

• 基础研究 •

宁神灵冲剂和脱氢表雄酮对慢性轻度应激小鼠认知功能的影响

杨楠 高瑞丰 左萍萍*

[摘要] 目的 观察慢性轻度应激(CMS)小鼠模型的自发与认知行为变化,中枢胆碱能毒蕈碱型(M)受体的改变及中药宁神灵冲剂和脱氢表雄酮(DHEA)的干预作用。方法 连续 3 周对小鼠采用 7 种不可预知的应激原建立 CMS 模型,于应激 2 周后进行药物治疗 1 周。用自发运动和水迷宫评定行为改变,用放射性配基法测定皮层、海马、下丘脑和小脑的 M 受体改变。结果 未治疗的 CMS 小鼠自发运动明显减少,寻找平台潜伏期明显延长($P < 0.01$)。经服用宁神灵冲剂和 DHEA 后可有效改善上述行为变化。CMS 小鼠大脑皮层、海马的 M 受体特异性结合与对照组比较减少($P < 0.05$),经上述两种药物治疗后恢复至正常水平。结论 CMS 可使动物的自发运动减少,并使其空间学习记忆功能减退,该变化与脑内胆碱能受体活性低下有关。中药宁神灵治疗后与 DHEA 一样可有效改善上述变化。

[关键词] 慢性轻度应激(CMS);宁神灵;脱氢表雄酮(DHEA);M 胆碱能受体;自发运动;Morris 水迷宫;小鼠

Effect of Ningshen Ling and dehydroepiandrosterone on the cognitive function in mice subjected to chronic mild stress YANG Nan, GAO Rui-feng, ZUO Ping-Ping. Department of Pharmacology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

[Abstract] **Objective** To investigate the alteration of behavior, such as spontaneous movement, spatial memory ability and cholinergic M receptors in the brain of mice subjected to chronic mild stress (CMS). And to determine whether Ningshen Ling (NSL) and dehydroepiandrosterone (DHEA) could reverse the cognitive impairment in this model. **Methods** Forty mice were divided into four groups: control group, CMS group, CMS + NSL (p.o. $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) group and CMS + DHEA (i.p. $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) group. Morris water maze procedure was used to determine the spatial memory ability. M receptor binding activity was measured with radioactivity assay by ^3H -QNB. **Results** After 3 weeks CMS, the mice exerted a decrease in spontaneous movement test, and the latency in Morris water maze was obviously prolonged. Treating CMS mice with NSL and DHEA for 1 weeks could improve the spontaneous movement and latency declined. Whereas the ^3H -QNB binding ability to M receptor showed a significantly decrease in cerebral cortex and hippocampus of CMS mice ($P < 0.05$), the decreased ability of M receptor binding was reversed by NSL treatment in hippocampus ($P < 0.05$). **Conclusion** NSL and DHEA can alleviate the stress response and reversed cognitive impairment induced by CMS, and it may be concerned with the central cholinergic M receptors activity.

[Key words] chronic mild stress (CMS); Ningshen Ling (Chinese herbs); dehydroepiandrosterone (DHEA); central cholinergic M receptor; spontaneous movement; Morris water maze; mice

中图分类号:R749.1 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2004)05-0268-03

[本文著录格式] 杨楠,高瑞丰,左萍萍.宁神灵冲剂和脱氢表雄酮对慢性轻度应激小鼠认知功能的影响[J].中国康复理论与实践,2004,10(5):268-270.

长期处于难以适应的慢性应激状态所引起的情绪变化,可导致大脑皮层功能失调,引起体内多种系统功能紊乱。中药宁神灵冲剂是由柴胡、黄芩、大黄、半夏(制)、桂枝、甘草、龙骨和牡蛎等中药组成。临床主要功能为舒肝解郁、镇静安神,用于头昏头痛、心烦易怒、心悸不宁、胸闷少气、惊厥抽搐和少寐多梦,效果良好。近年,在哺乳动物实验中证实,补充脱氢表雄酮

