

·方药研究·

本文引用:孟盼,朱青,赵洪庆,张秀丽,王宇红,杨蕙,雷昌.甘麦大枣汤对慢性应激抑郁大鼠HPA轴及海马显微结构的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(6):581-585.

## 甘麦大枣汤对慢性应激抑郁大鼠HPA轴及 海马显微结构的影响

孟盼<sup>1</sup>,朱青<sup>3</sup>,赵洪庆<sup>1</sup>,张秀丽<sup>1</sup>,王宇红<sup>1\*</sup>,杨蕙<sup>2</sup>,雷昌<sup>1</sup>

(1.湖南中医药大学,湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地,湖南长沙410208;

2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙410007;3.湖南省肿瘤医院,湖南长沙410006)

**[摘要]** **目的** 研究甘麦大枣汤对慢性应激抑郁模型大鼠HPA轴及海马显微结构的影响,探讨其可能的抗抑郁机制。**方法** 将SD大鼠随机分为6组:空白组、模型组、氟西汀组(5.4 mg/kg)、甘麦大枣汤高、中、低剂量组(3.84、1.92、0.96 g/kg),采用慢性不可预见性温和应激建立抑郁模型,于造模同时给药,连续21 d。采用糖水消耗实验和旷场测试检测大鼠的抑郁样行为,ELISA法检测大鼠血浆促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质酮(CORT)的变化,HE染色观察大鼠海马CA1区、CA3区及齿状回(DG)区的病理结构变化。**结果** 与空白组比较,抑郁模型组大鼠蔗糖偏食度及自主活动次数显著下降( $P<0.01$ ),血浆CRH、ACTH、CORT含量显著上升( $P<0.01$ ),海马CA1区、CA3区以及DG区神经元均萎缩、缺失,损伤明显;与模型组比较,甘麦大枣汤高剂量组大鼠蔗糖偏食度及活动次数均显著提高( $P<0.01$ ),血浆ACTH、CORT含量下降( $P<0.05$ ),同时海马各区神经元损伤情况得到缓解。**结论** 甘麦大枣汤能显著改善模型大鼠的抑郁样行为,其作用可能与调节HPA轴亢进,保护海马的损伤有关。

**[关键词]** 甘麦大枣汤;抑郁;慢性应激;HPA轴;海马;显微结构

**[中图分类号]**R285.5;R749 **[文献标识码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.06.001

### Effects of Ganmai Dazao Decoction on HPA Axis and Microstructure of Hippocampal in Chronic Stress Depression Model Rats

MENG Pan<sup>1</sup>, ZHU Qing<sup>3</sup>, ZHAO Hongqing<sup>1</sup>, ZHANG Xiuli<sup>1</sup>, WANG Yuhong<sup>1\*</sup>, YANG Hui<sup>2</sup>, LEI Chang<sup>1</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Training Bases of Hunan Key Laboratory of Chinese Materia Powder and Innovative Drugs Established by Provincial and Ministry, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 3. Hunan Provincial Tumor Hospital, Changsha, Hunan 410006, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effects of Ganmai Dazao decoction on the HPA axis and hippocampus microstructure in depressive rats induced by chronic stress, and to explore the possible mechanism of its antidepressive role. **Methods** SD rats were randomly divided into six groups: control group, model group, fluoxetine group (5.4 mg/kg), high, medium and low dose of Ganmai Dazao Tang group (3.84, 1.92, 0.96 g/kg). The model of depression was established by chronic unpredictable mild stress, administered simultaneously in modeling, which was administrated with medicines for 21 d. The depression-like behavior in rats was detected by sucrose consumption test and open-field test. The contents of corticotropin releasing hormone (CRH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosterone (CORT) in plasma were detected by ELISA. HE staining was to disclose pathological changes of hippocampal CA1 structure, CA3 region and dentate gyrus (DG) in

