

舒郁胶囊对抑郁情绪模型大鼠海马和下丘脑内 5-羟色胺 3B 受体分布与表达的影响

谭倩, 张惠云*

(山东中医药大学 中医药经典理论教育部重点实验室, 济南 250355)

[摘要] 目的:检测抑郁情绪模型大鼠海马、下丘脑内 5-羟色胺 3B 受体(5-HT_{3B}R)蛋白分布、表达的变化,初步探讨舒郁胶囊对抑郁情绪的干预机制。方法:筛选大鼠进入实验,分为正常组、模型组、舒郁胶囊组(0.4 g·kg⁻¹)、氟西汀组(0.002 g·kg⁻¹),采用慢性温和性刺激法(chronic mild stress, CMS)制备抑郁情绪大鼠模型,以造模前后体重及糖水偏好值评价模型,采用免疫荧光技术检测大鼠海马和下丘脑内 5-HT_{3B}R 的表达分布,以平均荧光强度(MFI)为指标对各组大鼠海马和下丘脑内 5-HT_{3B}R 进行定量。结果:与正常组大鼠相比,模型组大鼠体重显著减轻($P < 0.01$),糖水摄入量也显著减少($P < 0.01$),5-HT_{3B}R 蛋白在海马和下丘脑中的表达水平显著升高($P < 0.01$);与模型组相比,舒郁胶囊组和氟西汀组大鼠体重增长显著($P < 0.01$),糖水摄入量显著增加($P < 0.01$),5-HT_{3B}R 蛋白在海马和下丘脑中的表达水平明显降低($P < 0.01$),但两组之间没有显著性差异。结论:5-HT_{3B}R 表达水平的上调可能与抑郁情绪的产生关系密切;舒郁胶囊可对抑郁情绪模型大鼠海马、下丘脑 5-HT_{3B}R 表达水平的变化起到纠正作用。

[关键词] 抑郁情绪;舒郁胶囊;5-羟色胺 3B 受体

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0137-04

[收稿日期] 20110324(013)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助课题(2011CB505102);国家自然科学基金重点项目(30930110);国家自然科学基金面上项目(30973688);山东省科技发展计划项目(2010GSF10290)

[第一作者] 谭倩, 硕士在读, 从事中药调肝方药药理研究, Tel: 13853102641, E-mail: tanqian124@163.com

[通讯作者] * 张惠云, 教授, 博士生导师, 从事中药调肝方药药理研究, Tel: 0531-89628596, E-mail: zhuiyun@163.com

好的量效关系。通过对所得实验结果的分析, 肠激安提取物有利于腹泻型 IBS 的治疗和恢复。

[参考文献]

- [1] Bensoussan A, Talley N J, Hing M, et al. Chinese herbal medicine & irritable bowel syndrome[J]. JAMA, 1998, 280(18):1585.
- [2] 颜廷彦. 中西医结合治疗肠易激综合征临床研究[J]. 临床合理用药杂志, 2009, 2(18):59.
- [3] 李合国, 虞坚尔. 整肠灵对脾胃虚寒型大鼠肠易激综合征的胃肠激素影响[J]. 河南大学学报: 医学科学版, 2002, 21(3):11.
- [4] 谢建群, 陆雄, 龚丽萍, 等. 健脾温中法对脾胃虚寒型肠

易激综合征模型大鼠血管活性肠肽影响的实验研究[J]. 上海中医药大学学报, 2003, 17(4):49.

- [5] 龚剑峰, 朱维铭, 刘放南, 等. D-木糖吸收试验评价短肠综合征病人的吸收功能[J]. 中国新药与临床杂志, 2010, 20(1):88.
- [6] 盛惟, 黎明, 扬志燕. 木糖吸收实验方法的探讨[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(2):112.
- [7] 史正刚, 赵敏. 泻舒宁颗粒对胃肠运动及吸收功能的影响[J]. 中国中医药杂志, 2008, 6(2):28.
- [8] 李庆生, 李静平. 从“肤敏膏”的研发探析中药复方研究中的量效关系问题[J]. 中药材, 2008, 31(1):111.

