

补肾调肝清心方对围绝经期抑郁症睡眠障碍大鼠模型海马 5-羟色胺 1A 受体、5-羟色胺 2A 受体的影响

何军琴 尹晓丹 辛明蔚

【摘要】 目的 观察补肾调肝清心方对围绝经期抑郁症睡眠障碍模型大鼠海马 5-羟色胺 1A 受体(5-hydroxytryptamine 1A receptor, 5-HT1AR)、5-羟色胺 2A 受体(5-hydroxytryptamine 2A receptor, 5-HT2AR)的影响。**方法** 将 60 只围绝经期大鼠按体重随机分为 5 组,每组 12 只:围绝经期正常对照组(A);围绝经期抑郁症睡眠障碍模型组(B);围绝经期抑郁症睡眠障碍补佳乐治疗组(C);围绝经期抑郁症睡眠障碍米氮平治疗组(D);围绝经期抑郁症睡眠障碍中药治疗组(E);A 组为围绝经期正常大鼠,其余 4 组进行 18 天不可预知慢性应激。于应激后对造模动物进行 72 小时连续快速眼相睡眠剥夺(REM)。每天在应激前 1 小时按组给药。在末次灌胃 24 小时后,颈椎脱臼法处死大鼠,取大鼠海马,分别用荧光定量检测海马 5-HT1ARmRNA 和 5-HT2ARmRNA、蛋白印迹和免疫荧光检测海马 5-HT1AR 和 5-HT2AR 的表达。**结果** 蛋白印迹检测(western blot)海马及免疫荧光检测海马 CA1 区均显示:海马区 5-HT1AR 表达水平各组无明显差异($P > 0.05$),而 5-HT2AR 表达水平上,模型组显著低于正常组($P < 0.05$),治疗组提高了 5-HT2AR 的表达水平,且与模型组相比存在显著性差异($P < 0.05$);RT-PCR 显示:海马区 5-HT1AR mRNA 水平各组无明显差异($P > 0.05$),而 5-HT2AR mRNA 水平,模型组明显低于正常组($P < 0.01$),米氮平组较模型组有极显著性差异($P < 0.001$),中药组较模型组有显著性差异($P < 0.05$)。**结论** 补肾调肝清心方能提高 5-HT2AR 的 mRNA 及蛋白水平的表达,免疫荧光的结果表明在海马 CA1 区发挥作用,表明补肾调肝清心方可以通过调节海马 CA1 区 5-HT2AR 表达来改善睡眠障碍。

【关键词】 围绝经期抑郁症睡眠障碍; 补肾调肝清心方; 5-羟色胺 1A 受体; 5-羟色胺 2A 受体

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.06.003

Effect of Bushen Tiaogan Qingxin decoction on hippocampal 5-HT1A and 5-HT2A receptor of perimenopausal depression model rats HE Jun-qin, YIN Xiao-dan, XIN Ming-wei. Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100026, China

Corresponding author: HE Jun-qin, E-mail: junqinhe@sina.com

【Abstract】 Objective Observe the effect of Bushen Tiaogan Qingxin decoction on hippocampal 5-HT1A and 5-HT2A receptor of Perimenopausal depression model rats. **Methods** 60 perimenopausal rats were randomly divided into 5 groups, 12 rats in each group. The normal group (A); perimenopausal depression sleep disorder model group (B); perimenopausal depression sleep disorder progynova treatment group (C); perimenopausal depression sleep disorder mirtazapine treatment group (D); perimenopausal depression sleep disorder TCM treatment group (E). A group is perimenopausal normal rats, the other 4 groups were under 18 days of unpredictable chronic stress. After the last administration, the rats were killed by cervical dislocation to get the hippocampus and test the 5-HT1A receptor mRNA and 5-HT2A receptor mRNA by fluorescence quantitative detection, test 5-HT1A and 5-HT2A receptor expression by RT-PCR

