

温胆汤对精神分裂症模型鼠海马谷氨酸和 N-甲基-D-天冬氨酸受体亚单位表达的影响

杨翠萍¹, 蔡长春², 杨晓金³, 万红娇^{1*}, 肖纯¹

(1. 江西中医学院, 南昌 330004;

2. 江西九江学院附属医院, 九江 332000;

3. 南昌大学医学院 2010 级研究生, 南昌 330006)

[摘要] 目的: 观察温胆汤对精神分裂症模型鼠海马谷氨酸(Glu)和 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体亚单位表达的影响。方法: 将 30 只 SD 大鼠, 随机分 3 组, 每组 10 只, 分别为正常组(A)、模型组(B)及温胆汤组(C), A、B 组 ig 生理盐水 20 mL·kg⁻¹, C 组 ig 温胆汤 20 g·kg⁻¹, 每天 1 次, 21 d 后地卓西马来酸盐(MK801) ip 诱发精神分裂症, 造模 3 d 后, 4 ℃ 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液灌流固定、制备脑组织切片, 免疫组化染色, 观察各组大鼠海马 NMDA 受体 NR1、NR2B 亚单位的表达并进行病理评分。结果: 正常组评分为“-”, 模型组评分为 13+, 温胆汤组为 8+。与模型组比较, 差异有显著性(P<0.05)。各组大鼠海马 NMDA 受体 NR1、NR2B 亚单位的表达存在差异, 模型组海马细胞 Glu 降低, NMDA 受体代偿性增高, 呈强阳性反应; 正常组和温胆汤组呈弱阳性反应的趋势。结论: 温胆汤能调节离子型谷氨酸受体的表达水平, 对精神分裂症模型鼠海马的病理损伤有一定的保护作用。

[关键词] 温胆汤; 精神分裂症; 谷氨酸; N-甲基-D-天冬氨酸

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0152-04

Effect of Wendan Decoction on Receptor of Glutamic Acid and N-methyl-D-aspartate in Rats with Schizophrenia

YANG Cui-ping¹, CAI Chang-chun², YANG Xiao-jin³, WAN Hong-jiao^{1*}, XIAO Chun¹

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Affiliated Hospital of Jiujiang University, Jiujiang 332000, China;

3. 2010 Postgraduate of Medical School of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

[收稿日期] 20100612(003)

[第一作者] 杨翠萍, 讲师, 医学硕士, 主要从事中医药与免疫学研究, Tel: 13767055480, E-mail: yangcui pingy2@sina.com.

[通讯作者] * 万红娇, 教授, 医学博士, 主要从事方剂学研究, Tel: 13576296677, E-mail: ann.wan@163.com.

[参考文献]

- [1] 曾洒宇, 秦旭平. 血管重构及其药物治疗[J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(5): 769.
- [2] 杨绿化, 李云霞. 无创测量大鼠收缩压和舒张压的新仪器和新方法[J]. 中国应用生理学杂志, 1991, 7(1): 62.
- [3] Brekken R A, Sage E H. SPARC, a matricellular protein: at the crossroad of cell-matrix communication [J]. Matrix Biol, 2001, 19(8): 156.

- [4] Zhang W B, Chen C X, Sim S M, et al. *In vitro* vasodilator mechanisms of the indole alkaloids rhynchophylline and isorhynchophylline, isolated from the hoo of *Unearia rhynchophylla* (Miquel) [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2004, 369(2): 232.
- [5] Qin X P, Ye F, Hu C P. Effect of calcitonin gene-related peptide on angiotensin II-induced Proliferation of rat vascular smooth muscle cells [J]. Eur J Pharmacol, 2004, 488(1/3): 45.

(责任编辑 何伟)

[**Abstract**] **Objective:** To explore the effect of Wendan Decoction (WDD) on the receptor of glutamic acid (Glu) and *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA) in rats with schizophrenia. **Method:** Thirty SD rats were divided randomly into 3 groups with 10 in each group: normal group (A), model group (B) and WDD group (C). WDD group was administered intragastrically with 20 g·kg⁻¹WDD; the other groups were administered the same volume of normal saline (20 mL·kg⁻¹). The 3 groups were treated for 21 days. Except the normal group, the other groups were given MK801 with sinistro-intraperitoneal injection to set the schizophrenia model after 1 hour of intragastrical administration in the last 3 days. The dosage was 0.1 mL per 20 g. By the changes in immunohistochemistry and neuropathological morphology, we observed the influence of WDD on expression of receptor Glu in hippocampus, receptor subunit NR1 and NR2B of NMDA and protective effects on pathological injuries in hippocampus of the model rats. **Result:** The morphological observation showed that there were significant differences in expression of Glu, subunit NR1 and NR2B of NMDA receptor in all groups and there also were significant differences in cell structure and cell denaturalization of CA1 area in hippocampus. **Conclusion:** WDD can improve disorder of cell rearrangement, relieve the process of nuclei dissolution, postpone the denaturalization of hippocampus cell. It indicates WDD has certain protective effects on pathological injury in hippocampus of the model rats.

