

苏郁胶囊对慢性应激抑郁模型大鼠海马神经细胞凋亡的影响

钟晓明, 毛庆秋, 黄真, 梁泽华(浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

摘要:目的 探究苏郁胶囊抗抑郁的作用机制。方法 将 96 只 Open-Field 评分相近的成年 SD 雄性大鼠随机分为正常组、模型组、苏郁胶囊高、中、低剂量组(22.8g/kg、11.4g/kg、5.7g/kg)及氯米帕明组(0.02g/kg)。采用长期不可预见中等强度应激结合孤养造成大鼠抑郁模型。Open-Field 法和糖水消耗实验测定各组大鼠的行为变化;用 TUNEL 试剂盒检测海马 CA3 区神经细胞凋亡情况,免疫组化法检测 Bcl-xl 蛋白的表达;应用钙离子荧光指示剂 Fura-2/AM 测定海马突触体内游离 Ca^{2+} 浓度。结果 与正常组比较,模型组大鼠出现明显的行为异常,糖水消耗明显减少;海马 CA3 区 TUNEL 阳性细胞数增加明显,Bcl-xl 蛋白表达减少明显;海马突触体内游离 Ca^{2+} 浓度明显升高。苏郁胶囊高中治疗组能明显增加抑郁大鼠的糖水消耗量,改善其行为异常;苏郁胶囊高中低治疗组能明显减少海马 CA3 区 TUNEL 阳性细胞数,上调海马 CA3 区 Bcl-xl 蛋白表达,减少海马突触体内游离 Ca^{2+} 浓度,并具有一定的量效关系。结论 苏郁胶囊能改善大鼠的抑郁样行为;抑制抑郁大鼠海马神经细胞凋亡。其可能与苏郁胶囊抑制海马神经细胞外 Ca^{2+} 大量内流,阻止 Ca^{2+} 超载,上调海马 Bcl-xl 蛋白表达相关。

基金项目:浙江省中医药科技计划重点项目(2006Z001);浙江省教育厅科研项目(20050833)

The effect of Suyu capsule on nerve cell apoptosis in hippocampus of the depression model rats

ZHONG Xiao-ming, MAO Qing-qiu, HUANG Zhen, LIANG Zhen-hua (Department of Pharmacy Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 31005, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE This study examine the possible mechanism of Suyu capsule for antidepressive action. **METHODS** 96 male SD rats were separated randomly into 6 groups including the control group, the model group, Anafranil group and three other groups under the treatment of suyu capsule with the doses of 22.8g/kg, 11.4g/kg, 5.7g/kg respectively. The model was established by separation and chronic unpredictable mild stimulation. The behavioral outcome of the rats were measured by crossing score, rearing score of the open-field method in addition to the records of sweet water consumption of rats. On the other hand, cell apoptosis of rats in CA3 region of hippocampus neurons were examined by TUNEL while the expression of Bcl-xl protein were detected by an immunohistochemistry method. The concentration of Ca^{2+} ion in the hippocampal synaptic was determined by fluorimetry. **RESULTS** Comparing to those in the control group, rats in the model group showed obvious dystrophy with much lower sweet water consumption. Further, the numbers of the positive cells in the sub-region of CA3 region of hippocampus by TUNEL were obviously increased in contrast to an apparent decrease in the expression of Bcl-xl protein in the same region. In addition, Ca^{2+} ion in hippocampal synaptic was found to be increased. On the other hand, Suyu capsule (22.8g/kg, 11.4g/kg) when used to improve the behavioral outcome of rats with an increase in sweet water consumption and improvements in the crossing scores and rearing scores of the depression model rats. Suyu capsule (22.8g/kg, 11.4g/kg, 5.7g/kg) was found to decrease the numbers of TUNEL positive cells but at the same time increase the expression of Bcl-xl protein in the CA3 region of hippocampus. Further, the same treatments were also found to decrease Ca^{2+} ion in hippocampal synaptic with dose-effect relationship. **CONCLUSION** Suyu capsule can reverse all the symptoms of the depression and reduce nerve cell apoptosis in hippocampus of in the rats of the mode depression group. The effects appear to be brought about by reducing the secretion of Ca^{2+} ion and increasing expression of Bcl-xl protein in the subregion of hippocampus.

