

加味四逆散对青少年期应激模型大鼠行为学和HPA轴的影响

郭丽丽¹, 史亚飞^{2*}, 袁玉梅¹, 吴皓萌¹, 徐志伟²

(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 广州中医药大学基础医学院, 广州 510405)

[摘要] **目的:**观察加味四逆散对青少年期应激大鼠行为学、血浆促肾上腺皮质激素(ACTH)和血清皮质酮(CORT)浓度的影响。**方法:**32只SPF级雄性Wistar大鼠随机分为正常组,模型组,氟西汀组(0.01 g·kg⁻¹),加味四逆散组(16.9 g·kg⁻¹),采用慢性轻度不可预见性应激方法造模,造模同时ig给药28 d,每7 d称大鼠体重,检测糖水偏爱指数、旷场测试,采用放射免疫分析法检测大鼠血浆ACTH和血清CORT含量的改变。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠出现体重增长缓慢、糖水偏爱指数明显降低,血浆ACTH和血清CORT含量明显升高($P < 0.05$),而旷场测试大鼠的活跃度、总路程和平均速度均有所升高,中央区活动时间有所延长,但差异无统计学意义;与模型组比较,氟西汀组和加味四逆散组糖水偏爱指数明显升高($P < 0.05$),血浆ACTH和血清CORT含量明显降低($P < 0.05$),氟西汀组体重在第28天明显增加($P < 0.05$)。**结论:**加味四逆散可以有效改善青少年期应激大鼠行为学改变,下调其血浆ACTH和血清CORT含量,可能成为防治青少年期应激损伤的有效方法。

[关键词] 青少年期; 应激; 加味四逆散; 促肾上腺皮质激素; 皮质酮

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)24-0094-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015240094

Effect of Modified Sini San on Behavior and HPA Axis of Adolescent Rats Model with Stress GUO Li-li¹, SHI Ya-fei^{2*}, YUAN Yu-mei¹, WU Hao-meng¹, XU Zhi-wei² (1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. Basic Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of modified Sini San (MSNS) on the behavior and concentration of plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and serum corticosterone (CORT) in adolescent rats with stress. **Method:** The 32 male Wistar SPF rats were randomly divided into normal group, model group, fluoxetine group (0.01 g·kg⁻¹), MSNS group (16.9 g·kg⁻¹). The rats received 28 days chronic mild unexpected stimulation for modeling and intragastric administration. During the experiment, weighting, sucrose preference test and open field test were performed every 7 days. Plasma ACTH and CORT changes in rats were detected using radio immunoassay. **Result:** Compared with the normal group, the rats in model group showed a slow increase of body weight, decreased sucrose preference index, and significantly higher ACTH and CORT levels ($P < 0.05$), while in the open field test, the activity, total distance and average speed in rats were increased and the central activity time had been prolonged, but with no statistical difference. Compared with the model group, the sucrose preference index of fluoxetine group and MSNS group was significantly higher ($P < 0.05$), while ACTH and serum CORT levels were significantly lower ($P < 0.05$), and the body weight of rats in fluoxetine group was significantly increased on 28th day ($P < 0.05$). **Conclusion:** MSNS can effectively improve behavior changes of stressed adolescent rats, lower plasma ACTH and serum CORT levels, so it may be an effective method to prevent and treat adolescent stress injuries.

[Key words] adolescence; stress; modified Sini San; adrenocorticotrophic hormone; corticosterone

[收稿日期] 20141017(020)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573912);中国博士后基金项目(2014M562162);广东省自然科学基金项目(2015A030313356)

