

加味温胆汤对抑郁模型大鼠海马神经细胞内 钙离子浓度的影响

张丽萍¹, 武丽^{2*}, 张曼³, 吴沛然¹, 汤久慧¹

(1. 天津中医药大学, 天津 300073; 2. 广西中医学院, 南宁 530001; 3. 甘肃省中医院, 兰州 730000)

[摘要] 目的:探讨加味温胆汤对抑郁模型大鼠海马神经细胞内 Ca^{2+} 浓度干预作用。方法:198只SD大鼠随机分为空白组、模型组、中药组、西药组,每组48只。采用孤养结合慢性不可预见性应激造模抑郁模型大鼠,从造模第1天开始中药组给予加味温胆汤 $12\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,西药组予氟西汀 $1.8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,模型组、空白组给予生理盐水 $2\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,各组均灌胃给药,连续28日。在实验第7,14,21,28天,采用激光共聚焦技术检测各组大鼠海马 Ca^{2+} 浓度变化情况。结果:在抑郁形成过程中,抑郁大鼠海马 Ca^{2+} 浓度不断上升,21,28 d时,模型组 Ca^{2+} 荧光强度明显高于空白组 ($P < 0.01$);经治疗干预,抑郁大鼠海马 Ca^{2+} 荧光强度上升趋势得到抑制,21,28 d时,中、西药组 Ca^{2+} 荧光强度低于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:在抑郁形成过程中,海马神经元游离 Ca^{2+} 浓度明显升高,加味温胆汤可能通过抑制海马神经细胞 Ca^{2+} 大量内流,阻止其超载,改善神经可塑性而发挥其抗抑郁效应。

[关键词] 抑郁症; 加味温胆汤; 海马; Ca^{2+} ; 激光共聚焦

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0188-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121030.1142.001.html>

[网络出版时间] 2012-10-30 11:42

Effect of Jiawei Wendan Decoction on Intracellular Calcium Concentration in Rat Depression Model

ZHANG Li-ping¹, WU Li^{2*}, ZHANG Man³, WU Pei-ran¹, TANG Jiu-hui¹

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Tianjin 300073, China;

2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;

3. Gansu Province Hospital of TCM, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To probe the intervention effects of Jiawei Wendan decoction on intracellular calcium concentration of hippocampal neuron in rat depression model. **Method:** A total of 196 Sprague-Dawley rats were equally and randomly assigned to four groups: blank control, model, traditional Chinese medicine treatment group, and western medicine treatment group. Depression model was established, except for the blank group, by independent feeding and chronic stress for 21 days. In addition, traditional Chinese medicine and western medicine treatment were administered by Jiawei Wendan decoction $12\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ and fluoxetine $1.8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, respectively. Model and control group were treated with saline for 28 days. At the 7th, 14th, 21st, 28th day of the experiment, we detected changes of Ca^{2+} concentration in hippocampus neuron of each group by confocal laser technology. **Result:** During the progress of depression, the concentration of Ca^{2+} in depressive rat's hippocampus became higher and higher. At the 21st and 28th day, fluorescence intensity of Ca^{2+} in the model control group was higher than that of the blank group. After administration, this situation had been improved that

[收稿日期] 20120629(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973732)

[第一作者] 张丽萍,教授,博士生导师,主要从事中医情志病证的防治研究, Tel:022-59596257, E-mail:lipingz@sina.com

[通讯作者] * 武丽, Tel:15522658169, E-mail:wprlynn1987@163.com

fluorescence intensity of Ca^{2+} in Jiawei Wendan decoction-treated group and fluoxetine-treated group was both lower than that of the model control group at the 21st and 28th day ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** During the progress of depression, the concentration of Ca^{2+} increase obviously. Excessive influx of Ca^{2+} in hippocampus neuron can be inhibited by giving Jiawei Wendan decoction as to improve neuroplasticity for producing antidepressive effect.

[**Key words**] depression; Jiawei Wendan decoction; hippocampus; Ca^{2+} ; laser scanning confocal microscope

钙离子(Ca^{2+})作为第二信使物质不仅是重要的胞内信号传导因子,同时其在海马神经细胞内的离子稳态是调节细胞生理功能的重要物质基础,参与调节细胞膜通透性,影响环核苷酸及磷酸肌醇代谢,调控酶活性以及DNA合成等,是维持细胞各项代谢活动的必要条件^[1-2]。研究表明:细胞内 Ca^{2+} 积聚或者超载可导致包括神经元变性、坏死以及凋亡等在内的一系列神经元损伤,其机制多与通过激发CaMK信号转导通路活性有关^[3]。

