

舒郁胶囊对血管性抑郁模型大鼠脑组织 5-HT_{1A} R, D₂ R, α_{2A} R 及 ApoE₄ 表达的影响

李乐军^{1*}, 李鑫², 黄蓉¹, 魏凯峰², 刘涛², 李玉梅¹, 周越¹, 李祥勇¹

(1. 南京中医药大学连云港附属医院脑病科, 江苏 连云港 222000;

2. 南京中医药大学基础医学院, 南京 210029)

[摘要] **目的:**观察舒郁胶囊对血管性抑郁模型大鼠脑组织 5-羟色胺 1A 受体(5-HT_{1A}R)、多巴胺 2 受体(D₂R)、 α 肾上腺素 2A 受体(α_{2A} R)和载脂蛋白 E₄(Apo E₄)表达的影响。**方法:**除正常组外其他各组大鼠分别 im 给予维生素 D3(VD3) 30 万 U·kg⁻¹,连续 3 d,第 4 天起给予高脂饲养 9 周,继续高脂的同时给予慢性不可预见性温和应激刺激(CUMS)3 周,建立大鼠血管性抑郁模型。舒郁胶囊低、中、高剂量组大鼠均 ig 给予舒郁胶囊 533, 1 066, 2 132 mg·kg⁻¹,氟西汀组给予盐酸氟西汀 1.3 mg·kg⁻¹,正常组及模型组大鼠 ig 等体积蒸馏水,各组均为 1 次/d,疗程共 21 d。以敞箱实验,糖水偏嗜实验进行行为学评分,采用免疫组织化学法检测脑内 5-HT_{1A}R, D₂R, α_{2A} R 的含量变化,采用酶联免疫法测定 Apo E₄ 的含量变化。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠脑内的 5-HT_{1A}R, D₂R, α_{2A} R 受体和 Apo E₄ 的含量表达显著增加($P < 0.01$);舒郁胶囊低、中、高剂量组和氟西汀组与模型组比较均能降低大鼠脑内 5-HT_{1A}R, D₂R, α_{2A} R 受体及降低 Apo E₄ 含量($P < 0.05$, $P < 0.01$),舒郁胶囊 3 剂量组和氟西汀组之间比较无明显差异。**结论:**舒郁胶囊可能具有抗血管性抑郁作用,其作用机制可能与降低大鼠脑内 5-HT_{1A}R, D₂R, α_{2A} R 及 Apo E₄ 表达有关。

[关键词] 舒郁胶囊; 血管性抑郁模型; 5-羟色胺 1A 受体; 多巴胺 2 受体; α 肾上腺素 2A 受体; 载脂蛋白 E₄

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)13-0160-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014130160

Effect of Shuyu Capsule on Expression of 5-HT_{1A} R, D₂ R, α_{2A} R and ApoE₄ in Vascular Depression Model Rat

LI Le-jun^{1*}, LI Xin², HUANG Rong¹, WEI Kai-feng², LIU Tao², LI Yu-mei¹, ZHOU Yue¹, LI Xiang-yong¹

(1. Lianyungang Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Lianyungang 222000, China;

2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of shuyu capsule on the expression of serotonin 1A receptor (5-HT_{1A}R), dopamine D2 receptor (D₂R), α 2A adrenergic receptor (α_{2A} R) and apolipoprotein E₄ (Apo E₄) in brain tissue of rats with vascular depression model. **Method:** Except the normal group rats were given Vitamin D3 (VD3) 300 000 U·kg⁻¹ by intramuscular injection, for 3 d, at fourth day high-fat feeding was carried out, lasted for 9 weeks, meanwhile chronic unpredictable mild stress (CUMS) was performed for 3 weeks to establish the rat model of vascular depression. Shuyu capsule low dose (533 mg·kg⁻¹), middle dose (1 066 mg·kg⁻¹), high dose (2 132 mg·kg⁻¹) and fluoxetine (1.3 mg·kg⁻¹) were administered intragastrically group were given fluoxetine hydrochloride, the normal group and the model group rats were administrated distilled water, the treatment lasted 21 days. In the open field test, sucrose preference test was scored, immunohistochemical

