

氟西汀对卒中后抑郁模型大鼠脑组织中5-HT、NE及NGF表达的影响^Δ

赵立波^{1*},徐露^{2#},车珂科³,覃彬⁴(1.重庆市第三人民医院神经科,重庆 400014;2.重庆医科大学生化与分子药理学重点实验室,重庆 400016;3.重庆市第三人民医院药剂科,重庆 400014;4.重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆 400016)

中图分类号 R965;R971^Δ.4 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)21-1939-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.21.07

摘要 目的:研究氟西汀对卒中后抑郁(PSD)模型大鼠脑组织中5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)及神经生长因子(NGF)表达的影响。方法:将大鼠随机分为假手术组、抑郁模型组、卒中模型组、PSD模型组和氟西汀(10 mg/kg)组,每组12只。采用慢性温和不可预知应激(CUMS)结合孤养建立抑郁模型,大脑中动脉缺血(MCAO)术建立卒中模型,PSD模型组和氟西汀组大鼠先建立卒中模型后建立抑郁模型,腹腔注射相应药物进行干预,连续给药21 d后,用酶联免疫法和免疫组化SABC法检测给药后各组大鼠脑组织中5-HT、NE、NGF的表达。结果:与假手术组比较,抑郁模型组和PSD模型组大鼠脑组织中5-HT、NE、NGF表达均明显降低($P<0.01$);与抑郁模型组和PSD模型组比较,氟西汀组大鼠脑组织中5-HT、NE、NGF表达均明显升高($P<0.01$),且氟西汀组与假手术组比较无显著性差异($P>0.05$)。结论:氟西汀能显著提高PSD模型大鼠脑组织中5-HT、NE、NGF水平。

关键词 卒中后抑郁;大鼠;氟西汀;5-羟色胺;去甲肾上腺素;神经生长因子

Influence of Fluoxetine on the Levels of 5-HT, NE and NGF in Brain Tissue of Rats with Post-stroke Depression

ZHAO Li-bo¹, XU Lu², CHE Ke-ke³, QIN Bin⁴ (1.Dept. of Neurology, Chongqing Third People's Hospital, Chongqing 400014, China; 2.Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3.Dept. of Pharmacy, Chongqing Third People's Hospital, Chongqing 400014, China; 4.Dept. of Neurology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the influence of fluoxetine on the levels of 5-hydroxytryptamine (5-HT), norepinephrine (NE) and nerve growth factor (NGF) in brain tissue of rats with post-stroke depression (PSD). METHODS: Rats were randomized into sham-operated group, depression model group, stroke model group, PSD model group and fluoxetine group (10 mg/kg) with 12 rats in each group. The depression model was induced by chronic unpredictable mild stress (CUMS) combined with depression model, and stroke model was induced by middle cerebral artery occlusion (MCAO). Depression model was established in PSD model group and fluoxetine group after inducing stroke model. They were given relevant medicine intraperitoneally for consecutive 21 days, and ELISA and immunohistochemical SABC were used to detect the expression of 5-HT, NE and NGF in brain tissue. RESULTS: Compared with sham-operated group, the expressions of 5-HT, NE and NGF in brain tissue were significantly lowered in depression model group and PSD model group ($P<0.01$); compared with depression model group and PSD model group, the expressions of 5-HT, NE and NGF in brain tissue were significantly increased in fluoxetine group ($P<0.01$), and there was no significant difference between fluoxetine group and sham-operated group ($P>0.05$). CONCLUSIONS: Fluoxetine could increase 5-HT, NE and NGF levels in the brain tissue of PSD rats significantly.

KEY WORDS Post-stroke depression; Rats; Fluoxetine; 5-Hydroxytryptamine; Norepinephrine; Nerve growth factor

在脑卒中的并发症中,卒中后抑郁(Post-stroke depression, PSD)的发病率高达30%。PSD直接影响运动功能、认知功能的康复^[1],正成为脑血管病整体治疗中的一个严重问题,

Δ 基金项目:重庆市卫生局2011年医学科研计划项目(No.2011-3-323);重庆市第六届“步长杯”脑血管病科学研究基金面上项目(No. BCB2012010)

* 副主任医师,博士研究生。研究方向:缺血性脑卒中。电话:023-63520264。E-mail: neurodoctor1971@yahoo.com.cn

通信作者:讲师,博士研究生。研究方向:神经精神药物开发。E-mail: 106334600@qq.com

需要给予全面的认识和充分的诊治。氟西汀是选择性血清再吸收抑制剂型抗抑郁药当中的代表药物,尽管现在已有不少较新的药物,但氟西汀在临床应用中依然十分普遍^[2]。5-羟色胺(5-HT)及去甲肾上腺素(NE)是两种重要的神经递质,其与人类的一系列行为问题有关,同时也与性格和情感障碍有关;神经生长因子(NGF)具有促进神经再生和修复作用。本研究先采用线栓法建立大脑中动脉缺血(MCAO)模型,后加用慢性温和不可预知应激(CUMS)结合孤养建立抑郁模型,建成PSD大鼠模型,拟探讨氟西汀对PSD模型大鼠脑组织中5-HT、NE及NGF表达的影响。

