

疏肝和胃汤对抑郁模型大鼠延髓、脊髓及胃黏膜组织降钙素基因相关肽表达的影响

刘松林^{*}, 岳滢滢, 邢颖, 李明珠, 李家庚, 樊讯
(湖北中医药大学 中医临床学院, 武汉 430065)

[摘要] **目的:**观察疏肝和胃汤对抑郁模型大鼠延髓、脊髓及胃黏膜组织降钙素基因相关肽(CGRP)表达的影响,揭示疏肝和胃汤改善抑郁状态及胃肠功能的作用机制。**方法:**100只SPF级Wistar大鼠,雌雄各半,随机分成正常组、模型组、氟西汀组及疏肝和胃汤高、低剂量组。采用慢性不可预测温和应激加孤养法制作抑郁模型,共计造模4周。在第3周,氟西汀组及疏肝和胃汤高、低剂量组分别予以 $0.36\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $20,10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给药,正常组及模型组给予等体积生理盐水,每天分2次灌胃。在第4周结束后,使用内固定法取大鼠延髓迷走神经背核部位的脑、胸髓(T6-T8,根据脊神经定位)及胃黏膜组织,应用免疫组织化学技术检测上述部位CGRP的表达。**结果:**模型组大鼠延髓、脊髓中CGRP含量明显上升,胃黏膜CGRP含量明显上升,与正常组比较有非常显著性差异($P < 0.01$);治疗2周后,疏肝和胃汤高、低剂量组和氟西汀组大鼠延髓、脊髓组织中CGRP含量显著下降,胃黏膜CGRP含量明显减少,接近恢复至生理水平,与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$);其中,疏肝和胃汤高剂量组与氟西汀组延髓、脊髓中CGRP含量比较无显著性差异,但胃黏膜中CGRP含量与氟西汀组相比,有显著性差异($P < 0.05$)。**结论:**疏肝和胃汤通过降低延髓、脊髓及胃黏膜中CGRP的表达,调节“延髓-脊髓-胃”脑肠轴通路中CGRP的含量,可能是其改善抑郁状态与胃肠功能的作用机制之一。

[关键词] 抑郁症; 延髓; 脊髓; 胃黏膜; 疏肝和胃汤; 降钙素基因相关肽

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)24-0172-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014240172

Effect of Shugan Hewei Decoction on Expression of CGRP, of Medulla Oblongata, Spinal Cord and Gastric Mucosa in Depression Model Rats

LIU Song-lin^{*}, YUE Ying-ying, XING Ying, LI Ming-zhu, LI Jia-geng, FAN Xun

(Clinical College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Hubei University of TCM, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Shugan Hewei decoction (SHD) on the expression of calcitonin gene related protein (CGRP) of medulla oblongata, spinal cord and gastric mucosa in depression model rats. **Method:** Totally 100 SPF Wistar rats (half male and female) were randomized into the normal group, model group, fluoxetine $0.36\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group and the high and low dosage groups of SHD, with 20 in each group. The depression model was established with chronic unpredictable mild stress (CUMS) and separation for 4 weeks. The 3rd week after modeling each treatment group was given corresponding medicines. Fluoxetine group and high, low dosage ($20, 10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) of SHD group and were given for fourteen days. At the end of the fourth week, the internal fixation method was used to collect medulla oblongata vagus nerve nucleus tissue, spinal cord tissue (T6-T8) and gastric mucosa tissue. The method of immunohistochemistry (IHC) was used to detect the expression of CGRP in the above organizations. **Result:** Comparing with the normal group, the content of CGRP increased significantly in medulla oblongata, spinal cord and gastric mucosa of model rats ($P < 0.01$). Compared with the

[收稿日期] 20140623(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072720);教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-11-0963)

[通讯作者] *刘松林,博士,教授,从事经方防治消化及心血管疾病的临床基础研究, Tel:027-68890036, E-mail: newforest@163.com

model group, the content of CGRP reduced significantly in medulla oblongata, spinal cord and gastric mucosa of high, low dosage of SHD group and fluoxetine group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In addition, the effect of high dosage of SHD was equal to fluoxetine group in medulla oblongata and spinal cord, while the former was better than the later in gastric mucosa ($P < 0.05$). **Conclusion:** SHD has regulation effects on the expression of CGRP in the signal path of brain-gut axis 'medulla oblongata-spinal cord-gastric mucosa', which may be part of the mechanism for relieving depression and improving gastrointestinal function.

