

柴胡疏肝散干预卒中后抑郁模型大鼠海马神经细胞凋亡的机制研究

樊蔚虹*,姚建平,杨清,程凯
(河南中医学院,郑州 450008)

[摘要] 目的:探索柴胡疏肝散干预卒中后抑郁(PSD)模型大鼠海马神经细胞凋亡的机制及肝气郁结证与海马神经细胞凋亡的相关性。方法:健康雄性 SD 大鼠 100 只,随机分为 3 组:柴胡疏肝散组和 PSD 模型组各 40 只,正常对照组 20 只;除正常组外,其余 2 组先用线栓法制备局灶性脑缺血大鼠模型,手术 1 周后开始复合制备 PSD 大鼠模型,同时柴胡疏肝散组给予柴胡疏肝散 $7.875\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ ig}$,PSD 模型组给予蒸馏水 ig ,均 21 d;免疫组化法检测大鼠海马组织 Bcl-xs,Bcl-xl 蛋白的表达。结果:与正常对照组比较,PSD 模型组 Bcl-xs 蛋白表达升高,Bcl-xl 蛋白表达下降($P < 0.01$);与 PSD 模型组比较,柴胡疏肝散组 Bcl-xs 蛋白表达下降($P < 0.01$),Bcl-xl 蛋白表达升高($P < 0.01$)。结论:柴胡疏肝散对 PSD 模型大鼠海马 Bcl-xs,Bcl-xl 基因表达的调节作用可能是其干预海马神经细胞凋亡的机制之一;肝气郁结证是 PSD 的主要证型,且与海马神经细胞凋亡具有相关性。

[关键词] 卒中后抑郁;Bcl-xs;Bcl-xl;柴胡疏肝散;海马神经细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0216-03

脑卒中后抑郁症(post-stroke depression, PSD)是以精神和躯体症状相结合的复杂的神经精神情感障碍性疾病。是脑血管病的常见并发症之一。以情绪低落、兴趣减退、绝望、睡眠障碍、焦虑及躯体化症状为主要表现,发病率随脑卒中发病率的增高而增高。随着 MRI 等各种新技术的应用,已发现部分抑郁症患者存在脑组织形态结构的改变^[1],证明抑郁症并非完全是功能性疾病,海马神经细胞的损伤可能是诱发抑郁症的器质性基础^[2]。凋亡是细胞损伤的主要形式之一,本研究通过建立实验性 PSD 模型,以柴胡疏肝散为干预方药,观察 PSD 模型大鼠凋亡相关基因表达的变化,探索 PSD 与海马神经细胞凋亡的相关性,同时为肝气郁结证是 PSD 的主要证型提供佐证。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD 雄性大鼠,5~6 月龄,体重(300 ± 20)g,共 100 只。由河南省实验动物中心提供,合格证号 SCXK(豫)2005-0001。

1.2 药物及试剂 柴胡疏肝散方药组成参照《中医

方剂学》(第 7 版),组成:柴胡 6 g,陈皮 6 g,川芎 4.5 g,香附 4.5 g,枳壳 4.5 g,白芍 4.5 g,炙甘草 1.5 g;注射用青霉素钠(80 万 U/支,华北制药股份有限公司,批号 S0903307)。兔抗大鼠 Bcl-xl 亲和纯化抗体、兔抗大鼠 Bcl-xs 亲和纯化抗体,浓缩剂 $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (武汉博士德);ABC 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);DAB 显色试剂盒(C-0009-400 μL ,批号 375230A,北京博奥森生物技术有限公司)。**1.3 仪器** HM4440E 光学显微镜(Walldorf, Gemany),图像采集系统(Leica,德国),RM2145 自动切片机(Leica,德国),DHG-9031 电热恒温干燥箱(上海),BS224S 电子天平(德国)。

2 方法

2.1 分组及给药 大鼠适应性喂养 1 周,随机分为 3 组,即柴胡疏肝散组、PSD 模型组各 40 只,正常对照组 20 只。柴胡疏肝散组大鼠 $7.875\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}\text{ ig}$ (生药量,相当于 60 kg 成人剂量的 15 倍),PSD 模型组及正常对照组给予蒸馏水 ig ,在不可预测应激刺激的同时开始给药,连续 21 d。

2.2 PSD 大鼠模型的制备 线栓法制备局灶性脑缺血大鼠模型(MCAO)^[3],所有手术 2 d 内完成。局灶性脑缺血大鼠在清醒后移入小鼠笼内孤养 28 d,在卒中后第 8 天(神经功能缺损已基本恢复)相继给予共 21 d 的不可预测应激刺激处理。应激刺激参考文献[4]并做部分改进:电击足底(电流强度