(DHEA)具有增强记忆、抗焦虑、抗抑郁作用^[1]。本试验采用 7 种应激原经 3 周反复刺激造成的慢性轻度应激(chronic mild stress, CMS)模型,观察其行为和脑内某些受体的改变及上述两药的干预效果。

1 材料与方法

1.1 动物模型和给药 雄性昆明种小鼠,体重(20 ± 2)g,由军事医学科学院实验动物中心提供,4 只一笼饲养。饲养室温度(22 ± 2)℃,12 h 明暗轮换,自由饮食。宁神灵冲剂(NSL)由威海希波制药有限责任公司提供(批准文号:ZZ3515 国药准字 ZF20000149),为褐色颗粒,味酸、涩、微甘。动物随机分为 4 组,即对照组、CMS 组、CMS + NSL 组($5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、CMS + DHEA 组(i.p. $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) (sigma 产品)。对照组和 CMS 组灌服 0.3 ml 生理盐水。于应激刺激 2 周

基金项目:国家重点基础研究发展计划基金项目(No. 973. G2000057008)

作者单位:1. 100005 北京市,中国医学科学院基础医学研究所,中国协和医科大学基础医学院药理学(杨楠、左萍萍);2. 264200 山东威海市,希波制药有限责任公司(高瑞丰)。作者简介:杨楠(1976-),女,江西波阳市人,实习研究员,主要研究方向:神经药理学研究,*通讯作者:左萍萍。

后给药。除对照组外,其他动物每日给予应激刺激,持续 3 周。应激原有:每周各两次食物剥夺 12 h,饮水剥夺 14 h,居笼 45° 倾斜 12 h,彻夜光照(白色灯光,40 W),湿笼饲养 14 h,冰水游泳 3 min,电刺激(1 mA,刺激 1 s,间隔 29 s,连续 30 min)。上述应激原每日随机选取两种,使动物不能预料何种刺激发生。

1.2 行为学测定

1.2.1 自发活动测定 将自制直径 80 cm 圆形铝合金桶置于安静环境中,将小鼠置于同一出发点,连续观察 3 min 活动情况。圆桶上方通过数码摄像头与计算机相连,追踪小鼠的活动轨迹,并将其活动路程及范围记录在计算机中。

1.2.2 空间学习记忆实验 用 Morris 水迷宫(北京市吉日欧科技开发公司产品)测定小鼠的空间学习记忆能力。迷宫水温控制在 $(20 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,通过一摄像头跟踪小鼠的活动,电脑记录小鼠 2 min 内的行程、运动时间及平均运动速度,以寻找到站台的潜伏期的长短来评价空间学习记忆能力。实验在隔音的房间内进行,水池、光源、鼠笼等各种物件的位置在整个实验中保持不变。

1.3 毒蕈碱型(M)乙酰胆碱受体活性测定 于末次行为学测定后将小鼠断头处死,于冰上取出全脑,快速分离出大脑皮层、海马、下丘脑及小脑,置于液氮速冻后, -80°C 保存。实验时取上述组织加入 2 ml Tris-HCL 缓冲液(50 mmol/L, pH 7.4),高速分散器匀浆。于 12 000 g(4°C)离心 30 min。弃上清,再反复洗涤 2 次。沉淀(突触膜)于 -20°C 冻存。

受体测定:取磷酸缓冲液(PBS, 50 mmol/L, pH 7.4)稀释的突触膜 100 μl (调整蛋白浓度为 100—200 μg),加入 ^3H -QNB(喹宁环基联苯甲酸, M 受体拮抗剂, NEN 公司),终浓度为 0.5 nmol/L,非特异结合管中加入 0.1 mmol/L 阿托品,于 25°C 反应 60 min。用预冷的 PBS 5 ml 终止反应,抽滤在纤维素膜上,用 20 ml 冷 PBS 液洗涤。滤膜放入计数杯,加入甲苯闪烁液 5 ml,