[Key words] depression; medulla oblongata; spinal cord; gastric mucosa; Shugan Hewei decoction; calcitonin gene related protein

前期研究表明,慢性不可预知温和应激加孤养法可成功建立抑郁动物模型,并表现出肝气郁结的病理变化,而疏肝和胃汤能调节抑郁大鼠胃肠激素^[1-3],具有较好的促进胃肠动力的作用^[4]。降钙素基因相关肽(calcitonin gene related protein, CGRP)是含有37个氨基酸的脑肠肽,广泛分布于中枢、外周神经系统和胃肠组织^[5],可抑制胃酸分泌和胃肠运动^[6-7],亦可通过其相应受体参与内脏高敏感性和心理情绪障碍的形成^[8]。相关动物实验表明,抑郁模型内脏高敏感大鼠脑干CGRP含量显著上升^[9]。临床研究显示,CGRP阳性纤维在抑郁症患者脑积液中含量增高^[10]。亦有实验证实,肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)模型组中CGRP在丘脑、脊髓、结肠组织中的表达较正常组明显增强,提示CGRP在脑肠轴各个层面的表达与IBS密切相关^[11]。本研究应用免疫组织化学方法观察疏肝和胃汤对抑郁模型大鼠延髓、脊髓及胃黏膜组织CGRP表达的影响,拟从“中枢-外周”脑肠轴途径部分揭示疏肝和胃汤改善抑郁状态及胃肠功能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级Wistar大鼠100只,体重160~200 g,雌雄各半,购自湖北省实验动物研究中心,合格证号SCXK(鄂)2008-0005。饲养于湖北中医药大学实验动物中心,SPF级大鼠实验室,屏障环境,日常饮用超纯水。大鼠全价营养颗粒饲料,由湖北中医药大学实验动物中心提供。

1.2 药物 疏肝和胃汤(组成:柴胡10 g,炒枳实10 g,白芍10 g,郁金10 g,广木香10 g,砂仁10 g,焦白术15 g,黄连6 g,吴茱萸6 g,炙甘草6 g等),购自湖北省中医院凤凰门诊部。药物制备方法:先提取挥发油,另存;然后用水煮醇沉法,将药物连续煎煮3次,滤液经初步浓缩后醇沉,静置,过滤,再回收乙醇,水浴浓缩滤液至200%的浓度;取挥发油、药液及少量聚山梨酯共同研磨,分别用蒸馏水配制质

量浓度为1,2 g·mL⁻¹的药液,分装、灭菌,贮存于4℃冰箱内备用。氟西汀(礼来苏州制药有限公司,批号2709A),用0.9%生理盐水配置成0.09 g·L⁻¹的混悬液。

1.3 试剂与仪器 兔抗CGRP抗体(美国Santa Cruz公司,批号sc-28920),SP系列试剂盒(英国Abcam公司)。BX-60型Olympus光学显微镜,Nikonti-SR倒置荧光显微镜,Nikondi-U3显微镜数字成像系统(均为日本尼康公司),Mp10001电子天平(上海恒平仪器厂),Image-Pro Plus v6.0图像处理软件。

2 方法

2.1 分组及造模 按照随机分组方法将100只大鼠分为5组:正常组、模型组、氟西汀组、疏肝和胃汤高、低剂量组,每组20只。正常组自然饲养,其余各组参照文献报道^[13],运用慢性不可预知温和应激加孤养法制作抑郁模型,造模时间共计4周(28 d)。至第14天,造模各组大鼠出现毛发凌乱、警惕性高,喜欢铁笼壁,大便稀软,刺激时反抗次数减少,进食、进水量及体重降低,与文献报道^[13]一致,提示造模成功。