**[收稿日期]**2016-09-27

**[基金项目]**国家自然科学基金青年项目(81403387);湖南省教育厅一般项目(14C0862);湖南中医药大学校级青年基金(99820001-147);中医内科学省部共建教育部重点实验室开放基金(ZYNK201503)。

**[作者简介]**孟盼,女,在读博士研究生,助教,主要从事神经精神疾病的机制研究。

**[通讯作者]**\*王宇红,女,研究员,博士研究生导师,E-mail:wyh107@126.com。

rats. **Results** Compared with control group, sucrose partial eclipse and locomotor activity in rats decreased significantly in model group ( $P<0.01$ ), and CRH, ACTH, CORT content in plasma had a significant increase ( $P<0.01$ ), neurons in hippocampal CA1, CA3 and DG region were atrophic or lost, the damage was obvious. Compared with model group, the partial eclipse of sucrose and locomotor activity in high dose of Ganmai Dazao decoction were significantly improved ( $P<0.01$ ), and the content of plasma ACTH and CORT decreased ( $P<0.05$ ). Meanwhile, the hippocampal neuronal injury in model group had been alleviated. **Conclusion** Ganmai Dazao decoction could obviously improve depressive behavior in depressive rats, which might be associated with the regulation of hyperactivity in HPA axis, and reduction of hippocampal damage.

[**Keywords**] Ganmai Dazao decoction; depression; chronic stress; HPA axis; hippocampus; microstructure

抑郁症是以显著而持久的情绪低落或兴趣丧失为主要症状的一种情感障碍。目前,抑郁症的假说主要包括:神经营养假说、单胺递质假说、细胞因子假说、应激假说、受体假说等<sup>[1-2]</sup>。但以上传统假说远不能解释抑郁症的发生和抗抑郁治疗作用机理,现有较为公认的认识可总结为:在环境与遗传因素的相互作用下,造成以下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA轴)为主的神经-内分泌-免疫系统的功能障碍,导致出现包括神经元再生障碍、神经营养低下和神经损伤在内的海马神经元病理性改变,这是抑郁症发生的重要神经生物学机制<sup>[3]</sup>。

目前,西药中的抗抑郁药大多具有毒副作用较大、抗抑郁谱窄、易复发、药价与依赖性高等特点;中医药治疗抑郁症立足于整体调节,具有疗效好、副作用小、适合长期服用及安全可靠等优点。甘麦大枣汤为汉代张仲景《金匱要略》的有效名方,临床常使用甘麦大枣汤加味治疗抑郁症,能够有效地缓解和改善患者抑郁症状。为了能够更好的探明甘麦大枣汤的抗抑郁功效及其机制,本实验去除加味药物的影响因素,实验方药以炙甘草、小麦、大枣组成,采用慢性不可预见性温和应激抑郁模型,观察甘麦大枣汤对抑郁模型大鼠行为活动、HPA轴经典指标促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质酮(CORT)及海马CA1、CA3、齿状回(DG)区神经元的影响,研究其抗抑郁的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

雄性成年SD大鼠48只,180-220 g,购自湖南斯莱克动物有限公司,实验动物合格证:43004700015571。大鼠购入后先适应性喂养3 d,实验期间大鼠均在室温( $25\pm 1$ )℃、相对湿度( $50\pm 5$ )%环境下喂养。

### 1.2 药物

甘麦大枣汤由炙甘草、小麦、大枣组成,药材均购自湖南中医药大学第一附属医院,根据人临床用量折算出大鼠等效剂量,高、中、低剂量分别为等效剂量的4倍、2倍、1倍,分别为3.84、1.92、0.96 g/kg;氟西汀购自礼来苏州制药有限公司,批号为0722A,给药剂量为5.4 mg/kg。

### 1.3 试剂与仪器

CRH、ACTH、CORT试剂盒均购自R&D公司;TS-12A生物组织自动脱水机、BM-VIII生物组织包埋机购自湖北孝感市宏业医用仪器有限公司;DH-250型电热恒温培养箱购自北京市科伟永兴仪器有限公司;HM340E生物组织切片机购自美国THERMO SCIENTIFI公司;Smart-3.0开野视频跟踪系统购自西班牙Panlab公司。