作者单位:100026 首都医科大学附属北京妇产医院中医科

作者简介:何军琴(1972-),女,硕士,副主任医师。研究方向:围绝经期综合征、复发性自然流产、不孕症。E-mail: junqinhe@sina.com

and Western blot. **Results** Use Western blot to test the hippocampus and immunofluorescent to test the CA1 region of the hippocampus showed: 5-HT1A receptor expression in hippocampus had no significant differences ($P > 0.05$). The expression level of 5-HT2A receptor of model group was significantly lower than that of normal group ($P < 0.05$), the treatment group improved the expression level of 5-HT2A receptor, and there were significant differences ($P < 0.05$). RT-PCR showed: 5-HT1A receptor mRNA level in hippocampus showed no significant differences in each group ($P > 0.05$), and 5-HT2A receptor mRNA level of the model group was significantly lower than that of normal group ($P < 0.01$), mirtazapine group compared to the model group had significant differences ($P < 0.001$), TCM group compared with the model group had significant differences ($P < 0.05$). **Conclusion** Bushen Tiaogan Qingxin decoction can increase the expression of mRNA and protein levels of 5HT2A receptor, and immunofluorescence results showed that the effect happened in the CA1 region of hippocampus, and is close to progynova and mirtazapine.

【Key words】 Perimenopausal depression; Bushen Tiaogan Qingxin decoction; 5-HT1A receptor; 5-HT2A receptor

围绝经期抑郁症是指因卵巢功能衰退乃至消失而出现的一系列以睡眠障碍、情绪低落为主要症状的疾病。中国围绝经期抑郁症患者占围绝经期人群的 5.8%, 占围绝经期综合征患者的 78%^[1], 15% 的抑郁病人最终以自杀告终^[2]。睡眠障碍极可能是抑郁症患者自杀的诱发因素。以往研究提示, 5-羟色胺 1A 受体 (5-hydroxytryptamine 1A receptor, 5-HT1AR) 参与人体情感、认知及感觉等行为, 尤其是海马 5-HT1AR、5-羟色胺 2A 受体 (5-hydroxytryptamine 2A receptor, 5-HT2AR) 表达变化与抑郁睡眠障碍密切相关^[3-4]。补肾调肝清心方在治疗围绝经期抑郁症睡眠障碍的临床应用中疗效显著^[5], 但其药理机制尚不明确。本实验通过 SD 大鼠自主活动及对 5-HT1AR、5-HT2AR 的影响, 观察大鼠海马 5-HT2AR 及 5-HT1AR 表达变化与抑郁症睡眠障碍的相关性及补肾调肝清心方对上述指标的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

动物清洁级 13~15 月龄雌性 SD 大鼠 60 只, 体重 300~500 g, 由北京斯贝特动物实验中心提供。

1.2 实验药品

中药根据补肾调肝清心方制备。方药组成: 生地 10 g、熟地 10 g、炒白术 10 g、炒白芍 10 g、茯苓 10 g、茯神 10 g、淫羊藿 10 g、仙茅 10 g、女贞子 12 g、旱莲草 12 g、生龙骨^{先下} 30 g、生牡蛎^{先下} 30 g、青龙齿^{先下} 30 g、炙远志 10 g、石菖蒲 10 g、炒枣仁 12 g、绿萼梅 10 g、八月札 10 g、青皮 6 g、陈皮 6 g、炒枳壳 6 g、炙甘草 6 g。中药药材由北京同仁堂药店提供, 水煎并浓缩, 相当于生药 1 kg/L, 4℃ 冰箱中储存备

用。戊酸雌二醇片 (1mg/片, 商品名补佳乐), 拜耳医药保健有限公司, 生产批号: 100A。米氮平片 (30 mg/片, 商品名派迪生) 30 mg, 华裕 (无锡) 制药有限公司, 生产批号: 402541。

