

玉郎伞多糖对慢性应激抑郁小鼠行为学 及海马结构的影响

陆玉丹, 黄仁彬*, 何萍*

(广西医科大学药学院, 南宁 530021)

[摘要] 目的: 观察玉郎伞多糖(YLSPA)对慢性应激抑郁小鼠行为学及海马结构的影响。方法: 50 只昆明种小鼠随机分为 5 组: 正常对照组、模型组、氟西汀 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组和 YLSPA $1\ 200, 600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 高、低剂量组, 连续灌胃 21 d, 同期利用慢性不可预知温和应激加孤养模型建立小鼠抑郁症模型。采用蔗糖水消耗实验和小鼠自主活动记录仪进行行为学测定; 采用脑组织切片 HE 染色观察海马结构的改变。结果: 实验第 22 天, 模型组小鼠的体重、活动站立次数、糖水偏爱度明显减少(与正常对照组比较, $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), YLSPA 高、低剂量组、氟西汀组均较模型组有所增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 观察 HE 染色切片可见慢性应激引起海马结构发生改变, 细胞数量减少, 玉郎伞多糖和氟西汀可对抗这种改变。结论: YLSPA 具有抗抑郁作用, 能改善慢性应激对小鼠海马神经元细胞的损伤。

[关键词] 玉郎伞多糖; 慢性应激抑郁; 行为学; 海马

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0220-05

Effects of Yulangsan Polysaccharides on Behavior, Structure of Hippocampus in Mice with Chronic Stress-induced Depression

LU Yu-dan, HUANG Ren-bin*, HE Ping*

(Pharmaceutical College, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Yulangsan polysaccharides (YLSPA) on behavior, structure changes of hippocampus in mice with chronic stress-induced depression. **Method:** Fifty Kunming mice were randomly divided into 5 groups: normal control, animal model, fluoxetine $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and YLSPA $1\ 200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, YLSPA $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ groups with continuous oral administration for 21 d, and chronic unpredictable mild stress (CUMS) with isolated support was imposed simultaneously to establish mouse depression model. The behavior changes of mice were evaluated by sucrose water consumption and the spontaneous activity; the structure changes of hippocampus were detected by the brain tissue HE staining. **Result:** The weight, the number of active stand, the consumption and preference for sucrose solution of the animal model group were significantly decreased compared with normal control group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), and were increased in YLSPA group and fluoxetine group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Chronic unpredictable mild stress with isolated support could damage the structure of hippocampus, reduce the number of cells, YLSPA and fluoxetine could ameliorate these changes. **Conclusion:** YLSPA can improve the behavior scores of the mice with depression and ameliorate the damage of hippocampus induced by chronic unpredicted mild stress.

[Key words] YLSPA; chronic stress-induced depression; behavior; hippocampus

[收稿日期] 20120706(004)

[基金项目] 广西科学研究与科技开发攻关项目(桂科攻 0630002-2A); 国家自然科学基金项目(30960504); 广西自然科学基金重点项目(2011GXNSFD018030); 南宁市科学技术局科技攻关与新产品试制项目(201102084C)

[第一作者] 陆玉丹, 在读硕士研究生, 从事天然抗抑郁药物及机制研究, Tel: 14795723720, E-mail: luyudangx@163.com

[通讯作者] * 黄仁彬, 博士, 教授, 博士生导师, 从事天然药物研发, Tel: 13807713926, E-mail: huangrenbin518@163.com

* 何萍, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事神经药理学, Tel: 13607864525, E-mail: hpnngxmu@yahoo.com.cn

玉郎伞(*Yulangsana*, YLS)为豆科植物疏叶崖豆 *Millettia pulchra* (Benth.) Kurz var. *Laxior* (Dunn) Z. Wei 干燥根。始见于《广西中药志》,为广西壮、瑶医常用药材,亦称小牛力、土甘草、大罗伞、土茯神及荔枝参等,具有舒筋活络、补虚润肺之功能,民间用于腰腿痛、风湿痛和慢性肝炎,也用于智力减退、消化不良、营养不良和病后虚弱等。玉郎伞多糖(Yulangsana polysaccharides, YLSPA)是从 YLS 中提取的主要有效成分之一,由葡萄糖和阿拉伯糖组成^[1]。本课题组前期研究表明,YLSPA 能明显缩短行为绝望小鼠悬尾不动时间和强迫游泳不动时间,其机制可能与提高脑内单胺类神经递质水平有关^[2]。本研究采用慢性不可预知温和应激加孤养造成小鼠抑郁模型,探讨 YLSPA 对抑郁模型小鼠行为学及海马结构的影响,进一步研究 YLSPA 抗抑郁作用及作用机制。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠 50 只,SPF 级,雄性,体重(20±2)g,由广西医科大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(桂)2003-0003。

