

# 逍遥散干预抑郁症睡眠障碍模型大鼠海马 5-HT<sub>1A</sub>受体,5-HT<sub>2A</sub>受体的变化

孔梅,邢长永,舒晓春\*

(中山大学第五附属医院,广东 珠海 519000)

**[摘要]** 目的:观察逍遥散干预抑郁症睡眠障碍(SDD)大鼠自主行为及海马5羟色胺1A受体(5-HT<sub>1A</sub>受体),5羟色胺2A受体(5-HT<sub>2A</sub>受体)mRNA表达变化,探讨其治疗SDD的分子生物学机制。方法:48只Wistar大鼠进行敞箱行为(OFT)试验,根据得分将大鼠随机分为4组:正常组、模型组、米氮平组、逍遥散组。除正常组外,其余各组共接受18d不同的应激,应激18d后,进行72h快眼睡眠剥夺造模(DEM)。每天在应激前1h按组给药;模型组、米氮平组、逍遥散组分别予等容量生理盐水、米氮平、逍遥散水提液。21d计算行为得分后处死大鼠,取大鼠海马置液氮中备测。结果:21d后模型组大鼠自主活动较应激前显著减少( $P < 0.01$ )。与模型组比较,逍遥散组及米氮平组大鼠的自主活动明显增加,已达正常组水平;与正常组比较,模型组海马5-HT<sub>1A</sub>R mRNA表达水平下降,5-HT<sub>2A</sub>R mRNA表达水平上升( $P < 0.01$ );逍遥散组海马5-HT<sub>1A</sub>R mRNA,5-HT<sub>2A</sub>R mRNA的表达改善明显,与模型组比较,( $P < 0.01$ );而米氮平组与模型组比较无统计学意义,逍遥散组作用明显优于米氮平组( $P < 0.05$ )。结论:逍遥散可能通过上调海马5-HT<sub>1A</sub>R,下调5-HT<sub>2A</sub>R,调节5-HT再摄取发挥治疗SDD效应。

**[关键词]** 抑郁症睡眠障碍;5-羟色胺;逍遥散

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)14-0157-04

## Influence of Ease Powder Decoction on Expression of Hippocampus 5-HT<sub>1A</sub> Receptor and 5-HT<sub>2A</sub> Receptor in Rat Model of Sleep Deprivation Depression

KONG Mei, XING Chang-yong, SHU Xiao-chun\*

(The Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To discuss the molecular mechanism of Ease Powder decoction treating on sleep deprivation depression(SDD) by observing the changes of autonomic-behavior and the expression of hippocampus 5-HT<sub>1A</sub> receptor and 5-HT<sub>2A</sub> receptor in a rat experimental model of sleep deprivation depression. **Method:** 48 Wistar rats were divided into four groups after first open-field testing(OFT), they were normal group, model group, mirtazapine group and Ease Powder decoction group. Except the normal group, the other groups were received different stress for 21 days, then made 72 h rapid eye movement(REM), taken the drug every day before the stress(1 h). Meanwhile, the model group, mirtazapine group and Ease Powder decoction group were intragastric administration of normal saline, mirtazapine, Ease Powder decoction respectively. At the end of 21 days, all the animals were sacrificed. The hippocampus of rats were taken then kept in liquid nitrogen. **Result:** Compared with the situation before stress, there is a significant decrease in the autonomic-behavior of SDD after 21 days( $P <$

**[收稿日期]** 2010-05-25

**[基金项目]** 广东省建设中医药强省科研立项课题(2009051)

**[第一作者]** 孔梅,主管技师,Tel:0756-2528340,E-mail:kongmei.zsu.2008@163.com

**[通讯作者]** \*舒晓春,副主任医师,研究方向:内分泌及代谢疾病,Tel:0756-2528340,E-mail:kongmei.zsu.2008@163.com

0.01)。Compared with the model group, the rat's autonomic-behavior in Ease Powder decoction group and the mirtazapine group is increased. Compared with the normal group, the expression of 5-HT<sub>1A</sub>R mRNA in hippocampus of model group is decreased, the expression of 5-HT<sub>2A</sub>R mRNA is increased, with statistical significance ( $P < 0.05$ ). Comparison for expression of hippocampus 5-HT<sub>1A</sub>R mRNA and 5-HT<sub>2A</sub>R mRNA between the Ease Powder decoction group and the model group is significant ( $P < 0.01$ ). However, compared with the model group, the mirtazapine group has no statistical significance. Comparison of Ease Powder decoction group and mirtazapine group has statistical significance ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The Ease Powder decoction exert an effect on SDD by regulating the expression of hippocampus 5-HT<sub>1A</sub>R and 5-HT<sub>2A</sub>R.

