

· 基础研究 ·

栀子—刺五加含药血清对大鼠海马神经元发生的影响

徐向东¹ 徐向青² 孙灵芝² 李恃俊³

摘要 目的 观察栀子—刺五加含药血清对体外高浓度皮质酮作用下大鼠海马神经元发生的影响。**方法** 35 只雄性 Wistar 大鼠按随机数字表分为栀子组(0.23 g/d)、刺五加组(0.38 g/d)、栀子—刺五加组(栀子 0.23 g/d, 刺五加 0.38 g/d)、氟西汀组(0.51 mg/d)、空白组, 每组 7 只。连续灌胃 10 天后取含药血清和空白大鼠血清。体外建立高浓度皮质酮抑制大鼠海马神经元发生模型。采用 MTT 法测定神经元存活率, 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU) 标记海马神经元增殖, 神经元特异性烯醇化酶(NSE) 标记海马神经元生长。**结果** 与空白组及栀子组比较, 栀子—刺五加组、刺五加组、氟西汀组海马神经元存活率明显提高($P < 0.05$), 海马神经元中 BrdU 及 NSE 阳性细胞数明显增加($P < 0.05$)。**结论** 栀子—刺五加含药血清和刺五加含药血清有利于海马神经元在高皮质激素环境下的存活、增殖、生长, 具有促进海马神经元发生的作用。

关键词 栀子; 刺五加; 含药血清; 海马神经元发生

Effect of *Gardenia Jasminoides*-*Acanthopanax Senticosus* Containing Serum on Hippocampal Neurogenesis in Rats XU Xiang-dong¹, XU Xiang-qing², SUN Ling-zhi², and LI Shi-jun³ 1 Experiment Center, Affiliated Hospital of Shandong University of Chinese Medicine, Jinan(250014); 2 Encephalopathy Department, Affiliated Hospital of Shandong University of Chinese Medicine, Jinan(250014); 3 First Clinical Medical School, Shandong University of Chinese Medicine, Jinan(250014)

ABSTRACT Objective To study the effect of *Gardenia jasminoides*-*Acanthopanax senticosus* containing serum on hippocampal neurons in rats treated with high concentration of cortisol *in vitro*. **Methods** Totally 35 male Wistar rats were randomly divided into *Gardenia jasminoides* group(0.23 g/d), *Acanthopanax senticosus* group(0.38 g/d), *Gardenia jasminoides*-*Acanthopanax senticosus* group(*Gardenia jasminoides* 0.23 g/d, *Acanthopanax senticosus* 0.38 g/d), fluoxetine group(0.51 mg/d), and the blank group, 7 in each group. Ten days after continuous gavage, drug serum and blank rat serum were taken. The model of hippocampal neurons inhibited by high concentration of corticosterone was established *in vitro*. The survival rate of neurons was measured by MTT. The proliferation of hippocampal neurons was labeled by BrdU, and the growth of hippocampal neurons was labeled by neuron-specific enolase (NSE). **Results** Compared with the blank group and the *Gardenia jasminoides* group, hippocampal neuron survival rate, and the positive cells number of BrdU and NSE increased in *Gardenia jasminoides*-*Acanthopanax senticosus* group, *Acanthopanax senticosus* group and fluoxetine group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Gardenia jasminoides*-*Acanthopanax senticosus* containing serum and *Acanthopanax senticosus* containing serum are beneficial to the survival, proliferation and growth of hippocampal neurons under the environment of corticosteroid with high concentration, and can promote the development of hippocampal neurons.

KEYWORDS *Gardenia jasminoides*; *Acanthopanax senticosus*; drug containing serum; hippocampal neurons

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81302956); 山东省重点研发计划(No. 2017GSF19112)

作者单位: 1. 山东中医药大学附属医院实验中心(济南 250014); 2. 山东中医药大学附属医院脑病科(济南 250014); 3. 山东中医药大学第一临床医学院(济南 250014)

通讯作者: 徐向青, Tel: 18953192696, E-mail: happyxiangqing@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180702.188

