

健脑解郁方对脑小血管病并发抑郁症大鼠海马突触可塑性的影响

戴玲¹, 骆妍², 侯光菡³, 王乐², 李欢², 孟盼^{2*}

1. 湖南科技职业学院药学院, 湖南长沙 410200

2. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208

3. 长沙市第四医院, 湖南长沙 410200

摘要:目的 探讨健脑解郁方对脑小血管病并发抑郁症(cerebral small vessel disease related with depression, CSVDD)模型大鼠海马突触可塑性的干预作用及机制。方法 将40只SHR大鼠随机分为模型组、尼莫地平(21.6 mg/kg)+丁苯酞(54 mg/kg)+氟西汀(5.4 mg/kg)组和健脑解郁方高、中、低剂量(28.08、14.04、7.02 g/kg)组,每组8只,另取8只WKY大鼠作为对照组,大鼠背部sc D-半乳糖(400 mg/kg)8周联合双侧颈总动脉狭窄(bilateral common carotid artery stenosis, BCAS)4周及慢性不可预见性温和刺激(chronic unpredicted mild stress, CUMS)4周制备CSVDD模型。采用糖水偏好率实验、旷场实验、强迫游泳实验和水迷宫实验评价大鼠抑郁样行为;ELISA法检测大鼠血清中一氧化氮(nitric oxide, NO)、内皮素-1(endothelin-1, ET-1)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、谷氨酸(glutamate, Glu)、 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平;激光微循环血流成像观察脑血流量;苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠海马CA3区血管周围间隙情况;普鲁士蓝(LFB)染色观察大鼠脑白质胼胝体病理变化;TUNEL法检测大鼠海马CA3区神经元凋亡;免疫荧光法检测大鼠海马CA3区脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、突触素(synaptophysin, Syn)及突触后致密蛋白-95(post synaptic density-95, PSD-95)的表达。结果 与模型组比较,健脑解郁方组大鼠糖水偏好率显著升高($P<0.05$),自主活动显著增加($P<0.05$),游泳不动时间显著减少($P<0.05$),逃避潜伏期和目标的潜伏期显著缩短($P<0.05, 0.01$);脑血流量显著上升($P<0.05, 0.01$);血清中5-HT和GABA水平显著升高($P<0.05$),NO、ET-1、Glu、IL-6和TNF- α 水平显著降低($P<0.05, 0.01$);海马CA3区扩大的血管周围间隙数量减少,病理损伤明显减轻,胼胝体髓鞘损伤减轻;海马CA3区凋亡神经元数量显著减少($P<0.01$),BDNF、Syn和PSD-95表达显著升高($P<0.05, 0.01$)。结论 健脑解郁方可能通过促进海马突触可塑性,提升神经细胞营养供给,降低海马神经元凋亡,以此改善脑组织海马及白质区域病理损伤,调节神经内分泌指标的表达,改善CSVDD模型大鼠认知及情绪障碍。

关键词: 健脑解郁方; 脑小血管病并发抑郁症; 神经可塑性; 凋亡; 神经内分泌; 芍药苷; 地黄苷 A; 金丝桃素; 西红花苷 I; 莫诺苷

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)18-5968-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.18.015

Effect of Jiannao Jieyu Formula on hippocampal synaptic plasticity in rats with cerebral small vessel disease related with depression

DAI Ling¹, LUO Yan², HOU Guang-han³, WANG Le², LI Huan², MENG Pan²

1. School of Pharmacy, Hunan Vocational College of Science and Technology, Changsha 410200, China

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

3. The Forth Hospital of Changsha, Changsha 410200, China

Abstract: Objective To explore the intervention effect and mechanism of Jiannao Jieyu Formula (健脑解郁方) on hippocampal synaptic plasticity in rats with cerebral small vessel disease related with depression (CSVDD). **Methods** Forty SHR rats were divided

收稿日期: 2023-04-26

基金项目: 长沙市杰出创新青年培养计划项目(kq2009018); 湖南省教育厅科学研究项目(21C1190); 湖南省中医药科研课题(B2023021); 长沙市自然科学基金资助项目(kq2208471); 湖南省自然科学基金部门联合项目(2023JJ60213)

作者简介: 戴玲(1988—),女,硕士,讲师,主要从事中药药理活性及中药化学成分研究。Tel: 15874954751 E-mail: dailing-1988@163.com