1.3 主要仪器及试剂

奥利巴斯荧光显微镜, -80℃ 超低温冰箱, ABI7700 荧光定量 PCR 仪, DYCZ-24 系列蛋白垂直电泳仪, 柯达显影仪, 切片机。

1.4 实验方法

1.4.1 造模及分组 将实验大鼠按体质量分层随机分组 (随机数字表法)。每组 12 只, 围绝经期正常对照组 (简称正常对照组); 围绝经期抑郁症睡眠障碍模型组 (简称模型组); 围绝经期抑郁症睡眠障碍补佳乐治疗组 (简称补佳乐组); 围绝经期抑郁症睡眠障碍米氮平治疗组 (简称米氮平组); 围绝经期抑郁症睡眠障碍中药治疗组 (简称中药组)。5 组大鼠阴道涂片连续 5 天: 抽取 30 μl 生理盐水, 重复洗大鼠阴道口, 然后吸出约 20 μl 液体, 放到装有染色剂的 EP 管中, 弹匀, 室温放置 15 分钟后在显微镜下观察, 确认动物是否处于动情间期, 五天连续处于动情间期的动物已进入老 (更) 年期。采用不同方法进行 18 天不可预知慢性应激建立抑郁模型: 行为限制 2 小时、电击足底 (36 V 交流电, 每隔 1 分钟刺激 1 次, 每次刺激 10 秒, 共 30 次)、冰水游泳 (4℃, 5 分钟)、热应激 (45℃, 5 分钟)、摇晃 (1 次/秒, 15 分钟)、鼠笼倾斜 45 度 24 小时、夹尾 (1 分钟)、禁水 (24 小时)、禁食 (48 小时)、明暗颠倒、潮湿垫料 10 小时、空瓶放置 1 小时, 连续 18 天, 接受慢性应激的大鼠单笼饲养。

1.4.2 给药方法 72 小时剥夺睡眠测试实验后开始给药, 连续 21 天。正常对照组、模型组分别给予

生理盐水 2 ml/天灌胃;补佳乐组、米氮平组、中药组分别予补佳乐(0.117 mg/kg)、米氮平(3 mg/kg)、中药补肾调肝清心方(3.51 mg/kg)灌胃,均 1 次/天。实验过程中共死亡 4 只,其中模型组、补佳乐组灌胃时各死亡 1 只,米氮平组冰水游泳时淹死 1 只,中药组禁食时死亡 1 只。

1.4.3 观察指标 (1) 荧光定量检测海马 5-HT1AR mRNA、5-HT2AR mRNA 分别 40 个样(每组 8 个):使用 ABI7700 荧光定量 PCR 仪实时定量 PCR,最后电泳。(2) 蛋白印迹检测(western blot)海马 5-HT1AR、5-HT2AR 表达:DYCZ-24 系列蛋白垂直电泳仪制备蛋白质样品及分离 SDS-PAGE,蛋白质从凝胶转移到 NC 膜上,被转印到膜上的靶抗原与第一抗体(特异抗体)反应、与酶标第二抗体反应,以及用酶相应的底物处理后使用柯达显影仪进行靶蛋白(抗原)信号检测。(3) 免疫荧光检测海马 5-HT1AR、5-HT2AR 表达:每个石蜡切片滴加 100 μ l 适当比例稀释的一抗,湿盒 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,每个片子用 2 ml PBS 洗三次,再每个片子加稀释后的 FITC/Dyelight 549 标记的二抗,室温避光孵育 1 小时,DAPI 染色,封片,制好的片子 4 $^{\circ}$ C 保存,使用奥林巴斯荧光显微镜观察。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件包进行分析,数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,正态分布资料使用单因素方差分析,偏态分布使用秩和检验。

2 结果

2.1 蛋白印迹检测海马 5-HT1AR、5-HT2AR 表达

海马区 5-HT1AR 表达水平各组无明显差异($P > 0.05$),而 5-HT2AR 表达水平上,模型组显著低于正常组($P < 0.01$),治疗组提高了 5-HT2AR 的表达水平,且与模型组相比存在显著性差异($P < 0.05$),提示各治疗组可以增强海马区 5-HT2AR 表达。见表 1、图 1。

表 1 各组蛋白印迹检测海马 5-HT1AR 和海马 5-HT2AR 表达

组别	5-HT1AR/tubulin 相对值	5-HT2AR/tubulin 相对值
正常对照组	1.00	1.00
模型组	0.93	0.63 ^a
补佳乐组	1.00	0.72 ^b
米氮平组	0.96	1.11 ^b
中药组	1.03	0.91 ^b