近年来,激光共聚焦显微镜在医学和生物学研究方面的应用越来越广泛,其在不损伤细胞的前提下,对活组织、活细胞进行观察和测量,配合专用的分子探针,对于要检测的成分不仅可以定位到细胞水平,还可以定位到亚细胞水平和分子水平^[1]。因此,本实验选用新一代钙离子荧光染料Fluo-3/AM,运用激光共聚焦显微镜技术,观察和探讨了抑郁形成过程中大鼠海马神经细胞内 Ca^{2+} 浓度变化及加味温胆汤的干预机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级SD雄性大鼠192只,体质量(180 ± 20)g,由天津实验动物中心提供,许可证号SCXK(津)2010-0002。自由饮食,室温(20 ± 3)℃,光/暗周期为12h/12h(光照时间6:00~18:00)。

1.2 药物 加味温胆汤,药物组成:竹茹6g,法半夏10g,枳实10g,陈皮10g,远志6g,合欢花10g,茯苓15g,郁金10g,石菖蒲15g,厚朴10g,桃仁10g,片姜黄10g,(炒)酸枣仁12g,薏苡仁10g,经天津中医药大学中医药研究院中药植化室鉴定后,水煎浓缩为 $1.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 中药浸膏,置4℃冰箱内备用。氟西汀(美国礼来公司,20mg/粒),用前2h双蒸水新鲜配制。

1.3 仪器及试剂 FV100型激光共聚焦显微镜(日本奥林巴斯),UV-1800型紫外分光光度计(日本岛津),MPF-4型荧光分光光度计(日本日立)。抗荧光衰减封片剂(上海索莱宝生物科技有限公司,AR1109);Fluo-3/AM(Sigma, F6142);二甲基亚砷

(美国Sigma公司);D-Hanks液、胰蛋白酶、PBS液体均由中国中医科学院中药研究所提供。

2 方法

2.1 动物分组 按照随机数字表分组法,将大鼠随机分成空白对照组、模型对照组、中药治疗组、西药治疗组(以下简称为空白组、模型组、中药组、西药组),每组48只。中药组ig加味温胆汤 $12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,西药组ig氟西汀 $1.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,模型组、空白组ig生理盐水 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,持续28d。各组在实验第1天即开始行相应干预方法处理。

2.2 孤养结合慢性应激抑郁模型^[4] 大鼠均单笼饲养,采用24h禁食,24h禁水,通宵照明,4℃冷水游泳5min,45℃烘箱热烘5min,夹尾1min,高速水平振荡3min,100V电击足底1min,悬尾1min,共9种刺激方法,随机安排到21d内,每日1种,每种刺激至少出现2次,同种刺激不能连续出现,使动物不能预料刺激的发生。

2.3 检测指标与方法^[5]

2.3.1 激光共聚焦标本采集与处理 在实验第7,14,21,28天,每组取12只大鼠断头处死,迅速取出脑,在低温操作台上分离出双侧海马,用切片刀将CA3区切出,轻轻剔除脑膜及血管后置于冰PBS液中清洗2次。在冰上将海马剪成约 1 mm^3 小块,转入含5mL无血清DMEM/F12培养液的离心管内,加入等体积0.25%胰蛋白酶,用巴氏吸管轻轻吹打后,置37℃水浴箱内消化15~30min,每5min振荡1次。用5mL的1640培养液终止消化,巴氏吸管反复轻轻吹打至组织块基本消失。过200目不锈钢筛,将过滤后的清液离心,收集底部沉淀,PBS液洗两遍,用DMEM/F12培养基制成细胞悬液。

2.3.2 检测步骤 取上述培养海马神经细胞悬液1mL滴加到激光共聚焦显微镜专用培养皿中心孔内,立刻加入Fluo-3/AM液1μL,轻轻吹打均匀。放于37℃的培养箱中,避光负载15min后放置于共聚焦显微镜观察。选用激发光488nm,发射光为530nm进行检测海马神经细胞内 Ca^{2+} 浓度。将载

有样品的玻片固定在显微镜载物台上,在 100 × 高倍镜下的不同视野选择有绿色荧光的活细胞进行激光扫描。

2.3.3 数据采集方法 测得荧光度 R (样本测值), R_{\max} (加入 0.1 mL Triton-X100 震匀后测值) 及 R_{\min} (加入 0.1 mL EGTA 震匀后测值), 采用 FV10-ASW 2.0 Viewer 软件进行图像采集存盘, 数据分析采用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行。

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times (R - R_{\min}) \times (R_{\max} - R)^{-1}$$