[收稿日期] 20140220(016)

[基金项目] 江苏省中医药领军人才项目(LJ200930);江苏省“六大人才高峰”高层次人才项目(WSN-013);江苏省“333 工程”高层次人才培养项目(BRA2013100)

[通讯作者] *李乐军,博士,主任中医师,从事中西医结合防治脑血管病及其并发症研究, Tel:15305131505, E-mail:lilejunn999@163.com

method was used to detect the changes of content of 5-HT_{1A}R in brain, D₂R, α_{2A}R, Apo E₄ content determination by ELISA method. **Result:** The 5-HT_{1A}R, D₂R, α_{2A}R receptor and Apo E₄ expression increased significantly in the model group ($P < 0.01$). Shuyu capsule low, middle, high dose groups and fluoxetine group, compared with the model group, could reduce the 5-HT_{1A}R and D₂R, α_{2A}R receptor and decreased the content of Apo E₄ ($P < 0.05$, $P < 0.01$), **Conclusion:** Shuyu capsule may have anti-vascular depression effect, its mechanism may be related to the decrease of 5-HT_{1A}R, D₂R, α_{2A}R and expression of Apo E₄.

[**Key words**] Shuyu capsule; model of vascular depression; serotonin 1A receptor; dopamine D₂ receptor; α_{2A} adrenergic receptor; apolipoprotein E₄

血管性抑郁(vascular depression)作为抑郁症的一种特殊亚型,是危害严重的晚发性血管障碍性抑郁症,随着人口老龄化和心脑血管疾病发病率增加,血管性抑郁的发病率增加。血管性疾病与抑郁症互相影响,明显增加了患者的致残率和死亡率,造成患者及其家庭、社会的严重负担。舒郁胶囊前期临床研究显示治疗血管性抑郁患者具有良好的临床疗效^[1]。为进一步探讨舒郁胶囊治疗血管性抑郁的作用机制,故进行相关的实验研究。这对血管性抑郁患者早期发现、早期干预治疗、降低死亡率均具有重要的现实意义。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠,体重(200 ± 20) g,由南京中医药大学动物实验中心提供,动物合格证编号 SCXK(苏)2013-0023。动物于实验前 1 周运至实验室,在安静环境下分笼饲养,温度控制在(23 ± 1)℃的范围内,相对湿度 60%,光线自动控制,明(07:00 ~ 19:00)暗(19:00 ~ 07:00)交替,给予充足清洁饮水、摄食。所有大鼠都饲养于南京中医药大学实验中心 SPF 级清洁鼠房。

1.2 试剂及药品 舒郁胶囊(柴胡、郁金、法半夏、茯苓、白术、陈皮、合欢皮、葛根、川芎、地龙药物组成)为临床经验方(由连云港市中医院制剂室,批号 20120924),盐酸氟西汀胶囊(由美国礼来苏州制药有限公司提供,批号 20110726),维生素 D₃(VD₃)注射液(上海通用药业股份有限公司生产,批号 1210020),兔 5-羟色胺受体 1A(5-HT_{1A}R)抗体(北京博奥森生物技术有限公司,BS-1124R),大鼠多巴胺 2 受体(D₂R)抗体(北京博奥森生物技术有限公司,BS-1108R),大鼠肾上腺素 α₂受体(α_{2A}R)抗体(北京博奥森生物技术有限公司,BS-1062R),载脂蛋白 E₄(Apo E₄)ELISA 试剂盒(中国上海沪宇生物科技,FA01796B),DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.3 仪器 JL-B 电刺激器(上海嘉龙教仪厂),自

制大鼠夹尾瓶、自制大鼠束缚板、游泳用水箱、自制大鼠黑白颠倒箱,Image-Pro Plus(version 5.0.1.11)真彩病理图像分析系统(version 5.0.1.11)(美国 Media-Cybernetics 公司),CliniBio128C-400 型酶标仪(奥地利),Leitz 型切片机(德国),Polyvar 型万能显微镜(美国),自制大鼠敞箱,解剖用显微镜等。