1.2 药物与试剂 YLSPA 由本室自行从玉郎伞中提取,经水煮沸醇沉提取后证实为高纯度多糖,纯度 95%,得率为 0.41%,紫外扫描显示无核酸和蛋白特征吸收峰,薄层色谱和气相色谱表明由葡萄糖和阿拉伯糖组成;盐酸氟西汀胶囊(批号 110102,上海中西制药有限公司)。实验前将各试药用生理盐水配成所需浓度,4℃冷藏备用。乌拉坦(上海曹扬第二中学化工厂);多聚甲醛(PFA,上海化学试剂公司)。

1.3 仪器 4590 型包埋机(日本 SAKURA 精密技术公司),RM2235 型轮转切片机(德国 LEICA 公司),101A-2 型电热恒温干燥箱(上海市跃进医疗器械一厂),奥林巴斯光学显微镜,德国 Q550 病理图像分析仪,ZZ-6 小鼠自主活动测定仪(成都泰盟科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 所有实验小鼠适应性喂养 1 周后,随机分为 5 组,即正常对照组、模型组、氟西汀组、YLSPA 高、低剂量组,每组 10 只。除正常对照组每 5 只一笼外,其余各组小鼠均单笼饲养。造模同时,治疗组按氟西汀(20 mg·kg⁻¹)、YLSPA(1 200,600 mg·kg⁻¹)进行灌胃,正常对照组和模型组给予等量生理盐水,每天 1 次,共 21 d。

2.2 小鼠慢性应激抑郁模型的建立 除正常对照

组外,模型组和治疗组小鼠进行 21 d 慢性轻度不可预见性应激刺激(CUMS):禁食 24 h、禁水 24 h、冷水游泳(4℃,5 min)、摇晃(1 次/s,5 min)、夹尾(止血钳,距尾根 1,3 min)、悬吊 15 min、潮湿垫料(每 100 g 垫料中加入 200 mL 水)、昼夜颠倒(24 h)、鼠笼倾斜(12 h)、热应激(45℃,5 min)。每日随机安排 1 种刺激方式,每种刺激在实验过程中使用不超过 3 次。连续 21 d,每天上午给药,下午给予刺激。

2.3 抑郁模型小鼠行为学评价

2.3.1 体重观察 在食物量、饮水量保持平行对照下,每日 8:00 进行灌胃,分别在实验进行中的第 1, 7, 14, 21 天测定各组小鼠的体重。

2.3.2 小鼠自主活动实验 于实验第 1, 7, 14, 21 天给药后 1 h,将小鼠放入 ZZ-6 小鼠自主活动测定仪中,适应 2 min 后观察其 5 min 内的活动次数和站立次数。

2.3.3 蔗糖水消耗试验^[3] 试验前,在隔噪音、安静的房间内,训练动物适应含糖饮水,每笼同时放置 2 个水瓶,第 1 个 24 h,2 瓶均装有 1% 蔗糖水,随后的 24 h,1 个瓶装 1% 蔗糖水,1 个瓶装纯水。22 h 禁食禁水后,进行动物的基础糖水/纯水消耗试验,同时给予每只小鼠事先定量好的 2 瓶水:1 瓶 1% 蔗糖水,1 瓶纯水。120 min 后,取走 2 瓶并称量。计算动物的总液体消耗、糖水消耗、纯水消耗和糖水偏爱度。每周进行 1 次液体消耗试验。