## 2 方法

### 2.1 分组及干预

48只大鼠随机分为6组,即空白组,模型组,氟西汀组(5.4 mg/kg),甘麦大枣汤高、中、低剂量组(3.84, 1.92, 0.96 g/kg),每组8只。造模同时灌胃给药,每日1次(8:30-9:00),连续21 d,空白组、模型组则给予等体积的蒸馏水。

### 2.2 造模

采用慢性不可预见性温和应激联合孤养建立抑郁大鼠模型<sup>[4]</sup>,应激方法包括冰水浴4 min、禁食或禁水24 h、50 V电击3 min、倾笼24 h、噪音4 h、光照或黑暗24 h、潮湿垫料24 h、夹尾1 min,每天采用1~2种刺激,同种刺激不连续出现,躯体应激每周限一次(电击、夹尾),共21 d,期间动物均孤笼饲养。

### 2.3 糖水消耗实验

各组大鼠末次给药后,进行行为学检测。每组

大鼠单笼饲养,给予两个水瓶,一个装 1%蔗糖水,一个装蒸馏水,禁水 12 h 后,测定大鼠(18:00 至次日 9:00 期间)1%蔗糖水摄入量。

#### 2.4 旷场测试

糖水消耗实验结束后,将大鼠放入长宽高分别为 80 cm、80 cm、40 cm 的黑色敞箱中,敞箱底面平均划分为 25 个小方格。实验前 1 h 将待测大鼠放入测试房间,测试期间关闭房间灯光,将大鼠从敞箱中央放入,观察并记录大鼠 4 min 内水平运动格数以及垂直竖立次数,计算总和。

#### 2.5 ELISA 检测 CRH、ACTH、CORT 的含量

行为学检测结束后,水合氯醛麻醉大鼠,腹主动脉取血,离心,取血浆,留待检测 HPA 轴内分泌相关指标。往预先包被 CRH、ACTH、CORT 抗体的微孔中,依次加入标本、标准品、HRP 标记的检测抗体,经过温育并彻底洗涤。用底物 TMB 显色,TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅与血浆中各物质的含量呈正相关。用酶标仪在 450 nm 波长下测定光密度值。

#### 2.6 海马 CA1、CA3、DG 区 HE 染色观察

各组大鼠取血后,继续取脑组织,并固定于 4% 甲醛溶液中过夜,常规石蜡包埋,切片,薄片用二甲苯和各级乙醇切片脱蜡水洗,洗完用苏木素染色 5 min,蒸馏水冲洗至干净,经盐酸乙醇分化和自来水浸泡后置伊红液中 2 min,纯酒精脱水,二甲苯使之变透明,用加拿大树胶封固,置于显微镜下观察。

#### 2.7 统计学分析

采用统计软件 SPSS 16.0 分析数据,所有计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,采用 One-way-ANOVA 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 甘麦大枣汤对抑郁模型大鼠行为学的影响

与空白组比较,模型组大鼠蔗糖偏食度与活动次数均显著降低( $P < 0.01$ )。在给予高剂量甘麦大枣汤干预后,模型大鼠的蔗糖偏食度与活动次数均显著回升( $P < 0.01$ )。此外,中剂量甘麦大枣汤能提高模型大鼠的蔗糖偏食度( $P < 0.05$ )。结果见表 1。

#### 3.2 甘麦大枣汤对抑郁模型大鼠血浆 CRH、ACTH、CORT 的影响

表 1 甘麦大枣汤对抑郁模型大鼠行为学的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	蔗糖水消耗量(g)	自主活动次数(次)
空白组	138.1±4.7	48.7±10.7
模型组	79.5±8.3**	11.2±3.4**
氟西汀组	117.6±5.8##	36.9±9.0##
甘麦大枣汤高剂量组	114.4±4.9##	28.1±9.9##
甘麦大枣汤中剂量组	105.6±8.4#	17.7±8.7
甘麦大枣汤低剂量组	92.2±4.9	14.3±4.9
F 值	26.3	30.3
P 值	0.000	0.000

注:与空白组比较:\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较:# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ 。

