

舒郁宁心方对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及海马 BDNF, TrkB 表达的影响

杨焕新^{1,2}, 李磊², 于艳红¹

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 齐鲁工业大学, 济南 250353)

[摘要] **目的:**分析中药舒郁宁心方对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及海马脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), 酪氨酸激酶 B (tyrosine kinase B, TrkB) 表达的影响。**方法:**选取 60 只雄性 SD 大鼠, 随机分为正常组、模型组、西药组 (氟西汀)、舒郁宁心方低、中、高剂量组, 每组各 10 只, 除正常组外, 均建立为期 21 d 的慢性应激抑郁模型。建模 2 周后起, 进行为期 21 d 的给药。其中正常组不给药, 模型组 *ig* 生理盐水, 西药组 *ig* 氟西汀药液 12 mg·kg⁻¹, 中药低、中、高剂量组分别 *ig* 舒郁宁心方药液 2.5, 7.5, 25.0 g·kg⁻¹。对比各组大鼠在第 1 天 (造模前) 和第 56 天 (给药结束后) 的体重、糖水摄入量、水平运动格数、垂直运动次数。对比实验结束后各组大鼠海马组织中 BDNF 和 TrkB 的表达水平。**结果:**第 56 天与正常组比较, 模型组的体重、糖水摄入量、水平运动格数、垂直运动次数及 CA1 区和 CA3 区的 BDNF 和 TrkB 阳性表达的积分吸光度 (IA) 显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 氟西汀组和舒郁宁心方各剂量组上述指标显著升高 ($P < 0.05$)。**结论:**舒郁宁心方可以改变海马组织中的 BDNF 和 TrkB 表达水平, 进而起到一定的抗抑郁疗效。

[关键词] 舒郁宁心方; 抑郁; 脑源性神经营养因子; 酪氨酸激酶 B

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)19-0084-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015190084

Effects of Shuyu Ningxin Recipe on Praxiology and Expressions of Hippocampal BDNF and TrkB of Model Rats with Chronic Stress-induced Depression YANG Huan-xin^{1,2}, LI Lei², YU Yan-hong¹ (1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China; 2. Qilu University of Technology, Ji'nan 250353, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the effects of traditional Chinese medicine Shuyu Ningxin recipe on the praxiology and the expressions of hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its tyrosine kinase B (TrkB) expression in rats with chronic stress-induced depression. **Method:** Sixty male SD rats were randomly divided into normal control group, model group, western medicine group (fluoxetine), as well as Shuyu Ningxin recipe low dose group, middle dose group and high-dose group (2.5, 7.5, 25.0 g·kg⁻¹ respectively), with 10 models in each group. All other groups except normal control group were subjected to establish chronic stress-induced depression model for a period of 21 days. Starting from two weeks after modeling, the medicine was given for 21 days except those in the normal control group. Rats in model group was administered with normal saline; rats in western medicine group received 12 mg·kg⁻¹ fluoxetine orally; rats in Shuyu Ningxin recipe low dose group, middle dose group and high-dose group orally received 2.5, 7.5, 25.0 g·kg⁻¹ respectively. Body weight in rats on day 1 (before modeling) and 56 days (after the administration), sugar intake, the horizontal movement level and vertical movement times were compared. After the end of the experiment, the expression levels of hippocampal BDNF and TrkB were compared between various groups. **Result:** On day 56, the body weight of the rats, sugar intake, horizontal movement level, vertical movement times, BDNF and TrkB integral absorbance (IA) values in CA1 and CA3 were significantly lower than those in normal group ($P < 0.05$); compared with

[收稿日期] 20150204(011)

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(81102738)

[第一作者] 杨焕新, 在读博士, 主治医师, 从事肝藏象生理病理与情志致病机制研究, Tel: 0531-89628079, E-mail: yanghuanxinlx@163.com

model group, the above indicators in western medicine group and Shuyu Ningxin recipe group were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Shuyu Ningxin recipe can change the expression levels of BDNF and TrkB in hippocampal tissues and thus play a role in antidepressant therapy.

