

当归补血汤对慢性轻度不可预见性刺激 抑郁模型大鼠行为学及 HPA 轴的影响

王永辉^{1*}, 冯振宇², 刘慧宇², 侯渊¹, 周然¹

(1. 山西中医学院, 山西 晋中 030619; 2. 山西省中西医结合医院, 太原 030013)

[摘要] **目的:**观察当归补血汤对慢性轻度不可预见性刺激抑郁模型大鼠行为学和下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(HPA轴)的影响。**方法:**将120只SD雄性大鼠随机分为正常组、模型组、当归补血汤高、中、低剂量组(8,4,2 g·kg⁻¹)和阳性药组(盐酸氟西汀,3.33 mg·kg⁻¹)。除正常组外,其余各组采用慢性轻度不可预见性刺激法(CUMS)制备抑郁大鼠模型。各给药组动物灌胃给相应药物,正常组和模型组大鼠灌胃给予等体积生理盐水;每日1次,连续21 d。分别于第0,7,14,21天采用强迫游泳实验、悬尾实验和旷场实验等方法对抑郁模型大鼠的行为学改变进行检测,并于21 d采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠血清促肾上腺皮质激素(ACTH)和皮质酮(CORT)水平,采用实时荧光定量聚合酶链式反应法(Real-time PCR)检测大鼠下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素(CRH),下丘脑、垂体和海马糖皮质激素受体(GR)mRNA表达水平。**结果:**当归补血汤高、中剂量组可显著减少抑郁模型大鼠强迫游泳实验和悬尾实验的不动时间($P < 0.05$);显著增多旷场实验穿格数次数($P < 0.05$);显著降低血清CORT和ACTH水平($P < 0.05$);当归补血汤高剂量组可下调CRH mRNA表达水平;上调下丘脑、垂体和海马的GR mRNA的表达水平($P < 0.05$)。**结论:**当归补血汤具有改善CUMS大鼠抑郁行为的作用,表现出抗抑郁作用,其调节HPA轴功能是抗抑郁作用的重要机制之一。

[关键词] 当归补血汤; 抗抑郁; 慢性轻度不可预见性刺激; 下丘脑-垂体-肾上腺轴

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)08-0112-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017080112

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170210.0903.010.html>

[网络出版时间] 2017-02-10 9:03

Effect of Danggui Buxue Tang on Behavior and HPA Axis in Rat Models of Chronic Stress-induced Depression

WANG Yong-hui^{1*}, FENG Zhen-yu², LIU Hui-yu², HOU Yuan¹, ZHOU Ran¹

(1. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China;

2. Shanxi Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Taiyuan 030013, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Danggui Buxue Tang on behavior and hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in rat models of chronic stress-induced depression. **Method:** Totally 120 male SD rats were randomly divided into normal group, model group, Danggui Buxue Tang high, medium and low dose groups (8, 4, 2 g·kg⁻¹), and fluoxetine positive control group (3.33 mg·kg⁻¹). Chronic unpredictable mild stress (CUMS) was used to establish the rat depression model. They were orally administered with corresponding drugs for 21 days and the rats in normal group and model group received the equal volume of normal saline. All rats' behavior changes were observed through open field test (OFT), forced swimming test (FST) and tail suspension test (TST) at 0, 7, 14, 21 d; serum cortisol (CORT) and adrenocorticotropic hormone (ACTH) levels of rats were also detected by ELISA at 21 d. Meanwhile, Real-time PCR method was used to detect the

[收稿日期] 20160818(011)

[基金项目] 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAI07B01)

[通讯作者] *王永辉,博士,副教授,从事方药功用物质基础及药理作用研究,Tel:13068048517,E-mail:wyh766188@sina.com

mRNA expression levels of corticotrophin-releasing hormone (CRH) and glucocorticoid receptor (GR) in hypothalamus, pituitary and hippocampus of rats. **Result:** Danggui Buxue Tang high and middle dose groups can significantly reduce the immobility time in forced swimming test and hanging tail test of depression model rats ($P < 0.05$); significantly increase the number of grid crossing in open field test ($P < 0.05$), and significantly reduce the serum ACTH and CORT levels ($P < 0.05$); Danggui Buxue Tang high dose group can down-regulate CRH mRNA expression level, and up-regulate the GR mRNA expression levels in the hypothalamus, pituitary and hippocampus ($P < 0.05$). **Conclusion:** Danggui Buxue Tang can improve the depressive behavior in CUMS rats and show the anti-depression effect. Its mechanisms may be related to regulating HPA axis function.