与空白组比较,模型组大鼠血浆 CRH、ACTH、CORT 水平均显著升高( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。与模型组比较,甘麦大枣汤高剂量组大鼠血浆 CORT 和 ACTH 水平显著降低( $P < 0.05$ ),但 CRH 变化无显著性差异( $P > 0.05$ )。

表 2 各组大鼠血浆 CORT、ACTH、CRH 含量变化

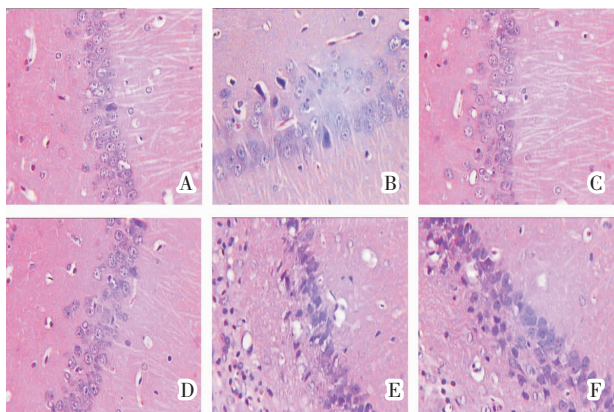
组别	CRH	ACTH	CORT
空白组	19.4±2.7	42.2±6.4	243.1±17.5
模型组	30.3±1.7*	66.8±5.2*	293.4±13.8**
氟西汀组	22.2±2.0#	49.9±1.8#	268.7±11.2#
甘麦大枣汤高剂量组	24.9±2.3	50.7±1.4#	274.1±9.5#
甘麦大枣汤中剂量组	28.7±2.4	57.3±2.3	284.3±17.6
甘麦大枣汤低剂量组	29.6±2.8	61.2±1.9	290.3±12.8
F 值	7.410	6.522	15.312
P 值	0.025	0.028	0.004

注:与空白组比较:\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较:# $P < 0.05$ 。

#### 3.3 甘麦大枣汤对抑郁模型大鼠海马病理结构的影响

3.3.1 对抑郁模型大鼠海马 CA1 区的影响 正常大鼠海马 CA1 区神经元结构完整,细胞形态规则,细胞间隙正常,排列整齐致密,可见 2-3 层细胞,核仁清晰。与空白组比较,模型组大鼠海马 CA1 区神经元萎缩,排列疏松,部分细胞呈空泡状,且存在细胞核固缩。与模型组比较,甘麦大枣汤高剂量和氟西汀组大鼠海马 CA1 区神经元的大小、数量及胶质细胞均增加,细胞间隙较模型对照组改善明显。结果见图 1。

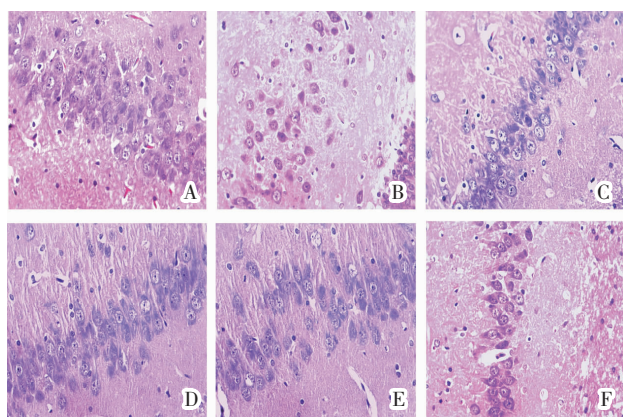
3.3.2 对抑郁模型大鼠海马 CA3 区的影响 正常大鼠海马 CA3 区神经元排列整齐,细胞呈椭圆状,染色质分布均匀,核膜完整,核仁清晰。与空白组比较,模型组大鼠海马 CA3 区神经元排列杂乱,细胞



注:A.空白组;B.模型组;C.氟西汀组;D.甘麦大枣汤高剂量组;  
E.甘麦大枣汤中剂量组;F.甘麦大枣汤低剂量组

图1 各组大鼠海马CA1区病理染色结果(HE×400)