[**Key words**] Shuyu Ningxin recipe; depression; brain-derived neurotrophic factor; tyrosine kinase B

抑郁症是一种以持续性情绪低落、精神萎靡不振、丧失生活兴趣为症状表现的情感性精神障碍^[1],在女性死亡和残疾致病因素中位居首位,人群中的发生率约为 11.3%,到 2020 年,精神疾病负担将成为仅次于缺血性心脏病的对人类健康产生极大威胁的第二大原因。近年来研究发现海马等脑区细胞源性神经营养因子(BDNF)及其受体 TrkB 表达降低和神经元受损可能是导致抑郁症发病的主要原因^[3]。中药舒郁宁心方是治疗抑郁症的有效方剂,本文研究舒郁宁心方对抑郁症模型大鼠行为及对 BDNF 及其受体 TrkB 蛋白表达的影响,以期对中药治疗抑郁症的疗效和作用机制提供依据。

1 材料

1.1 动物 选取 60 只健康雄性 SPF 级 SD 大鼠,体重为 190~210 g,月龄 3 个月,由维通利华动物实验中心提供,合格证号 SCXK(京)2002-0003。所有大鼠均在 22℃,50% 湿度, < 60 dB 噪声环境下饲养。

1.2 药物 舒郁宁心方所有药材均由我院药剂科统一采购,该方剂由栀子、柴胡、茯苓、远志、石菖蒲、合欢花和五味子各 10 g,郁金和酸枣仁各 15 g,薄荷和麻黄各 6 g 组成。浸泡、煎煮、过滤、恒温水浴(80℃)浓缩后,浓缩药液含生药量 5 g·mL⁻¹,置入 4℃ 冰箱备用。西药氟西汀片(礼来苏州制药有限公司生产,国药准字 2006017),配置为 2 g·L⁻¹药液,置入 4℃ 冰箱备用。

1.3 试剂 BDNF 抗体(北京博奥生物技术有限公司,批号 20131204),TrkB 抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号 20140118),GK500705 二抗染色试剂盒[En Vision Detection Kit 基因科技(上海)有限公司,批号 20131019],PBS 缓冲液(批号 20140110),柠檬酸盐缓冲盐(批号 20140112),无水乙醇(批号 20140225),甲醛(批号 20140128),二甲苯(批号 20130617),正丁醇(批号 20130829)和乙酸乙酯(批号 20130914),均为天津市大茂化学试剂厂。

1.4 仪器 LEICA ASP300 型全自动真空脱水机(德国 LEICA 公司),LEICA RM2135 型石蜡切片机(德国 LEICA 公司),LEICA EG1140H 型组织包埋机(德国 LEICA 公司),LEICA HI1210 型展片机(德

国 LEICA 公司),Motic B5 型光学显微镜(英国 Thermo 公司),Open Field Test 旷场实验箱系统(畅金源)。

2 方法

2.1 动物模型制备 随机分为对照组、模型组、西药氟西汀组、舒郁宁心方低、中、高剂量中药组,每组 10 只,除对照组 10 只大鼠饲养于同一笼中,其余各组每只大鼠单独笼饲养,连续接受 21 d 应激^[2],包括电击足底、冰水游泳、热应激、摇晃、夹尾、禁水、食 24 h 和昼夜颠倒等,每天随机选择一种方式。21 d 刺激结束后 2 周,西药组大鼠按照 12 mg·kg⁻¹·d⁻¹剂量 *ig* 氟西汀片,舒郁宁心方低、中、高剂量组大鼠分别按照 2.5,7.5,25.0 g·kg⁻¹ 体重 *ig* 中药浓缩液,对照组 *ig* 生理盐水,各组大鼠药物干预时间为 3 周^[2]。

2.2 体重变化、糖水摄入量测定 在第 1 天(实验开始时)和第 56 天(刺激和药物干预结束时),称量计算各组大鼠的平均体重;各组大鼠禁食禁水 10 h 后,给予 1% 糖水,1 h 后取瓶称重,计算糖水消耗量。

2.3 水平、垂直运动情况 在第 1 天和第 56 天进行敞箱实验,观察各组大鼠 3 min 内穿越方格数、前肢直立次数,实验时保持环境安静,每只大鼠测定 3 min,各组取 10 只大鼠实验均值。

2.4 BDNF 和 TrkB 的检测 各组大鼠分别在第 56 天取海马、大脑皮层、下丘脑,10% 低聚甲醛固定 48 h 以上。以松果体为标志,向头侧横向切取 3 段,每段厚 2 mm。石蜡包埋,连续切片,片厚 10 μm,取 3 套切片,分别用于 HE 染色,BDNF,TrkB 免疫组织化学染色,按照 BDNF,TrkB 免疫组化试剂盒操作方式进行实验。采用 Image-Proplus 5.1 图像分析系统分析图片,测定 BDNF 及 TrkB 细胞阳性表达数目及积分吸光度 *IA*。

2.5 统计学方法 各组资料采用 SPSS 19.0 软件进行分析,定量指标采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行多组间数据比较,方差齐,采用 *t* 检验进行两组间数据比较; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠体重、糖水摄入量比较 各组大鼠

糖水摄入量对比,见表 1。各组大鼠第 1 天的体重和糖水摄入量无统计学差异;第 56 天模型组的体重和糖水摄入量显著低于正常组,氟西汀组和舒郁宁心方各组的体重和糖水摄入量显著高于模型组。