[**Key words**] Danggui Buxue Tang; anti-depressant; chronic unpredictable mild stress; hypothalamic-pituitary-adrenal axis

抑郁症是情感性精神障碍类疾病的主要类型之一,其临床表现以明显而持久的心境低落为主要特征,患者有思维迟缓、情绪低落、悲观、自责自罪等表现,严重者可出现明显的自杀倾向,约 15% 的抑郁症患者死于自杀。目前,全球约有 3.5 亿抑郁症患者,每年因抑郁自杀者亦接近百万。世界卫生组织将抑郁症称为“隐形的负担”,逐年升高的发病率和死亡率使抑郁症已经成为一种影响人类健康的重大精神类疾病^[1]。抑郁症的发病原因十分复杂,普遍认为与遗传、心理、社会等多种因素的综合作用有关,其发病机制已从传统的“单胺类神经递质缺乏”学说发展为“内分泌-海马神经可塑性障碍”学说,认为下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA 轴)功能亢进和海马神经可塑性改变是引发抑郁症的关键环节之一^[2-3]。

抑郁症属于中医“郁证”的范畴,历代医家对其论述颇多,观点各异。抑郁症的临床辨证以肝气郁结为主,多采用疏肝理气、解郁安神的四逆散、柴胡疏肝散、逍遥散、酸枣仁汤等方进行治疗,其临床及实验研究报道屡见不鲜^[4-5]。抑郁症的发生与人的精神意识思维活动密切相关,中医理论认为“脾藏意主思,忧思伤脾,思则气结”,思虑太过,可致气机郁滞,升降失常,从而出现抑郁症状,可采用补益心脾、气血双补之法进行治疗^[6]。当归补血汤出自《内外伤辨惑论》,为金元时期著名医家李东垣所创,由黄芪和当归按 5:1 组成,原书主治“血虚阳浮发热”之证,是历代医家公认的补气生血的代表方剂^[7]。现代药理研究发现当归补血汤具有促进造血、抗动脉粥样硬化,改善微循环、调节免疫、抗肿瘤、抗辐射损伤、延缓衰老和中枢神经系统保护作用^[8-11]。本研究从“思则气结”的视角出发,依益气健脾,养血安神之法,观察了当归补血汤对慢性轻度不可预见性刺激(CUMS)抑郁模型大鼠的抗抑郁作用及其对下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA 轴)的影响,

为后期研究提供一定理论依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 雄性大鼠,体重(160 ± 20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2012-0001。实验大鼠适应性饲养 7 d 后,开始实验。本研究获得山西中医学院实验动物伦理委员会批准。

1.2 药物及试剂 黄芪、当归药材均购自山西太原同仁堂药店,经山西中医学院实验中心尚彩玲讲师鉴定黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 的干燥根,当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* 的干燥根。当归补血汤按其原方比例黄芪-当归 5:1,参照传统水煎煮工艺,加工成煎剂,减压浓缩至相当于含生药 2 g · mL⁻¹。盐酸氟西汀分散片(西班牙礼来公司,批号 4089A);大鼠促肾上腺皮质激素(ACTH),大鼠皮质醇(CORT)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(美国 BD 公司,批号分别为 CK-E30596,CK-E30596);RNA 提取试剂盒(爱思进生物技术有限公司,批号 271445AX);RNA 提取试剂盒,DNA 逆转录试剂盒及 PCR 扩增试剂盒(北京艾德莱生物有限公司,批号分别为 202126AX,262238AH,271545AX)。