[**Key words**] Wendan Decoction; schizophrenia; glutamic acid; *N*-methyl-*D*-aspartate

精神分裂症模型鼠的学习记忆力减退,温胆汤能够改善模型鼠学习记忆的损害,本课题组从1997年开始对温胆汤进行临床和实验研究,发现其具有镇静、镇痛、抗惊厥的作用,并且发现温胆汤对小鼠脑神经递质有多方面的影响^[1-3]。本实验是在前期临床和实验的基础上,以传统中医理论为指导,主要观察MK801诱发模型鼠海马的病理损伤及温胆汤对其的保护作用,观察温胆汤对模型鼠海马Glu和NMDA受体亚单位NR1, NR2B表达的影响,了解海马组织CA1区的Glu和NMDA受体亚单位阳性细胞的分布特征和神经病理学特征,为深入探讨温胆汤抗精神分裂症的作用机制奠定基础。

1 材料

1.1 动物 清洁级SD大鼠,雌性,(200±20)g,30只,由江西中医学院实验动物中心提供,动物合格证号SCXK(赣)2005-0001。

1.2 药物与试剂

1.2.1 中药汤剂制备 温胆汤组方:半夏10g,茯苓30g,竹茹10g,枳实10g,陈皮10g,甘草6g。各药物加水浸泡30min,先加药量8倍的水,沸腾后煎40min,过滤取汁,再加6倍的水,沸腾后煎30min,合并2次滤液浓缩成含生药1g·mL⁻¹,4℃冰箱保存备用。

1.2.2 试剂 地卓西平马来酸盐(MK801),美国Sigma公司生产。

1.3 仪器 Leica-2016型切片机,德国徕卡仪器有

限公司产品;Olympus-BX41显微镜,日本;病理分析工作站,南京长城信息系统公司研制;JVC TK-C1381数字彩色照相机,日本。

2 方法

2.1 分组、给药与造模^[4-5] 动物适应饲养环境5d后进行试验,随机分为3组:正常组、模型组、温胆汤组,每组10只。温胆汤组于造模前采用连续ig给药,每次给药20mL·kg⁻¹(相当于ig20g·kg⁻¹);正常组和模型组用等容量生理盐水ig,1次/d,共21d。

除正常组外,其他2组大鼠最后1d给药1h后,ipMK8010.6mg·kg⁻¹体重(注射量为5mL·kg⁻¹),诱发SD大鼠精神分裂症模型。正常组予以等量生理盐水ip。模型复制成功后不再给药。

2.2 海马免疫组织化学检测及病理损伤观察

2.2.1 灌注固定、制备脑组织切片 模型建立第3d处理动物并取组织检测。ip10%水合氯醛(9mL·kg⁻¹)麻醉,开胸经升主动脉灌注生理盐水100mL,以快速冲洗全身组织血液,随后灌注冷的(4℃)4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液(0.1mol·L⁻¹,pH7.4)约400mL,先快后慢,从右心耳引出,持续90min,灌注完毕后开颅取全脑,置于4%多聚甲醛中固定过夜(4℃),分别经200,300g·L⁻¹蔗糖溶液沉淀。梯度乙醇脱水,常规石蜡包埋,用Leica-2016型切片机做连续冠状切片,片厚4μm。取包含背侧海马即视交叉后约3.5mm的相邻4套切片,分别进行苏木精-