$$\text{糖水偏爱} = \frac{\text{糖水消耗}}{\text{液体消耗}} \times 100\%$$

2.4 海马 HE 染色观察

2.4.1 取材 第 22 天,20% 乌拉坦 5 mL·kg⁻¹,腹腔注射,待小鼠麻醉后,将其仰卧固定于手术台上,迅速剪开胸腔,充分暴露心脏,从左心室插入灌注针头,同时迅速剪开右心耳,以 0.9% 生理盐水 150 mL 左心室灌注,待从右心耳流出液变为无色后,继续以 4% 的多聚甲醛溶液 250 mL 左心室灌注。灌注结束后开颅取脑,剥离完整大脑后分离海马,浸入 4% 的多聚甲醛溶液中固定,石蜡包埋,于视交叉处连续冠状切片,片厚 4 μm。

2.4.2 脑组织 HE 染色 脑组织石蜡切片常规二甲苯脱蜡和梯度乙醇脱水,苏木素染色 5 min,自来水洗,1% 盐酸乙醇分化 3 s,自来水反蓝 10 min,伊红染色 2 min,稍水洗,过梯度乙醇,二甲苯透明 10 min,中性树胶封片,光镜下观察海马神经元结构的变化。

2.4.3 HE 结果处理 光镜下观察小鼠海马 CA1、CA3 区锥体细胞、齿状回(DG)区颗粒细胞的形态

并进行计数。各组每只小鼠选取 3 张切片,每张切片分别在海马的 CA1, CA3, DG 区选取 5 个互不重叠的视野,在 400 倍光镜下进行细胞计数,取平均值,进行统计分析。

2.5 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,选用单因素方差分析来检验各组数据之间的差异性, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠体重的影响 实验第 1,7 天,各组小鼠体重比较差异无显著性。实验第 14,21 天,与正常对照组相比,模型组小鼠体重增长数明显减少 ($P < 0.01$);与模型组相比,YLSPA 高、低剂量组及氟西汀组小鼠体重增长数明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 1。

汀组小鼠体重增长数明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 1。

3.2 对小鼠自主活动的影响 第 21 天,与正常对照组相比,模型组小鼠的活动站立次数均减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组相比,YLSPA 高、低剂量组及氟西汀组小鼠的活动站立次数均有所增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2。

3.3 糖水偏爱变化 实验第 14,21 天,蔗糖水消耗试验发现模型组小鼠糖水偏爱度明显下降,与正常对照组相比具有显著性差异 ($P < 0.01$);YLSPA 高、低剂量组及氟西汀组小鼠糖水偏爱度较模型组均有所改善 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 3。

表 1 玉郎伞多糖对小鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	给药后体重			
		d 1	d 7	d 14	D 21
正常对照	-	22.42 ± 2.81	25.02 ± 2.07	29.16 ± 1.78	31.76 ± 2.04
模型	-	22.03 ± 1.69	23.66 ± 2.58	25.25 ± 2.04 ²⁾	26.86 ± 1.78 ²⁾
氟西汀	20	21.16 ± 1.53	24.05 ± 1.83	27.72 ± 1.41 ³⁾	29.72 ± 1.41 ⁴⁾
YLSPA	1 200	20.66 ± 1.71	23.41 ± 2.42	27.81 ± 1.10 ³⁾	30.01 ± 1.56 ⁴⁾
	600	21.51 ± 1.28	22.84 ± 2.20	27.53 ± 1.69 ³⁾	29.63 ± 2.01 ⁴⁾

注:与正常对照组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组相比³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

表 2 玉郎伞多糖对小鼠给药后 5 min 内活动次数和站立次数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	活动次数				站立次数			
		d 1	d 7	d 14	d 21	d 1	d 7	d 14	d 21
正常对照	-	11.1 ± 8.1	11.2 ± 4.7	14.1 ± 10.6	20.7 ± 5.3	28.1 ± 12.5	41.2 ± 16.0	62.0 ± 17.4	58.9 ± 12.1
模型	-	9.6 ± 8.9	5.0 ± 3.9	4.6 ± 2.5 ¹⁾	4.0 ± 3.9 ²⁾	29.0 ± 16.3	40.8 ± 22.2	26.8 ± 13.6 ²⁾	16.8 ± 9.3 ²⁾
氟西汀	20	9.4 ± 6.4	7.2 ± 4.7	12.6 ± 8.3	15.6 ± 5.8 ⁴⁾	27.6 ± 13.5	48.3 ± 42.5	50.1 ± 22.8 ³⁾	49.2 ± 22.6 ⁴⁾
YLSPA	1 200	10.1 ± 4.4	7.9 ± 8.1	12.9 ± 6.3	14.4 ± 8.3 ⁴⁾	28.5 ± 10.2	51.3 ± 21.5	50.5 ± 21.4 ³⁾	49.3 ± 19.3 ⁴⁾
	600	10.2 ± 7.7	6.6 ± 4.6	8.8 ± 5.6	13.3 ± 6.5 ⁴⁾	27.8 ± 12.2	37.9 ± 10.3	38.7 ± 21.4	42.2 ± 16.8 ³⁾