[**Key words**] sleep deprivation depression; 5-hydroxytryptamine; Ease Powder decoction

睡眠障碍是抑郁症状群的重要组成部分,其中入睡困难、睡眠不深及早醒最具特征性。睡眠障碍可能是抑郁症患者自杀的诱发因素,因此 SDD (sleep deprivation depression, SDD) 的研究已成为人们关注的焦点。以往研究提示,5-HTR 参与人体情感、认知及感觉等行为,尤其是海马 5-HT<sub>1A</sub>受体、5-HT<sub>2A</sub>受体表达变化与抑郁睡眠障碍密切相关<sup>[1-2]</sup>。笔者观察了中药复方逍遥散对 SDD 大鼠自主活动及对 5-HT<sub>1A</sub>R、5-HT<sub>2A</sub>R 的影响。

## 1 材料

**1.1 动物** 清洁级 Wistar 大鼠 48 只,雌雄各半,体重 200 g ~ 250 g (广东省动物实验中心提供)。

**1.2 药物与试剂** 复方逍遥散(柴胡 9 g,当归 9 g,白芍 9 g,白术 9 g,茯苓 9 g,甘草 4.5 g,薄荷 4.5 g,煨生姜 4.5 g),以上药材均由广州中医药大学第一附属医院药房提供,经中山大学第五附属医院药剂科郑志新主管药师鉴定均为纯正药材。中药制成粗粉,首煎将中药粗粉置 8 倍温水中浸泡 0.5 h,沸腾后文火煎煮 4 h,过滤;第 2 次和第 3 次煎煮均分别以 6 倍水文火煎煮 2 h,过滤;合并 3 次药液,置水浴箱内浓缩至含生药 0.351 g·mL<sup>-1</sup>,药液常温冷却后,置 4℃ 冰箱保存备用;米氮平(批号 080201,15 mg/片,哈尔滨三联药业有限公司);焦碳酸二乙酯(DEPC)(上海生物工程技术公司);DEPC 处理水(上海赛百盛基因公司);氯仿(HPLC 级,上海试剂一厂);异丙醇(HPLC 级,苏州振亚化工厂);无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司);Trizol(美国 Invitrogen 公司);大鼠 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>,  $\beta$ -actin 基因引物(上海生工生物技术有限公司合成);SYBRGreen PCR 试剂盒(广州达晖生物公司)。

**1.3 仪器** 移液器(法国 Gilson 公司);BDC-280e 超低温冰箱(长沙伊来克斯);5417R 型高速冷冻离

心机(德国 EPPENDORF 公司);Real-time PCR 检测仪(7300Sequence Detection System) ABI-7500(美国 ABI 公司)等。

## 2 方法

### 2.1 造模

**2.1.1 分组** 大鼠先适应性喂养,在光/暗周期为 12 h/12 h(光照时间 7:00 ~ 19:00)条件下饲养,熟悉环境 1 周。分组前进行首次敞箱行为试验(OFT),根据得分将大鼠分为正常组、模型组,米氮平组,逍遥散组,每组 12 只。

### 2.1.2 慢性轻度不可预见性应激的抑郁模型复制

除正常组外,余下各组每日随机安排 1 种应激,包括:行为限制 2 h、电击足底(36 V 交流电,每隔 1 min 刺激 1 次,每次刺激 10 s,共 30 次)、冰水游泳(4℃,5 min)、热应激(45℃,5 min)、摇晃(1 次/秒,15 min)、鼠笼倾斜 45 度 24 h、夹尾(1 min)、禁水(24 h)、禁食(48 h)、明暗颠倒、潮湿垫料 10 h、空瓶放置 1 h,连续 18 d<sup>[3]</sup>。接受慢性应激的大鼠单笼喂养。

### 2.1.3 快速动眼相睡眠剥夺(REM)

于应激 18 d 后对造模动物进行 72 h 连续快速动眼相睡眠剥夺。采用小平台水环境法,剥夺箱为 30 cm × 30 cm × 40 cm 大小的玻璃水箱,正中立/直径 6 cm 圆形平台,箱中注满水,水面距平台约 1 cm。大鼠在平台上可自由进食进水,如果睡眠,会因为肌张力松弛而落入水中。为排除隔离、限制活动和水环境造成的应激影响,造模期间持续灯光照射,室内温度 18.0 ~ 22.0℃。水温保持在 20℃ 左右<sup>[4]</sup>。正常组不予处理。