间隙增大,细胞核固缩,胞浆浓缩深染,可见变性坏死神经元。甘麦大枣汤高剂量、氟西汀组大鼠海马CA3区神经元排列整齐,大部分神经元细胞核、膜结构较清楚,神经元损伤程度明显减轻,中剂量甘麦大枣汤可轻度改善或缓解CA3区神经元的变性和坏死。结果见图2。



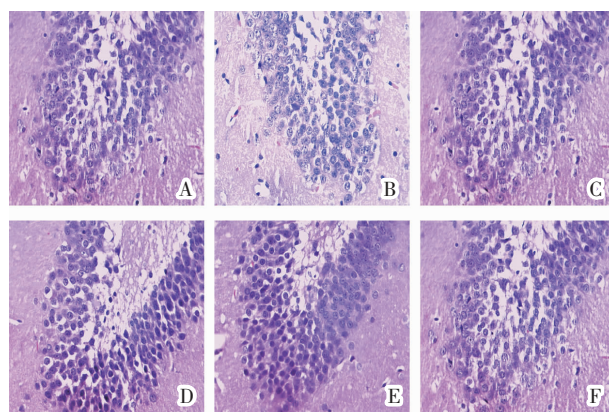
注:A.空白组;B.模型组;C.氟西汀组;D.甘麦大枣汤高剂量组;  
E.甘麦大枣汤中剂量组;F.甘麦大枣汤低剂量组

图2 各组大鼠海马CA3区病理染色结果(HE×400)

3.3.3 对抑郁模型大鼠海马DG区的影响 正常大鼠海马DG区神经元排列规则,细胞呈颗粒形,染色质分布均匀。模型组大鼠海马DG区神经元丢失,排列稀疏,染色质分布不均。与模型组比较,甘麦大枣汤高剂量组及氟西汀组大鼠海马DG区新生神经元细胞数量增加,排列相对有序。结果见图3。

## 4 讨论

慢性应激是抑郁症的重要诱发因素,目前,慢性不可预见性温和应激是国内外惯用的模拟抑郁症临



注:A.空白组;B.模型组;C.氟西汀组;D.甘麦大枣汤高剂量组;  
E.甘麦大枣汤中剂量组;F.甘麦大枣汤低剂量组

图3 各组大鼠海马DG区病理染色结果(HE×400)

床发病特征[5]的动物造模方法[5]。抑郁模型大鼠伴有精神萎靡,快感缺失,活动能力下降,学习记忆受损等特征,本实验在建模21d后,采用糖水消耗实验和旷场测试测定大鼠的抑郁样行为,结果显示抑郁模型大鼠对蔗糖水偏好度下降,同时活动次数显著下降,提示其快感缺失及活动能力下降,说明抑郁动物模型建立成功。给予甘麦大枣汤后,模型大鼠的蔗糖水偏好度及活动次数均上升,提示该复方具有良好的抗抑郁作用。

HPA轴是机体内分泌网络的关键枢纽,对维持机体内环境稳态具有重要作用,其亢进是抑郁症发生的重要危险因素。海马具有调节情绪认知、学习记忆的功能,其不仅是HPA轴的高位调节中枢,而且还是抑郁症发病的关键靶器官[6]。HPA轴功能亢进导致体内糖皮质激素含量升高,进而透过血脑屏障入脑,而海马是脑中最易受糖皮质激素攻击的组织,当海马中皮质醇含量异常升高时,可产生神经毒性,加速海马萎缩和损伤,进而诱发抑郁的产生[7]。同时,海马的损伤会进一步恶化神经内分泌的负反馈调节,加重HPA轴功能紊乱,造成恶性循环[8],而HPA轴过度活化可导致海马结构与功能发生障碍[9-10]。