[责任编辑 聂淑琴]

Effect of Shuyu Capsule on Location and Expression of 5-hydroxy Tryptamine_{3B} Receptor in Hippocampus and Hypothalamus Regions in Rats with Depression Emotion

TAN Qian, ZHANG Hui-yun*

(Key Laboratory for Classical Theory of Traditional Chinese Medicine of Education Ministry, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the changes in protein location and expression level of 5-hydroxy tryptamine_{3B} receptor in related regions of hippocampus and hypothalamus in rats with depression emotion (DE), to explore the intervention mechanism of Shuyu capsule for treating DE preliminarily. **Method:** The Wistar rats were divided into normal group, model group, Shuyu capsule group (0.4 g·kg⁻¹) and fluoxetine group (0.002 g·kg⁻¹). Then we used the chronic mild stress (CMS) to establish the DE model in rats, and then the rats were evaluated by sucrose intake and the body weight from beginning to the end for the model. We adopted the immune fluorescence to detect the protein distribution and expression levels of 5-HT_{3B} receptor in related region of hippocampus and hypothalamus, and to calculate the content of the receptors in the regions by the mean fluorescence intensity (MFI) as the index. **Result:** Compared with the normal group, the body weight of rats in DE model group lessened significantly ($P < 0.01$), the sucrose intake of preference also decreased obviously ($P < 0.01$), the expression of the receptor of 5-HT_{3B} had a significant increase in hippocampus and hypothalamus ($P < 0.01$). Compared with the model group, in the Shuyu capsule group and fluoxetine group, the body weight of rats in DE model group increased significantly ($P < 0.01$), the sucrose intake of preference also increased obviously ($P < 0.01$), the expression of the receptor of 5-HT_{3B} was increased markedly in hippocampus and hypothalamus ($P < 0.01$), however, there was no statistical differences in the two treatment groups. **Conclusion:** The high expression of 5-HT_{3B} receptor may have close relationship with DE, and Shuyu Capsule can correct the high expression of the 5-HT_{3B} receptor protein in the hippocampus and hypothalamus of DE model in rats.

[Key words] depression emotion; Shuyu capsule; 5-hydroxy tryptamine_{3B} receptor

抑郁情绪 (depression emotion) 以情感低落、抑郁悲观为特征, 如果持续时间较长又称抑郁心境, 是抑郁症、恶劣心境的核心症状^[1]。5-HT 是一种重要的中枢神经递质, 参与多种行为、情绪活动的调节, 而 5-HT 受体 (5-HTR) 在抑郁症的病因以及抗抑郁药物的机制研究中至关重要^[2]。舒郁胶囊具有疏肝解郁、调畅情志的作用。本研究用舒郁胶囊干预抑郁情绪大鼠模型, 以氟西汀做对照, 用免疫荧光化学方法观察大鼠海马和下丘脑中 5-HT_{3B} 受体阳性细胞的分布表达, 以进一步探讨舒郁胶囊抗抑郁的作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 Wistar 大鼠, 180 ~ 220 g, SPF 级, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证号 SCXK (京) 2002-0003。

1.2 药品及试剂 舒郁胶囊, 由白芍、柴胡、香附、甘草组成 (新药临床批件号 2008L11169); 氟西汀 (礼来苏州制药有限公司, 批号 H20050463); 5-HT_{3B} 多克隆一级抗体 (santa cruz, SB90078); FITC 标记山羊抗兔 IgG (北京中杉生物技术有限公司, ZF-0311); 封闭用正常山羊血清工作液 (北京中杉生物技术有限公司, ZLI-9022); 碘化丙啶 (PI, 北京中杉生物技术有限公司, ZLI-9038); 抗荧光衰减封片剂 (武汉博士德, AR1109)。

1.3 仪器 转轮式切片机 (LEICA, RM2015); 共聚焦激光扫描显微镜 (LSM510)。

2 方法

2.1 抑郁情绪大鼠模型制备及给药 雄性大鼠 28 只, 单笼饲养, 自由饮食饮水, 温度 (21 ± 2) °C, 光照时间 8:00-20:00。大鼠饲养 1 周以适应环境, 应激

操作开始前,称量体重,记录糖水摄入量,然后根据体重及糖水基线分为4组,每组7只,即正常对照组、抑郁情绪模型组、舒郁胶囊给药组、氟西汀给药组。除正常对照组外各组共接受3周的不同应激,包括频闪光刺激(100次/min)、持续光照刺激(24h)、脏笼刺激(垫料上倾倒200mL水)、陌生异物刺激(包括明亮玻璃球、碎布条、木块等)、噪声刺激(85dB)、倾斜鼠笼刺激(倾斜45度)、夹尾(1min)、限制进食2h(3片饲料)等,每日用其中的2~5种应激源进行刺激,3周后再次称量体重及记录糖水摄入量,并计算糖水偏好值(糖水偏好值=糖水摄入量/(糖水摄入量+纯水摄入量)。期间舒郁胶囊组和氟西汀组分别接受ig给药,舒郁胶囊0.4g·kg⁻¹,氟西汀0.002g·kg⁻¹,正常组和造模组均给予等量生理盐水。