KEY WORDS: Suyu capsule; Antidepressant; Hippocampus; Cell apoptosis

抑郁症是一种包括多种精神症状和躯体症状的复杂的情感性精神障碍。在现代社会剧烈的竞争压力下, 抑郁症已成为现代人常见的精神疾病之一, 据世界精神病协会调查表明, 全球抑郁症发病率为 4.2%, 中国达到 6.9%, 且抑郁症患者还以每年 113% 的增长率递增。从祖国医学中寻找, 开发高效、安全的抗抑郁药, 日益受到国内外重视。苏郁胶囊是根据临床验方研制而成的中药新药, 由柴胡、苏梗、郁金、石菖蒲等中药组成, 具有舒肝解郁、理气宽中、宁心安神之功效, 主治肝气郁结、痰火扰神所致的轻、中度抑郁症。笔者采用小鼠强迫游泳试验、小鼠悬尾试验和利血平拮抗模型对其抗抑郁作用进行行为评价, 结果显示其具有抗抑郁样活性(另文发表)。笔者应用慢性应激结合孤养建立大鼠抑郁模型, 研究苏郁胶囊对慢性应激抑郁模型大鼠行为、海马 CA3 区神经细胞凋亡、抗凋亡因子 Bcl-xl 蛋白表达及海马突触体内游离 Ca^{2+} 浓度的影响, 探讨苏郁胶囊治疗抑郁症的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 SD 雄性大鼠, 体重($200 \pm 20\text{g}$), 由浙江中医药大学实验动物中心提供, 动物合格证: syxk(浙)2003-0003。

1.1.2 试验药物与试剂 苏郁胶囊(浸膏), 由浙江中医学院中药新产品制剂研究重点实验室提供, 每克干粉含生药

12.7g, 批号: 050703; 盐酸氯米帕明片(安拿芬尼), 北京诺华制药有限公司产品, 批号: 05002; 兔抗鼠 Bcl-xl 抗体, Santa Cruze 公司产品; TUNEL 检测试剂盒, 德国宝灵曼公司产品; 钙离子荧光指示剂 Fura-2/AM, Molecular Probes 公司产品; RPMI-1640 培养液, Gibco 公司产品; 水合氯醛、多聚甲醛、苏木精等均为市售分析纯商品。

1.2 实验方法

1.2.1 分组及给药 大鼠饲养 1 周以适应环境, 然后采用 Open-Field 法作为行为学评分, 选择评分相近的大鼠 96 只, 随机分为 6 组, 即正常组, 模型组, 苏郁胶囊高、中、低剂量组(分别相当于原生药为 22.8, 11.4, 5.7g/kg), 氯米帕明组(0.02g/kg), 每组 16 只(其中 8 只用于灌注取材切片, 8 只用于海马突触体游离钙离子浓度测定)。除正常组外, 其余各组大鼠均孤养。于造模同时, 各组 ig 给药, 正常组及模型组给予等量的生理盐水, 每天一次, 共 21d。

1.2.2 慢性应激抑郁模型制备 由于机体对同种强度的单一应激原易产生耐受性, 因此本实验运用多种不可预知的刺激方式, 以每天 1 次的频率交替应激大鼠 21d, 应激包括: 高速水平震荡 60s、禁食 48h、禁水 24h、夹尾 60s、 45°C 热刺激 5min、悬吊 15min、昼夜颠倒 24h、 4°C 冷刺激 5min 等。

1.2.3 Open-Field 法测定大鼠行为变化 实验第 21 天用

Open-Field 法测定各组大鼠的行为变化。实验装置为 100cm × 100cm × 50cm (长 × 宽 × 高) 木箱, 周壁黑色, 底部等分为 25 方格。以大鼠穿越底面块数为水平活动得分, 大鼠一般靠周边行走, 以每 10cm 为 1 次; 以直立次数为垂直活动得分, 大鼠双足离开底面 1cm 为垂直活动得分, 无论大鼠站立多长时间直至大鼠双足放下为 1 次活动。时间为 3min。

1.2.4 糖水消耗实验 于实验第 22 天, 每只大鼠加 1% 蔗糖溶液 100mL, 同时进行禁食, 计算大鼠 24h 饮用 1% 蔗糖溶液量。

1.2.5 取材切片 实验第 23 天, 大鼠 10% 水合氯醛深麻醉后(8mL/kg), 迅速开胸暴露心脏, 经左心室先用 100mL 生理盐水快速冲洗, 随后用 4% 多聚甲醛缓冲液(4℃, 0.1mol/L, pH7.4)灌注约 20min。灌毕, 立即取脑, 浸入 4% 多聚甲醛缓冲液(4℃ pH7.4)固定 1d, 再浸入 30% 蔗糖 1d, 分离海马。在冰冻切片机上, 行 7μm 厚连续冠状切片。

