

逍遥散对慢性应激损伤大鼠促肾上腺皮质激素释放激素表达的影响

富文俊^{1*}, 敖海清¹, 孙琪², 徐志伟¹

(1. 广州中医药大学基础医学院, 广州 510006; 2. 宁夏医科大学中医学院, 银川 750004)

[摘要] 目的: 观察逍遥散对慢性应激损伤大鼠下丘脑室旁核促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)表达的影响。方法: 以逍遥散($5.265 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和糖皮质激素受体(GR)阻滞剂 RU-38486($12.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)为干预药物, 应用慢性不可预知应激对大鼠进行为期 3 周的造模, 在造模的同时给药。于第 22 天处死大鼠取材。采用原位杂交法测定各组大鼠下丘脑室旁核区 CRH mRNA 的表达。结果: 逍遥散可显著下调慢性应激损伤大鼠下丘脑室旁核 CRH 阳性表达。结论: 逍遥散可通过下调慢性应激损伤大鼠下丘脑室旁核区 CRH mRNA 表达而部分恢复慢性应激大鼠 HPA 轴负反馈功能。

[关键词] 逍遥散; 慢性应激; 促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0216-03

慢性应激发生时, HPA 轴兴奋性提高, 促肾上腺皮质激素释放激素(corticotrophin releasing hormone, CRH)分泌增多, 引起糖皮质激素水平升高, 从而动员储能, 适应应激反应。若机体长期处于应激状态, HPA 轴功能持续亢进, 高皮质酮/醇血症将对大脑海马神经元细胞造成严重损伤, 继发引起海马神经元内 *N*-甲基-*D*-天门冬氨酸受体(NMDAR)过度激活及海马神经元内糖皮质激素受体(iGR)表达减少或其活性降低, 引起 HPA 轴负反馈功能减弱, 而这将进一步加重高皮质酮/醇血症, 形成恶性循环。因此慢性应激损伤的一个重要环节即为高皮质酮/醇血症, 本研究以此为切入点, 用逍遥散和 GR-受体阻滞剂干预慢性应激损伤大鼠, 观察其下丘脑室旁核区促肾上腺皮质激素释放激素(CRH) mRNA 表达状况, 试图从 NMDAR-GC/GR(iGR)-HPAA 这一传导通路解释逍遥散对慢性应激的调控机制。

1 材料和方法

1.1 药物 逍遥散(太平惠民和剂局方所载原方), 药材均由广州中医药大学第一附属医院药房提

供。药材饮片制成粗粉, 6 倍蒸馏水浸泡 1 h, 武火急煎至沸腾后文火煎煮 2 h, 取汁后经 4 层纱布过滤; 药渣再以 4 倍蒸馏水文火煎煮 2 h, 同样过滤取汁, 合并 2 次滤液, 置水浴箱内浓缩至含生药 $0.53 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。冷却后, 置 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存备用。

1.2 试剂及仪器 CRH mRNA 检测试剂盒(MK-1614r, 武汉博士德有限公司), 浓缩型 DAB 试剂盒(TBD550, 购自武汉博士德有限公司), 原位杂交专用载、盖玻片(博士德公司), 湿盒(中山医科大学)。光学显微镜及摄像系统(IX 71 Olympus)。

1.3 分组及给药 SPF 级 Wistar 大鼠 40 只, 2 月龄, 南方医科大学实验动物中心提供, 动物合格证号 SCXK(粤)2006-009, 雄性, 体质量 $180 \sim 220 \text{ g}$, 按体质量随机分为 4 组: 正常对照组(生理盐水 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$); 应激模型组(生理盐水 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ig 后 1 h 再进行随机应激刺激); RU-38486 组应激 + RU-38486($12.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ig 后 1 h 再进行随机应激刺激); 逍遥散组应激 + 逍遥散(给予逍遥散 $5.265 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ig 后 1 h 进行随机应激刺激)。

1.4 慢性心理应激动物模型制备 慢性多相性应激源包括电击足底(电击笼, 中医基础理论教研室自制, 30 V, 电流强度 1.0 mA, 每隔 1 min 刺激 1 次, 每次持续 10 s, 共 30 次)、冰水游泳($4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 min)、束缚(6 h)、禁水(24 h)、禁食(24 h)。以上应激刺激每天 1 种, 随机安排在 21 d 内, 第 22 天取材。