注:与 A 组比较,^a $P < 0.01$,与 B 组比较,^b $P < 0.05$

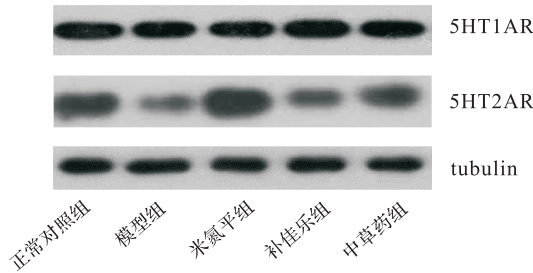


图 1 各组蛋白印迹检测海马 5-HT1AR 和海马 5-HT2AR 表达

2.2 免疫荧光检测 5-HT1AR 和 5-HT2AR 在海马的 CA1 区光密度比较

海马区 5-HT1AR 表达水平各组无明显差异($P > 0.05$)。模型组 5-HT2AR 表达水平显著低于正常组($P < 0.01$)。治疗组提高了 5-HT2AR 的表达水平,与模型组相比有显著性差异($P < 0.05$),提示各治疗组在海马的 CA1 区可提升 5-HT2AR。见表 2、图 2。

表 2 各组免疫荧光检测 5-HT1AR 和 5-HT2AR 在海马的 CA1 区光密度

组别	5-HT1AR 光密度值	5-HT2AR 光密度值
正常对照组	1.62 \pm 0.03	1.75 \pm 0.04
模型组	1.63 \pm 0.03	1.45 \pm 0.03 ^a
补佳乐组	1.72 \pm 0.03	1.77 \pm 0.03 ^b
米氮平组	1.77 \pm 0.02	1.76 \pm 0.02 ^b
中药组	1.78 \pm 0.02	1.76 \pm 0.04 ^b

注:与 A 组比较,^a $P < 0.05$,与 B 组比较,^b $P < 0.05$

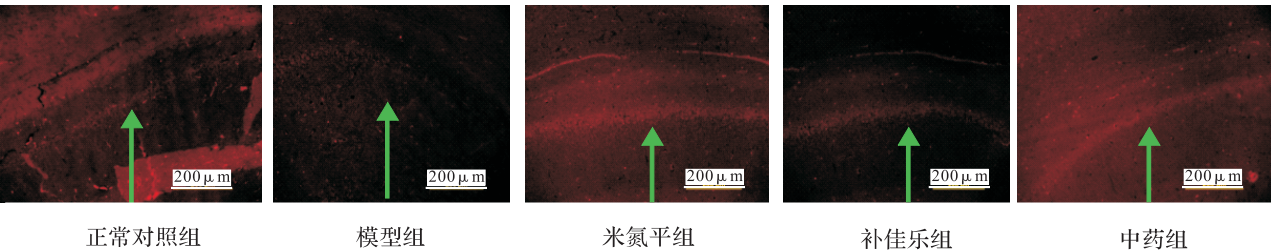


图 2 各组免疫荧光检测 5-HT1AR 和 5-HT2AR 在海马的 CA1 区光密度

2.3 RT-PCR 检测海马 5-HT1AR、5-HT2AR 表达

RT-PCR 显示海马区 5-HT1AR mRNA 水平各组无明显差异 ($P > 0.05$), 而 5-HT2AR mRNA 水平, 模型组明显低于正常组 ($P < 0.01$), 米氮平组较模型组有极显著性差异 ($P < 0.001$), 中药组较模型组有显著性差异 ($P < 0.05$), 除补佳乐组外, 其他各治疗组均对海马 5-HT2AR 有明显改善。见表 3、图 3。

表 3 各组 RT-PCR 检测海马 5-HT1AR 和海马 5-HT2AR 浓度

组别	5-HT1AR	5-HT2AR
正常对照组	0.92 ± 0.24	6.06 ± 1.61
模型组	0.75 ± 0.34	4.10 ± 1.88 ^b
补佳乐组	0.83 ± 0.24	4.76 ± 0.70 ^b
米氮平组	0.85 ± 0.25	6.74 ± 1.23
中药组	0.84 ± 0.26	5.60 ± 1.10 ^a

