

柴胡疏肝散对卒中后抑郁模型大鼠 BDNF/TrkB 信号通路和炎症指标的影响

胡 丹¹ 刘元月² 盛 蕾¹

(1.江苏省第二中医院,江苏南京 210017; 2.南京中医药大学,江苏南京 210023)

摘 要 目的:观察柴胡疏肝散对卒中后抑郁(PSD)模型大鼠的治疗作用和可能机制。方法:将SD大鼠随机分为假手术组、模型组和柴胡疏肝散高剂量组、低剂量组,每组10只。除假手术组以外,其余各组大鼠采用大脑中动脉线栓阻塞法和慢性不可预见性温和应激法复合制备卒中后抑郁模型。假手术组不插入栓线,不给予应激刺激。造模成功后柴胡疏肝散高剂量和低剂量组分别给予11.8 g/kg和5.9 g/kg剂量中药灌胃,假手术组、模型组灌胃等量生理盐水,共灌胃21 d。分别于造模前、造模后及治疗后评价神经功能缺损程度,观察行为学糖水偏好,记录强迫游泳试验结果;治疗后以酶联免疫法(ELISA)检测血清白介素6(IL-6)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平,以Western blot法检测海马脑源性神经营养因子(BDNF)、酪氨酸激酶受体B(TrkB)和核因子 κ B(NF- κ B)水平。结果:PSD模型大鼠神经功能缺损程度、糖水消耗量、强迫游泳不动时间和血清IL-6、TNF- α 水平,以及海马BDNF、TrkB、NF- κ B表达,与假手术组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。经治疗后,与模型组比较,柴胡疏肝散高、低剂量组大鼠神经功能缺损程度减轻($P<0.05$),糖水消耗量增加($P<0.05$),强迫游泳不动时间缩短($P<0.05$),海马BDNF、TrkB表达上升($P<0.05$),血清TNF- α 水平、海马NF- κ B表达下降($P<0.05$)。柴胡疏肝散高剂量组治疗后糖水消耗量明显高于低剂量组($P<0.05$),血清TNF- α 水平、海马NF- κ B表达明显低于低剂量组($P<0.05$),海马BDNF、TrkB表达明显高于低剂量组($P<0.05$)。结论:柴胡疏肝散对PSD大鼠具有治疗作用,其作用机制可能涉及调节BDNF/TrkB信号通路及抑制神经炎症。

关键词 中风后遗症;抑郁;柴胡疏肝散;海马;脑源性神经营养因子;酪氨酸激酶受体B;神经炎症;实验研究

中图分类号 R743.310.5 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2020)08-0078-04

基金项目 国家自然科学基金青年基金(81904136);江苏省中医药科技发展计划项目(YB201929、YB2015052)

卒中后抑郁(PSD)是最常见的卒中后神经精神并发症,可严重影响功能恢复并增加死亡风险。国内外研究显示,PSD发病率大约在30%~40%之间^[1],而在新发急性卒中后第一个月时发病达到高峰。如何安全高效地治疗PSD越来越引起人们的关注。中药在PSD治疗领域显示出优势,其中柴胡疏肝散具有疏肝活血、健脾理气之效,临床研究显示其具有良好的改善PSD抑郁程度的作用^[2-3]。本研究我们采用大脑中动脉线栓阻塞法(MCAO)联合慢性不可预见性温和应激法(CUMS)建立大鼠PSD模型,进一步观察柴胡疏肝散的干预作用,并探讨可能的机制,现将结果报道如下。

1 实验材料

1.1 实验动物 成年健康雄性清洁级SD大鼠,体重180~210 g,SPF级,购自常州卡文斯实验动物有限公司,批号:SCXK(苏)2016-0010。标准混合饲料饲养,保持室温25℃,相对湿度45%,昼夜明暗

12 h交替,适应性饲养1周。本实验通过南京中医药大学第二附属医院伦理委员会审查。

1.2 实验药物 柴胡疏肝散药物组成为柴胡、白芍、川芎、枳壳、陈皮、甘草、香附,由南京中医药大学第二附属医院草药房提供,各味药物按6:4.5:6:6:6:1.5:4.5的比例取药,以8倍量水浸泡1 h,加热回流提取2次,每次1.5 h,合并2次药液,经3层纱布过滤,在60℃下减压浓缩,得到柴胡疏肝散浓缩液。将浓缩液置于冷冻干燥机中干燥至粉末,保存于-20℃冰箱,用时以生理盐水稀释。