伊红染色和谷氨酸(GLU)、N-甲基-D-天冬氨酸受体 1(NR1)、N-甲基-D-天冬氨酸受体 2B(NR2B)免疫组织化学染色。

2.2.2 免疫组化染色 用防脱载玻片,捞片后置烤箱 58℃~60℃,40 min 以使切片紧密粘附,切片常规脱蜡至水,置 30% H₂O₂+蒸馏水(1:10)混合,室温 10 min 以灭活内源性酶,蒸馏水洗 3 次。热修复抗原:将切片浸入 0.01 mol·L⁻¹枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0),微波炉加热至沸腾后断电,间隔 10 min 后,反复 2 次。冷却后 PBS(pH 7.4)洗涤 2 次;滴加 5% BSA 封闭液,室温 20 min,甩去多余液体,不洗;滴加适当稀释的一抗(兔 IgG),4℃ 过夜。PBS(pH 7.4)洗 2 min×3 次。滴加生物素化鼠抗兔 IgG,37℃ 20 min,PBS(pH 7.4)洗 2 min×3 次;滴加试剂 SABC,37℃ 20 min。PBS(pH 7.4)洗 5 min×4 次。DAB 显色:使用 DAB 显色试剂盒(AR1022),取 1 mL 蒸馏水,加试剂盒中 A,B,C 试剂各 1 滴,混匀后加至切片。室温显色,镜下控制反应时间,一般在 10~20 min 之间。蒸馏水洗涤。苏木素轻度复染。脱水,透明,封片。显微镜观察。

2.2.3 选取包含了背侧海马的脑组织冠状切片,进行苏木精-伊红染色,显微镜观察各切片并从细胞排列、层次结构、胞体、胞核及核仁形态 5 个方面进行评分。①细胞排列疏松紊乱占整个切片的 1/3 以下为 1 个“+”,1/3~1/2 为 2 个“+”,1/2 以上为 3 个“+”。②层次结构不清占整个切片的 1/3 以下为 1 个“+”,1/3~1/2 为 2 个“+”,1/2 以上为 3 个“+”。③呈瘦长形胞体的数等于 10 个为 1 个“+”,10~20 个为 2 个“+”,大于 20 个为 3 个“+”。④呈固缩胞核的数等于 10 个为 1 个“+”,10~20 个为 2 个“+”,大于 20 个为 3 个“+”。⑤核仁不清或消失的数等于 10 个为 1 个“+”,10~20 个为 2 个“+”,大于 20 个为 3 个“+”。

评分“+”越高表示病变程度越重,反之越轻,分析为“-”表示无病变。

2.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行实验结果的处理。采用单因素方差分析比较组间的差异, $P < 0.05$ 具统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠海马病理半定量分析 正常组平均评分总和为 -;模型组平均评分总和为 13.0 +;温胆汤组平均评分总和为 8.0 +。与模型组比较 $P <$

0.05。见表 1。

表 1 各组大鼠海马病理半定量分析(平均评分,n=10)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	细胞 排列	层次 结构	胞体 形态	胞核 形态	核仁 形态	平均评 分总和
正常	-	-	-	-	-	-	- ¹⁾
模型	-	3+	2+	2+	3+	3+	13+
温胆汤	20	2+	1+	1+	2+	2+	8+ ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 用免疫组织化学染色法显示的各组大鼠海马齿状回 Glu 和 NMDA 受体亚单位 NR1, NR2B 的表达和分布情况 图 1~3 中 A,B,C 分别为正常组、模型组、温胆汤组齿状回部分 Glu, NR1 和 NR2B 的分布特征。从免疫反应染色的整体情况看,各组海马区域的颗粒细胞层染上了深棕黄色,在颗粒细胞周围,未见其他细胞有着色。

图 1 中显示的是各组大鼠海马齿状回 Glu 的表达情况。Glu 阳性细胞的染色反应主要集中在细胞核内,胞核染成深棕黄色,胞膜和胞浆为阴性,未见神经胶质细胞有阳性反应。图 2,图 3 中显示的分别是各组大鼠海马齿状回 NMDA 受体亚单位 NR1, NR2B 的表达情况。NR1, NR2B 受体亚单位阳性细胞的染色反应主要集中在细胞膜和细胞浆内,染成棕黄色,胞核为阴性。从形态结构上看,正常组大鼠海马齿状回细胞均排列整齐紧密,层次结构明显,胞体呈圆形或椭圆形,胞核圆而大,核仁清晰。模型组海马细胞排列较稀疏,层次结构不很明显,胞体呈瘦长型,胞核有固缩,核仁不清或消失,胞核深染成棕黄色,有的细胞正由正常向变性细胞发展。模型组海马细胞的变性改变以靠近中央区的 CA1 区最为严重。温胆汤组海马细胞结构的变化处于上述两组之间,对模型组海马细胞的变性损伤有所缓解和改善,仅有少量散在的固缩细胞,胞核染色较浅。

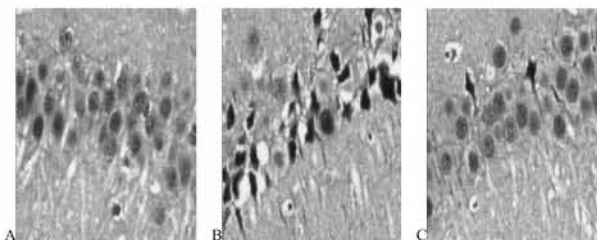


图 1 各组大鼠海马细胞 Glu 的分布(×400)

