均衡性在HPA调节中的重要性。因此,越来越多的研究支持受体介导作用的平衡学说,认为MR主要维持GC的作用,而GR主要参与GC的负反馈作用。应激状态MR/GR平衡失调使神经元处于易损状态,易于发生应激损伤性疾患。有研究发现:慢性突发性应激可以引起大鼠血浆皮质酮水平升高,海马MR/GR mRNA比例异常,同时该研究还发现:在GR功能受到损害的转基因大鼠中,HPA轴对GC的敏感性降

低,这使得糖皮质激素抑制性负反馈效率降低^[8-10]

近年来的研究显示:应激超过一定的时程(3~4周以上)则可能导致海马神经元的损害,这与许多神经疾病如抑郁症和阿尔茨海默病等的发病机制有关^[11]。在慢性应激环境下,下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA轴)功能亢进,糖皮质激素的分泌升高,海马内含有大量的糖皮质激素受体,这些受体对糖皮质激素的提高有很强的敏感性,并且受体会受到慢性应激而下调,皮质醇的增高可损伤海马、蓝斑等而导致神经元的丢失,进而使海马发生器质性改变而出现抑郁的临床症状^[12]。海马的破坏与HPA轴功能亢进相互作用,互为因果。一方面,海马可以抑制HPA轴的活性,应激反应时其对HPA轴具有抑制作用,海马损害提高了HPA轴对应激的敏感性,从而导致HPA轴亢进,GC分泌增加;另一方面,高水平的GC又选择性地损伤海马,使HPA轴功能更加亢进,以致海马长期暴露在高水平的皮质醇下^[13]。在长期这种高皮质醇情况下,GR的功能及表达量下降,其对HPA轴抑制作用减弱,使HPA轴持久亢进。总之,海马不仅是HPA轴的高位调节中枢,而且是应激损伤的敏感区,其通过MR的基础性调节和GR对高水平GC的负反馈调节之间的平衡来维持HPA轴的合理水平;同时慢性应激下,HPA轴的亢进,导致糖皮质激素受体过度应激,海马损伤。

实验结果显示:模型组大鼠海马内GR的蛋白表达较空白对照组显著下调($P < 0.05$),而模型组大鼠海马内MR的蛋白表达较空白对照组显著升高($P < 0.05$);经治疗后,各组大鼠海马内GR的蛋白表达较模型组显著上调($P < 0.05$),而各组大鼠海马内MR的蛋白表达较模型组显著下调($P < 0.05$),结果初步表明,加味丹栀逍遥散可以通过调节海马内GR和MR的蛋白表达而起到抗抑郁的作用,其作用机制可能与海马内GR和MR之间的平衡有关。

[参考文献]

[1] 许二平. 抑郁症诊疗学[M]. 北京:人民军医出版社, 2009:1.
[2] 沈渔邨. 精神病学[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社,

2006:426.

[3] 徐叔云,卞如廉,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2006:179.
[4] 夏军,叶慧,周义成,等. 慢性应激大鼠抑郁模型的建立及其有效性的探讨[J]. 华中科技大学学报:医学版,2005,34(4):493.
[5] 王建醒,周丽,徐华锋,等. 慢性应激大鼠抑郁模型的建立及评价[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2006,27(6):644.
[6] E Ronald de Kloet, Erno Vreugdenhil, Melly S Oitzl, et al. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease[J]. Endocrine Reviews,1998,19(3):269.
[7] Robert M, Sapolsky L, Michael R, et al. How do glucocorticoids influence stress responses? integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions[J]. Endocrine Reviews,2000,21(1):55.
[8] Liberzon, Lopez, Flagel, et al. Differential regulation of hippocampal glucocorticoid receptors mRNA and fast feedback: relevance to post-traumatic stress disorder[J]. J Neuroendocrinol,1999,11(1):11.
[9] Paskitti M E, McCreary B J, Herman J P. Stress regulation of adrenocorticosteroid receptor gene transcription and mRNA expression in rat hippocampus: time-course analysis[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2000,80(2):142.
[10] Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T. Formation mechanisms of stress adaptation: role of functional coupling of glucocorticoids and brain serotonergic nervous system[J]. Nihon Shinkei Seishin Yakurikaku Zasshi,2000,20(3):83.
[11] Cheryl D. Conrad. What is the functional significance of chronic stress-induced CA3 dendritic retraction within the hippocampus[J]. Behav Neurosci Rev, 2006,5(1):41.
[12] Robert M Sapolsky. The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death[J]. Biological Psychiatry,2000,48(8):755.
[13] Moqhaddam B, Bolinao M L, Stein-Behrens B, et al. Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate[J]. Brain Res, 1994,655(1/2):251.

[责任编辑 聂淑琴]