1.3 仪器与试剂 主要仪器:蛋白电泳及转膜系统(Bio-Rad);凝胶成像及分析系统(Tannon)。主要试剂:RIPA裂解液(Beyotime, P0013C);蛋白酶抑制剂Cocktail(Cell Signaling, 5872S);蛋白Marker(Thermo, 26625);一抗,均为兔抗大鼠,脑源性神经营养因子(BDNF, SantaCruz, sc-20981),酪氨酸激

酶受体B (TrkB, SantaCruz, sc-12);核因子 κ B (NF- κ B, SantaCruz, sc-1190); β -tubulin (Epitomics, 1799-1);二抗,羊抗兔(Thermo, A32732);ECL显色液(Pierce, 3206)。血清白介素6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) ELISA试剂盒(南京建成生物工程研究所, 20170910, 20170805)。

2 实验方法

2.1 分组与造模 大鼠随机分为假手术组、模型组和柴胡疏肝散高剂量组、低剂量组,每组10只。除假手术组以外,其余各组大鼠以大脑中动脉线栓阻塞法(MCAO)联合慢性不可预见性温和应激法(CUMS)诱导抑郁样行为建立PSD大鼠模型。所有大鼠术前12 h禁食不禁水后采用改良线栓法^[4]制备右侧MCAO局灶性脑缺血模型。具体手术方法:2%戊巴比妥(50 mg/kg)腹腔注射麻醉,固定,备皮,在大鼠颈部做正中切口,钝性分离出右侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉,结扎大鼠颈外动脉远心端,在颈外动脉距离颈总动脉2~3 mm处打一虚结,夹闭颈总动脉和颈内动脉,在颈外动脉结扎处和虚结之间剪一小口,插入栓线,系紧虚结,松开动脉夹,无出血后剪断颈外动脉,将栓线推入颈内动脉约18 mm,缝合、消毒,90 min后进行再灌注。注意维持大鼠在术中及术后体温在37℃。术后腹腔内注射0.2万单位青霉素以预防感染,回笼后常规喂养。术后若有大鼠死亡,则补以同批次相似体质量大鼠。造模成功标准:大鼠苏醒后出现左侧前肢弯曲、肩内旋和以对侧上肢为重的瘫痪,前进时向手术对侧转圈。选用缺血造模成功的大鼠,手术后第1天开始每天不同时间选取夹尾1 min、禁水24 h、禁食24 h、束缚5 min、昼夜颠倒24 h、电击1 min、4℃冰水游泳5 min等7种刺激方法中的一种^[5],交替应激大鼠,避免机体对同种强度的单一应激产生耐受性,共刺激3周。假手术组大鼠无栓线插入,不给予CUMS刺激。

2.2 给药 造模或手术后按大鼠体表面积换算药物剂量进行灌胃给药,共连续给药21 d。各给药组剂量分别为:柴胡疏肝散高剂量组生药量11.8 g/kg,柴胡疏肝散低剂量组生药量5.9 g/kg。取柴胡疏肝散生药粉用生理盐水配成所需浓度的混悬液,给药体积为1 mL/100 g,假手术组、模型组每天灌胃等体积生理盐水。

2.3 指标检测

2.3.1 神经功能缺损评价 分别于造模前、造模后第1天及治疗结束第1天进行测试。参照BEDERSON等^[6]神经功能评分标准:0级(0分),无

神经功能障碍;1级(1分),提大鼠尾,见瘫痪侧前肢回收屈曲不能正常伸向地面;2级(2分),除1级体征外,向瘫痪侧推时感阻力较对侧明显降低;3级(3分),除以上体征外,大鼠爬行时向瘫痪侧旋转;4级(4分),不能自发行走,意识丧失。

2.3.2 行为学评价 分别于造模前、造模后第1天及治疗结束第1天进行测试。糖水偏好试验:试验前1 d训练大鼠适应糖水。禁食24 h后,分别将装有蒸馏水和1%蔗糖水溶液的水瓶放于鼠笼上,中途交换两只水瓶的位置。记录2 h内大鼠摄入蒸馏水及糖水的量,计算糖水偏好率。糖水消耗率(%)=糖水消耗/总液体消耗 $\times$ 100%。强迫游泳试验:实验前1 d训练大鼠适应性游泳15 min。将大鼠放入水深25 cm的玻璃缸内(高26 cm,直径18 cm),水温25℃。应用DepressionScan观察6 min内大鼠的运动状态,记录入水2 min后大鼠在水中停止挣扎,或呈漂浮状态,仅有细小的肢体运动以保持头部浮在水面的持续时间作为强迫游泳不动时间。实验结束后将大鼠擦干,放回笼中单独饲养。