2 方法

2.1 动物分组 实验前动物适应性饲养 1 周后,采用敞箱试验(Open-field)方法进行行为学评价,选择行为学指标评分相近的大鼠,采用数字表法随机分为正常组,模型组,氟西汀组,舒郁胶囊低、中、高剂量组,每组 8 只。除正常组 4 只/笼群养外,其余各组均单笼饲养。各组间行为学指标评分差异无统计学意义。

2.2 血管性抑郁模型建立 正常组大鼠正常饲养,其余各组实施造模,按照文献[2]方法并加以改进。除正常组外其他各组大鼠分别给予 VD₃ 30 万 U·kg⁻¹,肌肉注射,连续 3 d,第 4 天起给予高脂饲料(配方:蛋黄粉 10%、猪油 10%、胆固醇 1%、胆酸钠 0.2%、普通饲料 78.8%),高脂饲养 9 周。动物高脂饲养 9 周后,继续高脂的同时给予慢性不可预见性温和应激刺激(CUMS)3 周,CUMS 按 Willner 等方法改进,将动物予以夹尾 1 min,禁水 24 h,禁食 24 h,潮湿垫料 24 h,束缚 2 h,空笼放置 4 h,4℃冰水浴 5 min,明暗颠倒 24 h,45°倾斜 24 h,电击足底 10 min(电流强度 1 mA,电压 30 V,每隔 1 min 刺激 1 次,每次 10 s,共刺激 10 次)等方法刺激。上述刺激每天采取一种,共安排 3 周,使动物不能预料刺激的发生,以避免其发生适应性。

2.3 给药方法 在抑郁造模结束后给药。舒郁胶囊低、中、高剂量组 ig 剂量分别为 533, 1 066, 2 132 mg·kg⁻¹,氟西汀组给予盐酸氟西汀 1.3 mg·kg⁻¹,正常组及模型组大鼠 ig 等体积蒸馏水,均为 1 次/d,连续 ig 给药 21 d。各组 ig 均于每天 9:00 进行。以敞箱实验,糖水偏嗜实验进行行为学评分,采用免疫

组织化学法检测脑内 5-HT_{1A}R, D₂R, α_{2A}R 的含量变化,采用酶联免疫法测定 Apo E₄ 的含量变化。实验过程中动物处置符合动物伦理学要求。

2.4 脑组织内神经递质受体水平检测^[3] 各组大鼠在完成行为学测试后各取 2 只 ig 给予 10% 的水合氯醛(用量为 400 mg·kg⁻¹)麻醉后断头取脑,放入福尔马林瓶中固定约 2 周后,常规脱水、透明,石蜡包埋,切片,每张切片厚 6 μm,进行测定指标的免疫组织化学法染色。完成后对免疫组织化学染色结果进行图像分析,每组选取 3 张切片,每张切片同一部位选取 3 个视野,Image-Pro Plus 真彩病理图像分析系统(version 5.0.1.11)(Media-Cybernetics, Int),统计每个视野中阳性细胞平均吸光度(A)。

2.5 脑组织内 Apo E₄ 表达水平检测^[4] 各组大鼠末次行为学检测后各取 8 只,断头处死,快速在冰盘上取出脑组织,用冰生理盐水冲洗除去血液,滤纸拭干,称重后置离心管中,保存于 -80 °C 的冰箱中,固体样本冰浴条件下超声匀浆 30 s,常温下 15 000 r·

min⁻¹离心 10 min,取上清液 50 μL 进行测定。取上述脑组织上清液采用 ELISA 法,按相关试剂盒说明书操作检测脑内 Apo E₄ 水平。

2.6 统计学分析 应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析。先进行方差齐性检验,方差齐直接进行方差分析;方差不齐进行方差齐性检验。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用方差分析(ANOVA/LSD),以 $P < 0.05$ 为显著性差异的标准。

