

加味四逆散对慢性应激大鼠海马区 5-羟色胺 2A 受体(5-HT_{2A}R)及其 mRNA 表达的影响

谢忠礼*, 李杰

(河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的: 探讨加味四逆散对慢性应激模型大鼠海马区 5-HT_{2A} 受体及其 mRNA 表达的影响。方法: 选择 Open-field 法评分相近的 74 只成年 SD 大鼠, 随机分为对照组、模型组、氟西汀组、加味四逆散高, 中, 低剂量组。应用分养和长期不可预见的中等强度应激造成大鼠抑郁模型, 以免疫组织化学法和原位杂交法研究大鼠海马区 5-HT_{2A}R 及其 mRNA 表达的变化。结果: 与对照组比, 模型组和加味四逆散高剂量组海马区 5-HT_{2A}R 表达降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 模型组、氟西汀组和加味四逆散中剂量组 5-HT_{2A}R mRNA 表达降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与模型组比, 各治疗组 5-HT_{2A}R 及 mRNA 的表达均升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。各组之间 5-HT_{2A}R/mRNA 的变化无统计学差异。结论: 慢性应激能诱发大鼠轻度抑郁障碍和海马区 5-HT_{2A}R 及其 mRNA 的低表达。加味四逆散改善慢性应激大鼠的抑郁症状可能与调节海马区 5-HT_{2A} 受体系统增高其表达有关。

[关键词] 应激; 情绪; 海马; 5-HT_{2A} 受体; 5-HT_{2A} 受体 mRNA

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)16-0150-02

加味四逆散由柴胡、枳实、白芍、炙甘草、桂枝、石菖蒲组成, 前期研究表明具有一定的抗抑郁作用, 可以改善恶劣心境障碍患者的临床抑郁症状和慢性应激大鼠的抑郁行为及海马区 5-羟色胺(5-HT)含量^[1-3]。5-HT 能系统在人的情绪调控中发挥重要作用, 人脑存在着多种 5-HT 受体亚型, 其中 5-羟色胺 2A 受体(5-HT_{2A}R)在海马的表达异常和抑郁发作有关。本研究利用免疫组织化学和原位杂交技术观察加味四逆散对 5-HT_{2A}R 系统的影响, 探讨其抗抑郁作用的神经分子基础。

1 材料和方法

1.1 动物分组及处理 成年 SD 大鼠, 体重为 (180 ± 20) g, 雌雄各半。Open-field 法选择评分相近的 74 只大鼠, 采用雌雄分层完全随机分组法分为对照组、模型组、氟西汀组、加味四逆散高、中、低剂量组。造模方法根据文献方法改进^[4-5], 除对照组外,

各组大鼠共接受 42 d 不同的应激, 包括冰水游泳(4 min, 5 min)、热水游泳(45 min, 5 min)、禁水(24 h)、夹尾(1 min)、摇晃(5 min, 每分钟换方向 1 次)、禁食(24 h)、昼夜颠倒等。平均每种刺激各 4 次。每 7 d 进行 1 次行为学测定, 21 d 后大鼠处于抑郁状态^[2]并开始灌胃给药: 加味四逆散 4.5, 2.7, 0.9 g·kg⁻¹, 氟西汀 1.8 mg·kg⁻¹, 对照组和模型组给予等量生理盐水。

1.2 试剂 5-HT_{2A}R 寡核苷酸探针杂交液、免疫组化染色试剂盒、HTR_{2A}R 原位杂交检测试剂盒、DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司产品); 缓冲液(3% 柠檬酸, 2 × SSC, 0.5 × SSC, 0.2 × SSC, 20% 甘油)。

1.3 方法

1.3.1 5-HT_{2A}R 测定(采用免疫组织化学法) 取大鼠右侧海马, 4% 多聚甲醛固定, 经包埋、切片、脱腊、抗原修复和血清封闭后, 加一抗, 于 4℃ 冰箱中保存过夜。加二抗, 置 37℃ 温箱中 30 min, 加 SABC(过氧化物酶), 置于 37℃ 温箱中 30 min, 加显色剂, 最后经复染, 脱水, 封片后观察。

1.3.2 5-HT_{2A}R mRNA 测定(采用原位杂交法, 按试剂盒说明操作): 大鼠海马组织切片, 用 4% 含有 1/1 000 DEPC 的多聚甲醛(0.1 mol·L⁻¹ PBS 配制, pH 7.2 ~ 7.6), 室温固定 30 min。蒸馏水洗涤后, 用

[收稿日期] 2010-01-04

[基金项目] 河南省教育厅自然科学基金基础研究计划(2010B360015); 河南中医学院博士科研启动基金(03301027)

[通讯作者] * 谢忠礼, 医学博士, 副教授, 研究方向: 慢性应激与中医神经学说及仲景方药的干预作用, Tel: 0371-65680181, E-mail: ramboxzl@yahoo.com.cn