1.2.6 神经细胞凋亡检测 切片于 20μg/mL 蛋白酶 K37℃ 下消化 30min; 配制含末端脱氧核苷酸转移酶和荧光素标记的 dUTP 混合反应液, 加入后 37℃ 孵育 1h; 再滴加连接碱性磷酸酶的抗荧光素抗体 37℃ 下孵育 30min; 坚固红呈色; 苏木素轻衬染, 常规脱水、透明、封片, 上述各步骤完成后均经 0.01mol/L PBS 洗涤 3min, 共 3 次。TUNEL 染色中细胞核呈暗紫色者为阳性细胞, 即凋亡细胞。每只大鼠取切片一张, 分别在海马 CA3 区域各选取四个视野, 光镜下(40 × 10)分析单个视野下调亡细胞个数, 取平均值统计。

1.2.7 免疫组化检测 Bcl-xl 蛋白表达 切片在 0.2% TritonX-100 PBS(0.01mol/L, pH7.4)中孵育 2h(室温), 用 20% 封闭用山羊血清孵育 20min(室温), 倾去血清, 加兔抗鼠 Bcl-xl 抗体(1:50)孵育(4℃, 过夜), 抗体用 1% 血清白蛋白酸缓冲液(PBS, 0.01mol/L) pH7.4 配制。对照试验用 0.01mol/L PBS(pH7.4)代替一抗。经 PBS 浸泡 30min 后, 切片浸入生物素结合羊抗兔 IgG(1:300)孵育 1h(室温)。再经 PBS 浸泡 30min, 切片浸入链卵白素-生物素结合辣根过氧化物酶(1:300)孵育 1h(室温)。PBS 充分漂洗后(30min), 用 0.05% DAB 和 0.01% 过氧化氢呈色, 明胶贴片, 空气中干燥, 苏木素复染, 脱水, 透明, DPX 封片。免疫组化染色中 Bcl-xl 蛋白的阳性反应为神经细胞胞浆着色, 呈现棕黄色者。每只大鼠取切片一张, 分别在海马 CA3 区域各选取四个视野, 光镜下(40 × 10)分析单个视野下 Bcl-xl 蛋白的阳性细胞数, 取平均值统计。

1.2.8 海马突触体内游离 Ca²⁺ 浓度测定 突触体的制备参考文献^[1]。大鼠于冰浴上快速断头取脑, 分离海马。将海马置于匀浆器中称重, 按 1:10(W/V)加入 4℃ 的 0.32mol/L 的等渗蔗糖液 4℃ 下匀浆, 1500r/min 离心 10min, 取去核上清液。上清液再于 9500r/min 离心 20min, 得到 P2 组分。将 P2 组分用 0.32mol/L 的蔗糖液(1g/mL)缓慢悬浮起来, 悬浮液按 4:15 小心铺在 0.8mol/L 蔗糖液面上。再于 9500r/min 离心 30min, 收集 0.8mol/L 蔗糖相组分, 并用 3 倍体积的 4℃ 的 Na⁺ 介质稀释, 17000r/min 离心 30min, 沉淀以 Na⁺ 介质清洗

并悬浮。突触体悬液 2mL(蛋白浓度为 10 ~ 15mg/mL)与 Fura-2/AM (终浓度 3μmol/L)于 37℃ 下孵育 40min(同时轻摇), 后加入 1 倍体积 4℃ Na⁺ 介质终止 Fura-2 负载。离心(12000r/min 10min), 用 2mL Na⁺ 介质(0.1% 牛血清白蛋白)清洗两次, 沉淀悬浮于 4mL 的 Na⁺ 介质中, 37℃ 下孵育 5min。荧光测定采用日立岛津 RF-540 型荧光分光光度计, 按文献^[2]测定计算突触体内游离 Ca²⁺ 浓度。

1.3 统计学处理

实验结果数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 11.5 分析应用软件处理分析数据, 组间样本比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 具有显著性差异。

2 结果

2.1 苏郁胶囊对抑郁模型大鼠行为变化及糖水消耗量的影响

结果见表 1。模型组大鼠的水平活动(crossing)得分和垂直活动(rearing)得分均较正常组显著减少($P < 0.001$), 糖水消耗量(mL)较正常组明显降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 苏郁胶囊高、中及低剂量均能增加抑郁大鼠的水平活动得分($P < 0.05$)和垂直活动得分($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.05$); 苏郁胶囊高及中剂量组能明显增加抑郁大鼠的糖水消耗量(mL)($P < 0.05$)。

表1 苏郁胶囊对抑郁模型大鼠行为及糖水消耗量的影响 ($n = 16, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 The effect of Suyu capsule on behavior and sweet water consumption of depression model rats($n = 16, \bar{x} \pm s$)