2.2 脑组织处理及切片 末次给药24h后,各组大鼠麻醉后进行心脏灌流;先用200mL生理盐水速灌冲洗血液,再以输液器注入350mL固定液(4%多聚甲醛-0.1mol·L⁻¹磷酸缓冲液pH7.4),至大鼠身体僵直,迅速剥离鼠脑,置于上述固定液中4℃保存;常规洗涤脱水,石蜡包埋,5μm连续切片。

2.3 免疫荧光技术检测5-HT_{3B}R的表达 石蜡切

片常规脱蜡,使用微波炉进行抗原热修复,纯水冲洗后滴加正常山羊血清封闭20min,滴加一抗稀释液(1:50),4℃过夜。PBS洗涤,滴加FITC标记的二抗稀释液(1:50),烤箱37℃孵育30min。PBS洗涤,滴加PI,烤箱37℃孵育20min。PBS充分冲洗,用抗荧光衰减封片剂进行封片。

2.4 图像分析 激光共聚焦显微镜下选择海马、下丘脑区域,观察5-HT_{3B}R的分布状态。同时,每张切片每个脑区选取3个不同的视野,进行拍照。使用Image-Pro Plus6.0进行半定量统计分析,计算相对荧光强度(MFI=IA/area)。

2.5 统计方法 用GraphPad Prism 5统计软件进行单因变量多因素方差分析和LSD法检验,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著性水平为 $P < 0.05$ 。

3 结果

3.1 各组大鼠体重及糖水偏好值比较 造模前各组大鼠体重及糖水偏好值无显著性差异,经过21d慢性应激之后,与正常组相比,模型组体重下降($P < 0.01$)、模型组大鼠糖水摄入显著降低($P < 0.01$)。与模型组大鼠相比,造模同时给予舒郁胶囊和氟西汀的大鼠,体重增长显著($P < 0.01$),糖水摄入量明显增多($P < 0.01$)。见表1。

表1 各组大鼠体重及糖水偏好值比较($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	应激前		应激后	
		体重/g	糖水偏好值	体重/g	糖水偏好值
正常	-	183.10 ± 8.28	0.49 ± 0.25	297.11 ± 14.10	0.74 ± 0.11
模型	-	185.20 ± 6.33	0.58 ± 0.30	214.47 ± 7.54 ¹⁾	0.25 ± 0.07 ¹⁾
舒郁胶囊	0.4	182.02 ± 8.86	0.67 ± 0.12	244.3 ± 9.45 ²⁾	0.80 ± 0.08 ²⁾
氟西汀	0.002	180.07 ± 6.65	0.63 ± 0.25	241.58 ± 4.58 ²⁾	0.83 ± 0.09 ²⁾

注:与正常组相比¹⁾ $P < 0.01$;与模型组相比²⁾ $P < 0.01$ (表2同)。

3.2 免疫荧光检测

3.2.1 各组大鼠不同脑区5-HT_{3B}R的定位分布 各组大鼠海马和下丘脑区域中5-HT_{3B}R的分布模式无明显变化,主要位于神经元的细胞核外,还有少量位于核内,细胞形态为点状、梭状或不规则状,在下丘脑中均匀分布,在海马中主要分布在锥体细胞部位。

3.2.2 各组大鼠海马、下丘脑5-HT_{3B}受体阳性细胞相对荧光强度比较 与正常组大鼠相比,模型组海马和下丘脑5-HT_{3B}R的MFI显著升高($P < 0.01$, $P < 0.01$)。给予舒郁胶囊和氟西汀后,与模型组大鼠相比,海马、下丘脑5-HT_{3B}R的MFI均显著降低

($P < 0.01$);而2给药组之间无明显差异。见表2。

表2 各组大鼠海马区、下丘脑区平均荧光强度(MFI)的比较($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	海马	下丘脑
正常	-	0.1366 ± 0.018	0.1072 ± 0.039
模型	-	0.2045 ± 0.025 ¹⁾	0.1974 ± 0.024 ¹⁾
舒郁胶囊	0.4	0.1285 ± 0.020 ²⁾	0.1269 ± 0.031 ²⁾
氟西汀	0.002	0.1474 ± 0.017 ²⁾	0.1254 ± 0.017 ²⁾