1.3 仪器 Synerg4 型多功能微孔板检测仪(美国博腾公司),ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),Tc-s 型 PCR 仪及 MB-102 型振荡型恒温金属浴(杭州博日科技有限公司),JXFSTRP-24 型全自动样品快速研磨仪(上海净信实业发展有限公司),Fresco17 型台式高速冷冻离心机及 1316 型生物安全柜(美国 Thermo Fisher 公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 实验当日(0 d),采用视频跟踪分析系统对实验大鼠进行 Open-field 行为学测定,选取评分相近的健康雄性 SD 大鼠,依照体重随机

分为正常组、模型组、当归补血汤高、中、低剂量组和阳性药组,每组 20 只。正常组和模型组大鼠灌胃给予生理盐水;当归补血汤高、中、低剂量组(8,4,2 g·kg⁻¹)灌胃给予相应煎剂;阳性药组灌胃给予盐酸氟西汀 3.33 mg·kg⁻¹,给药体积均为 10 mL·kg⁻¹,每日 1 次,连续 21 d。

2.2 模型制备 自 1 d 起,正常组每笼 5 只饲养,无任何刺激;其余各组大鼠均单笼饲养,采用 CUMS 法制备抑郁大鼠模型^[12-13],具体如下:45 ℃ 热应激 5 min,4 ℃ 冷水游泳 5 min,禁水 24 h,禁食 24 h,昼夜颠倒 24 h,夹尾 1 min,摇晃(1 次/s,5 min)和电击足底(5 mV,持续时间 10 s/次,间隔时间 30 s/次,共 15 次)等 8 种刺激随机安排,每日 1 种,同种刺激不连续出现,每日 1 次,连续刺激 21 d。

2.3 指标检测

2.3.1 行为学评价 分别于实验第 0,7,14,21 天采用强迫游泳实验、悬尾实验和旷场实验等方法^[14-15]对抑郁大鼠的行为学改变进行评价。

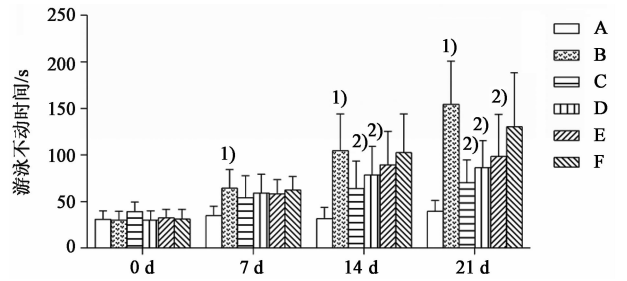
2.3.2 血清 CORT,ACTH 含量检测 于末次给药 2 h 后处死大鼠,分离血清,按照 ELISA 试剂盒说明书检测大鼠血清 CORT,ACTH 水平。

2.3.3 下丘脑 CRH 及下丘脑、垂体和海马 GR mRNA 表达水平检测 每组随机取 10 只大鼠,于冰盘中开颅取脑,剥离下丘脑、垂体及海马,-70 ℃ 保存,备测。分别提取下丘脑、垂体和海马总 RNA,实时荧光定量 PCR 法(Real-time PCR)检测大鼠下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素(CRH),糖皮质激素受体(GR)mRNA 及垂体、海马 GR mRNA 表达水平,其引物序列(5'-3')由武汉金开瑞生物工程有限公司利用 Genbank 数据库和 Primer Permier 5.0 软件设计并合成 CRH 上游引物 AGCCGCCATCTCTGGATCTC,下游引物 TCCCGAT AATCTCCATCAGTT;GR 上游引物 GATTGAACCCG AGGTGTTGATGC,下游引物 CGGCAAATGCCATG AGAAACATCC; β -actin 上游引物:CCCATCTATGAG GGTTACGC,下游引物 TTTAATGTCACGCACGAT TTC。扩增条件:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 延伸 34 s,共 40 个循环。PCR 结果分析采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法,通过 C_t 值计算 CRH,GR mRNA 的相对表达水平。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析,所有数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 One-way ANOVA 单因素方差分析,多组间比较采用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对抑郁模型大鼠行为学的影响 与正常组比较,在 7,14,21 d 时,模型组大鼠强迫游泳不动时间和悬尾不动时间逐渐延长,同时其穿格次数逐渐减少,其组间差异具有统计学意义($P < 0.05$);21 d 时,当归补血汤高、中剂量组和盐酸氟西汀组均可明显减少强迫游泳不动时间和悬尾不动时间($P < 0.05$),增加大鼠穿格次数($P < 0.05$)。见图 1~3。



