

• 短篇论著 •

消痰解郁方对慢性强迫游泳应激后小鼠行为学及其海马组织 5-HT_{1A} 受体 mRNA 表达的影响

Influence of Traditional Chinese Recipe *Xiaotanjiayu* Decoction on behavior of mice after chronic swimming stress and on expression of 5-HT_{1A} receptor mRNA in their hippocampus

修丽娟¹, 魏品康^{1*}, 刘 龙¹, 陆 焯¹, 武 峰¹, 杨志慧²

(1. 第二军医大学长征医院中医科, 上海 200003; 2. 长征医院病理科)

[摘要] **目的:**观察消痰解郁方对慢性强迫游泳应激后小鼠行为学及其海马组织 5-HT_{1A}受体 mRNA 表达的影响,探讨其可能的抗抑郁效果及机制。**方法:**40 只昆明种小鼠随机分为消痰解郁组、氟西汀组、生理盐水对照组和正常组($n=10$),前 3 组小鼠连续 7 d 行强迫游泳应激后分别给予消痰解郁方(3.92 g/ml, 0.4 ml/d)、氟西汀(0.13 mg/ml, 0.4 ml/d)和生理盐水(0.4 ml/d),正常组小鼠正常饲养。观察前 3 组小鼠 7 d 内强迫游泳不动时间的变化;应激结束取所有小鼠海马组织,RT-PCR 半定量法比较各组小鼠 5-HT_{1A}受体 mRNA 的表达。**结果:**与正常组相比,慢性强迫游泳应激后小鼠海马区 5-HT_{1A}受体的 mRNA 表达明显下降($P<0.05$);与生理盐水对照组相比,消痰解郁方和氟西汀均能明显缩短小鼠的强迫游泳不动时间,提高小鼠海马区 5-HT_{1A}受体 mRNA 的表达,且消痰解郁组优于氟西汀组(P 均 <0.05)。**结论:**消痰解郁方可能通过上调慢性强迫游泳应激后小鼠海马区 5-HT_{1A}受体 mRNA 的表达,缩短小鼠强迫游泳不动时间,这可能是其发挥抗抑郁作用的机制之一。

[关键词] 消痰解郁方; 5-HT_{1A}受体; 抑郁症; 慢性强迫游泳应激

[中图分类号] R 749.42

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2007)10-1126-03

抑郁症严重威胁人类健康,WHO 预测至 2020 年重度抑郁将成为人类死亡和残疾的第 2 大原因。消痰解郁方是第二军医大学长征医院中医科魏品康教授基于中医传统痰证理论结合多年临床经验形成的经验处方。前期研究^[1]表明消痰解郁方可降低小鼠急性应激后的强迫游泳不动时间,具有一定的抗抑郁作用。然而临床抑郁症多为慢性应激所致,慢性游泳应激能更好地模拟抑郁症的发生过程。已有研究^[2]发现 5-HT_{1A}受体与抑郁症明显相关,在抑郁症的发病和治疗中发挥重要作用。因此,本研究通过观察消痰解郁方对慢性强迫游泳应激抑郁模型小鼠行为学及其海马组织 5-HT_{1A}受体表达的影响,探讨其可能的抗抑郁效果及机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及药物 消痰解郁方处方组成为:半夏、天南星、茯苓、柴胡、白术等。实验所用中药材均购自上海雷允上药材公司,产地明确,经第二军医大学药学院生药学教研室鉴定为道地药材。半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎;天南星为天南星科植物天南星 *Arisaema consanguineum* Schott. 的块茎;茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw) Wolf 的干燥菌核;柴胡为伞形科植物北柴胡 *Bupleurum Chinese* DC. 的根;白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的根茎。实验中药由第二军医大学长征医院制剂室(国家中药实验室)提供,浓度 3.92 g/ml,相当于成人的临床最低有效剂量。盐酸氟西汀片(fluxetine hydrochloride tablets)为礼来苏州制药有限公司产品,批号 20030017;DEPC(焦碳酸二乙酯)为 Sigma 公司产品;TRIZol 为上海生工生物工程技术有限公司产品;M-MLV 逆转录酶为 Promega 公司产品;Oligo