2.3.3 血清IL-6、TNF- α 水平 治疗结束后第1天腹腔注射2%戊巴比妥(50 mg/kg)麻醉大鼠,腹主动脉取血置于抗凝采血管内,以离心半径10 cm,3 500 r/min离心10 min,分离血清,按照ELISA试剂盒说明书测定血清中IL-6、TNF- α 含量。

2.3.4 海马组织BDNF、TrkB、NF- κ B水平 采用4%多聚甲醛固定大鼠后,依据大鼠脑立体定位图谱取海马组织,迅速置于液氮中,-80℃冻存。用裂解液裂解海马组织,离心收集蛋白,BCA试剂盒蛋白定量,SDS-PAGE凝胶电泳后转膜,封闭缓冲液室温摇床震荡1 h,加一抗(BDNF、TrkB、NF- κ B、Tubulin稀释度均为1:1 000),4℃孵育过夜。TBST缓冲液洗涤3次,加羊抗兔二抗,孵育1 h。ECL显色,暗室曝光,采用Quantity One图像分析软件对显色条带进行分析,采集目的蛋白BDNF、TrkB、NF- κ B和Tubulin的灰度比值。

2.4 统计学方法 采用SPSS 19.0统计软件对相关数据进行统计分析。计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,组内比较采用重复测量资料方差分析,组间比较采用随机方差分析,不满足正态分布或方差不齐的数据采用秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠造模前后与治疗后神经功能评分比较 结果见表1。

表1 各组大鼠各时间点神经功能评分比较 ($\bar{x} \pm s$) 单位:分

组别	动物数/只	造模前	造模后	治疗后
假手术组	10	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	10	0.00±0.00	2.90±0.74 [△]	2.50±0.53 [△]
柴胡疏肝散低剂量组	10	0.00±0.00	2.80±0.79 [△]	1.60±0.52 ^{△#}
柴胡疏肝散高剂量组	10	0.00±0.00	3.00±0.67 [△]	1.40±0.52 ^{△#}

注:与同时期假手术组比较, $\Delta P < 0.05$;与同时期模型组比较, $\#P < 0.05$;与本组造模后比较, $*P < 0.05$;治疗后柴胡疏肝散各剂量组之间比较, 差异无统计学意义。

3.2 各组大鼠造模前后与治疗后的糖水消耗率比较 结果见表2。

表2 各组大鼠各时间点糖水消耗率比较 ($\bar{x} \pm s$) 单位: %

组别	动物数/只	造模前	造模后	治疗后
假手术组	10	74.54±5.64	74.91±5.65	73.19±6.31
模型组	10	78.45±4.91	50.21±5.44 [△]	52.30±5.93 [△]
柴胡疏肝散低剂量组	10	77.31±5.29	49.52±3.58 [△]	61.36±6.67 ^{△#}
柴胡疏肝散高剂量组	10	77.91±4.57	47.86±4.07 [△]	67.86±2.83 ^{△#}

注:与同时期假手术组比较, $\Delta P < 0.05$;与同时期模型组比较, $\#P < 0.05$;与同时期柴胡疏肝散低剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$;与本组造模后比较, $*P < 0.05$ 。

3.3 各组大鼠造模前后与治疗后的强迫游泳不动时间比较 见表3。

表3 各组大鼠各时间点强迫游泳不动时间比较 ($\bar{x} \pm s$) 单位: s

组别	动物数/只	造模前	造模后	治疗后
假手术组	10	106.37±11.80	104.83±13.29	100.63±11.18
模型组	10	107.82±13.18	164.97±20.03 [△]	155.77±27.23 [△]
柴胡疏肝散低剂量组	10	109.16±14.64	167.55±18.75 [△]	135.04±14.90 ^{△#}
柴胡疏肝散高剂量组	10	106.77±20.03	163.32±18.96 [△]	118.49±14.80 ^{△#}

注:与同时期假手术组比较, $\Delta P < 0.05$;与同时期模型组比较, $\#P < 0.05$;与本组造模后比较, $*P < 0.05$ 。

3.4 各组大鼠血清IL-6、TNF- α 水平及海马组织BDNF、TrkB、NF- κ B表达比较 见表4。

表4 各组大鼠血清IL-6、TNF- α 及海马NF- κ B、BDNF、TrkB表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	IL-6/ (pg/mL)	TNF- α / (pg/mL)	NF- κ B/ (pg/mL)	BDNF (μg/L)	TrkB/ (ng/mL)
假手术组	10	40.59±4.56	44.17±3.64	0.84±0.05	0.41±0.02	1.21±0.10
模型组	10	77.13±6.73 [△]	80.78±11.64 [△]	1.37±0.12 [△]	0.15±0.03 [△]	0.64±0.05 [△]
柴胡疏肝散低剂量组	10	70.22±9.73 [△]	68.94±10.86 ^{△#}	1.13±0.13 ^{△#}	0.23±0.03 ^{△#}	0.79±0.08 ^{△#}
柴胡疏肝散高剂量组	10	65.83±12.87 ^{△#}	54.36±5.60 ^{△#}	0.98±0.07 ^{△#}	0.32±0.04 ^{△#}	0.96±0.11 ^{△#}