A. 正常组;B. 模型组;C. 盐酸氟西汀组;D. 当归 8 g·kg⁻¹组;E. 当归 4 g·kg⁻¹组;F. 当归 2 g·kg⁻¹组。与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (图 2,3 同)

图 1 当归补血汤对抑郁模型大鼠游泳不动时间的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

Fig.1 Effect of Danggui Buxue Tang on forced swimming test of CUMS model rats($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

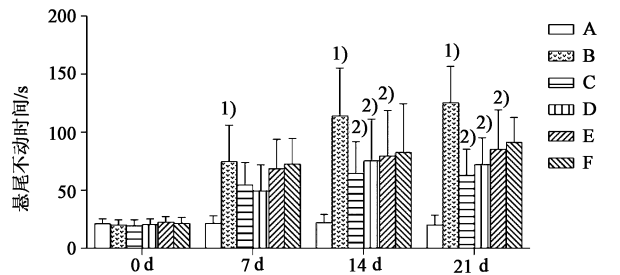


图 2 当归补血汤对抑郁模型大鼠悬尾不动时间的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

Fig.2 Effect of Danggui Buxue Tang on tail suspension test of CUMS model rats($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

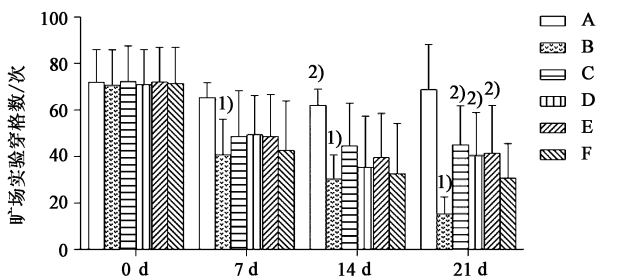


图 3 当归补血汤对抑郁模型大鼠旷场实验穿格次数的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

Fig.3 Effect of Danggui Buxue Tang on open field test of CUMS model rats($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

3.2 对抑郁模型大鼠血清 CORT, ACTH 含量的影响 模型组大鼠血清 CORT 和 ACTH 水平较正常组均明显增高 ($P < 0.05$); 当归补血汤高、中剂量组可明显降低大鼠血清 CORT 和 ACTH 水平 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 当归补血汤对抑郁模型大鼠血清 ACTH, CORT 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 1 Effect of Danggui Buxue Tang on ACTH, CORT of CUMS model rats ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	ACTH/ $ng \cdot L^{-1}$	CORT/ $\mu g \cdot L^{-1}$
正常	-	11.91 ± 1.46	75.61 ± 11.32
模型	-	21.95 ± 1.01 ¹⁾	172.15 ± 18.88 ¹⁾
盐酸氟西汀	3.33 × 10 ⁻³	11.68 ± 1.09 ²⁾	68.74 ± 7.88 ²⁾
当归补血汤	8	15.28 ± 2.05 ²⁾	117.61 ± 11.11 ²⁾
	4	17.80 ± 1.98 ²⁾	131.69 ± 17.26 ²⁾
	2	20.56 ± 2.27	166.51 ± 14.73