A. 正常组;B. 模型组;C. 温胆汤 20 g·kg⁻¹组(图 2~3 同)

4 讨论

温胆汤方中以半夏为君,燥湿化痰,和胃降逆,

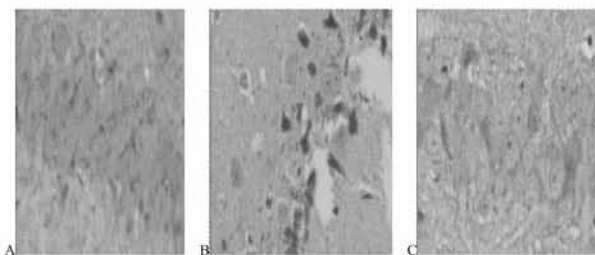


图2 各组大鼠海马细胞 NR1 受体亚单位的分布 (×400)

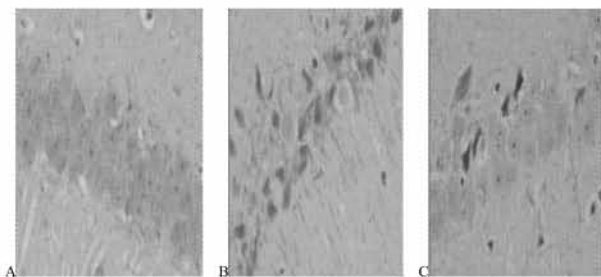


图3 各组大鼠海马齿状回颗粒细胞 NR2B 受体亚单位的分布 (×400)

使气降则痰降;以竹茹为臣,清热化痰,除烦止呕;与半夏相伍,化痰清热兼顾,使痰热清则无扰心之患。佐以枳实、陈皮理气化痰,使气顺则痰自消;茯苓健脾利湿,使湿去则痰不生,兼能宁心安神;甘草益气和中,调和诸药。由是可知温胆汤组方特点:其遣方的根本点在于“祛痰”,是以半夏燥湿化痰为主,同时注重理气祛痰、健脾利湿法则的配合使用。中医认为气机郁滞时会导致津液输布受阻,即所谓气滞痰凝,因此庞安常提出了治痰大法:“善治痰者,不治痰而治气,气顺则一身津液亦随气而顺矣。”中医同时也认为脾主运化,脾气虚弱或水湿壅盛困脾,运化不及则聚湿成痰^[6],在临证加减中,心神不宁见虚烦不眠较重者可重用茯苓。

本实验的免疫组化检测发现,各组大鼠海马 NMDA 受体 NR1、NR2B 亚单位的表达存在差异,模型组海马细胞 Glu 降低,NMDA 受体代偿性增高,呈强阳性反应;正常组和温胆汤组呈弱阳性反应的趋势。说明温胆汤对海马齿状回颗粒细胞层 NR1、NR2B 受体亚单位的表达有减弱的作用趋势,表明温胆汤能调节离子型谷氨酸受体的表达水平。此外,从病理学形态观察,给大鼠造模前预防性的使用温胆汤,可改善和延缓海马细胞的变性过程,阻滞核溶缩和固缩,即使有少量的固缩细胞,如延长用药时间也许有可能恢复。表明温胆汤对精神分裂症模型鼠海马的病理损伤有一定的保护作用,这也许是温胆汤抗精神分裂症的作用机制之一。

[参考文献]

- [1] 贺又舜,袁振仪,瞿延晖,等. 温胆汤镇静镇痛抗惊厥的实验研究[J]. 中国中医药科技, 1997, 4(4):226.
- [2] 贺又舜,袁振仪,欧阳建军,等. 宁神温胆汤镇静镇痛抗惊厥的实验研究[J]. 湖南中医杂志, 1999, 15(1):54.
- [3] 傅俊英,贺又舜,袁振仪,等. 温胆汤对小鼠整体行为影响的实验研究[J]. 湖南中医学院学报, 1999, 19(1):7.
- [4] 刘春文,谢俊霞. 精神分裂症模型大鼠伏核和纹状体多巴胺含量的检测及氟哌啶醇的影响[J]. 中国行为医学科学, 2001, 10(4):281.
- [5] 吴金华,邹洪,于军,等. 用不同实验小鼠品系建立精神分裂症的动物模型[J]. 生理学报, 2003, 55(4):381.
- [6] 贺娟,甘贤兵,柴丽红. 调理脾胃法治疗精神和神经类疾患临床及实验研究进展[J]. 北京中医药大学学报, 2004, 27(1):85.

[责任编辑 聂淑琴]