抑郁症是一组以兴趣减退、情绪低落、乐趣丧失为主要表现的心境障碍综合症,世界卫生组织预测到 2030 年抑郁症将成为全球主要的疾病负担^[1]。现代经典抗抑郁药物药理作用主要是基于抑郁症的单胺假说,该假说认为抑郁症的发生与体内三种主要单胺神经递质(5-羟色胺、去甲肾上腺素、多巴胺)的缺乏密切相关,抗抑郁药物主要的药理作用是抑制转运蛋白阻滞单胺递质再摄取,提高递质在突触间隙中的浓度。研究发现诸如 SSRI 类抗抑郁药物具有 3~4 周的延迟起效的时间,同时相关研究证实抗抑郁药物具有促进神经发生的作用^[2]。对抑郁症病理机制和治疗的相关研究推动了抑郁症的神经发生障碍假说的提出^[3]。神经元发生障碍假说认为抑郁症的发生与神经可塑性失调密切相关^[4]。神经可塑性是神经元适应的基本机制,应激和其他负刺激诱发的神经可塑性的变化在抑郁症的发生发展中起重要作用。抗抑郁治疗也通过调节神经可塑性发挥抗抑郁作用^[5]。神经元发生假说可以较好解释抗抑郁治疗过程中出现的延迟起效现象。药对栀子—刺五加在临床应用中表现出较好的抗抑郁疗效,本课题前期的动物实验结果也表明栀子—刺五加能够改善慢性应激模型大鼠的行为学^[6]。本实验旨在研究栀子—刺五加含药血清对体外模拟应激环境下的海马神经元发生的影响,以进一步探讨栀子—刺五加抗抑郁作用的机制。

材料与方 法

1 动物 SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠,2~3 月龄,体重 300~350 g。购自山东鲁抗医药股份有限公司,实验动物质量合格证:SCXY(鲁)20130001,灌胃前于山东中医药大学附属医院动物房饲养 1 周,设定动物房温度(22±2)℃、湿度 55%±5%、光照 12 h,标准鼠食饲养,自由饮水,饲养环境为清洁级。新生 24 h Wistar 乳鼠,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,实验动物质量合格证:SCXY(鲁)20140007,实验伦理审批单位为山东中医药大学, No. AF/SC-08/02.0。

2 药物 栀子、刺五加免煎颗粒购自江阴天江药业有限公司。溶于蒸馏水(栀子 0.115 g/mL,刺五加 0.19 g/mL),放于 4℃ 冰箱中保存,灌胃前预温后摇匀;氟西汀片(25 mg,Patheon France 生产,批号:4533A,进口药品注册证号:H20120468),加入蒸馏水溶解至 0.255 mg/mL,于 4℃ 冰箱中保存,灌胃前预温后摇匀。

3 主要试剂 DMEM-Hams F12 培养基(批

号:CM10092)、汉克斯平衡盐溶液(批号:CC013)、Trypsin-EDTA,0.05%(批号:CC017.2)购自中科迈晨北京科技有限公司;磷酸盐缓冲盐水(美国 Biological Industries,批号:02-020-1A);Neurobasal-A 培养基(批号:10888022)、Hi Horse Serum(批号:SR0035C)、B27 Supplement(批号:17504044)购自美国 Gibco 公司;青链霉素混合液(批号:P1400)、Cytosine β-D-arabinoluranoside(批号:Sigma C1768)、L-Glutamine(批号:mresco 0374)、MTT 试剂(批号:M1020-500T)、Poly-L-Lysine(批号:Sigma P1274)、5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU,批号:B8010)均购自北京索莱宝科技有限公司;羊抗 BrdU 多克隆抗体(批号:ab2285)、兔抗 NSE 多克隆抗体(批号:ab53025)购自美国 Abcam 公司;胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司,批号:11012-8611)。

4 主要仪器 CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo Scientific Forma,型号 3111);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司,型号 SW-CJ-1F);高速离心机(德国 Sigma,型号 1-13);低温离心机(美国 Thermo IEC,型号 MICROMAX R);荧光倒置显微镜(上海尼康公司,型号 Nikon Ti-s);超低温冰箱(美国 Thermo Scientific Forma,型号 725);移液器(德国 Eppendorf,型号 10~1 000 μL)。