K_d 为常数 224 nmol 计算。

2.4 数据处理 采用 SPSS 15.0 统计软件包进行统计学处理, 检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间差异显著性采用单因素方差分析, 用 Student-New man-Keuls 法进行组间的两两比较, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 统计学描述 在实验第 15 天时, 西药组 2 只大鼠因灌胃损伤死亡, 第 22 天中药组 1 只大鼠死亡, 解剖无特殊发现, 死亡原因不明, 此 3 只鼠数据不纳入统计。共 189 只大鼠进入分析。

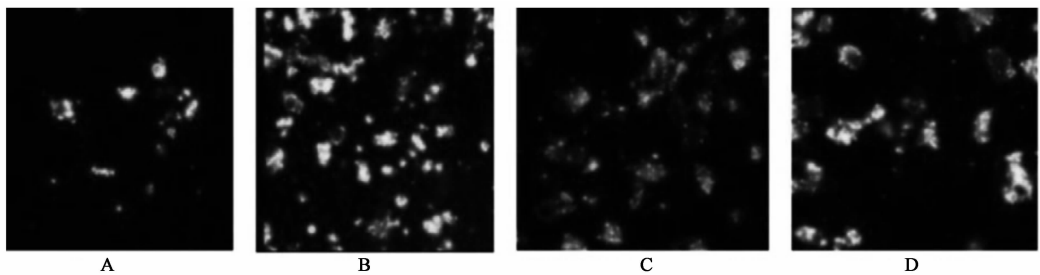
3.2 各组大鼠海马胞内 Ca^{2+} 浓度变化 在实验第 7, 14 天, 激光共聚焦显微镜观察到大鼠海马神经细胞内 Ca^{2+} 浓度变化不明显, 各组之间无明显统计学差异。21 d 时, 各组之间开始逐渐出现差异性: 与空白组比较, 模型组 Ca^{2+} 荧光强度明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 中、西药组 Ca^{2+} 荧光强度增加相对减少 ($P < 0.05$); 28 d 时, 与空白组比较, 模型组 Ca^{2+} 明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 中、西药组 Ca^{2+} 荧光强度明显减少 ($P < 0.01$); 中、西药组比较, 同时间段无明显统计学差异。见表 1, 图 1。

表 1 各组动物在实验各阶段 Ca^{2+} 浓度变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

nmol · L⁻¹

组别	剂量/g · kg ⁻¹	n	7 d	n	14 d	n	21 d	n	28 d
空白	-	12	135.4 ± 7.5	12	135.5 ± 7.2	12	136.4 ± 8.5	12	140.7 ± 8.3
模型	-	12	131.5 ± 7.6	12	140.4 ± 6.7	12	355.5 ± 8.3 ¹⁾	12	446.7 ± 8.5 ¹⁾
加味温胆汤	12	12	134.7 ± 5.9	12	141.1 ± 6.9	12	156.5 ± 8.7 ²⁾	11	264.2 ± 7.5 ³⁾
盐酸氟西汀	1.8 × 10 ⁻³	12	134.2 ± 6.8	12	141.2 ± 7.8	10	160.2 ± 8.7 ²⁾	10	271.5 ± 8.5 ³⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。



A. 空白对照组; B. 模型组; C. 加味温胆汤 12 g · kg⁻¹ 组; D. 盐酸氟西汀 1.8 mg · kg⁻¹ 组

图 1 第 28 天各组大鼠海马神经细胞内 Ca^{2+} 变化 (荧光染色, ×100)

4 讨论

在中枢神经系统中, 海马是与学习、记忆和情绪行为功能密切相关的重要脑区, 也是应激易累及损伤的主要靶区^[6]。细胞内 Ca^{2+} 积聚或者超载可引起包括神经元变性、坏死到迟发性在内的损伤, 主要由于 NMDA 是神经元内 Ca^{2+} 内流的通道, 过量的 Ca^{2+} 和 CaM 结合, 在 CaMK II 的诱导下激活 CREB 磷酸化, 最终导致神经元损伤, 从而影响抑郁患者的学习记忆能力^[7]。因此, 目前认为游离 Ca^{2+} 是引起细胞凋亡信号传递的重要成员之一^[8]。实验研究已表明: 抑郁模型大鼠海马神经元大量丢失, 海马突触体内游离钙浓度显著升高, 抑郁大鼠的抑郁行为

可能与海马神经细胞外 Ca^{2+} 大量内流, 细胞内 Ca^{2+} 浓度异常升高, 从而引起神经细胞凋亡有关^[9-10]。

本研究结果发现在抑郁形成过程中, 模型组大鼠海马神经细胞内的 Ca^{2+} 浓度增加明显, 加味温胆汤对此具有逆转作用, 且随着干预时间的延长, 至第 28 天效果进一步加强。结合同期相关研究发现: 在抑郁形成过程中, 抑郁大鼠海马 NMDA-NR1 mRNA/蛋白、CaM 蛋白、CaMK II 蛋白表达升高, CaMK 通路功能亢奋, 加味温胆汤的抗抑郁效应与降低 NMDA-NR1 mRNA/蛋白、CaM 蛋白、CaMK II 蛋白表达, 阻抑 CaMK 通路功能的作用同步。由此推断: 抑郁形成过程中, 海马神经元游离 Ca^{2+} 浓度