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

3.3 对抑郁模型大鼠 CRH, GR mRNA 表达的影响 模型组大鼠下丘脑 CRH mRNA 表达水平较正常组明显增高, 当归补血汤高剂量组可显著降低

表 2 当归补血汤对抑郁模型大鼠 CRH, GR mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Danggui Buxue Tang on CRH, GR mRNA expression of CUMS model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	CRH	GR		
			下丘脑	垂体	海马
正常	-	0.831 ± 0.142	1.721 ± 0.135	1.044 ± 0.131	1.284 ± 0.145
模型	-	1.174 ± 0.191 ¹⁾	1.074 ± 0.181 ¹⁾	0.624 ± 0.169 ¹⁾	0.611 ± 0.144 ¹⁾
盐酸氟西汀	3.33 × 10 ⁻³	0.861 ± 0.275 ²⁾	1.645 ± 0.232 ²⁾	0.994 ± 0.128 ²⁾	1.115 ± 0.172 ²⁾
当归补血汤	8	0.958 ± 0.173 ²⁾	1.424 ± 0.163 ²⁾	0.956 ± 0.175 ²⁾	0.937 ± 0.167 ²⁾
	4	0.982 ± 0.196	1.327 ± 0.251	0.711 ± 0.134	0.782 ± 0.114 ²⁾
	2	1.060 ± 0.202	1.194 ± 0.143	0.654 ± 0.132	0.662 ± 0.187

此, 海马的 GR 对 GC 更敏感, 且更容易受到高浓度 GC 的损坏^[17]。长期的应激伴随 GC 的持续升高, 会引起海马 GR 受损、密度下调, 甚至会导致海马神经元发生萎缩、凋亡及神经再生减少等一系列的退行性损伤^[12], 进而造成恶性循环, 使海马对 HPA 轴负反馈调控效应发生障碍, 呈现出 HPA 轴脱抑制状态, 最终引起 ACTH, CORT 等激素水平的持续性升高。这一过程被认为是应激导致抑郁症发生的主要病理机制之一^[18-19]。实验结果表明, 当归补血汤可显著改善抑郁模型大鼠的抑郁行为, 显示出较好的抗抑郁作用。同时, 当归补血汤可抑制慢性应激性所致抑郁模型大鼠下丘脑 CRH mRNA 表达水平; 促进下丘脑、垂体和海马的 GR mRNA 的表达, 显示出

CRH mRNA 表达水平 ($P < 0.05$); 模型组大鼠下丘脑、垂体和海马的 GR mRNA 表达水平较正常组明显降低, 当归补血汤高剂量组可不同程度增加抑郁大鼠下丘脑、垂体和海马的 GR mRNA 的表达水平 ($P < 0.05$)。见表 2。

4 讨论

长期的应激刺激能够导致机体 HPA 轴功能亢进, 从而促进下丘脑 CRH 的过度释放, 进而刺激垂体分泌 ACTH, 最终引起肾上腺大量合成和释放 CORT。糖皮质激素 (GC) 主要通过 MR 和 GR 2 类皮质类固醇激素受体发挥生理作用。一般认为, MR 除主要完成生理剂量下 GC 的功能外, 还参与基础水平 HPA 轴的负反馈调节。而 GR 则主要介导应激诱导的高水平 GC 时 HPA 轴的负反馈调节, 抑制 HPA 轴以免过度应激反应。由此可见, GR 是介导应激过程 GC 信号通路的主要受体分子, 对 HPA 轴恢复到基础水平起到关键性作用^[16]。海马是调控 HPA 轴应激反应的高位中枢, 与机体情感、情绪反应密切相关, 富含各种神经递质及受体, 也是 GR 表达最为丰富的脑区之一。因

对机体应激状态下 HPA 轴功能的负反馈调控作用。这一作用可能是当归补血汤其发挥抗抑郁作用的重要机制之一。

当归补血汤原为“血虚发热证”而设, 对其方易多从“有形之血不能速生, 无形之气所当急固”和“有形之血生于无形之气”的角度进行阐释, 药理实验研究亦多围绕血液系统、免疫系统等方面展开。《景岳全书·郁证》载:“思则气结, 结于心而伤于脾也……悲则气消, 忧则气沉, 必伤脾肺。”抑郁之病, 关键在于多思, 思则气结。气结可导致中焦脾胃气机升降的失调, 进而导致抑郁症发生。思虑过度伤及脾运, 脾虚不能化生气血, 五脏失其滋养, 出现一