*通信作者: 孟盼,女,博士,副研究员,主要从事神经精神疾病的机制研究及防治。E-mail: 403642392@qq.com

into model group, nimodipine (21.6 mg/kg) + butylphthalide (54 mg/kg) + flouxetine (5.4 mg/kg) group, Jiannao Jieyu Formula high-, medium-, low-dose (28.08, 14.04, 7.02 g/kg) groups, with eight rats in each group, and eight WKY rats were taken as control group. The rats were sc *D*-galactose (400 mg/kg) on backs for eight weeks, combined with bilateral common carotid stenosis (BCAS) for four weeks and chronic unpredicted mild stress (CUMS) for four weeks to establish CSVDD model. The depression-like behavior of rats was evaluated by sugar water preference rate test, open field test, forced swimming test and water maze test; ELISA was used to detect nitric oxide (NO), endothelin-1 (ET-1), 5-hydroxytryptamine (5-HT), glutamate (Glu), γ -aminobutyric acid (GABA), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels in serum of rats; Cerebral blood flow was observed by laser microcirculation blood flow imaging instrument; Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the perivascular space in CA3 area of hippocampus; The pathological changes of corpus callosum in white matter of rats were observed by Prussian blue (LFB) staining; TUNEL method was used to detect neuronal apoptosis in CA3 region of hippocampus; Immunofluorescence method was used to detect the expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), synaptophysin (Syn) and post synaptic density-95 (PSD-95) in CA3 region of hippocampus.

Results Compared with model group, preference rate of sugar water in Jiannao Jieyu Formula group was significantly increased ($P < 0.05$), autonomous activity was significantly increased ($P < 0.05$), swimming immobility time was significantly reduced ($P < 0.05$), and the escape latency and target quadrant latency were significantly shortened ($P < 0.05, 0.01$). Cerebral blood flow was significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). The levels of 5-HT and GABA in serum were significantly increased ($P < 0.05$), while the levels of NO, ET-1, Glu, IL-6 and TNF- α were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). The number of enlarged perivascular spaces in CA3 area of hippocampus was decreased, pathological damage and myelin sheath damage of corpus callosum were decreased. The number of apoptotic neurons in hippocampal CA3 area was significantly decreased ($P < 0.01$), and the expressions of BDNF, Syn and PSD-95 were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Jiannao Jieyu Formula may improve the pathological damage in hippocampus and white matter area of brain tissue, regulate the expression of neuroendocrine indicators, and improve the cognitive and emotional disorders of CSVDD model rats by promoting the synaptic plasticity of the hippocampus, enhancing the nutrition supply of nerve cells, and reducing the apoptosis of hippocampal neurons.

Key words: Jiannao Jieyu Formula; cerebral small vessel disease related with depression; neuroplasticity; apoptosis; neuroendocrine; paeoniflorin; rehmannioside A; hypericin; crocin I; morroniside

脑小血管病 (cerebral small vessel disease, CSVD) 是由颅内微小血管的动态弥漫性病变所致的脑微血管疾病, 在中老年人群中发病率超过 70%^[1], 具有高隐匿性、高发病率、高致残率等特点^[2]。脑小血管病并发抑郁症 (cerebral small vessel disease related with depression, CSVDD) 在 CSVD 患者中的发病率为 0.9%~42%^[3], 跨度范围大且逐年增加^[4]。“血管性抑郁症”假说提出 CSVD 是抑郁症的重要病因^[5], CSVDD 将成为脑病领域的一大挑战, 其潜在的发病机制仍然存在争议^[6]。

突触可塑性包含感知、评估、存储复杂信息及对相关刺激做出适应性反应的能力, 是大脑最基本和最重要的功能之一^[7]。CSVDD 发生后, 患者神经功能障碍可能与突触可塑性的降低密切相关。磁共振成像显示, CSVD 诱发的认知障碍患者出现不同程度的海马亚区萎缩^[8], 海马萎缩表现为海马神经元突触数目减少、功能受损及神经元固缩丧失。因此推测海马突触功能可塑性是 CSVDD 后神经功能恢复的关键, 也是改善 CSVD 患者预后的重点。