1 材料

H1850 台式高速离心机(湘仪离心机仪器有限公司); EL800 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); TS100-F 显微图像采集系统(日本 Nikon 公司)。

氟西汀片(美国礼来制药公司,批号:A120108,规格:每片 20 mg); 5-HT 试剂盒(上海达豪生物科技有限公司,批号:20120310); NE 试剂盒(上海富众生物科技发展有限公司,批号:20120215); 即用型免疫组化 SABC (Strept avidin-biotin complex) 检测试剂盒(武汉博士德生物科技有限公司,批号:2012.01)。

成年 SD 大鼠 60 只, ♂, 体质量(220 ± 20) g, 由重庆医科大学动物中心提供, 动物合格证号: SCXK(渝)20020001。

2 方法

2.1 建模

采用 MCAO 术^[3]建立卒中模型大鼠; 采用 CUMS 结合孤养建立抑郁模型^[4]大鼠; 采用先行 MCAO 术建立卒中模型, 术后第 2 天将建模成功大鼠以 CUMS 结合孤养建立 PSD 模型。

2.2 分组与给药

将大鼠随机分为假手术组、抑郁模型组、卒中模型组、PSD 模型组和氟西汀(10 mg/kg)^[2]组, 每组 12 只, 除氟西汀组建立 PSD 模型腹腔注射氟西汀外, 其余各组建立相应模型, 腹腔注射生理盐水, 连续给药 21 d。

2.3 5-HT 和 NE 含量的检测

各组大鼠于给药 21 d 后处死 6 只, 取脑海马区组织, 称质量后置入 1 ml 玻璃组织匀浆器中, 加入预冷的 0.1% 高氯酸溶液 400 ml, 在冰浴中上下转动 8 min, 充分研磨使组织匀浆化后, 将组织匀浆液倒入离心管内, 4 ℃ 下 10 000×g 离心 15 min, 吸取上清液, 用 0.1% 高氯酸溶液定容至 0.5 ml, 按试剂盒说明书操作检测各组大鼠脑组织中 5-HT 和 NE 的含量。

2.4 NGF 表达的检测

取给药 21 d 后各组剩余的 6 只大鼠, 腹腔注射 10% 水合氯醛 350 mg/kg 麻醉, 将其仰卧固定于手术台上, “V” 字形迅速剪开胸腔, 充分暴露心脏, 将灌注针头从左心尖部插入升主动脉; 同时迅速剪开右心耳, 以 0.9% 生理盐水 250~400 ml 左心室加压灌注, 待从右心耳流出液变为无色后, 继续以 10% 中性甲醛溶液 200~250 ml 左心室加压灌注。然后断头取脑, 脑组织在 10% 中性甲醛溶液中固定 24 h, 取双侧海马及皮质, 将标本在常温下进行梯度乙醇(70%、80%、95%、100%) 脱水, 二甲苯透明、浸蜡、石蜡包埋, 石蜡切片, 片厚 5 μm, 将组织附着于防脱剂处理过的载玻片上, 60 ℃ 恒温烤箱烤片后进行染色。采用免疫组化 SABC 法二氨基联苯胺(DAB) 显色, 每张图片在大脑额叶皮质及海马区各取 3 个视野, 在光学显微镜下观察 NGF 免疫阳性细胞表达数目(细胞浆染色呈棕黄色颗粒者为阳性反应细胞)。

2.5 统计学处理

数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用方差分析, 两组比较采用 *t* 检验。 *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 5-HT 及 NE 含量比较

与假手术组比较, 抑郁模型组和 PSD 模型组大鼠脑组织中 5-HT、NE 含量均明显降低(*P* < 0.01); 与抑郁模型组和 PSD 模型组比较, 卒中模型组和氟西汀组大鼠脑组织中 5-HT、NE

含量均明显升高(*P* < 0.01), 且氟西汀组与假手术组比较无显著性差异(*P* > 0.05)。各组大鼠脑组织中 5-HT、NE 含量比较见表 1。

表 1 各组大鼠脑组织中 5-HT、NE 含量比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Comparison of the contents of 5-HT and NE in brain tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	5-HT, ng/ml	NE, ng/ml
假手术组	170 ± 24.16	426 ± 40.64
抑郁模型组	112 ± 20.05*	218 ± 29.85*
卒中模型组	158 ± 21.11 [#]	404 ± 37.52 [#]
PSD 模型组	108 ± 18.07*	223 ± 30.33*
氟西汀组	155 ± 22.38 [#]	391 ± 33.70 [#]