系列抑郁躯体症状;思虑过度致气机郁结,五脏气机紊乱,也是发生抑郁症的关键^[6]。黄芪可健脾助运,升阳解郁^[20];当归则补血养肝以助肝用、兼以活血通脉^[21],对“思则气结”所致“郁证”可谓对证,其抗抑郁的作用值得进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 陈力,薛瑞,于能江,等.小补心汤总黄酮对获得性无助小鼠的抗抑郁作用及其对HPA轴功能的影响[J].中国药理学通报,2015,31(6):815-821.

[2] 龚胜兰,富文俊,黄彬青,等.抑郁症海马神经可塑性损伤机制探讨及丹栀逍遥散调控作用的研究进展[J].辽宁中医杂志,2016,43(3):663-666.

[3] 安锋利.多因素作用下的抑郁症机制研究进展[J].四川生理科学杂志,2016,38(2):95-98.

[4] 王慧慧,张百霞,叶小彤,等.基于“中药作用机理辅助解析系统”的四逆散抗抑郁作用机制研究[J].中国中药杂志,2015,40(19):3723-3728.

[5] 王睿,王琪,金明顺,等.中药复方抗抑郁研究进展[J].中国中医基础医学杂志,2016,22(3):440-443.

[6] 牛学恩,任璐璐,闫明.从“思则气结”论治抑郁症[J].中医学报,2015,30(6):841-842.

[7] 黄智超,杨芳艳,张红梅.当归补血汤释义[J].现代中医药,2016,36(3):83-84.

[8] 刘建春,杨婉芳,季新燕,等.当归补血汤的现代药理研究及其防治阿尔茨海默病的探讨[J].中华中医药学刊,2015,33(4):840-843.

[9] 曾宇,张三印,胡冠英.当归补血汤的研究进展[J].时珍国医国药,2016,27(2):422-424.

[10] 张三印,冯蓓,杨苗.当归补血汤抑制与肿瘤共培养血管内皮细胞的增殖及其分子机制[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(2):163-167.

[11] 王晓玲,赵舒武,王媛媛,等.当归补血汤对骨髓辐射

损伤过程中NF- κ B及bax、bcl-2表达的影响[J].中国老年病学杂志,2015,35(11):2887-2890.

[12] 冯振宇,刘慧宇,赵杰.温阳解郁汤对抑郁模型大鼠的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(6):99-102.

[13] 汪燕,肖伟,章显宝,等.应激性动物抑郁模型的建立及其评价研究概况[J].甘肃中医学院学报,2015,32(2):70-74.

[14] 蔡莉,李荣,吴清清,等.橙皮苷对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及HPA轴的影响[J].中国中药杂志,2013,38(2):229-233.

[15] 冯振宇,赵杰,刘慧宇.温阳解郁汤对抑郁模型大鼠HPA轴的影响[J].中华中医药杂志,2015,30(12):4304-4307.

[16] 安磊,李静,张有志,等.糖皮质激素受体:抑郁症治疗的潜在靶标[J].军事医学,2014,38(11):908-911,917.

[17] 张国双,杨坤.抗抑郁新靶点-糖皮质激素受体[J].国际精神病学杂志,2015,42(1):84-86.

[18] 马学萍,安书成.慢性应激性抑郁发生中海马糖皮质激素对BDNF的影响[J].陕西师范大学学报:自然科学版,2013,41(6):56-62.

[19] 陈姣,楚世峰,陈乃宏.糖皮质激素与抑郁发病相关机制研究进展[J].中国药理学通报,2013,29(11):1493-1495.

[20] 郭晓冬,许二平,李琳,等.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[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(11):119-123.

[21] 黄世敬,张永超,张颖.黄芪治疗抑郁症应用与研究[J].世界中医药,2014,9(5):665-668.

[责任编辑 周冰冰]