课题组基于脑小血管病并发抑郁症“虚、瘀、

郁”的中医病机特点, 立补肾健脾、活血通络、疏肝解郁的治法, 创健脑解郁方。该方以固元健脑方合百事乐方加减而成。其中, 固元健脑方是课题组筛选的临床经验方, 而百事乐方是课题组研发的具有独立知识产权的抗抑郁中药复方 (专利号 CN101816766A)。本研究通过构建 CSVDD 大鼠模型, 以海马突触可塑性为切入点, 探讨健脑解郁方是否可通过调控海马 CA3 区域突触可塑性从而发挥对 CSVDD 大鼠神经元的保护功能, 改善神经功能障碍。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 14 周龄 SHR 大鼠 40 只、SPF 级雄性 14 周龄 WKY 大鼠 8 只, 均由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物许可证为 SCXK (京) 2021-0006。动物饲养于湖南中医药大学实验动物中心 [SYXK (湘) 2019-0009], 室温 (25±2)℃, 光暗周期 12 h/12 h, 相对湿度 (50±5)%, 适应性喂养 5 d, 自由进食饮水。动物实验经湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 LLBH-

202011090001)。

1.2 药材

健脑解郁方由熟地黄 15 g、白芍 10 g、西红花 5 g、山茱萸 6 g、山药 10 g、石菖蒲 10 g、姜黄 10 g、贯叶连翘 5 g、炙甘草 5 g 等组成,以上药材均购自北京同仁堂,经湖南中医药大学第一附属医院中药房张志国教授分别鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch.的块根经加工蒸晒而成、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.的干燥根、鸢尾科植物番红花 *Crocus sativus* L.的干燥柱头、山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.的干燥成熟果肉、天南星科植物石菖蒲 *Acorus tatarinowii* Schott 的干燥根茎、姜科植物姜黄 *Curcuma longa* L.的干燥根茎、藤黄科植物贯叶连翘 *Hypericum perforatum* L.的全草、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.的干燥根和根茎经炮制加工而成。课题组采用 LC-MS/MS 法对健脑解郁方的成分进行分析,共鉴定出 36 种化合物,并对其中 5 种主要成分进行了定量分析,含芍药苷 1.98 mg/g、地黄苷 A 0.24 mg/g、金丝桃素 2.6 mg/g、西红花苷 I 8.57 mg/g、莫诺苷 0.36 mg/g。

1.3 药品与试剂

尼莫地平(批号 H14022821)购自亚宝药业集团股份有限公司;丁苯酞(批号 H20050299)购自石药集团恩必普药业有限公司;氟西汀(批号 2019024)购自礼来(苏州)制药有限公司;D-半乳糖(批号 V900922)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;突触后致密蛋白 95 (post synaptic density 95, PSD95) 抗体(批号 20665-1-AP)、突触素(synaptophysin, Syn) 抗体(批号 67864-1-Ig)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 抗体(批号 28205-1-AP)、山羊抗小鼠 488 抗体(批号 SA00013-1)、购自美国 Proteintech 公司;山羊抗兔 488 抗体(批号 GB25303)、髓鞘染色液试剂盒(批号 G1030)购自 Servicebio 公司;山羊抗兔 594 抗体(批号 ab150080)购自英国 Abcam 公司;一氧化氮(nitric oxide, NO) 试剂盒(批号 S0021S)购自上海碧云天公司;内皮素-1(endothelin-1, ET-1)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、谷氨酸(glutamate, Glu)、 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 试剂盒(批号分

别为 E-EL-R1458c、E-BC-K020-M、E-BC-K096-M、E-BC-K025-M、E-EL-R0362c、E-EL-R2536c) 购自武汉 Elabscience 公司。

1.4 仪器

MK3 型多功能酶标仪、HM430 型生物组织切片机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);BM-I 型生物组织包埋机(湖北孝感宏业医用仪器有限公司);Stemi 508 型光学显微镜、LSM900 型激光共聚焦显微镜(德国 ZEISS 公司);Pannoramic MIDI 数字玻片扫描系统(匈牙利 3DHISTECH 公司);FLPI-2 型激光微循环血流成像仪(英国 Moor 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