5 方法

5.1 分组及干预方法 将大鼠按随机数字表分为栀子组(0.23 g/d)、刺五加组(0.38 g/d)、栀子—刺五加组(栀子 0.23 g/d,刺五加 0.38 g/d)、氟西汀组(0.51 mg/d)、空白组,每组 7 只。按人与动物体表面积计算药物等效剂量^[7]给药,药物组大鼠和空白组大鼠每日灌胃 2 mL 药物溶液或蒸馏水,连续灌胃 10 d。末次灌胃 2 h 后腹主动脉取血 10 mL,常温静置 2 h 后,2 000 r/min 离心 20 min,取上层血清,0.22 μm 过滤器过滤除菌,于 -20℃ 冰箱中备用。

5.2 海马神经元原代培养 新生 24 h Wistar 乳鼠,取材前冰上冷冻,断头取脑,沿大脑中线切开脑组织,于纵切面去除脑干,暴露及分离海马组织,去除血管膜,将海马组织剪为 1 mm×1 mm×1 mm 大小的碎块,放入含 2 mL 0.05% 胰蛋白酶的离心管中,37℃ 消化 9 min。加含血清培养洗涤 2 遍,1 mL 移液枪轻柔吹打 10 次,200 目细胞筛过滤,分别以 7×10⁵ 和 5×10⁵ 种植于用 0.01% PLL 包被的 24 孔板(500 μL)和 96 孔板(100 μL)。4 h 后换维持液。

5.3 MTT 法测定神经元存活率 接种 72 h 后

加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 阿糖胞苷作用 24 h 以抑制胶质细胞的增殖。在无血清培养液中加入皮质酮,使其终浓度为 10^{-6} mol/L,作用 24 h,加入 10% 含药血清或正常大鼠血清作用 24 h,接种第 6 天开始 MTT 检测。取 96 孔板,加入 MTT,使每孔 100 μL 体积中含有浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT,培养 24 h,吸取培养液,加入 DMSO 震荡,待蓝色结晶溶解后,在酶标仪上读取 OD 值(波长 570 nm)。神经元存活率(%) = 正常血清(或含药血清) OD/无血清对照 OD 平均值 $\times 100\%$ 。

5.4 BrdU 标记检测神经元增殖的免疫组化反应 参照文献方法^[8],接种 24 h 后去血清,加入皮质酮使其终浓度为 10^{-6} mol/L,作用 24 h 后加入 10% 的正常大鼠血清或含药血清作用 24 h,给予 2% (V/V) BrdU 作用 24 h。PBS 液洗 2 遍,4% PFA 固定 30 min 后进行免疫组化反应:0.1% Triton X100 洗涤 3 次,每次 5 min;冰上 HCL (1 mol/L) 孵育 10 min, HCL (2 mmol/L) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 硼酸缓冲液 (0.01 mmol/L) 漂洗 12 min, 0.1% Triton X100 洗涤 3 次,每次 5 min;BrdU 多克隆抗体孵育,过夜;0.1% Triton X100 洗涤 3 次,每次 5 min;孵育二抗、三抗, DAB 显色。

5.5 NSE 免疫组化反应 海马神经元正常培养 3 天后,加入皮质酮及含药血清或正常大鼠血清干预,具体方法同上。进行 NSE 免疫组化反应:3% H_2O_2 室温孵育 15 min, $1 \times \text{PBS}$ 洗涤 3 遍,每次 5 min,正常山羊血清封闭 10 min,孵育一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;复温, $1 \times \text{PBS}$ 洗涤 3 遍,每次 5 min,依次加入二抗、三抗(链霉卵白素-过氧化物酶复合物), DAB 显色。NSE 阳性细胞:细胞轮廓清楚,并且有至少一根超过 2 倍胞体的突触。

5.6 BrdU 和 NSE 阳性细胞计数 100 倍光镜下计数玻片上 0、3、6、9 点方位以及中央区域的阳性细胞。NSE 阳性细胞计数标准:细胞轮廓清晰,至少有 1 支突起,且长度超过 2 倍胞体直径。

6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 One-Way ANOVA 及 LSD, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组海马神经元存活率比较(表 1) 与空白组及栀子组比较,栀子-刺五加组、刺五加组、氟西汀组海马神经元存活率明显提高 ($P < 0.05$)。

表 1 各组海马神经元存活率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	存活率
空白	6	0.7 \pm 0.3
栀子	6	0.8 \pm 0.3
刺五加	6	1.3 \pm 0.4 * Δ
栀子-刺五加	6	1.3 \pm 0.4 * Δ
氟西汀	6	1.3 \pm 0.4 * Δ