表 1 舒郁宁心方对慢性应激抑郁模型大鼠糖水摄入量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Shuyu Ningxin recipe on sugar intake in rat model of chronic stress depression ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	第 56 天糖水摄入量/mL
正常	-	80.0 \pm 5.8 ³⁾
模型	-	42.5 \pm 6.1 ¹⁾
氟西汀	12.0 \times 10 ⁻³	56.4 \pm 6.0 ²⁾
舒郁宁心方	2.5	61.0 \pm 5.8 ²⁾
	7.5	59.8 \pm 6.0 ²⁾
	25.0	61.4 \pm 6.1 ²⁾

注:和正常组相比¹⁾ $P < 0.01$;和模型组相比²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.2 对慢性应激抑郁模型大鼠行为学的影响 各组大鼠活动情况对比,见表 2。各组大鼠第 1 天的水平运动格数、垂直运动次数无统计学差异;第 56

天模型组的水平运动格数、垂直运动次数显著低于正常组;氟西汀组和舒郁宁心方组的水平运动格数、垂直运动次数显著高于模型组($P < 0.05$)。

表 2 舒郁宁心方对慢性应激抑郁模型大鼠第 56 天活动情况的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Shuyu Ningxin recipe on activities at day 56 in model rat with chronic stress depression ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	水平运动数/格	垂直运动数/次
正常	-	39 \pm 6 ³⁾	21 \pm 7 ³⁾
模型	-	16 \pm 6 ¹⁾	11 \pm 5 ¹⁾
氟西汀	12.0 \times 10 ⁻³	21 \pm 6 ²⁾	15 \pm 6 ²⁾
舒郁宁心方	2.5	28 \pm 6 ²⁾	18 \pm 6 ²⁾
	7.5	27 \pm 6 ²⁾	19 \pm 6 ²⁾
	25.0	29 \pm 6 ²⁾	19 \pm 6 ²⁾

3.3 对大鼠海马 BDNF 和 TrkB 阳性表达的影响 各组大鼠海马 BDNF 和 TrkB 阳性表达 IA 比较,见表 3。模型组 CA1 区和 CA3 区的 BDNF 和 TrkB IA 显著低于正常组,氟西汀和舒郁宁心方低、中、高剂量组的 CA1 区和 CA3 区的 BDNF 和 TrkB IA 显著高于模型组。

表 3 舒郁宁心方对慢性应激抑郁模型大鼠海马 BDNF 和 TrkB 阳性表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Shuyu Ningxin recipe on hippocampal BDNF and TrkB expression in rat model of chronic stress depression ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	BDNF 阳性细胞(IA)		TrkB 阳性细胞(IA)	
		CA1 区	CA3 区	CA1 区	CA3 区
正常	-	375 \pm 46 ³⁾	414 \pm 41 ³⁾	378 \pm 6 ³⁾	404 \pm 49 ³⁾
模型	-	244 \pm 33 ¹⁾	210 \pm 32 ¹⁾	231 \pm 7 ¹⁾	266 \pm 43 ¹⁾
氟西汀	12.0 \times 10 ⁻³	298 \pm 35 ²⁾	308 \pm 35 ²⁾	279 \pm 8 ²⁾	354 \pm 58 ²⁾
舒郁宁心方	2.5	354 \pm 40 ²⁾	356 \pm 36 ²⁾	327 \pm 7 ²⁾	387 \pm 55 ³⁾
	7.5	349 \pm 36 ²⁾	347 \pm 31 ²⁾	332 \pm 8 ²⁾	384 \pm 51 ³⁾
	25.0	340 \pm 37 ²⁾	350 \pm 38 ²⁾	323 \pm 7 ²⁾	380 \pm 50 ³⁾

4 讨论

抑郁症在中医学中属于郁病范畴,与“百合病”、“郁证”等病的证候相似。中医藏相理论认为“心者,君主之官也,神明出焉”,心为精神之所舍,主宰七情五志,调节意识活动,心藏神之功能失调,则意志淡漠、思维迟缓;而肝主疏泄,调节气机与情志,喜条达而恶抑郁,功能不及则气结于胸,郁结不畅,“心肝失调”则气血失和,结聚而不得发越,郁病始生。七情内伤所致气机变化会导致心情抑郁、情绪不稳、胸胁胀痛等一系列精神和躯体症状^[4],人身诸病,多生于郁,抑郁一证病根在于心、肝二脏,

