

颞脑解郁方对脑出血后抑郁大鼠脑内 5-羟色胺和 5-羟色胺 1_A 受体表达的影响

罗 斌¹, 唐启盛^{1*}, 侯秀娟²

(1. 北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029; 2. 北京中医药大学附属东方医院, 北京 100078)

[摘要] 目的: 探讨脑出血后抑郁动物模型脑内单胺神经递质 5-羟色胺(5-HT) 5-羟色胺 1_A 受体(5-HT_{1A}R) 的变化, 研究中药颞脑解郁方对脑出血后抑郁的干预机理。方法: 用免疫组织化学方法观察脑出血后抑郁模型大鼠脑内 5-HT、5-HT_{1A}R 的表达变化及以西药百忧解为对照, 中药颞脑解郁方的干预作用。结果: 脑出血后抑郁模型大鼠脑海马 CA3、扣带皮质、隔核内 5-HT 阳性细胞表达减少, 颞脑解郁方和百忧解均增加海马 CA3、扣带皮质内 5-HT 阳性细胞内蛋白表达, 减少 5-HT 阳性细胞在下丘脑表达; 模型组大鼠海马 CA3、隔核、下丘脑 5-HT_{1A}R 阳性细胞表达较正常增加, 百忧解和颞脑解郁方均可增加海马 CA3 区、扣带皮质 5-HT_{1A}R 阳性细胞表达, 但百忧解减少隔核、下丘脑内 5-HT_{1A}R 阳性细胞表达, 颞脑解郁方减少下丘脑内 5-HT_{1A}R 阳性细胞表达。结论: 中药颞脑解郁方可以通过增强 5-HT 阳性细胞的蛋白表达, 调节不同部位 5-HT_{1A}R 细胞功能起到改善抑郁的作用。

[关键词] 脑出血后抑郁; 颞脑解郁方; 5-羟色胺; 5-羟色胺 1_A 受体

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)06-0069-03

卒中后抑郁是指卒中后继发的抑郁症, 它的发生影响脑卒中患者的神经功能缺损及认知功能损害恢复, 增加卒中后病死率及自杀率的潜在危险因素, 并长期影响脑卒中患者生活质量。中药颞脑解郁方治疗脑卒中后抑郁症临床上取得较好疗效。我们采用中药颞脑解郁方干预脑出血后抑郁大鼠模型, 以 5-HT 再摄取抑制剂百忧解作对照, 应用免疫组织化学法观察大鼠脑内不同部位 5-羟色胺 5-羟色胺 1_A 受体阳性细胞表达的变化, 以进一步探讨颞脑解郁方治疗脑出血后抑郁的机理。

1 材料

1.1 实验动物 健康 Wistar 雄性大鼠, 二级, 5~6 月龄, 32 只, 体重(200±10)g。购于维通利华动物试验中心, 合格证编号: SCXK(京)2004-0003。

1.2 试剂与药品 颞脑解郁方药物(北京中医药大学中药鉴定教研室鉴定), 使用前按照灌胃剂量煎药浓缩, 浓度 0.62 g·mL⁻¹, 贮存于 4℃冰箱中备用, 临用前加热。百忧解(Eli Lilly and Company Limited, 生

产批号: A019602); 按照成人用量(0.33 mg·kg⁻¹·d⁻¹) 7 倍计算大鼠用量(2.33 mg·kg⁻¹·d⁻¹)。临用时溶于蒸馏水中, 混匀, 浓度为 0.233 mg·mL⁻¹。免疫组织化学试剂: 北京中山生物技术有限公司兔抗 5-羟色胺(5-HT), 武汉博士德生物工程有限公司产兔抗 5-羟色胺 1_A 受体(5-HT_{1A}R)。

1.3 实验仪器 美国 Polyvar 万能显微镜; 美国 Mediar Cybernetics, Int 产 Image-Pro Plus 真彩病理图像分析系统(version 5.0.1.11)。