3 结果

3.1 对脑组织内海马 CA1 区 5-HT_{1A}R, D₂R, α_{2A}R 表达的影响 舒郁胶囊治疗后各组大鼠脑组织内海马 CA1 区 5-HT_{1A}R, D₂R, α_{2A}R 表达比较结果显示:模型组 5-HT_{1A}R, D₂R, α_{2A}R 总体表达水平均呈现增加趋势,与正常组相比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。舒郁胶囊低、中、高剂量组和氟西汀组与模型组比较均能降低大鼠脑内 5-HT_{1A}R, D₂R, α_{2A}R 受体及 Apo E₄ 含量,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 舒郁胶囊对血管性抑郁模型大鼠脑组织内海马 CA1 区 5-HT_{1A}R, D₂R, α_{2A}R 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	5-HT _{1A} R	D ₂ R	α _{2A} R
正常	-	245.96 ± 6.44	246.25 ± 4.90	153.13 ± 6.00
模型	-	281.64 ± 4.01 ²⁾	271.30 ± 6.51 ²⁾	172.70 ± 6.61 ²⁾
氟西汀	1.3	251.09 ± 3.18 ⁴⁾	243.60 ± 6.69 ³⁾	151.49 ± 6.92 ⁴⁾
舒郁胶囊	533	256.87 ± 7.80 ⁴⁾	250.92 ± 5.88 ³⁾	167.12 ± 4.89 ³⁾
	1 066	251.24 ± 5.45 ⁴⁾	248.76 ± 5.13 ³⁾	162.57 ± 4.53 ³⁾
	2 132	246.12 ± 5.63 ⁴⁾	246.53 ± 5.04 ³⁾	157.23 ± 4.12 ³⁾

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

3.2 对脑组织内 Apo E₄ 表达的影响 模型组 Apo E₄ 表达水平均呈现增加趋势,与正常组相比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。舒郁胶囊低、中、高剂量组和氟西汀组 Apo E₄ 表达均较模型组减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。但舒郁胶囊 3 剂量组和氟西汀组之间 Apo E₄ 表达比较无明显差异。见表 2。

表 2 舒郁胶囊对血管性抑郁模型大鼠脑组织内 Apo E₄ 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Apo E ₄ /μg·L ⁻¹
正常	-	3.03 ± 0.35
模型	-	3.46 ± 0.14 ¹⁾
氟西汀	1.3	3.04 ± 0.19 ³⁾
舒郁胶囊	533	3.08 ± 0.20 ³⁾
	1 066	3.07 ± 0.19 ³⁾
	2 132	3.05 ± 0.21 ³⁾

4 讨论

目前国内外抗血管性抑郁实验多采用高脂饲养致动脉硬化法叠加慢性不可预见性应激刺激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)的造模方法,该造模可较好的模拟血管性抑郁的自然发病过程,从而使实验更具科学性。实验大鼠在经过 9 周的高脂饲养后给予 3 周慢性刺激后的行为与血管性抑郁患者的抑郁临床表现有相关性。血管性抑郁的确切发病机制比较复杂,脑内神经递质受体 5-HT_{1A}R, D₂R, α_{2A}R 等的过度表达是目前普遍认可的血管性抑郁发病机制之一^[5-8]。该假说认为血管性抑郁与中枢神经突触所释放的神经递质受体 5-HT_{1A}R, D₂R, α_{2A}R 等的改变有关。另有研究发现,携带 ApoE4 这一基因型患者深部白质高信号与抑郁症状之间的相关性更强,而且其抑郁症状较未携带者更为严重^[9]。

前期临床研究显示舒郁胶囊治疗血管性抑郁患者具有良好的临床疗效。血管性抑郁属中医学“郁证”范畴,其属形神失调疾病,形神失调则五脏功能失调、气血紊乱而诱发郁证疾病;情志不遂是郁证主要发病因素;五脏气机失调是郁证的基本病机;郁病之害多虚实夹杂,初在气机失调,再由气及血,气血不畅,进而导致湿、痰、热、食相因或相兼为病。根据传统的中医学辨证论治理论和临床实践,笔者提出血管性抑郁的发生是以脾胃不足为本,肝气郁滞、痰瘀互结为标,脏腑功能紊乱所致。在此基础上拟定经验中药复方舒郁胶囊(由柴胡、郁金、法半夏、黄芪、茯苓、白术、陈皮、合欢皮、川芎、地龙等药物组成),现代药理学研究表明^[10-11],柴胡皂苷可以抑制胆碱酯酶,发挥拟胆碱样作用;郁金可缩短小鼠强迫游泳、悬尾不动时间。方中黄芪、茯苓、白术等亦有不同程度的抗抑郁作用。