组 别	剂量 (g/kg)	水平运动	垂直运动	糖水消耗量 (mL)
正常组	—	54.5 ± 15.5 **	9.8 ± 2.7 ***	53.3 ± 16.8 **
模型组	—	29.5 ± 11.7 #	3.6 ± 1.5 ##	30.7 ± 10.4 #
高剂量	22.8	43.6 ± 13.2 *	8.4 ± 4.9 *	44.9 ± 13.4 *
中剂量	11.4	45.5 ± 14.9 *	9.0 ± 3.9 **	43.1 ± 12.3 *
低剂量	5.7	43.1 ± 12.2 *	6.3 ± 2.6 *	39.4 ± 15.2
氯米帕明组	0.02	43.2 ± 13.3 *	8.4 ± 3.5 **	43.0 ± 10.8 *

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与正常组比较, # $P < 0.01$, ## $P < 0.001$ (下同)

Note: vs model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; vs control group, # $P < 0.01$, ## $P < 0.001$

2.2 TUNEL 染色观察

结果见表 2。模型组大鼠海马 CA3 区调亡细胞数较均正常组明显增加($P < 0.001$); 苏郁胶囊高、中及低剂量组可拮抗抑郁模型大鼠海马神经细胞调亡, 调亡细胞个数与模型组比较有显著性差异($P < 0.001, P < 0.001, P < 0.05$), 并呈现一定的量效关系。

2.3 免疫组化结果观察

结果见表 2。模型组大鼠海马 CA3 区 Bcl-xl 蛋白的阳性细胞个数较正常组明显减少($P < 0.01$); 与模型组比较, 苏郁胶囊高、中及低剂量组可增加抑郁模型大鼠海马 CA3 区阳性细胞个数($P < 0.01, P < 0.05, P < 0.05$), 并呈现一定的量效关系。

表2 各组大鼠海马CA3区TUNEL染色及Bax-xl蛋白免疫组化阳性细胞计数结果($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 The numbers of positive cell by TUNEL and Bax-xl by immunohistochemistry in CA3 region of hippocampus($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	TUNEL 阳性细胞数	Bax-xl 阳性细胞数
正常组	—	6.4 ± 2.5 ***	10.9 ± 3.7 **
模型组	—	16.5 ± 3.6 ##	5.5 ± 2.3 #
高剂量	22.8	7.4 ± 1.9 ***	9.4 ± 2.7 **
中剂量	11.4	9.5 ± 2.1 ***	8.4 ± 2.9 *
低剂量	5.7	10.9 ± 3.4 *	8.1 ± 2.2 *
氯米帕明组	0.02	8.4 ± 2.7 ***	8.9 ± 2.1 **

2.4 海马突触体内游离Ca²⁺浓度

结果见表3。与正常组比较,模型组大鼠海马突触体内游离Ca²⁺浓度升高十分明显($P<0.001$);与模型组比较,苏郁胶囊高、中及低剂量组可剂量依赖性的降低慢性应激抑郁模型大鼠海马突触体内游离Ca²⁺浓度($P<0.001, P<0.01, P<0.05$)。

表3 各组大鼠海马突触体内游离Ca²⁺浓度($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab 3 The concentration of Ca²⁺ ion in the hippocampal synaptic($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	Ca ²⁺ (nmol/L)
正常组	—	153.8 ± 27.7 ***
模型组	—	330.5 ± 33.6 ##
高剂量	22.8	212.9 ± 46.5 ***
中剂量	11.4	255.8 ± 29.9 **
低剂量	5.7	266.2 ± 73.1 *
氯米帕明组	0.02	243.5 ± 40.3 **

3 讨论

本实验采用慢性不可预见性的应激刺激,与人类抑郁症中慢性、低水平的应激源促进抑郁症的发生及发展的机理更为接近,是抑郁症病理生理研究较好的模型之一,也是目前国内外学者在抑郁症研究中广泛应用的动物模型。在实验中可见模型组在规定时间内水平活动、垂直活动次数均较空白对照组明显减少,糖水消耗量降低,说明模型组大鼠活动能力下降,兴趣丧失,快感缺乏等;并且经过抗抑郁中药新药苏郁胶囊治疗后上述症状明显改善,说明抑郁动物模型复制成功。