2 方法

2.1 动物分组及处理 首先用 Opern field 法作为学评分, 选择得分相近的 32 只大鼠随机分为正常组、模型组、中药颞脑解郁方药组(以下简称中药组)和百忧解治疗对照组(以下简称西药组), 每组 8 只。采用唐氏脑出血后抑郁大鼠模型造模^[1]。正常组每笼饲养 4 只, 模型组、中药组和西药组每笼饲养 1 只。模型组、中药组、西药组均接受脑出血手术及 21 d 慢性不可预见性应激。慢性应激刺激结束后, 中药组和西药组分别接受灌胃给药中药颞脑解郁方(6.2 g·kg⁻¹·d⁻¹)、百忧解(2.33 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 每天给药 1 次, 持续 6 周。模型组予蒸馏水蒸馏水 10 mL·kg⁻¹灌胃 6 周。正常组: 正常饮食饮水。

[收稿日期] 2009-02-11

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30171163)

[通讯作者] * 唐启盛, Tel: (010) 52075206

2.2 脑组织处理及切片 各组大鼠在完成实验过程后给予大鼠用 10% 的水合氯醛麻醉(用量为 400 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,生理盐水灌注,10% 甲醛灌注固定后,断头取脑,放入盛有相同灌注液的瓶中固定约 2 周后,常规脱水、透明,石蜡包埋,切片,每张切片厚 6 μm,进行测定指标的免疫组织化学法染色。

2.3 免疫组化染色 免疫组化染色用 ABC 法,步骤如下:(1)切片常规脱蜡至水。(2)切片入 3% H₂O₂ 水溶液室温 10 min。蒸馏水洗涤 3 次。(3)切片入 0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液(pH6.0)微波加热修复抗原。(4)滴加正常羊血清封闭,室温 30 min。(5)兔抗 5-羟色胺(5-HT, 1:50)兔抗 5-羟色胺 1_A 受体(5-HT1_AR, 1:50)。(6)生物素化羊抗兔(小鼠) IgG, 37℃ 1 h。(7)滴加试剂 SABC 链酶亲和素-过氧化物酶复合物, 37℃ 1 h。(8)使用 DAB 显色试剂盒显色,镜下控制反应时间。

2.4 图像分析 对免疫组织化学染色结果,每组选取 3 张切片,每张切片同一部位选取 3 个视野, ImagePro Plus 真彩病理图像分析系统(version 5.0.1.11)(Media-Cybernetics, Int),统计每个视野中

阳性细胞平均光密度(density),积分光密度(integrated optical density)。

2.5 统计学方法 数据用 SAS 8.2 软件进行分析,结果以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用方差分析(ANOVA/LSD),以 $P < 0.05$ 作为显著性差异的标准。

3 结果

3.1 脑内 5-HT 阳性细胞的表达 模型组大鼠脑海马 CA3 扣带皮质、隔核内 5-HT 阳性细胞表达减少,圆形空泡样,分布稀疏,颜色浅淡,光密度下降,与正常组比较有统计学显著性意义 $P < 0.05$ 。模型组大鼠下丘脑内 5-HT 阳性细胞与正常组比较没有统计学显著性意义 $P > 0.05$ 。西药组在海马 CA3、扣带皮质表达增多,与模型组比较有统计学显著性差异 $P < 0.05$;西药组在下丘脑表达减少,与模型组比较有统计学显著性差异 $P < 0.05$ 。中药治疗组 5-HT 阳性细胞在海马 CA3、扣带皮质、隔核表达增多,与模型组比较有统计学显著性差异 $P < 0.05$;在下丘脑表达减少,与模型组比较有统计学显著性差异 $P < 0.05$ 。见表 1~2。