1.5 标本的制备 用 10% 水合氯醛 ip 麻醉($35 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$), 开胸, 经左心室插管至升主动脉, 先

[收稿日期] 2011-04-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30801525); 广东省中医药强省基金项目(2007054); 广州中医药大学创新基金项目(K0070010)

[通讯作者] * 富文俊, 博士, 讲师, 从事情志致病机制研究, Tel: 15918464103, E-mail: fuqingzhu2006@163.com

用生理盐水 200 mL 灌注,再用 250 mL 含 4% 多聚甲醛的 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.2 ~ 7.6) 灌注,取脑,置于含 4% 多聚甲醛的 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 中 4 ~ 6 h,常规石蜡包埋,制片,片厚 $4 \mu\text{m}$ 。裱片后把切片置 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 烤箱中烤片 1 ~ 3 h,置室温下保存备用。

1.6 下丘脑室旁核(PVN)定位 以大鼠脑立体定位图谱为对照,大鼠脑立体定位仪坐标:以前囟为零点定位 PVN,坐标为:AP-1.8 mm(前囟后),LR-0.2 mm,H-7.9 mm(颅骨下),切片以 HE 染色观察校正。HE 染色后,可见一狭长的正中矢状裂,为第三脑室。一群密集细胞团位于第三脑室壁旁,呈楔型,为下丘脑室旁核分布。提示所选切片含 PVN,可选择相应切片进行下一步实验。

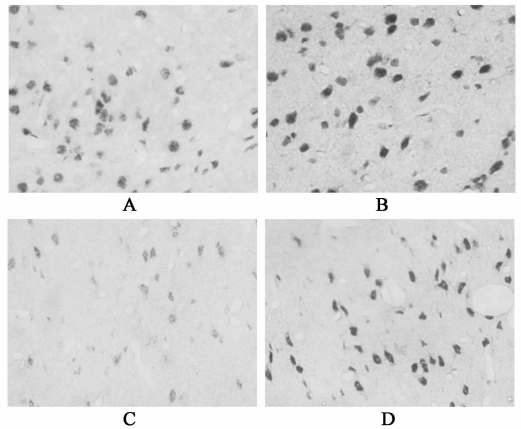
1.7 原位杂交检测 CRH mRNA 的表达 严格遵守试剂盒操作程序,实验操作过程中,所用的器具及溶液均高压灭菌或过滤除菌或高温 ($200 \text{ }^\circ\text{C}$) 烘烤,以消除 RNA 酶对试验结果的影响。

1.8 图像分析 采用 Imagepro plus 6.0 图像分析系统,对 CRH mRNA 阳性细胞进行半定量检测。每只随机观测 2 张制片,所有切片均在同一放大倍数 ($\times 400$),同一曝光强度下分析,鼠下丘脑室旁核区 CRH mRNA 阳性表达以阳性反应细胞平均吸光度 (A) 表示。

1.9 统计学方法 统计学分析运用 SPSS 13.0 等软件进行。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用方差分析,显著性水平取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

各组大鼠下丘脑室旁核区 CRH mRNA 的表达见表 1,图 1。棕黄色颗粒即为阳性染色的神经元,阳性染色主要在神经元的胞浆,少量见于胞核。正常组大鼠下丘脑 PVN 区阳性神经元较少,着色较浅,模型组 PVN 内的 CRH mRNA 表达量明显升高,PVN 区出现大量阳性染色的神经元,阳性神经元表达与正常组相比有明显差异 ($P < 0.05$);RU-38486



A. 空白组;B. 模型组;C. RU-38486 $12.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$;D. 逍遥散 $5.265 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

图 1 各组大鼠下丘脑室旁核区 CRH mRNA 的表达 (原位杂交 $\times 400$)

组阳性神经元表达较正常组减少,着色较浅;逍遥散组阳性神经元表达则介于正常组与模型组之间,着色较深,与模型组相比有显著性差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论