于液闪计数器(西安 262 厂)上测定放射活性,特异性结合以每毫克蛋白结合 ^3H -QNB 的 f mol 数表示。

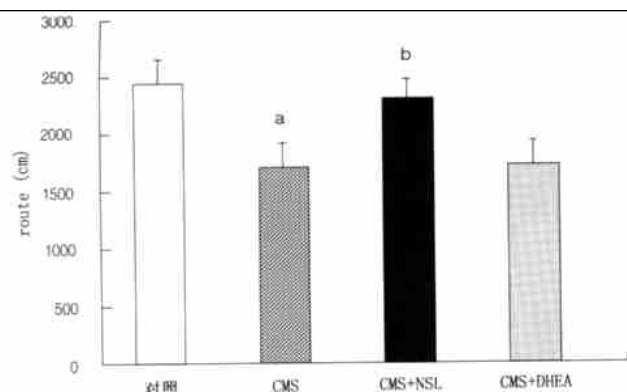
1.4 统计学处理 数据输入采用 SPSS 软件进行单因素方差分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 自发运动 CMS 组小鼠 3 min 内自发运动的路程轨迹与对照组比较下降 30%,两者有显著性差异($P < 0.01$)。CMS + NSL 组及 CMS + DHEA 组 3 周后,与 CMS 组比较,自发活动增加($P < 0.05$),与对照组间无统计学差异,见图 1。

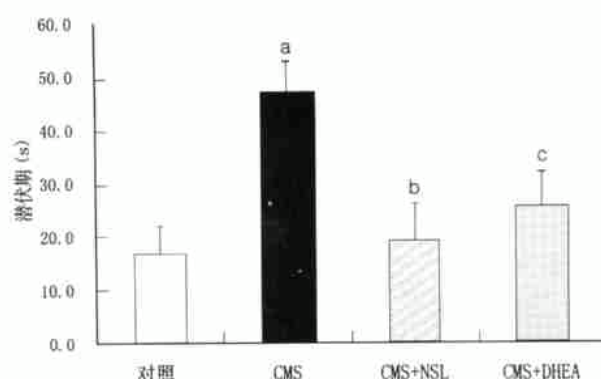
2.2 空间学习记忆实验 CMS 1 周后,各组小鼠寻找平台的潜伏期之间没有统计学差异。CMS 2 周后, CMS 组小鼠的潜伏期与对照组比较增加 102.5%,两者间有显著性差异($P < 0.05$)。CMS + NSL 组和 CMS + DHEA 组分别为 CMS 组的 55% 和 63.1%,潜伏期缩短但无显著性差异。CMS 3 周后, CMS 组小鼠潜伏期比对照组增加 177.5%,有非常显著性差异($P < 0.01$);而 CMS + NSL 组仅为 CMS 组的 40.7%,有非常显著性差异($P < 0.01$),CMS + DHEA 组为 CMS 组的 54.8%,也有显著性差异($P < 0.05$)。CMS + NSL 组、CMS + DHEA 组与对照组之间没有显著性差异。见图 2。

2.3 胆碱能 M 受体结合 CMS 组小鼠大脑皮层 ^3H -QNB 特异性结合与对照组比较下降 28.8%($P < 0.05$);经 NSL 和 DHEA 治疗后,特异性结合与对照组比较无显著性差异。CMS 组小鼠海马 ^3H -QNB 特异性结合与对照组比较下降 25.8%($P < 0.05$);经中药治疗后特异性结合提高($P < 0.05$),见表 1。CMS 组小鼠下丘脑和小脑的 ^3H -QNB 特异性结合与对照组比较分别下降了 28.7% 和 3.5%,但无统计学差异;经两药治疗后特异结合有一定升高,但无统计学差异(数据未显示)。



注:与对照组比较, a: $P < 0.01$; 与 CMS 组比较, b: $P < 0.05$ 。

图 1 各组小鼠自发运动的比较 ($n=10$)



注:与对照组比较, a: $P < 0.01$; 与 CMS 组比较, b: $P < 0.01$, c: $P < 0.05$ 。

图 2 各组小鼠寻找平台潜伏期的比较 ($n=10$)

表 1 各组小鼠大脑皮层和海马 M 受体特异性结合的比较

组别	大脑皮层	海马
对照组	147.72 ± 7.65	90.42 ± 4.87
CMS 组	105.12 ± 13.83 ^a	71.87 ± 2.73 ^a
CMS + NSL 组	129.20 ± 6.07	99.68 ± 9.45 ^b
CMS + DHEA 组	106.68 ± 8.78	78.55 ± 7.76