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与栀子组比较, $\Delta P < 0.05$

2 各组海马神经元 BrdU、NSE 阳性细胞数比较(表 2,图 1) 与空白组及栀子组比较,栀子-刺五加组、刺五加组、氟西汀组海马神经元中 BrdU 及 NSE 阳性细胞数增加 ($P < 0.05$)。

表 2 各组海马神经元 BrdU、NSE 阳性细胞数比较 (个/ μm^2 , $\bar{x} \pm s$)

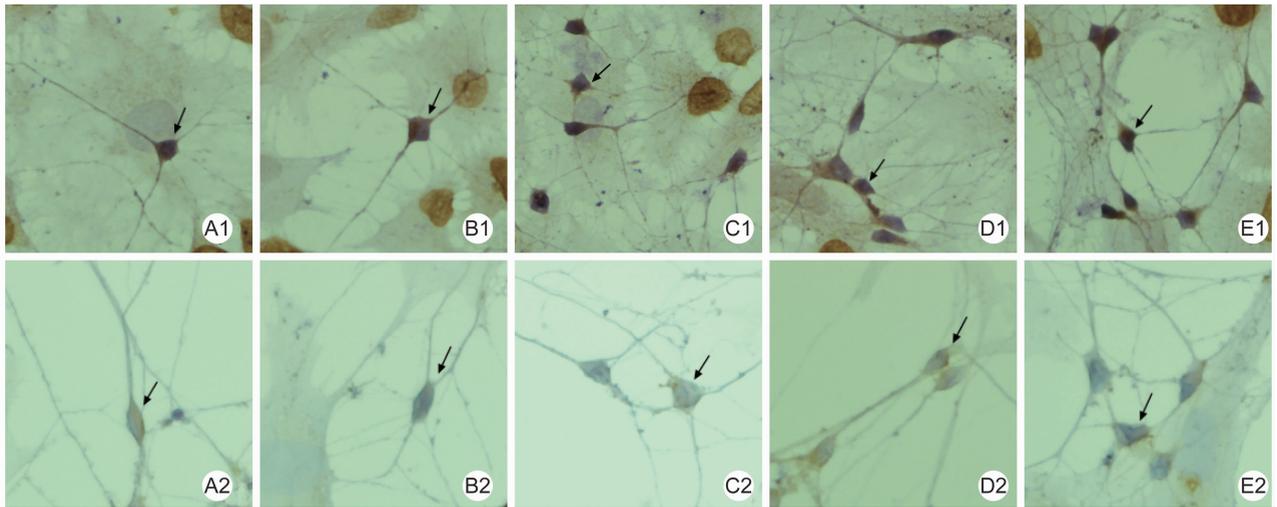
组别	n	BrdU 阳性细胞数	NSE 阳性细胞数
空白	6	15.2 \pm 4.9	8.7 \pm 3.6
栀子	6	17.2 \pm 2.8	9.7 \pm 4.2
刺五加	6	25.8 \pm 4.4 * Δ	15.8 \pm 5.8 * Δ
栀子-刺五加	6	27.2 \pm 5.1 * Δ	16.5 \pm 4.6 * Δ
氟西汀	6	28.5 \pm 7.0 * Δ	17.5 \pm 4.0 * Δ

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与栀子组比较, $\Delta P < 0.05$

讨 论

1998 年由 Eriksson PS 确认海马中存在新生的成熟神经元^[9]。位于海马齿状回下颗粒层的祖细胞分裂增殖后,新生细胞经过数周的时间成熟为具有形态学特征的颗粒细胞,并向分子层和 CA3 区分别发出树突和轴突,产生动作电位而具备相关功能^[10]。新生神经元经历分化、成熟到融入海马齿状回环路各步骤的时程与抗抑郁药物的起效时间相同^[11]。