新配的 30% H₂O₂ (甲醇配制) 室温处理 30 min 灭活内源性过氧化物酶, 蒸馏水洗涤 3 次, 暴露 mRNA 核酸片段, 加 3% 柠檬酸新鲜的胃蛋白酶(1 mL 3% 柠檬酸加 2 滴浓缩型胃蛋白酶), 37 °C 消化 5 ~120 min, 1% 多聚甲醛 /0.1 mol·L⁻¹ PBS 洗 3 次 ×5 min, 蒸馏水洗 3 次。经预固定、杂交、洗涤、封闭、依次滴加生物素化鼠抗地高辛、SABC、生物素化过氧化物酶, 最后 DAB 显色, 水溶性封片后观察。

1.4 图片处理 显微镜视野下每切片随机取 5 视野, 计算阳性反应数, 取平均值。

1.5 数据处理 SPSS 13.0 统计软件包进行数据处理。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

与对照组比, 模型组和加味四逆散高剂量组海马区 5-HT_{2A}R 表达降低 ($P < 0.01, P < 0.05$), 模型组、氟西汀组和加味四逆散中剂量组 5-HT_{2A}R mRNA 表达降低 ($P < 0.01, P < 0.05$)。与模型组比, 各治疗组 5-HT_{2A}R 及 mRNA 的表达均升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。各组之间 5-HT_{2A}R/mRNA 的变化无统计学差异, 5-HT_{2A}R 与 5-HT_{2A}R mRNA 表达成平行关系(表 1)。

表 1 各组大鼠海马 5-HT_{2A}R 及其 mRNA 表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	5-HT _{2A} R 阳性反应数	5-HT _{2A} R- mRNA 阳性反应数	5-HT _{2A} R /mRNA
对照	-	9	57.02 ±3.73	55.53 ±4.03	1.06 ±0.09
模型	-	8	25.38 ±2.59 ²⁾	20.19 ±1.10 ²⁾	1.24 ±0.08
氟西汀	1.8 ×10 ⁻³	9	46.73 ±3.70 ⁴⁾	40.57 ±2.75 ^{1,4)}	1.17 ±0.08
加味四逆散	4.5	8	42.15 ±3.43 ^{1,3)}	47.83 ±3.96 ⁴⁾	0.96 ±0.15
	2.7	7	49.46 ±3.18 ⁴⁾	40.54 ±2.17 ^{1,4)}	1.24 ±0.10
	0.9	9	48.20 ±3.59 ⁴⁾	54.07 ±4.00 ⁴⁾	0.92 ±0.09

注: 与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3 讨论

应激性生活事件是抑郁发作的明显促发因素, 在前期的研究中我们发现长期慢性应激后大鼠可处于抑郁状态, 其精神萎靡, 各种活动减少, 在规定的时间内水平活动和垂直活动次数减少, 糖水消耗量降低, 并伴有海马 5-HT 量的降低^[1-3], 对于慢性应激

后海马的 5-HT_{2R} 及 5-HT_{2AR}- mRNA 表达尚无定论^[4-5]。试验结果显示, 慢性应激后大鼠海马区的 5-HT_{2AR} 及其 mRNA 表达水平降低。据此推测, 慢性应激能诱导海马 5-HT_{2AR} 及其 mRNA 的低表达, 慢性应激后海马的 5-HT 能神经系统活动水平处于低下状态, 和抑郁发作存在一定的关系。而加味四逆散各组 5-HT_{2AR} 及其 mRNA 的表达较模型组升高, 说明加味四逆散抗抑郁作用可能是通过影响 5-HT_{2A} 受体系统而起作用的。在组内, 5-HT_{2AR} 的表达和其对应的 mRNA 的表达存在着一致性, 而 5-HT_{2AR} 由 5-HT_{2AR} mRNA 翻译, 说明随 5-HT_{2AR} mRNA 转录的增加, 5-HT_{2AR} 的翻译也增加, 故 5-HT_{2AR}/mRNA 在组内成平行关系而在组间无统计差异。

中医神情学说认为, 心主神明为五脏六腑之大主, 肝主疏泄, 调畅情志, 脑为元神之府。加味四逆散为《伤寒论》四逆散加桂枝和石菖蒲组成, 原方可和解少阴之枢机。加味后桂枝配白芍可调和营卫气血, 枳实配芍药可理气活血, 桂枝配甘草可辛甘化阳, 白芍配甘草可酸甘化阴, 更以柴胡疏通气机, 全方有调畅情志、调和气血、平衡阴阳的功效, 用于轻度抑郁的发作, 为本法的立论创新之处。

[参考文献]

- [1] 谢忠礼. 加味四逆散对恶劣心境障碍模型大鼠行为学影响[J]. 陕西中医学院学报, 2004, 27(4): 60.
- [2] 谢忠礼, 王兴华. 加味四逆散治疗恶劣心境障碍 38 例临床研究[J]. 中国中医药信息杂志 2005. 12(4): 8.
- [3] 谢忠礼, 周全, 张全文, 等. 加味四逆散对恶劣心境障碍模型大鼠海马单胺类神经递质的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2006, 33(9): 1196.
- [4] Wigger A, Neumann I D. Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats [J]. Physiol Behav, 1999, 66: 293.
- [5] Levshina I P, Shuikin N N. Peculiarities of exploration behavior of socially deprived rats in stress situation [J]. Zh Vyssh Nerv Deiat Im IP Pavlova, 2002, 52: 602.

[责任编辑 何伟]