**2.2 给药时间** 每天在应激前 1 h,正常组、模型组分别给予生理盐水,米氮平 3 mg·kg<sup>-1</sup>,逍遥散 3.51 g·kg<sup>-1</sup>,均 ig,1 次/d,连续 21 d。

**2.3 大鼠自主活动** 使用 Open-Field 法(OFT)检

测<sup>[5]</sup>,以大鼠在 3 min 内的水平运动得分和垂直运动得分之和为大鼠总的自主活动量,于分组前和治疗后进行。

### 2.4 海马 5-HT<sub>1A</sub>R, 5-HT<sub>2A</sub>R mRNA 检测

5-HT<sub>1A</sub>R, 5-HT<sub>2A</sub>R 引物序列、扩增长度及 PCR 反应条件,

表 1 5-HT<sub>1A</sub>R, 5-HT<sub>2A</sub>R,  $\beta$ -actin 引物序列、扩增长度

基因	引物序列	产物长度/bp	退火温度/℃
Rat $\beta$ -actin (+)	上游引物: 5'-TGTGATGGTGGGTATGGGTCAGAAG-3'	207	55
$\beta$ -actin (-)	下游引物: 3'-TCACGGTTGGCCTTAGGGTTCAGAG-5'		
Rat 5-HT <sub>1A</sub> R (+)	上游引物: 5'-GCAAACGAATCAGCAGTAGCAT-3'	475	50
5-HT <sub>1A</sub> R (-)	下游引物: 3'-GACTGCATCAGAGTGTGCTTTGA-5'		
Rat 5-HT <sub>2A</sub> R (+)	上游引物: 5'-TGACCAAATCAAGGAGCAAT-3'	412	55
5-HT <sub>2A</sub> R (-)	下游引物: 3'-GGGTCTTCGGCGGATTCT-5'		

2.5 统计分析 所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,符合正态分布资料采用单因素方差分析;非正态分布资料采用 Mann-Whitney U 秩和检验。统计软件为 SPSS11.5 for windows,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 3 结果

3.1 逍遥散对大鼠自主活动量的影响 应激前,4 组大鼠的自主活动差异无统计学意义。21 d 后模型组自主活动较应激前显著减少 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,逍遥散组及米氮平组大鼠的自主活动明显增加,已达正常组水平(表 2)。

表 2 逍遥散对大鼠自主活动量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	造模前	造模 21 d
正常	-	96.35 ± 9.21	98.78 ± 8.78 <sup>1)</sup>
模型	-	98.59 ± 8.69	37.45 ± 9.14
米氮平	3 × 10 <sup>-3</sup>	97.65 ± 9.53	95.68 ± 9.24 <sup>1)</sup>
逍遥散	3.51	97.86 ± 9.21	96.72 ± 8.89 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与米氮平比较<sup>2)</sup>  $P < 0.001$ (表 3 同)

3.2 逍遥散对大鼠海马 5-HT<sub>1A</sub>R, 5-HT<sub>2A</sub>R mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组海马 5-HT<sub>1A</sub>R mRNA 表达水平下降,5-HT<sub>2A</sub>R mRNA 表达水平上升,(均  $P < 0.01$ );逍遥散组海马 5-HT<sub>1A</sub>R mRNA, 5-HT<sub>2A</sub>R mRNA 的表达与模型组比较均有明显改善 ( $P < 0.01$ );而米氮平组与模型组比较无明显差异。逍遥散作用优于米氮平 ( $P < 0.01$ )(表 3)。

## 4 讨论

本研究综合孤养与中等强度的不可预见的慢性应激刺激诱导建立抑郁大鼠模型,同时采用小平台水环境法对抑郁模型大鼠进行连续 72 h 的 REM 睡

以  $\beta$ -actin 为内参(表 1)。Trizol 试剂一步法抽提总 RNA 后;取 RNA 产物 1.0  $\mu$ g,用 M-MLV 逆转录酶合成 cDNA,然后用 PCR 扩增仪进行 PCR 反应。用 2% 琼脂糖电泳,电泳结束后置凝胶成像系统中进行分析,计算与内参  $\beta$ -actin 的比值用以校正。

表 3 逍遥散对大鼠海马 5-HT<sub>1A</sub>R, 5-HT<sub>2A</sub>R mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	5-HT <sub>1A</sub> R	5-HT <sub>2A</sub> R
正常	-	2.29 ± 0.19 <sup>1)</sup>	1.55 ± 0.12 <sup>1)</sup>
模型	-	0.67 ± 0.11	3.50 ± 0.09
米氮平	3 × 10 <sup>-3</sup>	0.62 ± 0.08	3.49 ± 0.07
逍遥散	3.51	2.24 ± 0.12 <sup>1,2)</sup>	1.35 ± 0.10 <sup>1,2)</sup>