2.2 给药方法 疏肝和胃汤高、低剂量组按,按每天成人用药等效剂量^[12]的2倍、1倍给药,即按20,10 g·kg⁻¹体重给药;氟西汀组按0.36 mg·kg⁻¹给药;正常组及模型组给予等体积生理盐水。各组每天2次ig,连续14 d。

2.3 标本取材 在第4周结束时,各组大鼠给药2 h后取材。具体方法:将实验大鼠称重后按2 mL·kg⁻¹ip 10%水合氯醛麻醉,麻醉成功后行4%多聚甲醛主动脉灌注固定取延髓、脊髓及胃组织。将大鼠仰卧位固定于手术台上,于剑突下开胸,暴露心脏,将带有输液装置的,尖端轻微磨圆的穿刺针直视下穿入左心室,然后小心插入升主动脉,在右心耳剪开一个小口用来放血,先用150 mL 4℃生理盐水快速灌注以排出血液,继之应用4℃4%多聚

甲醛 PBS 溶液 (pH 7.4) 约 100 mL 快速灌注固定, 之后稍减慢多聚甲醛灌注速度, 继续固定 15 min。在 4% 多聚甲醛的主动脉灌注固定过程中, 可见大鼠全身肌肉颤动并尾部抽动, 后逐渐僵硬。固定完成后开颅取出延髓迷走神经背核部位的脑组织, 开腹取出胸髓 (T6-T8, 根据脊神经定位) 组织, 在距幽门约 1 cm 处取 2~3 块胃黏膜组织。上述标本放入 4 °C 4% 多聚甲醛中后固定 24 h。修块, 流水冲洗 1 h, 移至自动脱水机脱水至蜡 (总程序共 17 h), 行石蜡包埋, 制成蜡块。在切片机上做延髓迷走神经背核部及胸髓连续横断切片, 胃黏膜连续横断面切片, 切片厚度 4 μm, 备用。

2.4 病理样品处理 CGRP 免疫组化检测: 石蜡切片常规脱蜡至水, 按免疫组化 SP 试剂盒说明书操作: ①枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0) 微波抗原修复 3 min, PBS 洗涤 5 min, 3 次; ②3% H₂O₂ 去离子水孵育 10 min, 以消除内源性过氧化物酶活性; ③PBS 冲洗, 3 min, 5 次; ④滴加试剂 A 室温孵育 15 min, 倾去, 勿洗; ⑤滴加 1:1 000 的兔抗 CGRP 抗体 4 °C 孵育 24 h, 4 °C 过夜, PBS 冲洗 3 min, 5 次; ⑥滴加试剂 B 室温孵育 20 min, PBS 冲洗 3 min, 5 次; ⑦滴加试剂 C 室温孵育 15 min, PBS 冲洗 3 min, 5 次; ⑧DAB 显色 5 min 后自来水冲洗返蓝; ⑨梯度乙醇脱水, 二甲苯透明后, 用中性树胶封片。

2.5 检测延髓、脊髓及胃黏膜中 CGRP 的阳性表达

用光学显微镜 (10 × 40 倍) 观察延髓、脊髓及胃黏膜中 CGRP 的阳性表达, 每例组织观察 3 张切片。上述组织中 CGRP 阳性表达呈棕黄色, 其中深棕黄色为强阳性、黄色为中等阳性、浅黄色为阳性; 着色与背景色相同为阴性。用计算机图像分析系统, 在每张切片同一结构位置随机挑选 5 个视野 (10 × 40 倍), 计算随机视野组织中 CGRP 阳性表达的平均累积吸光度 (IA)。IA 是 Image-Pro Plus v6.0 图像处理软件中 area (阳性面积) 与 density (阳性颜色深浅) 两者的乘积, 是反应阳性表达面积与深浅的综合指标, 即 IA 是没有单位的相对数值。IA 代表 CGRP 含量的多少, 值越大, 表示 CGRP 的含量越多。

2.6 统计学处理 用 SPSS 12.0 统计软件进行统计, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 组间用 *q* 检验, *P* < 0.05 为有显著性差异。