表 1 各组在脑不同部位 5-HT 阳性细胞光密度、积分光密度的表达($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量 (mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	海马 CA3 区		扣带皮质	
		光密度	积分光密度	光密度	积分光密度
正常组	—	162.9 ± 9.2	41 612.6 ± 1 599.5	161.1 ± 4.3	30 087.3 ± 3 054.4
模型组	—	140.4 ± 4.0 ¹⁾	37 095.9 ± 1 909.2 ¹⁾	145.1 ± 2.7 ¹⁾	13 692.2 ± 2 995.1 ¹⁾
百忧解组	2.33	155.1 ± 9.4 ^{1,2)}	40 061.1 ± 1 983.4 ²⁾	158.8 ± 2.1 ²⁾	22 277.6 ± 2 461.6 ^{1,2)}
颞脑解郁方组	6 200	152.8 ± 3.2 ^{1,2)}	39 463.9 ± 1 387.9 ^{1,2)}	156.5 ± 3.2 ^{1,2)}	20 381.5 ± 2 556.2 ^{1,2)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (下同)

表 2 各组在脑不同部位 5-HT 阳性细胞光密度、积分光密度的表达($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量 (mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	隔核		下丘脑	
		光密度	积分光密度	光密度	积分光密度
正常组	—	156.7 ± 9.5	48 191.1 ± 4 105.6	157.4 ± 4.6	27 924.7 ± 3 066.4
模型组	—	136.1 ± 9.4 ¹⁾	22 667.6 ± 2 607.2 ¹⁾	153.2 ± 4.8 ¹⁾	24 813.2 ± 2 084.1 ^{1,2)}
百忧解组	2.33	141.4 ± 4.7 ¹⁾	21 629.1 ± 3 890.4	135.9 ± 2.8 ^{1,2)}	22 387.36 ± 1 705.7 ^{1,2)}
颞脑解郁方组	6200	139.3 ± 7.6 ¹⁾	35 825.9 ± 2 936.9 ^{1,2)}	137.4 ± 3.2 ^{1,2)}	19 202.5 ± 1 651.1 ^{1,2)}

3.2 各组脑内 5-HT_{1A}R 的测定结果 模型组大鼠海马 CA3 区、隔核、下丘脑 5-HT_{1A}R 阳性细胞表达较正常增加 $P < 0.05$;西药组海马 CA3 区、扣带皮质 5-HT_{1A}R 阳性细胞表达较模型组升高 $P < 0.05$;在

隔核、下丘脑内 5-HT_{1A}R 阳性细胞表达较模型组升减低 $P < 0.05$ 。中药组扣带皮质 5-HT_{1A}R 阳性细胞表达较模型组升高 $P < 0.05$;在下丘脑 5-HT_{1A}R 阳性细胞表达较模型组减低 $P < 0.05$ (见表 3~4)。

表 3 各组在脑不同部位 5-HT_{1A}R 阳性细胞光密度、积分光密度的表达($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量 (mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	海马 CA3 区		扣带皮质	
		光密度	积分光密度	光密度	积分光密度
正常组	—	141.9 ± 3.6	214 384.8 ± 8 923.0	161.3 ± 4.31	42 725.7 ± 4 946.8
模型组	—	152.7 ± 3.7 ¹⁾	28 757.9 ± 3 730.1 ¹⁾	158.4 ± 3.7	31 517.6 ± 3 825.1 ¹⁾
百忧解组	2.33	167.5 ± 7.3 ^{1,2)}	38 083.9 ± 3 436.8 ^{1,2)}	173.5 ± 3.4 ^{1,2)}	43 305.7 ± 2 320.5 ²⁾
颐脑解郁方组	6 200	151.6 ± 6.8 ¹⁾	84 606.2 ± 6 281.6 ^{1,2)}	165.2 ± 3.3 ^{1,2)}	10 669.6 ± 5 488.5 ^{1,2)}

表 4 各组在脑不同部位 5-HT_{1A}R 阳性细胞光密度、积分光密度的表达($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量	隔核		下丘脑	
		光密度	积分光密度	光密度	积分光密度
正常组	—	138.1 ± 10.8	24 627.3 ± 1 767.2	141.8 ± 5.1	24 835.1 ± 4 218.9
模型组	—	164.3 ± 14.1 ¹⁾	25 927.1 ± 1 445.2 ¹⁾	157.3 ± 4.9 ¹⁾	227 488.5 ± 1 906.4
百忧解组	2.33	140.3 ± 4.9 ²⁾	29 468.8 ± 3 268.6 ^{1,2)}	150.8 ± 5.6 ^{1,2)}	25 593.0 ± 2 843.5
颐脑解郁方组	6200	162.1 ± 6.0 ¹⁾	29 301.3 ± 2 328.7 ^{1,2)}	152.0 ± 7.2 ^{1,2)}	27 324.8 ± 3 478.3