眠剥夺,建立抑郁症睡眠障碍大鼠模型。应用目前使用最广泛的 OFT 试验考察大鼠行为学改变,并观察大鼠海马 5-HT<sub>2A</sub>R 及 5-HT<sub>1A</sub>R 表达变化与抑郁症睡眠障碍的相关性及逍遥散对上述指标的影响。

5-HT 作为自体活性物质,主要分布于松果体和下丘脑,可能参与痛觉、睡眠和体温等生理功能的调节,海马区域是大脑的边缘系统,与人的精神活动密切相关,中枢神经系统尤其是海马区域 5-HT 含量/功能异常可能与精神病、睡眠障碍等多种疾病的发病有关。5-HT 受体基因中含量最丰富的是 5-HT<sub>1A</sub>R, 5-HT<sub>1A</sub>R 按其分布位置的不同可以分为突触前膜受体和突触后膜受体两类,两者共同作用调节 5-HT 的释放<sup>[6]</sup>。突触后膜受体广泛分布于 5-HT 能神经传入的前脑区,尤其是皮质、海马、中隔、杏仁体及下丘脑,定位于神经元的轴突上,被激活后将会引起突触后膜超极化,抑制神经元的兴奋性<sup>[7]</sup>。研究表明 5-HT<sub>2A</sub>R 及 5-HT<sub>1A</sub>R 的表达与睡眠障碍相关<sup>[8]</sup>,拮抗 5-HT<sub>2A</sub>R 具有明确改善睡眠障碍的效应。

祖国医学将 SDD 归属于“郁症”范畴,究其病机,肝气郁结,心神失主贯穿疾病始终。诚如《证治汇补》云:“郁病虽多,皆因气不周流,法当顺气为先”。逍遥散方中以柴胡疏肝解郁为君,又有当归、

白芍养血柔肝为臣,当归之芳香可以行气,味甘可以缓急,更是肝郁血虚之要药。白术、茯苓健脾去湿,使运化有权,气血有源。炙甘草益气补中,缓肝之急。生姜煨过,温胃和中之力益专,薄荷少许,助柴胡疏肝郁而生之热,全方共奏疏肝健脾、养血安神之功。本研究发现,SDD 大鼠海马 5-HT<sub>1A</sub>R 表达下降,5-HT<sub>2A</sub>R 表达上升,与文献报道一致;逍遥散可能通过上调 5-HT<sub>1A</sub>R 水平、降低 5-HT<sub>2A</sub>R 水平,调节 5-HT 再摄取,发挥治疗 SDD 的效应。

### [参考文献]

[ 1 ] Wei H, Ma A, Wang Y X, et al. Role of spinal 5-HT receptors in cutaneous hypersensitivity induced by REM sleep deprivation [J]. *Pharmacol Res*, 2008, 57 ( 6 ) : 469.

[ 2 ] Landolt H P, Wehrle R. Antagonism of serotonergic 5-HT<sub>2A</sub>/2C receptors: mutual improvement of sleep, cognition and mood? [J]. *Eur J Neurosci*, 2009, 29 ( 9 ) : 1795.

[ 3 ] De Vasconcelos C A, De Oliveira J A, De Oliveira Costat L A, et al. Malnutrition and REM-sleep deprivation modulate in rats the impairment of spreading depression by a single sub-convulsing dose of pilocarpin

[J]. *Nutr Neurosci*, 2004, 7(3) : 163.

[ 4 ] Lopez-Rodriguez F, Kim J, Poland R E. Total sleep deprivation decreases immobility in the forced-swim test [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2004, 29(6) : 1105.

[ 5 ] de Oliveira R A, Cunha G M, Borges K D, et al. The effect of venlafaxine on behaviour, body weight and striatal monoamine levels on sleep-deprived female rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2004, 79(3) : 499.

[ 6 ] Alexandre C, Popa D, Fabre V, et al. Early life blockade of 5-hydroxytryptamine 1A receptors normalizes sleep and depression-like behavior in adult knock-out mice lacking the serotonin transporter [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(20) : 5554.

[ 7 ] Novati A, Roman V, Cetin T, et al. Chronically restricted sleep leads to depression-like changes in neurotransmitter receptor sensitivity and neuroendocrine stress reactivity in rats [J]. *Sleep*, 2008, 31(11) : 1579.

[ 8 ] Pozzi L, Greco B, Sacchetti G, et al. Blockade of serotonin 2A receptors prevents PCP-induced attentional performance deficit and CREB phosphorylation in the dorsal striatum of DBA/2 mice [J]. *Psychopharmacology*, 2010, 208(3) : 387.

[责任编辑 何伟]