本实验采用的检测细胞凋亡技术为细胞原位标记法,亦称为TUNEL法(TdT酶介导的原位末端标记法)。TUNEL方法具有特异性和灵敏度高,重复性好,分辨率较高,使用方便等优点^[3,4]。在实验中发现,抑郁模型组大鼠海马CA3区TUNEL染色阳性细胞较正常组明显增加,表明抑郁症模型大鼠海马神经细胞凋亡增加,与Lucassen等^[5]及谢氏^[6]等在抑郁症病人及大鼠海马内神经细胞凋亡的研究结论一致。口服苏郁胶囊治疗后,苏郁胶囊组海马CA3区TUNEL染色阳性细胞明显减少,与模型组比较,有统计学差异,说明苏郁胶囊可拮抗抑郁症模型大鼠海马神经细胞凋亡。细胞凋亡时也伴随着一些凋亡促进或抑制基因的表达,这些基因通过对细胞凋亡发生过程的干预而对凋亡进行调控。Bcl-xl是脑

组织中表达较高的抗凋亡基因,既往研究证实^[7]:Bcl-xl表达量的变化与细胞是否存活有密切关系。因此本实验用免疫组化法探讨了抑郁症模型大鼠海马CA3区Bcl-xl的蛋白表达及苏郁胶囊的干预作用。结果显示:抑郁模型大鼠海马CA3区表达Bcl-xl蛋白的阳性细胞计数明显较正常组减少,苏郁胶囊能增加抑郁模型大鼠海马CA3区Bcl-xl蛋白阳性细胞个数,与模型组比较,有统计学差异,这进一步证实抑郁模型大鼠海马神经细胞凋亡及苏郁胶囊的干预作用。抑郁症模型大鼠海马神经细胞凋亡可能与Ca²⁺超载相关,长期慢性应激可引起神经细胞外兴奋性氨基酸(如谷氨酸)堆积,谷氨酸与N-甲基-D-天门冬氨酸受体(NMDAR)结合增加,受体被持续激活,Ca²⁺大量内流,Ca²⁺可以激活一系列与凋亡相关的酶,从而导致细胞凋亡^[8,9]。本实验研究结果亦证明抑郁症模型大鼠海马突触体内游离Ca²⁺浓度明显升高($P<0.001$),苏郁胶囊可能降低海马突触体内游离Ca²⁺浓度,与模型组比较,有统计学差异,并呈现一定的量效关系。这可能是苏郁胶囊干预神经细胞凋亡的机制之一。

抑郁症属中医“郁证”范畴。其病理机制为情志不舒,肝气郁结渐致五脏不和引起,因此中医临床多从肝论治。苏郁胶囊中柴胡具有和表解里、疏肝升阳之功效,对肝气郁结、气机不畅引起的胸胁胀满、抑郁寡欢等有治疗作用,苏梗、郁金理气宽中,行气止痛,石菖蒲开窍豁痰,化湿和胃,诸药合用共奏疏肝解郁、理气宽中、宁心安神之功。从本实验可以得出:苏郁胶囊能改善大鼠的抑郁样行为;干预抑郁模型大鼠海马神经细胞凋亡,其可能与苏郁胶囊抑制海马神经细胞外Ca²⁺大量内流,阻止Ca²⁺超载,上调海马Bcl-xl蛋白表达相关。

参考文献

[1] Xu ZW, Ao HQ, Wu LL, et al. Effect of Xiaoyaosan on hippocampal synaptic structural plasticity of rats under multi stress model [J]. Pharmacology and clinics of Chinese materia medica(中药药理与临床),2005,21(1):5.

[2] Yang YH, Shan D, Du HW, et al. Effect of Cobra venom cardiotoxin on the contraction and cytosolic calcium in adult rat ventricular myocytes [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy (中国现代应用药理学),2005,22(6):448.

[3] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation [J]. J Cell Biol,1992,119(3):493.

[4] Peng L, Liu JJ. A novel method for quantitation analysis of apoptosis [J]. Lab Invent,1997,7(6):547.

[5] Lucassen PJ, Marianne B Muller, Florian Holsboer, et al. Hippocampal apoptosis in major depression is a minor event and absent from subarease at risk for glucocortic overexposure [J]. Am J Pathol,2001,158(2):453.

[6] Xie SF, Ma H, Liu W, et al. Studying apoptosis in the hippocampus of the depression model rats. Chin J Nerv Ment Dis(中国神经精神疾病杂志),2004,30(5):342.

[7] Bolse LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, et al. Bcl-xl, a bcl-2-related gene that function as a dominant regulator of apoptotic cell

death[J]. Cell, 1993, 74(7):597.

- [8] Zhivotovsky B, Cedervak B, Jiang S, et al. Involvement of Ca^{2+} in the formation of high molecular weight DNA fragments in the thymocyte apoptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 202(1):120.

- [9] Virgin CE, Ha TP, Packan DR. Glucocorticoids inhibit glucose transport and glutamate uptake in hippocampal astrocytes: implications for glucocorticoid neurotoxicity[J]. J Neurochem, 1991, 57(4):1422.

收稿日期:2006-02-28