(dT)、Ribonuclease Inhibitor、dNTP 均为 TaKaRa 公司产品;PCR 混合反应液为北京天为时代科技有限公司产品。

1.2 实验动物及分组 昆明种小鼠 SPF 级,雄性,体质量 20~24 g,由上海市中国科学院实验动物中心提供,室温(22±1)℃,自由饮水。40 只小鼠随机分为消痰解郁组、氟西汀组、生理盐水对照组、正常对照组,每组 10 只。前 3 组小鼠连续 7 d 行强迫游泳应激后,消痰解郁组给予消痰解郁方(3.92 g/ml, 0.4 ml/d);氟西汀组给予氟西汀(0.13 mg/ml, 0.4 ml/d,生理盐水配制);生理盐水对照组给予生理盐水 0.4 ml/d。正常对照组正常饮食、饮水。

1.3 慢性强迫游泳应激后小鼠行为学观察 参照 Porsolt 等^[3]的方法,将消痰解郁组、氟西汀组及生理盐水对照组小鼠各自给药 1 h 后,置于水深 10 cm 的玻璃皿(高 20 cm,直径 14 cm)中,水温 25 ℃,观察 6 min,观察各组小鼠在后 4 min 内的累计不动时间,持续 7 d。

1.4 RT-PCR 法检测应激后小鼠海马组织 5-HT_{1A}受体 mRNA 的表达

1.4.1 组织获取 第 7 天强迫游泳实验结束后 1 h,小鼠断头处死,冰皿上迅速分离大脑海马区,液氮冷冻保存。

1.4.2 引物设计 引物设计参考 Kulikov 等^[4]的报道,5-HT_{1A}:正义引物 5'-CCC CCC AAG AAG AGC CTG AA-3',反义引物 5'-GGC AGC CAG CAG AGG ATG AA-3',退火温度 64℃,扩增长度 336 bp;内参(β -actin):正义引物 5'-CGG AAC CGC TCA TTG CC-3',反义引物 5'-ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA-3',退火温度 61℃,扩增长度 285

[作者简介] 修丽娟,博士生。E-mail: xiaoxiu@126.com

* Corresponding author. E-mail: czzyk@smmu.edu.cn

bp。由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.4.3 RT-PCR 半定量检测 取海马组织 20 mg, 用 TR-Izol、氯仿、异丙醇等提取总 RNA。在微量离心管中加入 RNA 提取物 4 μ l, RNA 酶抑制剂 0.2 μ l, Oligo(dT)1 μ l, 用 DEPC 处理过的双蒸水补足体积至 13 μ l, 72 $^{\circ}$ C 加热 2 min 后迅速冰浴 2 min, 上述体系内加入 5 \times buffer 4 μ l, 10 \times dNTP 2 μ l, M-MLV 0.6 μ l, DTT 0.4 μ l, 总体积 20 μ l, 42 $^{\circ}$ C 加热 60 min, 冰浴 2 min。取 cDNA 模板 5 μ l, 正向、反向引物各 1.5 μ l, 双蒸水 4.5 μ l, PCR 混合反应液 12.5 μ l, 总反应体系 25 μ l。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 64 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 4 min。取 PCR 产物 10 μ l 在 2% 琼脂糖凝

胶上电泳, 结果采用 Gis 凝胶图像处理软件分析, 用内参基因的灰度值校正目的基因产物的灰度值进行半定量。

1.5 统计学处理 应用 SAS 软件包, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用多变量方差分析方法, 重复测量资料采用方差分析。