“木郁达之”,“郁病皆因气不周流,法当顺气为先”,因此治疗以疏肝安神为基本大法^[5]。舒郁宁心方方中郁金性寒味苦、辛,入气分能行气解郁,入血分以凉血破瘀,为疏肝解郁、理气活血之要药,酸枣仁养心、益肝、安神,主治惊悸怔忡,神明失守,炒后得温以助心神,又取香温以温肝、胆促五脏安和,二者共为君药;柴胡疏肝解郁,升阳举陷与枣仁共为臣药^[6-7];茯苓健脾和中、宁心安神,甘淡渗湿,化解气机阻滞产生的水湿痰饮;合欢花性甘平,归心肝经,能安神解郁,活血消肿,五味子味酸入肝,性温而不热不燥,能宁心安神、生津敛肺,以上 3 味共为佐药。

全方升降并用、收散合理^[8]。诸药合用,共奏疏肝气、宁心神、解郁结之功效,对抑郁症心肝失调型的病人进行治疗取得较好的疗效。

动物模型主要模拟了人类抑郁的核心症状,其中食欲不振、体重减轻是抑郁症典型躯体症状;糖水摄入量与消耗量和活动量密切相关;水平运动格数可以反映大鼠在面临陌生环境时兴奋性的高低。BDNF是神经元细胞增殖、分化和存活所必需的因子,主要分布海马、皮质等脑区;TrkB是BDNF的高亲和性受体,作用为介导BDNF信号传导,BDNF与TrkB结合后起到对神经元保护、促进再生功能^[9],本研究选择糖摄入量等行为学变化的指标及海马组织BDNF与TrkB阳性表达评价舒郁宁心方抗抑郁的药效^[10]。研究结果显示:模型组大鼠与对照组相比出现体重减轻等类似于抑郁症状的行为学改变,CA1区和CA3区的BDNF和TrkB IA显著降低;中药组大鼠抑郁症行为比模型组显著减轻,海马组织BDNF与TrkB阳性表达增加且呈现剂量依赖性,对改善大鼠抑郁症行为和增加海马组织BDNF与TrkB阳性表达方面效果显著优于西药组,说明舒郁宁心方能够有效缓解抑郁症状,其作用机制可能与增加抑郁模型大鼠脑区海马组织BDNF与TrkB阳性表达有关。

综上所述,中药舒郁宁心方具有显著的抗抑郁功效,能够有效改善抑郁症大鼠模型的精神和躯体症状,组织学实验结果显示药物可以明显提高患病大鼠脑区海马BDNF及TrkB的表达,提示舒郁宁心方可能通过该作用机制发挥治疗效果,从而达到抗抑郁的作用。

[参考文献]

- [1] 纪倩,李志刚,唐银杉,等.不同电针刺刺激对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及海马谷氨酸转运体的影响[J].针刺研究,2013,38(3):203-207,210.
- [2] 黄泉智.疏郁宁心汤抗抑郁作用的实验研究[D].北京:军医进修学院,2012.
- [3] 邓颖,张春虎,张海男,等.柴胡疏肝散及其拆方对抑郁模型大鼠行为及海马、杏仁核、额叶BDNF及其受体TrkB的影响[J].中国中西医结合杂志,2011,31(10):1373-1378.
- [4] 陈利平,王发渭,孙志高,等.舒郁散对慢性应激抑郁大鼠行为及海马BDNF表达的影响[J].中国中医急症,2012,21(7):1082-1083.
- [5] 王发渭,陈利平,骆敏.舒郁宁心法治疗抑郁症思路探析[J].中国中医药信息杂志,2011,18(3):99-100.
- [6] 张春虎,胡随瑜,李云辉,等.柴胡疏肝散对慢性应激抑郁模型小鼠行为与脑促肾上腺皮质激素释放激素基因表达的影响[J].中华行为医学与脑科学杂志,2011,20(6):485-487.
- [7] Szymanska M, Budziszewska B, Jaworska-Feil L, et al. The effect of antidepressant drugs on the HPA axis activity, glucocorticoid receptor level and FKBP51 concentration in prenatally stressed rats [J]. Psychoneuroendocrinology, 2009,34(6):822-832.
- [8] 孙志高,黄泉智,许成勇,等.舒郁宁心方对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及海马BDNF,TrkB表达的影响[J].中国中西医结合杂志,2013,33(3):370-375.
- [9] 樊蔚虹,姚建平,赵文景.柴胡疏肝散对卒中后抑郁大鼠海马组织Bcl-2,Bax蛋白表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(3):181-183.
- [10] 刘仁慧,郑君芳,袁颖,等.淫羊藿女贞子配伍调节哮喘大鼠NO/ET及HPA轴作用的研究[J].中国中药杂志,2010,35(12):1590-1593.

[责任编辑 聂淑琴]