与假手术组比较: **P* < 0.01; 与抑郁模型组和 PSD 模型组比较: [#]*P* < 0.01

vs. sham-operated group: **P* < 0.01; vs. depression model group and PSD model group: [#]*P* < 0.01

3.2 NGF 表达比较

与假手术组比较, 抑郁模型组和 PSD 模型组大鼠脑组织中 NGF 表达均明显降低(*P* < 0.01); 与抑郁模型组和 PSD 模型组比较, 卒中模型组和氟西汀组大鼠脑组织中 NGF 表达均明显升高(*P* < 0.01), 且氟西汀组与假手术组比较无显著性差异(*P* > 0.05)。各组大鼠脑组织中 NGF 免疫阳性细胞数比较见表 2, 显微镜图见图 1。

表 2 各组大鼠脑组织中 NGF 免疫阳性细胞数比较(个/400 倍视野, $\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 The number of immunoreactive cells of NGF in brain tissue of rats in each group (cells/×400 scope, $\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	海马区	额叶皮质
假手术组	37.64 ± 10.03	35.81 ± 8.77
抑郁模型组	12.26 ± 5.83*	14.07 ± 5.95*
卒中模型组	30.45 ± 9.62 [#]	30.50 ± 9.17 [#]
PSD 模型组	11.04 ± 5.38*	12.74 ± 5.66*
氟西汀组	31.49 ± 10.16 [#]	29.46 ± 9.53 [#]

与假手术组比较: **P* < 0.01; 与抑郁模型组和 PSD 模型组比较: [#]*P* < 0.01

vs. sham-operated group: **P* < 0.01; vs. depression model group and PSD model group: [#]*P* < 0.01

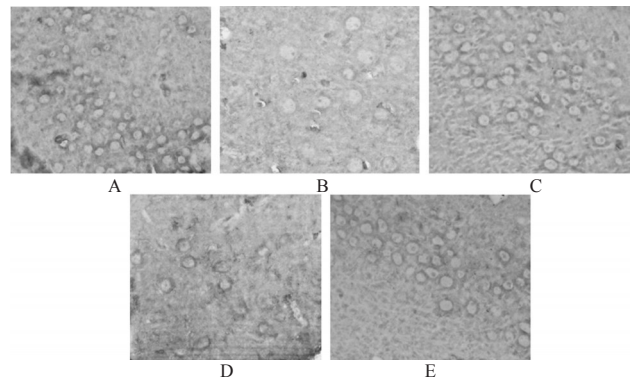


图 1 各组大鼠脑组织中 NGF 免疫阳性细胞数显微镜图(×400)

Fig 1 Microscopic images of the number of immunoreactive cells of NGF in brain tissue of rats(×400)

A. sham-operated group; B. depression model group; C. stroke model group; D. PSD model group; E. fluoxetine group

4 讨论

PSD 为脑卒中后常见的并发症,其发病机制十分复杂,至今尚未明确,而对于其诊断、治疗等仍然以参考原发性抑郁为主^[6]。本实验室的 PSD 建模方法采用的是最为经典的 Willenr P 的 PSD 模型法,目前大部分的 PSD 模型都是采用此方法。该方法是一种较为理想的 PSD 模型法,用该法建立的 PSD 大鼠模型与临床的精神抑郁状态极为相似,表现为精神萎靡、活动能力下降、兴趣丧失等。

5-HT 作为神经递质,主要分布于松果体和下丘脑,可能与痛觉、睡眠和体温等生理功能的调节^[6]。中枢神经系统 5-HT 含量、功能异常可能与精神病、偏头痛等多种疾病的发病有关。NE 是一种重要的单胺类神经递质,广泛作用于不同的脑区,调控觉醒和应激反射。NE 皮质系统的基本功能是通过对新奇环境刺激和觉醒状态的注意来平衡警醒和观察行为^[7]。中枢 NE 系统实质与应激反应系统相关,而焦虑和抑郁的发病机制也与 NE 系统的失调有关。5-HT 和 NE 的缺乏是抑郁症发生的重要神经介质。5-HT 与人类的行为有密切关系,而 NE 除了对躯体运动有调节以外,还参与情感、认知、思维、理解和推理等精神活动的调节^[8]。NGF 是一类选择性调节周围神经和中枢神经系统神经生长和存活的蛋白质,是一种靶细胞源性因子,具有独特而显著的神经营养和促进神经生长作用^[9]。NGF 是神经系统最重要生物活性分子之一,其可营养某些神经元并诱导其突起的生长,在维持神经系统生长发育和功能中起着重要作用,是参与损伤神经再生与修复的重要因素^[10]。

