

定志小丸对雌性抑郁大鼠雌二醇和 齿状回神经干细胞的影响

闫醒予, 王德山, 单德红*
(辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110032)

[摘要] 目的: 研究定志小丸的抗抑郁机制。方法: 40只体重和行为学得分相近的雌性大鼠分为正常对照组、抑郁症模型组、生理盐水组和定志小丸组, open field法检测行为学得分, ELISA法检测血清雌二醇(E₂)含量, 免疫组化技术检测齿状回神经干细胞(NSC)增殖情况。结果: 与正常对照组比较, 模型组和盐水组行为学得分及血清E₂含量显著下降, NSC增殖明显减少, 定志小丸组行为学得分及血清E₂含量与正常对照组比无明显变化, NSC增殖显著增加。结论: 定志小丸的抗抑郁作用与其维持E₂正常分泌和促进NSC增殖有关。

[关键词] 抑郁症; 雌二醇; 神经干细胞; 定志小丸

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)06-0043-03

Effect of Dingzhixiaowan on E₂ and Dentate Gyrus Neural Stem Cell of Female Depressed Rats

YAN Xing-yu, WANG De-shan, SHAN De-hong*
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-depression mechanism of dingzhixiaowan. **Methods:** 40 female rats of same weight and behavior points were divided into the control, the depression model group (model group), saline group and dingzhixiaowan group (Chinese medicine group). The behavior points were measured by open field method. Serum E₂ levels were detected with ELISA. The proliferation levels of neural stem cells (NSC) in dentate gyrus were detected by immunohistochemistry technique. **Results:** Compared with the control, the behavior points and serum E₂ levels of the model group and saline group decreased obviously, and those of the Chinese medicine group did not change markedly. Compared with the control, the proliferation levels of NSC of the model group and saline group decreased obviously, while that of the Chinese medicine group increased markedly. **Conclusion:** Dingzhixiaowan has the anti-depression acting by maintaining the normal E₂ level and increasing proliferation of the NSC.

[Key words] depression; E₂; neural stem cell; Dingzhixiaowan

抑郁症是常见的情感障碍, 女性发病率要高于男性, 特别易发于经前期、产后和绝经期。目前认为雌激素大幅下降是女性易发抑郁症的主要原因, 因

为雌激素具有保护神经元和促进齿状回神经干细胞增殖(NSC)^[1]作用, 其分泌减少, 会使海马结构失去保护而易为慢性应激损伤, 从而影响海马结构调节情绪、行为及内脏活动的功能。本项实验主要通过检测血清雌二醇(E₂)含量及NSC增殖, 观察定志小丸对雌性抑郁大鼠的抗抑郁作用。

[收稿日期] 2006-08-17

[基金项目] 辽宁省教育厅课题(No: 05L244)

[通讯作者] * 单德红, Tel: (024) 31207089; E-mail: shandehong1971@163.com

1 材料

1.1 动物 Wistar 雌性大鼠, 普通级, 体重 220 ± 20 g, 由辽宁中医药大学动物实验中心提供, 合格证号: SCXK(辽) 2004-0018。

1.2 定志小丸的药物组成与制备 定志小丸由人参、茯苓、远志、石菖蒲的标准提取物的颗粒剂组成, 均购于安徽宣城百草植物工贸有限公司, 其制备工艺及质控标准均依据《企业标准》。取人参、茯苓、远志、石菖蒲的标准提取物各 10: 10: 6: 6, 溶于适量水中, 加热后浓缩为生药 1 kg/L。

1.3 仪器与试剂 行为学检测箱为自制 1 m × 1 m × 1 m 木箱, 底部按 0.2 m × 0.2 m 划分区域。BF-2000 医学图像分析系统由成都泰盟科技有限公司生产。Nestin 免疫组化试剂盒内购于武汉博士德沈阳分公司, 产品编号 SA1022。

2 方法

2.1 动物分组 适应性饲养 1 周后, 选择体重和行为学得分相近的 40 只大鼠, 随机分为正常对照组(正常组)、抑郁症模型组(模型组)、生理盐水组(盐水组)和定志小丸组(中药组), 每组 10 只。正常组每笼 5 只饲养, 其余 3 组每笼 1 只饲养。