[第一作者] 郭丽丽,在读硕士,从事中医病因病机研究,Tel:13828497110,E-mail:guolili6vip@126.com

[通讯作者] *史亚飞,博士,研究员,从事中医肝藏象理论及其应用基础的研究,Tel:13798046294,E-mail:446750173@qq.com

最新研究显示,基于现代社会生活压力产生的成年后精神障碍不单纯是即刻应激产生的效应,而往往与青少期应激反应密切相关,且在青少年期应激状态下时神经内分泌系统即已发生改变,并迁延至成年^[1-2],由此提出开展抗应激损伤的机制与有效干预手段研究的作用节点有必要提前至青少期。中医药以现代心理应激反应为切入点模拟肝失疏泄情志内伤病理过程,以应激诱导的心身疾病(抑郁等)为基础病证结合开展调肝治法方药抗应激损伤的机制研究,已取得了一系列有效结果^[3],但是否对青少期应激模型大鼠行为学与神经内分泌系统产生影响尚不清楚。啮齿类动物青少年期大致在断乳后21~60 d。本研究采用慢性不可预计性应激模型制作青少期应激动物模型,观察其行为学和下丘脑-垂体-肾上腺皮质(HPA轴)的相关改变以及调肝方药加味四逆散对其的影响,旨在探究青少期应激在精神障碍类疾病发病过程中的重要作用及加味四逆散对青少期精神障碍类疾病的防治疗效。

1 材料

1.1 动物 25 d龄 SPF级雄性 Wistar 大鼠 32 只,体重为 49~72 g,由广州中医药大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(粤)2013-0034。普通级动物房饲养,实验室温度 22~28℃,明暗周期 12 h/12 h。

1.2 药物及试剂 加味四逆散(JWSNS)组成:柴胡 5 g,白芍 15 g,枳壳 6 g,枸杞子 15 g,山栀 5 g,地黄 18 g,石决明 30 g。药材由广州中医药大学第一附属医院药房提供,经广州中医药大学徐志伟教授鉴定,符合 2010 年版《中国药典》一部项下标准。将中药制成粗粉,首煎将中药粗粉置 8 倍温水中浸泡 0.5 h,沸腾后文火煎煮 4 h,注意均匀搅拌,取汁后经 3 层纱布过滤;第 2 次和第 3 次煎煮均分别以 6 倍水文火煎煮 2 h,同样方法取汁,合并 3 次药液,置水浴箱内浓缩至含生药 16.9 g·kg⁻¹(相当于 2 倍成人临床等效量),作为加味四逆散水煎剂供试验品。药液常温冷却后,4℃保存备用。盐酸氟西汀胶囊(法国 Patheon France 公司,分包装厂礼来苏州制药有限公司,生产批号 2090A,分包装批号 2090AA),ACTH 放射免疫分析试剂盒(北京北方生物技术研究提供,批号 20140520),CORT 放射免疫分析试剂盒(北京北方生物技术研究提供,批号 140750R)。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器 SN2695B 型放免测量仪(上海日环核仪器厂),AEG-220 型微量电子天平(日本岛津公

司),Nefuge 15R 型低速离心机(上海力申科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 分组及模型建立 首先将 32 只大鼠标记,称重,随机分为 4 组,分别为正常组、模型组、氟西汀组和加味四逆散组,每组大鼠 8 只。适应性饲养 1 周后开始造模。参照 Willner 等方法复制而成^[4]。大鼠随机接受 28 d 各种不同的应激源刺激,包括:束缚 3 h,45 度斜笼 7 h,湿笼 17 h(200 g 垫料倒 100 mL 水,使垫料湿透)、新入侵者(两笼并笼)23 h,持续光照 36 h,空瓶 1 h,禁食禁水 23 h。每日 2~3 种。正常组动物不接受上述任何刺激。从造模之日起各组于每日应激造模前 1 h 予相关药物或生理盐水 ig 处理。氟西汀组:予氟西汀 0.01 g·kg⁻¹ ig;加味四逆散组:予加味四逆散 16.9 g·kg⁻¹ ig;正常组和模型组:予等体积的 0.9% 生理盐水 ig,每日 1 次。各组每日 ig 1 次,连续 28 d。

2.2 糖水偏爱指数检测 将大鼠禁食禁水 23 h 后给予 1% 的蔗糖水和纯水进行测定,于 24 h 后称蔗糖水瓶和纯水水瓶的质量,记录水和糖水的摄入量,计算大鼠在 24 h 内蔗糖水的消耗量,并计算糖水偏爱指数。

$$\text{糖水偏爱指数} = \frac{\text{糖水消耗量}}{\text{糖水消耗量} + \text{纯水消耗量}} \times 100\%$$