本实验观察到,模型组大鼠脑内的 5-HT_{1A}R、D₂R、α_{2A}R 受体和 Apo E₄ 的含量表达显著增加 ($P < 0.01$);舒郁胶囊低、中、高剂量组和氟西汀组与模型组比均能降低大鼠脑内 5-HT_{1A}R、D₂R、α_{2A}R 受体及降低 Apo E₄ 含量 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),但舒郁胶囊 3 个剂量组和氟西汀组之间 5-HT_{1A}R、D₂R、α_{2A}R 受体及 Apo E₄ 含量比较无明显差异。表明舒郁胶囊对血管性抑郁模型大鼠脑内的 5-HT_{1A}R、D₂R、α_{2A}R 受体及 ApoE₄ 具有调节作用,可能与其抗抑郁作用的机制有关。舒郁胶囊低剂量组、舒郁胶囊中剂量组、舒郁胶囊高剂量组从临床效价相比而言,3 个剂量组治疗作用相当,但低剂量组长期服用应当对肝肾毒性作用最小,且对患者经济负担最轻,从临床实际运用情况而言应该最具有优势。同时本研究也显示舒郁胶囊具有同氟西汀一样的抗抑郁作用,值得临床推广使用。

本研究初步表明:提示舒郁胶囊可能具有抗血管性抑郁作用,其作用机制可能与降低大鼠脑内 5-HT_{1A}R、D₂R、α_{2A}R 及 ApoE₄ 表达有关。

[参考文献]

- [1] 李乐军,邵凤扬,肖辉,等.舒郁胶囊治疗血管性抑郁患者随机双盲对照临床研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(5):220.
- [2] 潘菊华,王彦云,黄世敬,等.血管性抑郁大鼠模型的建立[J].首都医科大学学报,2007,28(6):760.
- [3] 侯秀娟.从单胺递质及其受体探讨颞颥解郁方对脑卒中后抑郁干预机理的研究[D].北京:北京中医药大学,2005
- [4] 李静,宋景贵,穆俊林,等.脑卒中后抑郁症患者载脂蛋白 E 水平检测[J].郑州大学学报,2011,46(3):401.
- [5] Szewczyk B, Albert P R, Rogaeva A. Decreased expression of Freud-1/CC2D1A, a transcriptional repressor of the 5-HT1A receptor, in the prefrontal cortex of subjects with major depression [J]. Int J Neuropsychopharmacol,2010,13(8):1089.
- [6] Gian M L,Vincenzo M, Filippo D. Increased sensitivity to antidepressants of D3 dopamine receptor-deficient mice in the forced swim test (FST) [J]. Eur Neuropsychopharmacol,2008,18(4):271.
- [7] Invernizzi R W, Garattini S. Role of presynaptic alpha2-adrenoceptors in antidepressant action: recent findings from microdialysis studies [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2004, 28(5):819.
- [8] McCarron M O, DeLong D, Alberts M J. APOE genotype as a risk factor for ischemic cerebrovascular disease: a meta-analysis [J]. Neurology, 1999, 53(6):1308.
- [9] Nebes R, Vora D. Relationship of deep white matter hyperintensities and apolipoprotein E genotype to depressive symptoms in older adults without clinical depression [J]. Am Psychiatric Assoc,2001,158(6):878.
- [10] 张静艳,张晓杰.柴胡皂苷对抑郁模型大鼠海马乙酰胆碱代谢及组织形态学影响的实验研究[J].黑龙江中医药大学学报,2011,32(4):506.
- [11] 韩珍,贺弋,杨艳.郁金抗抑郁作用的实验研究[J].宁夏医学院学报,2008,30(6):275.

[责任编辑 聂淑琴]