2.2 抑郁症模型的复制 除正常组, 其余 3 组动物均接受慢性应激刺激, 参考 Katz RJ 等方法复制慢性不可预见性应激模型^[2,3]。方法是在 21 d 内施加电击足底(36 V 交流电, 5 min)、冷水游泳(4 °C, 5 min)、摇晃(1 min)、夹尾(1 min)、禁水(24 h)、禁食(24 h)等刺激, 每次抽签决定刺激类型, 每日 1 次, 平均每种刺激 3~4 次。

2.3 给药方法 正常组不给药; 模型组只施加灌胃动作但不给药; 中药组灌服定志小丸。按成人用量折算成灌胃剂量(10 g·kg⁻¹·d⁻¹), 于刺激前 1 h 灌服; 盐水组灌服同体积生理盐水(10 mL·kg⁻¹·d⁻¹)。

2.4 大鼠行为学检测 在实验的第 0 d 和第 22 d, 采用 Open field 法检测, 以 3 min 内大鼠水平穿越方格数作为水平活动得分, 以前肢抬起次数为垂直活动得分。检测过程中保证时间、光照、温度及环境噪音的一致性。检测由 3 人同时完成, 1 人负责计时, 1 人负责观察大鼠的水平活动, 1 人负责计数垂直活动。正式检测前, 3 人首先熟悉检测标准, 并进行多次训练, 尽量减少人为误差。

2.5 血清 E₂ 检测 在第 22 d, 大鼠腹腔注射 20%

氨基甲酸乙酯(0.4 mL/100 g) 麻醉后, 腹主动脉取血, 离心后取血清, 冻存备用。于沈阳军区总医院内分泌实验室采用 ELISA 方法进行检测。

2.6 Nestin 免疫组化(SABC 法) 大鼠经 20% 乌拉坦(100 mg/kg) 腹腔麻醉后, 升主动脉插管, 150 mL 生理盐水快速冲去血液, 立即取双侧海马, 4% 多聚甲醛固定 4~6 h, 置于 30% 蔗糖溶液中至沉底。冰冻连续切片, 片厚 25 μm, 隔 4 片取 1 片。将切片置含新鲜 0.5% H₂O₂ 的纯甲醇中 30 min, 蒸馏水洗 3 次; 0.1% Triton 溶液中 30 min; 5% BSA 封闭, 室温 20 min, 不洗; 兔抗鼠 Nestin 一抗(1:2 000, Sigma), 25 °C 孵育 1 h, 4 °C 过夜, PBS 洗 2 min × 3 次; 生物素化山羊抗兔 IgG 室温下 60 min, PBS 洗 2 min × 3 次; SABC 复合物, 室温 60 min, PBS 洗 5 min × 4 次; DAB 显色, 蒸馏水洗涤。染色对照: 用正常山羊血清和 PBS 代替 Nestin 一抗作孵育, 其余步骤同上。每只动物选取一张含有完整齿状回区域的切片, 利用 BF-2000 医学图像分析系统的显微镜(16 × 40) 观察, 选齿状回区域中内 Nestin 阳性细胞数量丰富的视野, 拍成数码照片, 计数全视野内 Nestin 免疫阳性细胞数。

2.7 统计学方法 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS11.5 进行处理, 采用 ANOVA 检验。

3 结果

实验过程中没有实验动物的死亡及脱失, 各组有效例数均为 10 只。

3.1 各组大鼠行为学得分 表 1 可见: 第 0 d 4 组大鼠的水平 and 垂直得分之间均没有统计学差异; 同组大鼠第 0 d 和第 22 d 比较, 正常组和中药组无明显差异, 模型组和盐水组得分则显著减少。

表 1 各组大鼠的行为学(次/3 min)得分

组别	剂量 (kg ⁻¹)	水平		垂直	
		第 0 d	第 22 d	第 0 d	第 22 d
正常组	—	49.2 ± 17.0	44.2 ± 13.8	11.6 ± 3.9	10.0 ± 4.2
模型组	—	55.4 ± 15.6	34.2 ± 15.1 ¹⁾	10.6 ± 4.5	5.3 ± 4.7 ¹⁾
盐水组	10 mL	49.3 ± 16.5	28.3 ± 10.7 ¹⁾	11.9 ± 6.2	5.6 ± 3.4 ¹⁾
定志小丸组	10 g	56.7 ± 19.2	48.3 ± 16.7	10.5 ± 3.4	11.4 ± 3.7