注:与对照组比较, a: $P < 0.05$; 与 CMS 组比较, b: $P < 0.05$ 。

3 讨论

迄今为止,用于抗抑郁药研究的动物模型有十几种,但多数采用单种刺激,如电击、断尾、水浸束缚等方法,这些较强烈的刺激不仅使动物难以承受,也与人类社会通常的身心应激状态不符。Willer 等提倡的较长时间给动物施加多种不同的中、轻度刺激,使之处于快感缺乏的抑郁状态,与人类的实际情况比较接近^[2]。本试验采用 7 种应激原经 3 周反复刺激后,发现动物的自发运动和空间学习记忆功能均显著下降,而经中药宁神灵冲剂和 DHEA 治疗后,动物可明显逆转上述变化。

抑郁症导致学习和记忆能力下降已被人们普遍接受,重度抑郁症患者脑海马锥体细胞数目明显下降,免疫系统功能紊乱^[3]。近年临床观察发现,中、重度抑郁症患者脑脊液中 DHEA 含量比正常人明显低下,而经 DHEA 治疗后症状明显改善^[4]。有人认为,DHEA 水平过低是导致精神疾患的一个重要因素^[5]。

从免疫学机制看,DHEA 在啮齿动物体内具有抗糖皮质激素作用,由于后者在机体应激过程中明显上升并直接损伤神经元功能,因此被认为是 DHEA 拮抗应激致认知功能下降的重要机理^[6]。此外, γ -氨基丁酸(GABA)作为中枢神经系统的抑制性递质,其受体激动剂亦可损毁记忆,而 DHEA 是 GABA-A 受体的拮抗剂,因此具有改善记忆的作用^[7]。

中药宁神灵冲剂所含成分柴胡、龙骨、牡蛎,据报道可治疗失眠和抑郁症型神经症^[8];此外,桂枝甘草

龙骨牡蛎汤对神经症也有很好疗效^[9]。本实验发现,动物在慢性轻度应激后,大脑皮层和海马两部位的胆碱能 M 受体结合活性明显下降。M 受体参与对运动机能、睡眠、攻击行为、学习记忆等调节过程^[9],由于在应激情况下海马会发生萎缩,因此,在本试验中 M 受体的变化与动物行为学结果是相符的。我们发现,给予宁神灵冲剂后能明显提高海马 M 受体的结合活性,效果优于 DHEA,初步显示其是通过加强胆碱能神经功能而起作用的。该方剂的更详细作用机理尚待进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Kroboth PD, Salek FS, Pittenger AL, et al. DHEA and DHEAS: a review[J]. J Clin Pharmacol, 1999, 39(4): 327 - 348.
- [2] Willner P, Muscat R, Papp M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression[J]. Neurosci Biobehav Rev, 1992, 16: 525 - 534.
- [3] Miller GE, Cohen S, Herbert TB. Pathways linking major depression and immunity in ambulatory female patients[J]. Psychosomatic Med, 1999, 61: 850 - 860.
- [4] Bloch M, Schmidt PJ, Danaceau MA, et al. Dehydroepiandrosterone treatment of midlife dysthymia[J]. Biol Psychiatry, 1999, 45: 1533 - 1541.
- [5] Murphy BE. Steroids and depression[J]. Steroid Biochem Mol Bio, 1991, 38: 537 - 559.
- [6] Baulieu EE, Thomas G, Legrain S, et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEA study to a sociobiomedical issue[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 4279 - 4284.
- [7] Majewska MD. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of GABA-A receptor. Mechanism of action and physiological significance[J]. Prog Neurobiol, 1992, 38: 379 - 395.
- [8] 陈威. 柴胡加龙骨牡蛎汤治疗郁症型神经官能症[J]. 陕西中医, 1984, 12: 41.
- [9] 丁世名. 桂枝甘草龙骨牡蛎汤治疗神经官能症 38 例[J]. 湖北中医杂志, 1983, 1: 11.

(收稿日期: 2004-04-05)