2 结果

2.1 应激小鼠强迫游泳不动时间的变化 随应激时间的延长, 3 组小鼠的强迫游泳不动时间逐渐延长 ($P=0.0001$)。在每个时间点, 消痰解郁组和氟西汀组强迫游泳不动时间明显低于对照组 ($P<0.05$), 且消痰解郁组明显低于氟西汀组 ($P<0.05$)。详见表 1。

表 1 不同时间点各组小鼠强迫游泳不动时间的比较

Tab 1 Forced swimming immobility time in mice of each group at different time points

($n=3, \bar{x} \pm s, t/s$)

Group	Time after first swimming stress(t/d)						
	1	2	3	4	5	6	7
Xiaotaijieyu decoction	58 \pm 36* Δ	70 \pm 35* Δ	83 \pm 47* Δ	92 \pm 54* Δ	100 \pm 34* Δ	104 \pm 58* Δ	109 \pm 62* Δ
Fluoxetine	65 \pm 29*	88 \pm 38*	90 \pm 39*	102 \pm 68*	107 \pm 55*	116 \pm 47*	132 \pm 41*
Saline control	74 \pm 37	98 \pm 37	121 \pm 46	135 \pm 38	149 \pm 34	149 \pm 70	159 \pm 46

* $P<0.05$ vs saline control group; $\Delta P<0.05$ vs fluoxetine group

2.2 各组小鼠海马组织 5-HT_{1A} 受体 mRNA 的表达 消痰解郁组、氟西汀组及生理盐水对照组及正常对照组小鼠 5-HT_{1A} 受体 mRNA 的相对表达量分别为 1.20 \pm 0.40、0.69 \pm 0.41、0.32 \pm 0.28、1.98 \pm 0.64。消痰解郁组、氟西汀组及生理盐水对照组小鼠海马组织 5-HT_{1A} 受体的 mRNA 表达均明显低于正常组 ($P<0.05$); 消痰解郁组、氟西汀组明显高于生理盐水对照组 ($P<0.05$), 且消痰解郁组明显高于氟西汀组 ($P<0.05$)。详见图 1。

其中 5-HT_{1A} 受体是目前被认为与抑郁症最有关的受体之一^[8], 在大脑的颞叶海马部分最丰富, 可能通过 cAMP 信号系统或 MAPK 信号转导通路促进海马神经元及突触的可塑性。临床研究^[9-10]发现抑郁症患者两侧海马容积明显减小; Lopez 等^[11]从 6 例因抑郁症而自杀的患者尸检中发现位于大脑的颞叶海马部分的 5-HT_{1A} 受体 mRNA 显著低于正常对照组。慢性应激抑郁动物模型也有类似结果, 且在给予抗抑郁药物后 5-HT_{1A} 受体 mRNA 的表达水平能显著升高^[12]。

本实验用慢性强迫游泳应激观察小鼠的行为学改变, 结果显示小鼠的强迫游泳不动时间随着应激强度的累积逐渐延长, 且应激后小鼠海马的 5-HT_{1A} 受体 mRNA 水平较正常小鼠明显下降, 推测小鼠的抑郁状态可能与海马 5-HT_{1A} 受体 mRNA 水平下调有关。抗抑郁剂氟西汀及中药复方制剂消痰解郁方用药组随应激的累积强迫游泳时间也有增加趋势, 但增加幅度显著低于生理盐水对照组, 消痰解郁方组增加幅度最小, 且与氟西汀组差异有统计学意义。以上结果提示氟西汀与消痰解郁方均具有抗抑郁作用, 且消痰解郁方的作用效果更加显著。本研究结果表明消痰解郁方与氟西汀均可上调 5-HT_{1A} 受体 mRNA 水平, 降低应激后小鼠强迫游泳不动时间, 表明其上调海马 5-HT_{1A} 受体 mRNA 水平可能是消痰解郁方抗抑郁作用机制之一。