3 讨论

脑出血后抑郁症是一种器质性情感障碍,其通常缓慢起病,病程迁延。脑内单胺能神经功能低下是构成脑出血后抑郁的病理生理基础。

目前研究表明,脑卒中后抑郁症产生相关的脑定位损害主要的是额叶/颞叶-基底节-脑干腹侧这一环路。5-HT 耗竭大鼠应激时更容易产生抑郁和焦虑症状,并易导致学习、记忆等认知功能受损,对应激适应能力下降。5-HT_{1A} 受体主要分布在中枢神经系统,以边缘系统(海马、隔、杏仁)和中缝背核最多,下丘脑、锥体外系、大脑皮质和脊髓也有少量分布。5-HT_{1A} 受体在突触后,有调节情绪作用^[2],突触后 5-HT_{1A} 的激活能够缓解 5-HT 耗竭及 5-HT 耗竭应激大鼠的焦虑和抑郁症状,促进对慢性应激的适应^[3]。

颐脑解郁方是唐启盛老师临床应用多年的经验方,以刺五加、郁金等组成。临床上起到了改善患者抑郁症候的效果^[4]。在图像分析中,光密度越大,表示某种物质的含量越高,积分光密度为待测目标的光密度总和,反映光密度与面积的综合变化。本研究显示脑出血后抑郁模型大鼠脑海马 CA3、扣带皮质、隔核内 5-HT 阳性细胞表达减少,颐脑解郁方和百忧解均增加海马 CA3、扣带皮质内 5-HT 阳性细胞内蛋白表达,减少 5-HT 阳性细胞在下丘脑表达;模型组大鼠海马 CA3、隔核、下丘脑 5-HT_{1A}R 阳性细胞蛋白表达较正常增加,百忧解和颐脑解郁方均可增加海马 CA3 区、扣带皮质 5-HT_{1A}R 阳性细胞蛋白表达,但百忧解减少隔核、下丘脑内 5-HT_{1A}R 阳性细胞

蛋白表达,颐脑解郁方减少下丘脑内 5-HT_{1A}R 阳性细胞蛋白表达,与相关研究抗抑郁药物西酞普兰可以促进拟脑卒中后抑郁大鼠海马齿状回 5-HT_{1A} 的表达一致^[5]。

上述研究表明颐脑解郁方可以通过增强 5-HT 的功能,增加其浓度,调节不同部位 5-HT_{1A}R 细胞功能起到改善抑郁的功能;同时也提示在脑出血后抑郁的发病过程中,下丘脑可能有者与海马、扣带皮质、隔核不同的功能,同时也提示中药颐脑解郁方和百忧解针对脑出血后抑郁存在相同和不同的作用部位,这点仍需进一步探讨。

[参考文献]

- [1] 唐启盛,罗斌,司银楚,等. 脑出血后抑郁状态动物模型的建立[J]. 北京中医药大学学报, 2006, 29(1): 16-19.
- [2] Meltzer CC, Price JC, Mathis CA, et al. Serotonin 1A receptor binding and treatment response in late-life depression[J]. Neuropsychopharmacology, 2004, 29(12): 2258-2265.
- [3] 周建松,李凌江,曹霞,等. 5-羟色胺及其突触后 1A 受体对慢性应激大鼠情绪和认知的影响[J]. 中南大学学报(医学版), 2008, 33(04): 305-311.
- [4] 唐启盛,侯德明,陈密文,等. 颐脑解郁方治疗轻、中度抑郁症的开放性临床研究[J]. 中国临床康复, 2002, (6): 3207.
- [5] 王少华,张志璠,郭怡菁,等. 西酞普兰对脑卒中后抑郁大鼠海马齿状回 5-羟色胺(1A)受体表达的影响[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2007, 33(8): 463-466.