3 结果

模型组大鼠延髓、脊髓中 CGRP 含量明显上升, 胃黏膜 CGRP 含量明显上升, 与正常组比较有非常显著性差异 (*P* < 0.01); 治疗 2 周后, 疏肝和胃汤高、低剂量组和氟西汀组大鼠延髓、脊髓组织中 CGRP 含量显著下降, 胃黏膜 CGRP 含量明显减少, 接近恢复至生理水平, 与模型组比较有显著性差异 (*P* < 0.05, *P* < 0.01)。表明疏肝和胃汤可不同程度地降低抑郁模型大鼠延髓、脊髓中 CGRP 的含量, 其作用与氟西汀相似。见表 1。

表 1 疏肝和胃汤对抑郁大鼠延髓、脊髓及胃黏膜中 CGRP 表达累积吸光度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量 /g · kg ⁻¹	CGRP/IA		
		延髓	脊髓	胃黏膜
正常	-	4 118 ± 516 ²⁾	3 629 ± 711 ²⁾	12 255 ± 515 ²⁾
模型	-	9 137 ± 848	6 248 ± 678	22 292 ± 691
氟西汀	3.6 × 10 ⁻⁴	4 188 ± 588 ²⁾	4 737 ± 530 ²⁾	16 181 ± 319 ²⁾
疏肝和胃汤	20	4 379 ± 424 ²⁾	4 537 ± 402 ²⁾	14 917 ± 202 ^{2,3)}
	10	7 604 ± 354 ^{2,3)}	5 639 ± 413 ^{1,3)}	18 621 ± 342 ^{2,3)}

注: 与模型组比较 ¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01; 与氟西汀组比较 ³⁾ *P* < 0.05。

4 讨论

脑肠肽是一类同时存在于中枢神经系统和肠神经系统的多肽, 既可参与中枢神经系统的调节, 亦能调节胃肠道的感觉和运动^[14]。CGRP 作为一种重要的脑肠肽, 以脊髓背根神经节和三叉神经节内初级感觉神经元以及它们在脊髓和脑干的投射纤维中密度较高^[15]。研究表明, CGRP 在受到伤害性刺激时被释放, 引起脊髓背角伤害感受性神经元兴奋, 起着“伤害性递质”的作用^[16-17], 并通过调节脊髓初级

传入神经元 NK1R1 表达, 增加内脏敏感性^[18]。另有研究指出, 脊髓背角是初级伤害性传入神经末梢的主要集中部位, 作为脑肠轴的“中继站”, 是内脏敏感性调节的关键部位^[19]。

焦海霞^[20]等研究证实, 经电针治疗后, 慢性内脏痛模型大鼠胸腰段、腰骶段脊髓背角 CGRP 阳性表达显著减少, 认为电针降低慢性内脏痛敏反应的镇痛机制与脊髓背角内 CGRP 表达的减少有关。滕金艳^[21]等实验证实, 电针“百会”、“印堂”可明显降

低抑郁模型大鼠结肠黏膜中 CGRP 的含量,并改善抑郁症胃肠道躯体化症状,表明内脏痛敏反应,以及脑肠轴中兴奋性、抑制性递质的平衡与 CGRP 含量的下降有关。

本实验结果表明,经疏肝和胃汤高、低剂量和氟西汀治疗后,抑郁模型大鼠延髓、脊髓中 CGRP 阳性表达显著下降,胃黏膜 CGRP 阳性表达较模型组明显减少,接近恢复正常水平。由此可以推测,疏肝和胃汤可能通过减少脊髓中 CGRP 的合成和(或)释放,一方面减少中枢伤害性刺激的传入,下调延髓中 CGRP 的表达,减轻中枢过敏,缓解抑郁症状;另一方面,正反馈下调胃黏膜 CGRP 的表达,降低大鼠胃肠敏感性,提高内脏感觉阈值,使胃肠道神经系统受到的刺激减弱而发挥改善胃肠功能的作用。即疏肝和胃汤调节“延髓-脊髓-胃”脑肠轴通路中 CGRP 的表达变化,可能是其发挥抗抑郁和改善胃肠功能的作用机制之一。