[收稿日期] 2100-08-09

[基金项目] 河南省中医管理局继承与创新专项(HHZY0702-1);郑州市科技攻关项目(10PTGS485-5)

[通讯作者] *樊蔚虹,教授,硕士生导师,从事中医诊断及教学科研,Tel: 0371-65949704, E-mail: fwhong@hactcm.edu.cn

1 mA,电压 45 V,每隔 1 min 刺激 1 次,每次持续 10 s,共 30 次)、冰水游泳(4 ℃,3 min)、热应激(45 ℃烘箱,5 min)、摇晃(每次 1 s,共 15 min)、夹尾(每次 10 s,共 3 min)、禁水 24 h、禁食 24 h、昼夜颠倒共 8 种刺激,每日随机采用 1 种刺激方式,在整个刺激实验中,每种刺激给予 1~3 次。

2.3 免疫组化法检测 Bcl-xl, Bcl-xs 蛋白表达

2.3.1 标本的制备 大鼠造模及治疗结束后,ip 10% 水合氯醛麻醉,仰卧位固定于手术台上,“V”字形迅速剪开胸腔,充分暴露心脏,将灌注针头从左心尖部插入升主动脉,同时迅速剪开右心耳,用 37 ℃ 生理盐水 250~400 mL 向左心室加压灌注,待从右心耳流出液变成无色后,继续用 4 ℃ 预冷的 4% 的多聚甲醛溶液 200~250 mL 向左心室加压灌注,直至大鼠僵直,改为缓慢滴灌,整个灌注时间约 20 min。然后将其断头取脑,脑组织在 4 ℃,4% 的多聚甲醛溶液中固定 24 h。取右侧海马组织,梯度乙醇脱水、梯度二甲苯透明各 10 min,浸蜡(置于 60 ℃ 的石蜡)4 h,包埋,连续冠状切片,每片厚 5 μm。将切片贴在 APES 处理过的载玻片上,置于 37 ℃ 烤箱中 48 h,4 ℃ 保存备用。

2.3.2 大鼠海马区神经元免疫组织化学染色 将切片置二甲苯 I、二甲苯 II 各 20 min;100% 乙醇 10 min;95% 乙醇 5 min;90% 乙醇 5 min;80% 乙醇 5 min;70% 乙醇 5 min;蒸馏水冲洗 2~3 次;PBS(0.01 mol·L⁻¹ pH 7.4,下同)漂洗 3 次×5 min;3% 过氧化氢(甲醇稀释),常温下孵育 20 min;蒸馏水冲洗 3 次×5 min;PBS 漂洗 2 次×5 min;0.1 mol·L⁻¹ 枸橼酸缓冲液(pH 6.0)微波修复 10 min,自然冷却;滴加 10% 正常山羊血清 50 μL,湿盒内 37 ℃ 温箱孵育 20 min;甩除羊血清,不冲洗。分别加入兔抗大鼠 Bcl-xl 抗体、兔抗大鼠 Bcl-xs 抗体 50 μL,4 ℃ 冰箱孵育过夜;PBS 漂洗 3 次×5 min;滴加 ABC 试剂盒中 B,C 液 50 μL 于对应的切片上,湿盒内 37 ℃ 温箱孵育 30 min;PBS 漂洗 3 次×5 min;加入辣根过氧化物标记的链霉素卵白素 50 μL,湿盒内 37 ℃ 温箱孵育 30 min;PBS 漂洗 3 次×5 min;用 0.05% DAB-0.01 过氧化氢显色 2 min;自来水终止显色;梯度乙醇脱水;二甲苯 I, II, III 各透明 10 min;中性树胶封片,光镜观察。

2.3.3 阳性结果观测 经 DAB 显色后,细胞中出现棕黄色反应产物者为 Bcl-xl, Bcl-xs 免疫阳性。反

应产物颜色浅、颗粒稀疏者为阳性信号弱,反应产物颜色深、颗粒密集者为阳性信号强。每组取 6 张片,用显微照像系统对海马脑组织切片进行观察、照相,每张片取 5 个视野(×400),用 Biosens Digital Imaging System v16(上海山富科学仪器有限公司)图像分析系统对图像进行面积和吸光度(A)测量,计算阳性面积百分比和平均 IA。