注:与假手术组比较, $\Delta P < 0.05$;与模型组比较, $\#P < 0.05$;与柴胡疏肝散低剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

4 讨论

卒中后抑郁属中医学“郁证”与“中风”之共病范畴,与卒中“阴阳失调、气血逆乱”的基本病机相关,乃因风、痰、火、瘀交炽郁结致气血郁滞不畅、肝

失条达而致,病机特点主要为“肝气郁滞,脉络瘀阻”。《素问·六元正纪大论》言“木郁达之”,《证治汇补·郁证》言“郁病虽多,皆因气不周流,法当顺气为先”,治当疏肝开郁。柴胡疏肝散出自《景岳全书》。方中柴胡辛苦泻为疏肝之要药,功擅疏肝理气,畅达气机;川芎活血行气、通络止痛,香附疏肝理气、行气止痛,共助柴胡疏肝解郁活血;芍药、甘草酸甘化阴,既养血柔肝,又可防柴胡、香附之辛苦伤阴;陈皮、枳壳升降相因,理气健脾、燥湿化痰,防肝病传脾;甘草调和药性。诸药相辅相成,使得柴胡疏肝散具有良好的抗抑郁作用。

脑源性神经营养因子(BDNF)作为神经营养因子家族的一员,广泛存在于中枢与外周,对神经元的增殖、分化和存活至关重要。BDNF与抑郁症的关系早已被反复证实^[7],而近几年其与PSD的关系也在逐渐被认识^[8]。现有研究显示啮齿类动物PSD模型中海马、纹状体等^[9]部位BDNF表达水平下调,五羟色胺在摄取抑制剂(SSRI)治疗后水平显著上调^[8]。同时BDNF置换治疗也已开始应用于神经变性疾病诸如亨廷顿病、阿尔兹海默病及抑郁症的动物和临床试验中^[10]。

我们前期临床研究发现PSD患者血清BDNF水平显著下降^[2],给予柴胡疏肝散加味后BDNF水平显著提升。基于BDNF存在外周与中枢平行变化的特点^[11],我们建立了大鼠大脑中动脉线栓阻塞法(MCAO)联合慢性不可预见性温和应激法(CUMS)复合PSD模型以验证柴胡疏肝散的中枢作用机制。结果显示PSD模型大鼠表现出神经功能缺损、糖水消耗量减少、强迫游泳不动时间延长,与相关研究结果一致^[8],证实此模型能成功模拟卒中后的功能缺失,并体现了抑郁的核心症状——快感缺失和绝望心境。经柴胡疏肝散高低剂量治疗21 d后,大鼠神经缺损和抑郁程度较治疗前均有明显减轻;同时

柴胡疏肝散高剂量比低剂量更能增加大鼠的糖水消耗率,并缩短强迫游泳不动时间。进一步对模型组大鼠的海马组织进行分析,可以发现BDNF表达水平显著下降,而TrkB作为BDNF的特异性功能受体,同样在海马区表达降低。众多研究表明BDNF与其

受体TrkB共同作用可增加突触可塑性,促进轴突及树突生长,增加突触末端密度。大量基因学研究证实,抗抑郁药主要通过激活TrkB信号通路,增加脑内BDNF水平,起到改善抑郁行为的作用。而完整的

BDNF/TrkB信号通路不仅是抗抑郁药促进海马神经发生,也是其促进前额叶皮质、杏仁核等关键部位突触发生和长时程增强(LTP)的必要基础^[12]。本实验给予不同剂量的柴胡疏肝散干预,PSD大鼠海马BDNF和TrkB表达均有显著上升,而高剂量组表达水平显著高于低剂量组,初步认为柴胡疏肝散可能通过BDNF/TrkB信号通路发挥抗抑郁作用,并与剂量相关。