应激性海马神经元损伤与神经元再生障碍共同导致的海马神经元丢失是抑郁症发病的关键环节^[12]。应激引起的神经发生障碍与体内 HPA 轴功能持续亢进、糖皮质激素含量升高密切相关。Chetty S 等^[13]研究发现,束缚应激大鼠模型和体外注射皮质酮后处理的大鼠, BrdU 阳性细胞中神经细胞比例下降,停止注射皮质酮 1 周后,大鼠海马新生神经细胞的比例恢复到正常水平。在体外培养的神经干细胞转染脱氧核糖核酸受体(Dngr)以阻断糖皮质激素受体的下行信号通路后,与转染 GFP 的神经干细胞相比,具有更高的神经元比例和更低的胶质细胞比例。以上实验结果说明应激不仅可减少神经元的增殖,而且可以改变神经干细胞的分化方向,最终通过提高胶质细胞的比例而改变海马的功能和结构。Hu P 等^[14]对大鼠体外注射皮质酮 18 天后给予米非司酮干预,运用免疫组织化学和免疫荧光化学法分别检测海马区 BrdU、神经元前



注:A 为空白组;B 为栀子组;C 为刺五加组;D 为栀子—刺五加组;E 为氟西汀组;1 为 BrdU 阳性细胞;2 为 NSE 阳性细胞;箭头所示为阳性细胞

图 1 各组海马神经元 BrdU 及 NSE 阳性细胞 (×400)

体细胞的标志微管相关蛋白(doublecortin, DCX)和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA),皮质酮可明显减少增加 BrdU、DCX 和 PCNA 阳性细胞数,米非司酮干预 1~4 天后 BrdU、DCX 和 PCNA 阳性细胞数均恢复至正常水平,提示糖皮质激素受体拮抗剂可提高逆转皮质酮对神经发生的抑制作用。应激作为环境因素启动 HPA 轴为主的神经内分泌功能障碍,导致神经递质、受体、信号通路、基因表达一系列功能障碍,海马等相关脑区神经损伤与再生障碍等神经可塑性病理改变,这可能是抑郁症主要的发病机制。

抗抑郁药物可促进神经发生^[15],传统的神经生物学抑郁症理论,如单胺假说等,不能完全解释抑郁症的发病机制,抑郁症的新治疗方向转移到调节神经元可塑性、促进神经元发生上^[16]。长期使用氟西汀、瑞波西汀等抗抑郁药物和电休克治疗均能提高受试动物的神经发生,表明多种抗抑郁药物对神经元发生具有相同的影响^[17]。

本实验采取改进的新生 24 h 大鼠海马神经原代培养方法,在培养体系中加入皮质酮以模拟高浓度糖皮质激素环境。BrdU 参入培养基可代替胸腺嘧啶参与 S 期的 DNA 合成,通过免疫组化反应后作为标志物反映细胞早期增殖。研究发现栀子—刺五加含药血清明显增加了海马神经元的 BrdU 阳性细胞数目,并且能增加 NSE 阳性细胞的突触数目。MTT 检测显示栀子—刺五加含药血清能提高皮质酮作用下的细胞存活率。

既往药理研究表明刺五加能够抑制神经元凋

亡^[18],修复损伤神经元和重建突触^[19]等多重药理作用。李冬梅、田会玲等^[20,21]发现颞颥解郁复方能上调卒中后抑郁大鼠 BDNF 表达及、促进海马神经元发生,其中刺五加、栀子为主要药物。与以往同类研究比较,本研究提出“泻南补北”法治疗抑郁症的理论新观点,选取具有补肾益精、清心调肝功效的栀子—刺五加药对,观察该药对含药血清对海马神经元发生的影响。刺五加有补肝肾、安神定志之功,栀子源于《伤寒论》栀子豉汤,具清心泻火、解郁安神之效,栀子—刺五加药对最为符合益肾水、清心火,兼顾调肝的治法。从现代药理学角度看,栀子具有中枢抗炎、神经元保护作用,刺五加具有调节内分泌及免疫增强作用,能提高体外神经细胞存活率。刺五加、栀子配伍可能会产生多靶点作用,从而产生抗抑郁的作用。本实验结果提示,外源性皮质酮可降低海马神经元存活率,抑制神经元的增殖与突触的生长。栀子—刺五加含药血清可支持海马神经元的生存,促进神经元的增殖与生长,增强神经元的可塑性,这可能是栀子—刺五加抗抑郁作用的机制之一。本研究的不足之处是尚未就其促进海马神经元发生的分子机制进行深入研究,今后应从神经营养、细胞信号传导通路等方面进一步探讨栀子—刺五加抑制海马神经元凋亡、促进神经元发生的具体机制。