2.4 统计学分析 数据处理采用 SPSS 13.0 统计软件统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 描述,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 PSD 大鼠海马神经细胞 Bcl-xs 蛋白表达的影响 与正常对照组比较,模型组 Bcl-xs 蛋白表达显著增强($P < 0.01$);与模型组比较,柴胡疏肝散组 Bcl-xs 蛋白表达显著减弱($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 柴胡疏肝散对模型大鼠海马神经细胞 Bcl-xs 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	阳性面积 /%	IA
正常对照	-	8.67 ± 2.93 ¹⁾	97.19 ± 3.36 ¹⁾
模型	-	54.75 ± 2.62	154.30 ± 4.09
柴胡疏肝散	7.875	22.98 ± 4.12 ¹⁾	115.44 ± 14.25 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 对大鼠海马神经细胞 Bcl-xl 蛋白表达的影响 与正常对照组比较,模型组 Bcl-xl 蛋白表达显著减弱($P < 0.01$);与模型组比较,柴胡疏肝散组 Bcl-xl 蛋白表达显著增强($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 柴胡疏肝散对模型大鼠海马神经细胞 Bcl-xl 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	阳性面积 /%	IA
正常对照	-	18.25 ± 2.60 ¹⁾	119.79 ± 4.48 ¹⁾
模型	-	11.51 ± 2.98	101.92 ± 2.46
柴胡疏肝散	7.875	59.00 ± 4.20 ¹⁾	140.15 ± 15.85 ¹⁾

4 讨论

细胞凋亡是由很多基因直接参与的一个复杂的网络调控系统,涉及一系列蛋白的激活、表达以及调控等作用。Bcl-xl 基因是近几年发现的 Bcl-2 家族的重要成员。大量细胞凋亡研究表明,在内源性凋亡途径中,Bcl-xl 通过拮抗 Bcl-2 家族促凋亡蛋白(如 Bax, Bcl-xs)以稳定线粒体外膜,在死亡配体诱导的外源性凋亡途径中,Bcl-xl 通过干扰死亡诱导信

号复合体 DISC (death-inducing signing complex) 的组装,从而抑制了半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 caspase-8 (cysteiny lasparate specific proteinase-8) 的活性,发挥其抗凋亡的作用^[5]。Bcl-xs 是 Bcl-xl 的逆向调节剂,具有促进凋亡的作用^[6]。Bcl-xs 对细胞凋亡的促进作用需要 BH3 同源区和柔性环区 (flexible loop domain) 的参与,结合之后能够消除 Bcl-xl 的细胞凋亡抑制作用^[7]。

通过对 Bcl-xl 及 Bcl-xs 蛋白间相互作用的研究发现,Bcl-xl 与 Bcl-xs 这两类蛋白的比例影响着细胞受到各种凋亡刺激因子刺激时的敏感性或拮抗性,决定着 caspase 的活性,此酶的活化是细胞不同凋亡途径的最后通路^[8],决定着是否发生凋亡。机体在受到各种应激刺激时,Bcl-xl 及 Bcl-xs 之间的动态平衡被打破,从而导致海马组织功能受损,引起抑郁。

本实验结果显示,与正常对照组比较,PSD 模型组大鼠海马神经细胞 Bcl-xs 蛋白阳性表达升高,Bcl-xl 蛋白表达下降,表明细胞凋亡趋势增强;与 PSD 模型组比较,柴胡疏肝散组 Bcl-xs 蛋白表达明显下降,Bcl-xl 蛋白表达升高,表明柴胡疏肝散对两类凋亡基因有显著的调节作用,说明柴胡疏肝散有可能通过调节凋亡相关基因的表达减轻海马神经细胞损伤,进而改善 PSD 大鼠抑郁状态。

[参考文献]

[1] 夏军,陈军,周义成,等. 抑郁症患者海马及杏仁核容积

异常的 MRI 研究[J]. 中华放射学杂志,2005,39(2): 140.

- [2] Hayley S, Poulter M O. The pathogenesis of clinical depression: stressor and cytokine induced alterations of neuroplasticity[J]. Neuroscience, 2005,135(3):659.
- [3] 谢婷,赵琰,屈会化,等. 一种新的线栓法制备大鼠大脑中动脉缺血模型方法[J]. 实验动物与比较医学,2008,28(2):80.
- [4] Katz R J, Roth K A. Acute and chronic stress effects on open-field activity in the rat: Implications for a model of depression[J]. Neurosci Biobehav Rev,1981,5(2):247.
- [5] Wang X, Zhang J, Kim H P, et al. Bcl-xi disrupts death-inducing signal complex formation in plasma membrane induced by hypoxia/reoxygenation[J]. FASEB,2004,18: 1826.
- [6] Reed J C, Miyashita T, Cuddy M, et al. Regulation of p26-bcl-2 protein levels in human peripheral blood lymphocytes[J]. Lab Invest,1992,67(4):443.
- [7] Minn A J, Boise L H, Thompson C B. Bcl-x (S) anatagonizes the protective effects of Bcl-x(L) [J]. Biol Chem,1996,271(11):6306.
- [8] Sato T, Hanada M, Bodrug S, et al. Interactions among members of the bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1994,91: 9238.

[责任编辑 何伟]