大量研究表明,慢性应激或长期外源性糖皮质激素处理可选择性损伤海马,使其神经细胞丢失,神经树突萎缩,突触点减少,GR 减少^[1-3]。所以,慢性应激可损伤海马在下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA) 轴反馈抑制中的作用。由于海马对 HPA 轴抑制功能减弱,一方面,可引起静息状态 HPA 轴昼夜节律中波谷期削弱或消失,从而使血浆糖皮质激素水平升高,另一方面,可引起海马应激关闭功能障碍,从而使 HPA 轴应激反应持久亢进,无论何者均使机体更多地处于高水平的糖皮质激素中,高水平的糖皮质激素不仅可直接损伤海马,而且可促进脑中兴奋性氨基酸释放^[4],造成海马乃至全脑兴奋性毒性。兴奋性氨基酸的释放和海马损伤的加重又可使 HPA 轴功能愈发亢进。可见,应激性海马损伤与 HPA 轴功能亢进是神经内分泌系统应激反应的恶性循环的结果。在此过程中糖皮质激素起着级联放大的作用。高水平的糖皮质激素既是应激性海马损伤的结果,又是海马损伤的原因。

本实验采用了多相寡核苷酸探针及长尾段标记法等技术,并配合使用敏感性加强的原位杂交检测方法,其结果比免疫组化更能反映 CRH 在组织和细胞中的分布。

既往的研究结果表明,以束缚限制活动空间,每天应激时间不固定并累加的方式,连续 2 周所造成

表 1 逍遥散对下丘脑室旁核区 CRH mRNA 原位杂交反应阳性神经元表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	A
正常	-	$0.5710 \pm 0.0077^{1)}$
模型	-	1.1186 ± 0.01202
RU-38486	12.5	$0.4810 \pm 0.00924^{1)}$
逍遥散	5.265	$0.6848 \pm 0.0649^{1)}$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

的慢性心理应激大鼠模型,可表现出抑郁状态,同时血浆皮质酮(CORT)、促肾上腺皮质激素(ACTH)和促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)含量升高,HPA轴功能亢进^[5]。

本研究在前期实验的基础上,探讨了慢性应激状态下大鼠下丘脑 CRH mRNA 表达的改变,及 GR 受体阻滞剂 RU-38486 与中药复方逍遥散对此改变的调节。结果显示,正常组大鼠下丘脑 PVN 区阳性神经元较少,着色较浅,模型组大鼠于应激后 PVN 内的 CRH mRNA 表达量明显升高,逍遥散阻阳性神经元平均 A 与模型组相比有显著性下降($P < 0.05$)。

研究结果提示在慢性应激状态下存在 CRH 表达增加,HPA 轴调节功能发生异常异常,而 CRH 的表达增多与 HPA 轴功能的失衡可能互为因果,为一恶性循环。RU-38486 与逍遥散可降低 CRH mRNA 的阳性表达,表明二者均可在应激的高位中枢海马发挥作用,诱导上升的 CRH mRNA 表达下调,恢复 HPA 轴的生理机制,防止海马结构和功能的进一步损害,但 RU-38486 的作用又强于逍遥散,其甚至可以使 CRH mRNA 表达水平低于正常水平。原因可能与其作为 GR 受体阻滞剂,作用通道单一,对 HPA 轴调节功能为单向调节有关,具体原因仍有待于进

一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 张建宁,孙红宇,杨树源,等. 糖皮质激素对大鼠海马神经元影响的体外研究[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2003,29(3):196.
- [2] Landfield P W, Eldridge J C. Evolving aspects of the glucocorticoid hypothesis of brain aging: hormonal modulation of neuronal calcium homeostasis [J]. Neurobiol Aging, 1994, 15(4):579.
- [3] Bodnoff S R, Humphreys A G, Lehman J C, et al. Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats [J]. J Neurosci, 1995, 15(1):61.
- [4] Stein-Behrens B A, Lin W J, Sapolsky R M, et al. Physiological elevations of glucocorticoids potentiate glutamate accumulation in the hippocampus [J]. J Neurochem, 1994, 63(2):596.
- [5] 徐志伟,严灿,李艳,等. 加味四逆散对慢性心理应激大鼠的神经内分泌和行为学的调整作用[J]. 广州中医药大学学报, 2002, 19(2):127.

[责任编辑 何伟]

本刊欢迎网上投稿

《中国实验方剂学杂志》2010 年正式施行网上投稿,请登录本刊网站 www.syfjxzz.com 注册会员,登陆采编系统之后按照提示在线投稿。本刊对网上来稿免收稿件处理费。编辑部对来稿有修改权。经审后,如录用,请按通知要求交纳论文发表费。详见本刊稿约。