以活化的小胶质细胞、星型胶质细胞和表达上调的促炎因子为基础的神经炎症也参与了PSD的发病过程^[1]。有研究证实临床患者血清IL-6、TNF- α 等炎性因子水平上升与PSD的发生有关^[13]。与此报道一致,本研究结果显示PSD模型大鼠的血清IL-6、TNF- α 水平和海马NF- κ B表达显著升高。NF- κ B是炎症细胞因子基因转录的关键性调控因子,IL-6、TNF- α 等均为其靶基因。NF- κ B激活后介导下游众多炎症反应介质如环氧化酶2(COX-2)、前列腺素E2(PGE2)以及其他众多炎性因子,直接导致吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO)表达增加,促使色氨酸代谢为犬尿酸,抑制5-羟色胺(5-HT)合成途径,造成额叶皮质和基底节区等部位5-HT减少,色氨酸有毒产物增加。另一方面促炎因子的增加还会导致HPA轴功能失调,增加卒中后神经功能恶化和死亡几率,也增加抑郁发生风险^[14]。而经柴胡疏肝散治疗后血清TNF- α 水平和海马NF- κ B表达显著下降,同时高剂量组上述指标下降更明显,显示柴胡疏肝散具有抑制神经炎症的潜力。

综上,柴胡疏肝散治疗PSD的作用机制可能与调节BDNF/TrkB信号通路,抑制神经炎症相关。前期网络药理学研究也显示了柴胡疏肝散对PSD的治疗作用可能涉及调节炎症应答、突触合成等生物学过程^[15]。本研究仅初步验证了柴胡疏肝散对PSD的疗效,应进一步明确神经炎症与突触功能的关系,深入寻找二者之间的核心介质,有助于进一步揭示柴胡疏肝散治疗PSD的科学内涵和PSD发病机制。

参考文献

- [1] VILLA R F, FERRARI F, MORETTI A. Post-stroke depression: Mechanisms and pharmacological treatment[J]. Pharmacol Ther, 2018, 184: 131.
- [2] 陈贺华, 刘勇, 沈晓明. 柴胡疏肝散加味治疗卒中后抑郁的临床观察与机制分析[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(1): 112.
- [3] 胡丹, 盛蕾. 加味柴胡疏肝散颗粒辅助治疗缺血性脑卒中后抑郁的疗效观察[J]. 中草药, 2016, 47(21): 3866.
- [4] TAO X, YANG W L, ZHU S Z, et al. Models of poststroke depression and assessments of core depressive symptoms in rodents: How to choose?[J]. Exp Neurol, 2019, 322: 113060.
- [5] WILLNER P. Animal models of depression: an overview[J]. Pharmacol Ther, 1990, 45(3): 425.
- [6] BEDERSON J B, PITTS L H, GERMANO S M, et al. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats[J]. Stroke, 1986, 17(6): 1304.
- [7] CASTRÉN E, RANTAMÄKI T. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity[J]. Dev Neurobiol, 2010, 70(5): 289.
- [8] JIN H J, PEI L, LI Y N, et al. Alleviative effects of fluoxetine on depressive-like behaviors by epigenetic regulation of BDNF gene transcription in mouse model of post-stroke depression[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 14926.
- [9] KIM Y R, KIM H N, HONG K W, et al. Anti-depressant effects of phosphodiesterase 3 inhibitor cilostazol in chronic mild stress-treated mice after ischemic stroke[J]. Psychopharmacology (Berl), 2016, 233(6): 1055.
- [10] NAGAHARA A H, TUSZYNSKI M H. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders[J]. Nat Rev Drug Discov, 2011, 10(3): 209.
- [11] KAREGE F, SCHWALD M, Cisse M. Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets[J]. Neurosci Lett, 2002, 328(3): 261.
- [12] CASTRÉN E, ANTILA H. Neuronal plasticity and neurotrophic factors in drug responses[J]. Mol Psychiatry, 2017, 22(8): 1085.
- [13] YIN J Y, ZHONG C K, ZHU Z B, et al. Elevated circulating homocysteine and high-sensitivity C-reactive protein jointly predicts post-stroke depression among Chinese patients with acute ischemic stroke[J]. Clin Chim Acta, 2018, 479: 132.
- [14] 林文娟, 王东林, 潘玉芹. 抑郁症的心理神经免疫学研究: 细胞因子的作用[J]. 心理科学进展, 2008, 16(3): 404.
- [15] 盛蕾, 刘元月, 胡丹, 等. 柴胡疏肝散治疗卒中后抑郁的网络药理学研究[J]. 中草药, 2018, 49(15): 3509.

第一作者: 胡丹(1986—), 女, 医学硕士, 副主任中医师, 从事脑卒中及卒中后抑郁的临床与基础研究。

通讯作者: 盛蕾, 硕士, 主任医师, 硕士研究生导师。hejieqong1234@163.com

收稿日期: 2020-03-23

编辑: 吴宁