于造模第 1,7,14,21,28 天分别测 1 次。

2.3 体重测定 实验期间,于造模第 1,7,14,21,28 天分别测定每只动物体重变化。

2.4 旷场实验 用 OPen-field 法进行测试。在造模第 28 天进行。旷场实验箱 100 cm × 100 cm × 60 cm,周壁底面为黑色。操作者握住大鼠尾根部 1/3 处,小心放入旷场正中格,用跟踪分析系统自动记录动物 4 min 的行为变化,包括活跃度、中央区活动时间、总路程、平均速度。每只大鼠每次测试 4 min。

2.5 取材及血浆促肾上腺皮质激素(ACTH)和血清皮质醇(CORT)测定方法 于 28 d 造模结束后第 1 天,早晨 9:00~10:00 取材,在大鼠安静状态下进行。10% 水合氯醛(3.5 mL·kg⁻¹)麻醉大鼠,心脏取血 10 mL,置于抗凝管和非抗凝管中各 5 mL,3 000 r·min⁻¹,4℃下离心 15 min,取上清 400 μL,-80℃下保存备用。均采用放射免疫法测定,严格按照说明书要求进行。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计分析软件进行处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据间的比较采用方差分析和 LSD 比较,以 $P < 0.05$ 为差异具

有统计学意义。

3 结果

3.1 对青少年期应激模型大鼠的糖水偏爱指数的影响 应激造模第 1 天各组大鼠糖水偏好指数无统计学意义。与正常组比较,模型组在应激造模 1~21 d,糖水偏爱指数稍降低,但差异无统计学意义;在造模第 28 天明显性降低,两者之间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组比较,在应激造模第 7 天至第

28 天,氟西汀组和 JWSNS 组大鼠糖水偏爱指数明显降低 ($P < 0.05$);与氟西汀组比较,JWSNS 组在应激造模第 7 天至第 21 天糖水偏好指数均明显性降低于 ($P < 0.05$);而在应激造模第 28 天,两组糖水偏爱指数基本接近,且差异无统计学意义。从时间点来看,正常组糖水偏爱指数基本上无大的改变;模型组下降的幅度很大;氟西汀组略有下降;JWSNS 组上升的幅度很大。见表 1。

表 1 加味四逆散对青少年期应激模型大鼠的糖水偏爱指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effects of modified Sini San on sucrose preference index in adolescence rats with stress ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第 1 天/%	第 7 天/%	第 14 天/%	第 21 天/%	第 28 天/%
正常	-	94.32 ± 2.50	95.29 ± 4.18	66.58 ± 2.79	93.76 ± 5.50	93.79 ± 5.39
模型	-	93.75 ± 1.39	90.85 ± 2.35	63.80 ± 3.25	89.75 ± 3.67	57.36 ± 7.94 ¹⁾
氟西汀	0.01	94.73 ± 2.07	76.64 ± 4.68 ²⁾	52.48 ± 4.94 ²⁾	70.49 ± 5.17 ²⁾	70.87 ± 3.64 ²⁾
JWSNS	16.9	94.33 ± 1.46	48.91 ± 13.58 ^{2,3)}	33.63 ± 3.86 ^{2,3)}	60.13 ± 6.71 ^{2,3)}	70.60 ± 4.84 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与氟西汀组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

3.2 对青少年期应激大鼠体重的影响 应激造模前各组大鼠体重无明显性差异。造模开始后,正常组体重增长呈上升趋势,而其他 3 组下降趋势,在第 3,4 周,与正常组比较,模型组体重增长明显性下降 ($P < 0.05$),表明造模对体重增长影响较大。与模

型组比较,氟西汀组体重在第 2,3 周有明显增长 ($P < 0.05$),第 1,4 周明显减缓 ($P < 0.05$),JWSNS 组在第 1,3 周明显减缓 ($P < 0.05$),第 2,4 周差异无统计学意义,表明造模对各组体重增长影响较大。见表 2。