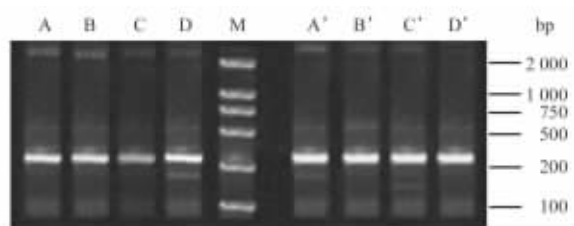


图 1 各组小鼠海马 5-HT_{1A} 受体 mRNA 的表达

Fig 1 5-HT_{1A} receptor mRNA expression in hippocampus of mice

A: Xiaotaijieyu decoction group; B: Fluoxetine group; C: Saline control group; D: Normal group; M: Marker; A': β -actin for A; B': β -actin for B; C': β -actin for C; D': β -actin for D

3 讨论

应激是抑郁症发生的重要因素之一, 临床上抑郁症的发生多与慢性应激有关。慢性强迫游泳应激动物模型中不动时间反映了动物的绝望状态, 是应激后活动减少的一种表现, 能较好地模拟人类的抑郁状态^[5]。5-HT 受体在抑郁症发病机制及抗抑郁治疗中发挥重要作用, 有多个亚型^[6-7]。

[参考文献]

- [1] 修丽娟, 魏品康. 消痰解郁方对小鼠强迫游泳不动时间及 S₁₈₀ 肉瘤生长的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2007, 31: 343-345.
- [2] Yasuno F, Suhara T, Ichimiya T, et al. Decreased 5-HT_{1A} receptor binding in amygdala of schizophrenia[J]. Biol Psychiatry, 2004, 55: 439-444.
- [3] Porsolt R D, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a

- primary screening test for antidepressants[J]. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1977, 229: 327-336.
- [4] Kulikov A V, Naumenko V S, Voronova I P, et al. Quantitative RT-PCR assay of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} serotonin receptor mRNAs using genomic DNA as an external standard[J]. J Neurosci Methods, 2005, 141: 97-101.
- [5] Avgustinovich D F, Alekseenko O V, Bakshtanovskaia I V, et al. Dinamicheskue izmeneniia serotonergicheskoi i dofaminergicheskoi aktivnosti mozga v protsesse razvitiia trevozhnoi depressii; eksperimental'noe issledovanie. [Dynamic changes of brain serotonergic and dopaminergic activities during development of anxious depression: experimental study][J]. Usp Fiziol Nauk, 2004, 35: 19-40.
- [6] Strobel A, Gutknecht L, Rothe C, et al. Allelic variation in 5-HT_{1A} receptor expression is associated with anxiety- and depression-related personality traits[J]. J Neural Transm, 2003, 110: 1445-1453.
- [7] Neumeister A, Young T, Stastny J. Implications of genetic research on the role of the serotonin in depression: emphasis on the serotonin type 1A receptor and the serotonin transporter [J]. Psychopharmacology(Berl), 2004, 174: 512-524.
- [8] 潘玉芹, 林文娟. 海马 5-羟色胺系统与抑郁症[J]. 中国行为医学科学, 2006, 15: 379-380.
- [9] Bremner J D, Narayan M, Anderson E R, et al. Hippocampal volume reduction in major depression[J]. Am J Psychiatry, 2000, 157: 115-118.
- [10] Colla M, Kronenberg G, Deuschle M, et al. Hippocampal volume reduction and HPA-system activity in major depression [J]. J Psychiatr Res, 2007, 41: 553-560.
- [11] Lopez J F, Chalmers D T, Little K Y, et al. Regulation of serotonin 1A, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression[J]. Biol Psychiatry, 1998, 43: 547-573.
- [12] 金 艳, 王庆国, 石任兵, 等. 四逆散活性成分对慢性应激诱导的抑郁症模型大鼠大脑皮层与海马 5-HT_{1A}受体 mRNA 表达的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2004, 27: 34-36.
- [收稿日期] 2007-04-09 [修回日期] 2007-07-28
[本文编辑] 贾泽军