南寒水石炮制工艺及药效学初探

陈朝军, 陆景坤*, 高甜, 王芳, 张斌, 毅和
(内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010010)

[摘要] 目的: 优选南寒水石的炮制工艺, 并对其药效进行初步研究。方法: 通过四因素三水平的正交试验, 以煨后性状和 CaCO_3 含量作为观测指标对炮制方法进行评估。动物分为模型组、 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 雷尼替丁组、 $360.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 洁白丸成药组、 $334.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 去寒水石洁白丸组、 $26.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 河南产、浙江产和新疆产南寒水石组, 分别灌胃给予相应药物连续 7 d 后, 幽门结扎法建立大鼠胃液分泌增加模型, 观察寒水石对大鼠胃液分泌量、pH 值和胃液酸度的影响。结果: 南寒水石炮制后性状以质酥, 色白, 触及为细粉状为指标, 其最佳工艺条件为粉碎粒度为粉末(过 20 目), 温度为 $1\ 000\ ^\circ\text{C}$, 时间为 1.5 h; 除浙江产南寒水石对胃液排出量无影响外, 南寒水石各组和去寒水石洁白丸组均能显著引起幽门结扎大鼠胃液分泌量减少, pH 增加, 胃液总酸度和 1 h 酸排出量下降; 洁白丸组除可增加 pH 以外对其他指标无影响, 河南产南寒水石药效最优, 浙江产南寒水石表现欠佳。结论: 南寒水石对大鼠胃液分泌有抑制作用, 且不同产地南寒水石药效有所不同。

[关键词] 南寒水石; 炮制; 药效

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0191-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121029.1138.001.html>

[网络出版时间] 2012-10-29 11:38

Processing Technology and Pharmacodynamics of Hanshuishi

CHEN Zhao-jun, LU Jing-kun*, GAO Tian, WANG Fang, ZHANG Bin, YI He
(Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010010, China)

[收稿日期] 20120617(005)

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划重点项目(2008BAI55B02-16); 内蒙古自治区教育厅高等学校科学研究项目(NJ09110)。

[第一作者] 陈朝军, 教授, 从事无机化学研究, Tel: 13804746319, E-mail: chenchaojun18@163.com

[通讯作者] * 陆景坤, 硕士, 副研究员, 药理毒理学, Tel: 15248156805, E-mail: lujingkun909@sina.com

明显升高, 导致 CaMK 信号转导通路亢奋, 加味温胆汤可能通过抑制海马神经细胞 Ca^{2+} 大量内流, 阻止其超载, 抑制 CaMK 信号转导通路活性, 改善神经可塑性而发挥其抗抑郁效应。

[参考文献]

- [1] Maclennan D H. Ca^{2+} signaling and muscle disease[J]. Eur J Biochem, 2000, 267(17): 5291.
- [2] 王树荣, 王欣. 细胞内 Ca^{2+} 浓度的调节[J]. 中华现代中西医杂志, 2004, 2(8): 692.
- [3] 刘冰. 中枢神经系统钙稳态紊乱与神经损伤的研究进展[J]. 国外医学: 卫生学分册, 2006, 33(4): 193.
- [4] 郭晓云, 江开达. 慢性轻度应激抑郁动物模型研究进展[J]. 国际精神病学杂志, 2007, 34(6): 216.
- [5] 赵宇. 盐酸氟西汀调控神经干细胞信号通路及下游

基因表达的实验研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2009.

- [6] 陈嘉, 董文心. 抑郁药物对海马神经元保护作用的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(6): 441.
- [7] 耿战辉, 程义勇, 洪燕, 等. 心理应激时大鼠海马神经元的钙状态变化及锌的作用研究[J]. 营养学报, 2003, 5(1): 65.
- [8] 牛玉杰, 石年. 溴氰菊酯对大鼠神经细胞内游离钙的影响[J]. 卫生毒理学杂志, 2001, 15(4): 216.
- [9] 徐金影, 刘寿先. 抑郁大鼠海马神经元损伤及其机制[J]. 咸宁学院学报: 医学版, 2006, 20(4): 302.
- [10] 钟晓明, 毛庆秋, 黄真, 等. 苏郁胶囊对慢性应激抑郁模型大鼠海马神经细胞凋亡的影响[J]. 中国现代应用药学杂志, 2006, 23(8): 733.

[责任编辑 聂淑琴]