目前认为,抑郁症的神经生物学机制主要与中枢神经突触间隙 5-HT 及 NE 神经递质浓度降低有关。在本实验中,氟西汀组 PSD 模型大鼠的 5-HT、NE 含量与抑郁模型组和 PSD 模型组相比显著升高($P < 0.01$),说明氟西汀对 PSD 具有显著的预防作用。NGF 具有神经元营养和促突起生长双重生物学作用,NGF 表达升高,则能加速神经的修复与生长。在本实验中,氟西汀组 PSD 模型大鼠的 NGF 表达与抑郁模型组和 PSD 模型组相比显著升高,说明升高 NGF 的表达是氟西汀预防 PSD 的有效方法。

通过本实验发现,抑郁模型组和 PSD 模型组大鼠 NE、5-HT 及 NGF 表达均明显低于假手术组和卒中模型组($P < 0.01$),表明 PSD 模型大鼠脑组织中 NE、5-HT 及 NGF 表达均下

降。氟西汀组 PSD 模型大鼠 NE、5-HT 及 NGF 表达与假手术组比较无显著性差异($P > 0.05$),表明氟西汀可升高 PSD 模型大鼠脑组织中 5-HT、NE 及 NGF 表达,对 PSD 具有一定的预防作用,这可能是其治疗 PSD 的重要机制。

参考文献

- [1] 唐启盛,裴清华,侯秀娟,等.脑卒中后抑郁状态动物模型的建立[J].北京中医药大学学报,2004,27(3):33.
- [2] 刘永珍,龙洁.卒中后抑郁状态对预后的影响及治疗进展[J].国外医学脑血管病分册,2001,9(4):245.
- [3] 罗勇,董为伟.Wistar 大鼠插线法局灶性脑缺血/再灌注模型的实验研究[J].重庆医科大学学报,2002,27(1):13.
- [4] Willenr P, Towell A, Sampson D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic mild unpredictable stress and its restoration by a tricyclic antidepressant[J]. *Psychopharmacology: Berl*, 1987(93):358.
- [5] Ciucurel C, Iconaru EI. A case study of occupational therapy for poststroke depression in elderly[J]. *Social and Behavioral Sciences*, 2012(46):3 865.
- [6] 周建松,李凌江,曹霞,等.5-羟色胺及其突触后 1A 受体对慢性应激大鼠情绪和认知的影响[J].中南大学学报:医学版,2008,33(4):305.
- [7] Morita M, Nakayama K. Mirtazapine in combination with perospirone synergistically enhances dopamine release in the rat prefrontal cortex via 5-HT1A receptor activation[J]. *Psychiatry Clin Neurosci*, 2011,65(3):246.
- [8] 许晶,孙玉华.急性脑卒中后抑郁血清单胺类递质的变化[J].中国康复理论与实践,2003,9(3):153.
- [9] Graiani G, Emanuelli C, Desortes E, et al. Nerve growth factor promotes reparative angiogenesis and inhibits endothelial apoptosis in cutaneous wounds of type 1 diabetic mice[J]. *Diabetologia*, 2004,47(6):1 047.
- [10] 彭正午,薛芬,席敏,等.帕罗西汀对海马星形胶质细胞增殖的作用及其机制研究[J].中国神经精神疾病杂志,2011,37(11):646.

(收稿日期:2013-01-18 修回日期:2013-03-07)

“实现健康公平,建成小康社会”高层研讨会在京召开

本刊讯 为深入贯彻“十八大”提出的全面建成小康社会的精神,推动卫生计生领域“中国梦”的学习和理解,2013年4月27日,国家卫生和计划生育委员会卫生发展研究中心在京召开了以“实现健康公平,建成小康社会”为主题的研讨会,暨《医改专题研究》绿皮书和《新型农村合作医疗制度》绿皮书发布会。

国家卫生和计划生育委员会副主任陈啸宏在会上发表了主旨演讲。他阐述了卫生计生领域对“中国梦”的理解,提出了“享有优质便捷的服务梦”、“享有个人负担较低的保障梦”和“享有良好身心状态的健康梦”的“三个享有”理念,同时结

合我国当前的医药卫生体制改革和发展,提出了促进早日实现卫生计生领域的中国梦的六项政策建议。未来卫生改革应将卫生公平性问题摆在更加重要的位置。

与会专家和学者就卫生筹资公平性、政府财力保障公平性、卫生服务公平性以及医疗保障公平性等四个主题展开了深入讨论。大家一致认为,本次高层次的研讨会的召开,对于深入研究相关理论、研究服务和推动改革实践、开拓卫生改革和发展新思路、早日实现健康公平和建成小康社会的目标,具有重要意义。