表 3 玉郎伞多糖对小鼠糖水偏爱度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	给药后糖水偏爱度			
		d 1	d 7	d 14	d 21
正常对照	-	61.12 ± 13.47	62.78 ± 8.84	64.52 ± 3.04	66.04 ± 3.56
模型	-	61.63 ± 18.90	62.28 ± 9.28	50.76 ± 5.74 ²⁾	45.94 ± 3.07 ²⁾
氟西汀	20	60.29 ± 16.80	64.30 ± 8.01	61.19 ± 2.58 ⁴⁾	64.93 ± 1.85 ⁴⁾
YLSPA	1 200	60.64 ± 15.20	64.66 ± 10.84	61.20 ± 6.25 ⁴⁾	64.78 ± 3.50 ⁴⁾
	600	60.82 ± 11.00	62.73 ± 8.72	59.37 ± 4.52 ³⁾	63.46 ± 1.32 ⁴⁾

3.4 对小鼠海马神经元结构的影响 光镜下观察可见正常对照组小鼠海马 CA1, CA3 区锥体细胞, DG 区颗粒细胞排列规则,密集,形态正常,神经元核呈圆形,清晰可见,未见固缩。模型组小鼠海马 CA1, CA3 区锥体细胞, DG 区颗粒细胞神经元数量较正常对照组明显减少 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),且较多细胞出现明显固缩,细胞形态改变为锥形或多边形,胞核染色加深;YLSPA 高、低剂量组及氟西汀组小鼠海马各区分区神经元数量较模型组明显增多

($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),形态结构均有明显改善。见表 4。

4 讨论

抑郁症动物模型的制备方法有多种,有应激模型、孤养模型、药物模型、脑损伤模型等,分别从生物学、遗传学、社会心理学等不同角度来模拟抑郁症的表现,但均有各自特点和不足之处^[4]。梁霜等^[2]采用强迫游泳实验(forced swim test, FST)和悬尾实验(tail suspension test, TST)两种行为绝望模型证实了

表4 玉郎伞多糖对小鼠海马神经元数目的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

个/400倍视野

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	海马各区神经元计数		
		CA1	CA3	DG
正常对照	-	44.3 ± 3.1	34.8 ± 3.1	55.0 ± 3.2
模型	-	38.9 ± 2.9 ¹⁾	27.9 ± 3.5 ²⁾	48.1 ± 2.9 ²⁾
氟西汀	20	44.1 ± 4.5 ³⁾	34.2 ± 3.2 ⁴⁾	54.7 ± 4.1 ⁴⁾
YLSPA	1 200	43.9 ± 3.6 ³⁾	34.1 ± 4.5 ⁴⁾	54.2 ± 3.2 ⁴⁾
	600	43.7 ± 3.6 ³⁾	33.9 ± 4.6 ⁴⁾	53.9 ± 4.7 ⁴⁾

YLSPA对“行为绝望”动物模型有明显的抗抑郁作用。FST和TST是评价抗抑郁药作用最为常用的两种模型。“行为绝望”动物模型其原理是通过给动物施以无法逃避的应激刺激造成动物的行为绝望而模拟人类的抑郁症症状,又称行为绝望抑郁动物模型。因FST和TST的实验操作较为简单、条件易于控制,且多种抗抑郁药急性给予后反应较为敏感,常用于抗抑郁药物的初筛^[5-6]。而本实验采用的CUMS模型是国际上公认的抑郁症模型,主要模拟了人类抑郁的核心症状即快感缺乏,同时模拟了其他重症抑郁障碍的症状表现。该模型可持续几个月,基本符合抑郁模型的要求,是目前国内文献中常用的模型^[7-8]。