表 2 加味四逆散对青少年期应激模型大鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of modified Sini San on weight in adolescence rats with stress ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第 0 周体重/g	第 1 周后增重/g	第 2 周后增重/g	第 3 周后增重/g	第 4 周后增重/g
正常	-	80.88 ± 7.59	27.27 ± 10.37	31.60 ± 10.21	39.60 ± 5.22	43.87 ± 5.21
模型	-	73.29 ± 3.77	34.27 ± 8.04	29.60 ± 9.08	31.27 ± 4.62 ¹⁾	25.00 ± 4.68 ¹⁾
氟西汀	0.01	80.13 ± 6.53	19.53 ± 4.34 ²⁾	50.07 ± 8.22 ²⁾	35.33 ± 5.28 ²⁾	16.73 ± 4.76 ²⁾
JWSNS	16.9	76.38 ± 7.63	21.6 ± 8.39 ^{1,2)}	30.20 ± 4.72	26.80 ± 5.51 ²⁾	24.73 ± 7.45

3.3 对青少年期应激模型大鼠的行为学的影响 与正常组比较,经造模第 28 天后,模型组中央区活动时间、总路程、平均速度差异均无统计学意义,但模型组

的活跃度、总路程和平均速度均有所升高,中央区活动时间有所延长。与正常组和模型组分别比较,JWSNS 组活跃度明显性增加 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 加味四逆散对青少年期应激模型大鼠的行为学的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effects of modified Sini San on behavior in adolescence rats with stress ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	活跃度/次	中央区活动时间/s	总路程/mm	平均速度/mm·s ⁻¹
正常	-	23.70 ± 7.84	4.67 ± 4.41	1 192.83 ± 520.77	4.97 ± 2.17
模型	-	25.38 ± 5.37	6.84 ± 7.22	1 384.23 ± 442.24	5.77 ± 1.84
氟西汀	0.01	28.05 ± 10.75	4.37 ± 3.03	1 324.74 ± 544.66	5.53 ± 2.28
JWSNS	16.9	32.38 ± 7.89 ²⁾	3.55 ± 2.36	1 471.15 ± 565.11	6.13 ± 2.35

3.4 对青少年期应激大鼠血浆 ACTH 及血清 CORT 浓度的影响 与正常组比较,模型组血浆 ACTH 和血清 CORT 含量明显升高,具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组比较,氟西汀组和 JWSNS 组血浆 ACTH 和血清 CORT 分别含量明显降低,具有统计学意义 ($P < 0.05$);氟西汀组与正常组比较,血浆

ACTH 含量有所降低,但无统计学意义。见表 4。

4 讨论

人类的青少年期大致从 13~18 岁,约相当于大鼠等啮齿类动物出生后 28~60 d 阶段^[5]。体重、糖水偏好指数和旷场行为是评价抑郁焦虑等情绪的有效指标。本实验发现青少年期大鼠在经 28 d 应激

表 4 加味四逆散对青少年期应激模型大鼠的血浆 ACTH 和血清 CORT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effects of modified Sini San on concentration of plasma ACTH and serum CORT in adolescence rats with stress ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ACTH/ng·L ⁻¹	CORT/mg·L ⁻¹
正常	-	77.12 ± 14.70	509.61 ± 82.29
模型	-	97.06 ± 23.88 ¹⁾	683.30 ± 76.25 ¹⁾
氟西汀	0.01	69.16 ± 6.80 ²⁾	537.03 ± 109.25 ²⁾
JWSNS	16.9	77.97 ± 14.35 ²⁾	572.48 ± 130.05 ²⁾