海马齿状回颗粒细胞下层(SGZ)的新生细胞通过短距离的迁移达到DG区的颗粒细胞层,其中存活的神经元可延伸到CA3区锥体细胞层,形成突触,并参与脑内信息的传递及记忆的形成[11-12]。CA3区是海马生理功能发挥最早的部位,也是对外来病理因素最为敏感的部位。慢性应激使大鼠海马CA1、CA3区锥体细胞损伤,并导致神经元形态改变,神经细胞大量丢失,学习记忆能力下降,海马萎

缩,最终产生抑郁情绪<sup>[13]</sup>。故而,准确定位于海马 CA1、CA3、DG 区对于研究抑郁症海马神经元的损伤机制具有重要的科学价值。

本实验采用“二区一回”为关键靶区域研究抑郁症海马神经元损伤的病理机制及甘麦大枣汤的干预作用。结果显示,甘麦大枣汤能显著降低抑郁模型大鼠血浆的 CORT 和 ACTH 含量,抑制 HPA 轴高亢,增加海马 CA1 区、CA3 区及 DG 区锥体及颗粒细胞层厚度,降低海马神经元的萎缩、核固缩。提示,甘麦大枣汤能有效改善抑郁模型大鼠的抑郁样症状,其作用机制可能是通过降低 HPA 轴的高亢,减缓神经元的损伤和丢失进而有效保护海马神经元实现的。

#### 参考文献:

- [1] Ménard C, Hodes GE, Russo SJ. Pathogenesis of depression: Insights from human and rodent studies [J]. *Neuroscience*, 2016, 321:138-162.
- [2] She Y, Xu J, Duan Y, et al. Possible antidepressant effects and mechanism of electroacupuncture in behaviors and hippocampal synaptic plasticity in a depression rat model [J]. *Brain Res*, 2015, 1629: 291-297.
- [3] Fournier NM, Duman RS. Role of vascular endothelial growth factor in adult hippocampal neurogenesis: implications for the pathophysiology and treatment of depression[J]. *Behav Brain Res*, 2012, 227(2): 440-449.
- [4] 赵洪庆,杜青,凌佳,等.左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马神经元 JNK/Elk-1/c-fos 通路的调控作用[J].*中国临床药理学与治疗学*,2016,21(6):625-629.
- [5] 傅锦华,刘勇.舒肝解郁胶囊对抑郁模型大鼠脑内 5-HT、DA 及其代谢产物水平的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2016,36(6):47-51.
- [6] Nader M, Rasoul G, Zahra G, et al. Effect of Chronic Restraint Stress on HPA Axis Activity and Expression of BDNF and TrkB in the Hippocampus of Pregnant Rats: Possible Contribution in Depression during Pregnancy and Postpartum Period [J]. *Basic Clin Neurosci*, 2014, 5(2): 131-137.
- [7] Dorey R, Piérard C, Chauveau F, et al. Stress-Induced Memory Retrieval Impairments: Different Time-Course Involvement of Corticosterone and Glucocorticoid Receptors in Dorsal and Ventral Hippocampus [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2012, 37(13): 2870-2880.
- [8] Joao MN, Paula MA, Rui AC, et al. Caffeine consumption Prevents diabetes induced memory impairment and synaptotoxicity in the hippocampus of NONcZNO10/LTJ mice [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): 1-10.
- [9] Lang BT, Yan Y, Dempsey RJ, et al. Impaired neurogenesis in adult type-2 diabetic rats[J]. *Brain Res*, 2009, 1258: 25-33.
- [10] 王宇红,谭小雯,赵洪庆.左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马星形胶质细胞 GFAP、S100B 的影响[J].*时珍国医国药*,2015,26(8):1808-1811.
- [11] Tetsuya M, Hayato S, Eriko F, et al. Antidepressant-induced vascular dynamics in the hippocampus of adult mouse brain [J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 358(1): 43-55.
- [12] Toni N, Teng EM, Bushong EA, et al. Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus [J]. *Nature Neuroscience*, 2007, 10(6): 727-734.
- [13] 张丽虹,江沛,李焕德,等.癌症治疗对海马神经元生成的影响及其与认知功能和抑郁症间的关系[J].*中南药学*,2015,13(2):162-165.

(本文编辑 杨 瑛)