本实验采用CUMS加孤养模型建立抑郁症小鼠模型,21d后抑郁模型组小鼠自主活动实验中的活动次数、站立次数、蔗糖水消耗量、体重均明显减少。活动次数反映了动物的活动度,站立次数反映了动物对新鲜环境的好奇程度,糖水消耗量则是评价快感缺乏的有效客观指标。这些表现说明动物表现出抑郁状态、兴趣丧失和快感缺乏,与抑郁症的核心症状:心情低落、兴趣缺乏以及快感丧失等有一定程度的相似性,表明小鼠抑郁症模型复制是成功的,与文献报道相一致^[9]。YLSPA高、低剂量组小鼠的体重,活动站立次数、糖水偏爱度与模型组相比均显著增加。本实验结果显示玉郎伞多糖能明显改善抑郁模型小鼠的行为,具有抗抑郁作用,为玉郎伞多糖治疗抑郁症提供了部分实验依据。

海马是边缘系统中的一个重要组成结构,担当着关于记忆以及空间定位的作用,与学习记忆密切相关。许多精神类疾病都会引起海马形态结构的改变。临床研究表明,抑郁症病人海马容积缩小,神经元萎缩死亡,且其程度与抑郁持续时间呈正相关,这可能与海马神经元受到损害有关,而抗抑郁剂能缓解海马神经元萎缩及逆转应激诱导的海马体积的减

少^[10-11]。据相关文献报道^[12],慢性应激可引起海马神经元损伤及海马结构发生病理改变,主要表现在海马细胞结构不完整,排列紊乱、细胞萎缩和死亡。本实验结果显示,经21天慢性应激后模型组小鼠海马CA1、CA3区锥体细胞和DG区颗粒细胞明显固缩,排列稀疏,细胞数量减少。玉郎伞多糖组小鼠海马的形态结构明显改善,细胞数量增加。实验结果与文献报道基本一致,说明造模成功。玉郎伞多糖组能有效对抗慢性应激引起的海马神经元损伤和病理结构的改变,但其保护机制有待系统、细致的深入研究。

[参考文献]

- [1] 林兴,蒋伟哲,焦杨,等.玉郎伞多糖的分离纯化和组成性质研究[J].时珍国医国药,2009,20(4):901.
- [2] 梁霜,王乃平,黄仁彬,等.玉郎伞多糖抗抑郁作用研究[J].时珍国医国药,2010,21(1):241.
- [3] 韩明飞,高东,孙学礼.应激抑郁动物模型的建立与评价[J].华西医学,2008,23(4):901.
- [4] 李晓秋,许晶.抑郁症动物模型的研究进展[J].中华精神科杂志,2002,35(3):184.
- [5] 赵启铎,舒乐新.酸枣仁油对行为绝望小鼠模型的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(18):190.
- [6] 陆蕊杭,王丽娜.抑郁平胶囊对小鼠抗抑郁作用研究及有效部位的筛选[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(14):174.
- [7] 贾广成,郑兴宇,周玉枝,等.逍遥散对CUMS模型大鼠行为学及血浆内单胺类神经递质的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(6):136.
- [8] 赵博,冯秀萍,李建国,等.抗郁散对CUMS大鼠T₃/T₄/TSH的影响[J].药理毒理,2010,1(4):33.
- [9] Forbes N F, Stewart C A, Matthews K, et al. Chronic mild stress and sucrose consumption: validity as a model of depression[J]. Physiol Behav, 1996, 60: 1481.
- [10] 张艳美.慢性应激、大脑损害与抑郁症[J].国外医学:神经病学分册,2001,28(2):105.
- [11] Czeh B, Michaelis T, Watanabe Y, et al. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 12796.
- [12] 肖爱娇,施旻,闵建新,等.抑郁症模型大鼠学习记忆力及海马形态结构的变化[J].江西医学院学报, 2009, 49(1): 4.

[责任编辑 聂淑琴]