[参考文献]

- [1] 邢颖. 抑郁模型大鼠行为学和胃肠激素变化及疏肝和胃汤干预作用的实验研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2012.
- [2] 刘松林,梅国强,赵映前,等. 疏肝和胃汤对功能性消化不良大鼠血中血管活性肠肽和生长抑素的影响[J]. 湖北中医学院学报,2008,10(4):15.
- [3] 刘松林,梅国强,赵映前,等. 疏肝和胃汤对功能性消化不良大鼠胃窦组织中 VIP 和 SS 的影响[J]. 中华中医药学刊,2009,27(6):1245.
- [4] 刘松林,梅国强,赵映前,等. 疏肝和胃汤对小鼠胃排空作用的影响[J]. 中药药理与临床,2004,20(1):36.
- [5] Friese N, Diop L, Chevalier E, et al. Involvement of prostaglandins and CGRP-dependent sensory afferents in peritoneal irritation-induced visceral pain [J]. *Regul Pept*, 1997,70(1):1.
- [6] 杨孝朴,魏彦明. 脾虚证模型大鼠血浆中 β -EP、CGRP、NPY 含量的变化[J]. 中国兽医学报,2006,26(1):85.
- [7] 章鹏宇,朱琳,王景杰. 小肠缺血性改变引起 HCN-1、SP 及 CGRP 表达变化的研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2013,22(2):144.
- [8] Aoki Y, Ohtori S, Takahashi K, et al. Expression and Co-Expression of VR1, CGRP, and IB4-binding glycoprotein in dorsal root ganglion neurons in rats: differences between the disc afferents and afferents [J]. *Spine*, 2005,30(13):1496.
- [9] 吕宾,蒋霞,丁瑞峰,等. 内脏高敏感大鼠脑干降钙素基因相关肽、c-fos 基因表达的研究[J]. 胃肠病学,2007,12(11):681.
- [10] Mathe A, Agren H, Wallin A, et al. Calcitonin gene-related peptide and calcitonin in the CSF of patients with dementia and depression: possible disease markers [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2002,5(26):41.
- [11] 朱雪萍,陈卫昌,朱晓黎,等. 脑肠肽、脑肠轴在肠易激综合征模型中作用机制研究[J]. 临床儿科杂志,2008,26(3):236.
- [12] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1991:1136.
- [13] Willner P, Towell A, Sampson D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. *Psychopharmacology*, 1987,93(3):358.
- [14] Wood J D, Grundy D. Little brain-big brain V [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 1998,10:377.
- [15] Robinson D R, Mc Naughton P A, Evans M L, et al. Characterization of the primary spinal afferent innervations of the mouse colon using retrograde labeling [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2004,16(1):113.
- [16] 徐纪伟,孙丹华. NEP1-40 治疗增加大鼠脊髓损伤引起的降钙素基因相关肽 CGRP 的表达[J]. 免疫学杂志,2013,29(8):654.
- [17] 徐纪伟,孙丹华. 姜黄素对大鼠脊髓损伤后降钙素基因相关肽表达的影响[J]. 中国修复重建外科杂志,2013,27(10):1225.
- [18] Seybold V S, Mc Carson K E, Mermelstein P G, et al. Calcitonin gene-related peptide regulates expression of neurokinin 1 receptors by rat spinal neurons [J]. *J Neurosci*, 2003,23(5):1816.
- [19] Marchands S. The physiology of pain mechanisms: from the periphery to the brain [J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2008,34(2):285.
- [20] 焦海霞,刘庆,陈瑜,等. 电针对慢性内脏痛大鼠脊髓背角降钙素基因相关肽的影响[J]. 神经解剖学杂志,2010,26(6):594.
- [21] 滕金艳,李志刚,白妍,等. 不同电针对抑郁模型大鼠结肠黏膜脑肠肽 GAS、NPY、CGRP 含量的影响[J]. 世界中西医结合杂志,2013,8(3):226.

[责任编辑 聂淑琴]