4 讨论

本研究采用慢性温和性刺激法建立抑郁情绪大鼠模型。经过21d的慢性应激,与正常组相比,模型组大鼠体重明显降低($P < 0.01$),糖水摄入量显著降

低 ($P < 0.01$), 说明造模后大鼠体重增长缓慢, 这与临床抑郁患者食欲下降, 体重减轻症状相似, 糖水摄入量减少, 说明该模型模拟了临床抑郁患者快感缺失, 以上证实了本实验成功复制了抑郁情绪大鼠模型。

5-HT 是神经系统内的一种重要的单胺类神经递质, 普遍认为中枢神经系统内的 5-HT 神经系统发生紊乱可能导致一系列不良情绪诸如: 焦虑、抑郁、恐惧等^[3-5]。中枢的 5-HT_{3B}R 被认为是治疗多种情绪精神障碍、认知功能障碍、药物滥用与停用、特定疼痛等病症的潜在靶点^[6-7]。5-HT_{3B}R 在啮齿类动物前脑的表达以海马为主, 而在大脑皮层、尾状核、下丘脑、小脑等部位也有分布, Fordl 等^[8]提出海马结构的改变在抑郁障碍发生病因中起主要作用, 而下丘脑被认为是情绪的躯体反应和内脏反应的整合部位^[9], 所以海马和下丘脑区域与情绪反应密切相关, 因此本实验选择观察 5-HT_{3B}R 在海马和下丘脑内的表达。

中医普遍认为, 抑郁以肝气郁结、情志不疏、气机郁滞为主因^[10], 舒郁胶囊是名老中医博士生导师张珍玉教授根据多年的诊治经验研发的国内治疗抑郁症之肝郁气滞证的经验之方, 该方由白芍、柴胡、香附、甘草组成, 中医认为柴胡具有行气疏肝解郁之功效, 香附理气疏肝, 可助柴胡以解肝郁, 增其行气止痛之功效, 白芍与柴胡同用, 可养血柔肝, 缓中止痛。本研究采用免疫荧光化学技术, 检测了抑郁情绪大鼠 5-HT_{3B}R 蛋白在海马、下丘脑中的分布与表达, 通过平均荧光强度 MFI 的检测, 表明模型大鼠 5-HT_{3B}R 在海马、下丘脑蛋白表达水平均有显著升高 (均 $P < 0.01$), 由此推测抑郁情绪的发生可能与 5-HT_{3B}R 蛋白上调有关。进一步分析可发现, 给予舒郁胶囊和氟西汀后, 与模型组大鼠相比, 海马、下丘脑中 5-HT_{3B}R 的 MFI 显著降低 (均 $P < 0.01$); 而两给药组之间无明显差异。说明经调肝方药舒郁胶囊干预能纠正该受体蛋白表达水平异常升高的状态,

其作用效果与阳性药氟西汀无显著差异, 由此推测使 5-HT_{3B}R 蛋白表达下调可能是舒郁胶囊缓解抑郁情绪的作用机制, 但是对于舒郁胶囊中各中药配伍后的具体作用靶点还不是很明确, 在下一步的工作中可以尝试用药物单体与血清药理学相联系, 研究相关基因的下游信号转导通路等, 以做更进一步的探讨。

[参考文献]

- [1] 田青, 包祖晓. 抑郁情绪的中医学认识[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(9): 1360.
- [2] 张崇燕. 逍遥散及其组方抗抑郁作用与 5-HT_{1A/2A} 分子机制的实验研究[D]. 四川: 成都中医药大学, 2006.
- [3] 李慧, 林凌云, 张印南, 等. 抑郁模型大鼠脑内色氨酸及 5-羟色胺的改变[J]. 中华神经科杂志, 2006, 39(4): 233.
- [4] Berton O, Nestler E J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines [J]. Nat Rev Neurosci, 2006, 7(2): 137.
- [5] Pittenger C, Duman R S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms [J]. Neuropsychopharmacology, 2008, 33(1): 88.
- [6] Hornby P J. Central neurocircuitry associated with emesis [J]. Am J Med, 2001, 111(8): 106S.
- [7] Thompson A J, Lummis S C. The 5-HT₃ receptor as a therapeutic target [J]. Expert Opin Ther Targets, 2007, 11(4): 527.
- [8] Frodl T, Meisenzahl E M, Zetsche T, et al. Hippocampal changes in patients with a first episode of major depression [J]. Am J Psychiatry, 2002, 159(7): 1112.
- [9] 吴斌. 大鼠杏仁核-下丘脑神经通路研究[J]. 自然科学杂志, 2000, 201(1): 75.
- [10] 乔明琦. 肝气逆、肝气郁两证客观指标实验研究[J]. 山东中医学院学报, 1992, 16(3): 23.

[责任编辑 聂淑琴]