注: 与同组第 0 d 比较¹⁾ P < 0.01。

3.2 各组大鼠血清 E₂ 含量 与正常组相比, 模型组和盐水组 E₂ 水平显著下降, 中药组 E₂ 水平没有明显变化(见表 2)。

表 2 给药 22 d 各组大鼠血清 E₂ 浓度影响

组别	剂量 (kg ⁻¹)	E ₂ (pg/mL)
正常组	—	17.56 ± 7.70
模型组	—	10.15 ± 1.89 ¹⁾
盐水组	10 mL	9.11 ± 3.91 ¹⁾
定志小丸组	10 g	14.70 ± 7.19

注:与正常对照组比较¹⁾ P < 0.01。(下同)

3.3 各组 Nestin 免疫阳性细胞数量 Nestin 蛋白呈波状,集中在核膜周围。与正常组比较,模型组和盐水组 Nestin 免疫阳性细胞数量明显减少,中药组则明显增多(见表 3)。

表 3 各组海马 Nestin 免疫阳性细胞数

组别	剂量 (kg ⁻¹)	免疫阳性细胞数
正常组	—	30.8 ± 12.6
模型组	—	15.7 ± 4.9 ¹⁾
盐水组	10 mL	17.3 ± 5.2 ¹⁾
定志小丸组	10 g	110.2 ± 45.7 ¹⁾

4 讨论

女性在经前期、产后和绝经期容易出现抑郁情绪,其原因可能与雌激素在短时间内出现绝对不足或相对不足有关,因此补充 E₂ 是治疗女性抑郁症的常用方法⁴⁾,其作用机制可能与神经保护作用有关。目前认为抑郁症的发病与海马结构关系密切。海马结构主要由海马和齿状回构成,其中齿状回存在 NSC,可以在雌激素、神经生长因子等适宜刺激下增殖发育,修复受损的海马结构和功能,但在抑郁状态下,雌激素水平下降可能影响了海马结构的自我修复能力,导致内脏功能的异常。虽然补充雌激素具有一定抗抑郁作用,但其副作用限制了该疗法的广泛开展,因此寻找替代品就成为研究的热点。

定志小丸源于唐代孙思邈的《备急千金要方》,由远志、石菖蒲、茯苓和人参组成,具有祛痰开窍、健脾益智作用,主治心气不定,五脏不足,忧悲不乐等。本课题组将其用于防治抑郁症是该方治疗范围的拓

展。实验中首先观察到中药组大鼠的行为学得分与正常对照组无明显差异,表明该方能够对抗慢性应激对大鼠行为学的影响,具有一定的抗抑郁作用。其次检测到中药组大鼠的 E₂ 水平与正常对照组没有显著差异,说明该方能够维持 E₂ 的正常分泌,提示该方可以成为 E₂ 的替代品。最后以齿状回 NSC 为指标探讨定志小丸的中枢抗抑郁机制。由于 NSC 缺乏成熟神经细胞所具有的抗原,目前主要是通过间接标记 Nestin 等方法反应 NSC 增殖分化情况, Nestin 为 NSC 发育过程中一过性表达的中间丝蛋白,参与早期 NSC 发育。实验中观察到模型组和盐水组 Nestin 免疫阳性细胞数量明显低于正常组,说明抑郁状态下,齿状回 NSC 增殖抑制,海马自我修复能力下降,而中药组 Nestin 免疫阳性神经元数量明显高于正常组,表明该方不仅能够维持齿状回 NSC 的正常增殖水平,而且能够明显促进其增殖,极大提高其自我修复能力。参考前二项检测指标,提示该方的抗抑郁作用可能与维持 E₂ 的正常分泌、促进齿状回 NSC 增殖有关,但中药组 Nestin 免疫阳性细胞数量比正常对照组还高的原因及意义目前尚不清楚,这将是以后研究的重点。

[参考文献]

- [1] Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, *et al.* Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat[J]. *J Neurosci*, 1999, 19: 5792-5801.
- [2] Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1981, 5(2): 247-251.
- [3] Katz RJ, Sibel M. Animal model of depression: tests of three structurally and pharmacologically novel antidepressant compounds[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1982, 16(6): 973-977.
- [4] Mermelstein PG, Becker JB, Surmeier DJ. Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor[J]. *J Neurosci*, 1996, 16: 595-604.