造模后,与正常组比较,模型组体重明显性增长,糖水偏爱指数明显性降低,ACTH 和 CORT 含量明显性升高,说明青少年期应激模型制备成功,这与应激状态下模型大鼠体重明显下降、快感缺乏及血清学变化的基本改变相符。JWSNS 组第 7,14 天糖水偏爱指数有明显降低的波动,有待进一步研究。旷场测试是有效检测大鼠抑郁焦虑行为的有效指标。经 28 d 慢性应激的青少年期大鼠旷场测试总体结果未出现明显性差异,但与正常组比较,模型组总路程和平均速度有所增加提示青少年期应激后行为学有倾向于焦虑改变的趋势,而与正常组比较,模型组中央区活动时间有所延长,提示应激后青少年期大鼠对新环境认知能力较差。与正常组和模型组分别对比,JWSNS 组活跃度明显性增加,具有统计学意义,总路程、平均速度均有所升高,提示 JWSNS 组有进一步提升大鼠兴奋性的作用的可能。既往研究报道,人类青春期(青少年末期)的焦虑水平明显高于其他年龄阶段,且往往与抑郁样行为共病^[6];本实验初步证实这一点。

HPA 轴改变是慢性心理应激反应神经内分泌系统的基本改变。基于糖水偏好指数与行为学指标检测显示 28 d 是建立成青少年期应激大鼠模型较合适的时间,本实验检测的 HPA 轴 ACTH,CORT 的变化。结果显示,应激后的青少年期大鼠血浆 ACTH 和血清 CORT 含量明显升高,表明处于应激状态的青少年期大鼠 HPA 亢进;经过治疗后青少年期大鼠血浆 ACTH 和血清 CORT 含量明显降低,说明口服氟西汀或加味四逆散可以改善青少年期应激大鼠的应激状态;与氟西汀组比较,JWSNS 组大鼠血浆 ACTH 和血清 CORT 含量升高,差异无统计学意义,提示采用 JWSNS 下调青少年期应激大鼠血浆 ACTH 和血清 CORT 含量可能是防治青少年期应激的另一有效途径。

青少年期应激已成为当前精神障碍疾病发生机制研究必须面对的关键命题。有数据显示,早期创伤性应激经历是导致成年期抑郁症易感性增加的高风

险因素之一,约 50% 的青少年期抑郁可能慢性迁延至成年,而成年抑郁约 50% 的患者有抑郁早期发作的经历^[7]。此外,实验室研究也表明了早期环境应激能诱导啮齿和灵长类动物成年期的抑郁表现^[8]。本实验结果表明,青少年期应激状态下大鼠体重增长明显减慢,HPA 功能亢进,快感缺失,说明此次实验青少年期应激模型制备成功,调肝治法方药可以有效改善应激大鼠抑郁样行为和 HPA 轴改变,但部分数据显示的波动性显示出青少年期个体发育因素是影响抑郁行为以及应激和药物治疗作用的重要因素,有待进一步深入研究。以往基于成年人和动物发展起来的建立动物模型方法可能不完全适用于青少年应激损伤。建立符合青少年行为和生理特点的精神障碍动物模型以及临床的追踪研究对阐明应激所致的青少年精神障碍的生理病理机制,筛查更加有效的治疗药物具有重要意义。

[参考文献]

[1] Pryce C R, Ruedi-Bettschen D, Dettling A C, et al. Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and Primates: Potential animal models in depression research [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005, 29(4/5): 649-674.

[2] 丁岩, 章杰, 杨平, 等. 生命早期应激对成年期子代雄鼠抑郁样行为的影响 [J]. *汕头大学医学院学报*, 2013, 26(3): 148-150.

[3] 富文俊, 敖海清, 孙琪, 等. 逍遥散对慢性应激损伤大鼠肾上腺皮质激素释放激素表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(19): 216-218.

[4] Willner P, Benton D, Brown E, et al. Depression increases craving for sweet rewards in animal and human models of depression and craving [J]. *Psychopharmacology*, 1998, 136(3): 272-283.

[5] Spear L P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2000, 24(4): 417-463.

[6] Hyman S E. Mood disorders in children and adolescents: an NIMH perspective [J]. *Biol Psychiatry*, 2001, 49(12): 962-969.

[7] Taylor S E. Mechanisms linking early life stress to adult health outcomes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(19): 8507-8512.

[8] Weiner I. The "two-headed" latent inhibition model of schizophrenia: modeling positive and negative symptoms and their treatment [J]. *Psychopharmacology*, 2003, 169(3/4): 257-297.

[责任编辑 周冰冰]