注:与 A 组比较, ^a $P < 0.05$, 与 B 组比较, ^b $P < 0.05$

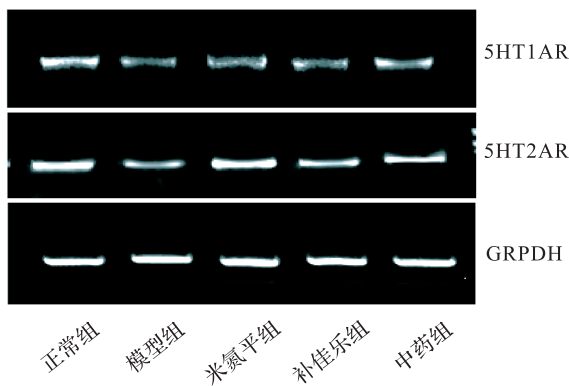


图 3 各组 RT-PCR 检测海马 5-HT1AR 和海马 5-HT2AR 浓度

3 讨论

上海名医汤希伟先生自拟补肾调肝清心方, 临床应用三十余载, 在围绝经期睡眠障碍方面颇具心得, 提出本虚标实的病机特点, 病因为肾虚, 病机为肾虚肝郁、心肾不交, 睡眠障碍为其病理表现, 病位在心、肝、肾三脏, 治疗以补肾调肝清心安神为主。^[6]方中生地黄“甘苦大寒, 入心肾”, 滋养肾阴而清心除烦, 熟地补肾养血, 中和生地之苦寒; 青龙齿、生龙骨、生牡蛎重镇潜阳安神; 炙远志、炒酸枣仁、茯苓神滋养宁心安神; 绿萼梅、八月札, 平而不燥, 既不伤阴又疏肝理气解郁; 淫羊藿、仙茅、女贞子、墨旱莲取“二仙、二至”之意, 从肾阴阳双补; 炒

白术、白芍调和营卫。诸药合奏补肾调肝、清心安神、调和营卫, 多点综合调理围绝经期睡眠障碍。

5-HT 作为自体活性物质, 主要分布于松果体和下丘脑, 可能参与痛觉、睡眠和体温等生理功能的调节, 海马区域是大脑的边缘系统, 与人的精神活动密切相关, 研究表明 5-HT2AR 及 5-HT1AR 的表达与睡眠障碍相关^[7], 拮抗 5-HT2AR 具有明确改善睡眠障碍的效应。本课题在明确经过 5 天连续处于动情间期的动物已进入围绝经期后, 通过不同方法进行 18 天不可预知慢性应激建立抑郁模型, 再通过 72 小时剥夺睡眠测试实验, 建立围绝经期抑郁症睡眠障碍的动物模型后开始给药, 然后测定各组蛋白印迹检测海马 5-HT1AR 和 5-HT2AR 表达, 各组免疫荧光检测 5-HT1AR 和 5-HT2AR 在海马的 CA1 区光密度, 各组 RT-PCR 检测海马 5-HT1AR 和海马 5-HT2AR 浓度, 发现各组 5-HT1AR 均无变化, 模型组 5-HT2AR 均下调, 提示抑郁症睡眠障碍与 5-HT2AR 有相关性, 各组治疗后 5-HT2AR 均有不同程度的上调, 与文献报道一致, 提示补肾调肝清心方可能通过上调海马 CA1 区 5-HT2AR 水平, 调节 5-HT 再摄取, 发挥治疗围绝经期抑郁症睡眠障碍的效应。

参 考 文 献

[1] 姜大珍, 冯秋霞, 高英堂, 等. 滋水清肝饮对围绝经期抑郁模型大鼠下丘脑雌激素 α 受体 mRNA 表达及 5-羟色胺含量的影响[J]. 天津中医药, 2008, 25(2): 170-173.

[2] 许贤豪. 综合医院医生必须重视“抑郁综合症”[J]. 中华内科杂志, 1998, 37(4): 285.

[3] Wei H, Ma A, Wang Y X, et al. Role of spinal 5-HT receptors in cutaneous hypersensitivity induced by REM sleep deprivation [J]. Pharmacol Res, 2008, 57(6): 469.

[4] Landolt H P, Wehrle R. Antagonism of serotonergic 5-HT_{2A} /2C receptors: mutual improvement of sleep, cognition and mood [J]. Eur J Neurosci, 2009, 29(9): 1795.

[5] 何军琴. 补肾调肝清心方对围绝经期抑郁症患者睡眠障碍的治疗机理探讨[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(6): 16-18.

[6] 何军琴, 汤希伟, 岑幻仙, 等. 补肾调肝清心方治疗更年期抑郁症的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(10): 889-892.

[7] Pozzi L, Greco B, Sacchetti G, et al. Blockade of serotonin 2A receptors prevents PCP-induced attentional performance deficit and CREB phosphorylation in the dorsal striatum of DBA/2 mice [J]. Psychopharmacology, 2010, 208(3): 387.

(收稿日期: 2014-03-05)

(本文编辑: 秦楠)