利益冲突:作者宣称无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Samuels BA, Mendez-David I, Faye C, et al. Serotonin 1A and serotonin 4 receptors: essential mediators of the neurogenic and behavioral ac-

- tions of antidepressants [J]. *Neuroscientist*, 2016, 22(1): 26–45.
- [2] 朱冉, 张黎明, 李云峰. 快速起效抗抑郁药物的潜在靶标[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2017, 31(12): 1194–1199.
- [3] Hanson ND, Owens MJ, Nemeroff CB. Depression, antidepressants, and neurogenesis: a critical reappraisal [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2011, 36(13): 2589–2602.
- [4] 王小雪, 岳广欣, 巫鑫辉, 等. 抑郁症海马神经可塑性改变及中药调控作用研究现状[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2017, 19(4): 80–83.
- [5] Liu W, Ge T, Leng Y, et al. The role of neural plasticity in depression: from hippocampus to prefrontal cortex[J]. *Neural Plast*, 2017, (5): 1–11.
- [6] 徐向青, 徐向东, 宋婷, 等. 药对刺五加-栀子对慢性应激抑郁模型大鼠大脑 PKC-IP3 信号通路的影响[J]. *中医杂志*, 2017, 58(5): 415–417.
- [7] 徐叔云主编. *药理实验方法学*[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1861.
- [8] 马强, 杨志华, 晁福寰. 过量皮质酮致原代培养的大鼠海马神经元死亡方式的研究[J]. *中国应用生理学杂志*, 2001, 17(1): 29–32.
- [9] Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus [J]. *Nat Med*, 1998, 4(11): 1313–1317.
- [10] Schoenfeld TJ, Gould E. Differential effects of stress and glucocorticoids on adult neurogenesis [J]. *Curr Top Behav Neurosci*, 2013, 15(15): 139–164.
- [11] Pechnick RN, Zonis S, Wawrowsky K, et al. Antidepressants stimulate hippocampal neurogenesis by inhibiting p21 expression in the subgranular zone of the hippocampus [J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27290.
- [12] Rolls ET. The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus [J]. *Frontiers Systems Neurosci*, 2013, 7(7): 74–75.
- [13] Chetty S, Friedman AR, Taravoshlahn K, et al. Stress and glucocorticoids promote oligodendrogenesis in the adult hippocampus [J]. *Mol Psychiatry*, 2014, 19(12): 1275–1283.
- [14] Hu P, Charlotte O, Anne-marie VD, et al. A single-day treatment with mifepristone is sufficient to normalize chronic glucocorticoid induced suppression of hippocampal cell proliferation [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e46224.
- [15] Apple DM, Fonseca RS, Kokovay E. The role of adult neurogenesis in psychiatric and cognitive disorders [J]. *Brain Res*, 2016, 1655: 270–276.
- [16] Huang YJ, Lane HY, Lin CH. New treatment strategies of depression: based on mechanisms related to neuroplasticity [J]. *Neural Plast*, 2017(1): 4605971
- [17] Schoenfeld TJ, Cameron HA. Adult neurogenesis and mental illness [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2015, 40(1): 113–128.
- [18] 黎功炳, 雷宁, 龙军等. 刺五加胶囊改善抑郁大鼠学习记忆能力及对海马 BDNF 表达的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(6): 1078–1080.
- [19] Tohda C, Ichimura M, Bai Y, et al. Inhibitory effects of *Eleutherococcus senticosus* extracts on amyloid beta(25–35)-induced neuritic atrophy and synaptic loss [J]. *J Pharmacol Sci*, 2008, 107(3): 329–339.
- [20] 李冬梅, 唐启盛, 赵瑞珍, 等. 颐脑解郁方对脑卒中大鼠模型边缘系统脑源性神经营养因子的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2015, 35(8): 988–992.
- [21] 田会玲, 李小黎, 唐启盛, 等. 颐脑解郁复方对卒中后抑郁大鼠海马神经发生及 Notch 信号通路的影响 [J]. *中医杂志*, 2018, 59(4): 333–335.

(收稿: 2016–05–09 在线: 2018–07–23)

责任编辑: 赵芳芳