SHR 大鼠背部 sc D-半乳糖(400 mg/kg)连续 8 周联合双侧颈总动脉狭窄(bilateral common carotid artery stenosis, BCAS)4 周,进而采用慢性不可预见性温和应激加孤笼饲养,建立 CSVDD 大鼠模型。大鼠 ip 10%水合氯醛(3.5 mg/kg)麻醉,仰卧固定于木板上,采用脱毛膏脱去颈部毛发裸露出皮肤,乙醇消毒,颈腹正中切口暴露双侧颈总动脉,小心地将其与迷走神经分离,在内外颈动脉分叉前 1 cm 处,将直径 0.45 mm 注射器针头扎在双侧颈总动脉上,在确保活结牢固固定后,小心拔出针头,保证血管内有一定血流量通过,BCAS 成功后,喷洒青霉素并缝合伤口消毒^[9]。将 CSVDD 成模大鼠随机分为模型组、尼莫地平(21.6 mg/kg)+丁苯酞(54 mg/kg)+氟西汀(5.4 mg/kg)组和健脑解郁方高、中、低剂量(28.08、14.04、7.02 g/kg,分别相当于临床剂量的 2、1、0.5 倍)组,每组 8 只,另取 WKY 大鼠背部 sc 0.9%生理盐水作为对照组。

采用慢性不可预见性温和刺激(chronic unpredicted mild stress, CUMS)加孤笼饲养进一步建立 CSVDD 大鼠模型,慢性应激的方法包括:①禁食 24 h;②禁水 24 h;③潮湿垫料 24 h;④夹尾 2 min;⑤昼夜颠倒 24 h;⑥噪音 4 h;⑦50 V 电击 3 min;⑧4 °C 冰水浴 3 min,每天随机安排 1~2 种刺激,同种刺激 3 d 内不重复出现,电击和夹尾刺激每周限 1 次,共 21 d。各组大鼠于 CUMS 造模期间同时 ig 给药(10 mL/kg),对照组和模型组 ig 等体积的蒸馏水,1 次/d,连续 21 d 后,进行行为学检测,并立即取材。

2.2 行为学检测

2.2.1 糖水偏好实验 实验开始前,将大鼠进行分笼,每只大鼠给予2个规格和外观相同的水瓶,第1天为2瓶1%纯净水,第2天为1瓶1%蔗糖水及1瓶纯净水,第3天交换2个水瓶的位置,训练时间持续24 h。适应结束后,禁食禁水24 h,提前称定并记录1%蔗糖与纯净水含量,2 h后交换水瓶位置,检测结束记录剩余的蔗糖水与纯净水,计算糖水偏好率。

糖水偏好率=蔗糖水消耗量/(蔗糖水消耗量+纯净水消耗量)

2.2.2 旷场实验 旷场实验主要是用来观察动物的自主活动行为和探究行为,将大鼠从同一位置放入规格为50 cm×50 cm×50 cm、底板和四壁均为蓝色且底部划为25个小格的清洁敞箱内,适应30 s后,记录大鼠3 min内的水平运动次数(四爪均在格内)和垂直站立次数(两前爪抬起)。每次测试后,用酒精棉擦拭敞箱的内壁和底部,避免气味相互干扰下一只大鼠的测试,实验过程中保持房间内光线一致且安静。

2.2.3 强迫游泳实验 将大鼠放入25 cm×30 cm的圆筒中,圆筒中水的高度以大鼠伸展全身而后足不触碰圆筒底部,且大鼠不能跳出圆筒为准。大鼠放入圆筒后,先适应性游泳30 s,而后观察并记录3 min内大鼠在水中保持漂浮状态、四肢不动的禁止不动时间。实验中注意保证同期实验大鼠之间不可见,以减少干扰。

2.3 Morris水迷宫实验

造模结束后,对各组大鼠进行水迷宫学习训练。从同一位置将大鼠面壁放入水中,若60 s内未找到平台,则牵引至平台停留30 s,训练4 d。用以训练其找到水下平台(实验中平台的位置始终保持不变)。第5天时,将大鼠从适应期同一位置放入水中,记录其找到水下平台的时间,记为逃避潜伏期。第6天时,撤离水下平台,将大鼠放入水中,记录其在原平台所在目标象限中的游泳时间。实验期间需要保持室内安静,物品放置及灯光状态一致,水温(24±1)℃。

2.4 血清中NO、ET-1、5-HT、Glu、GABA、IL-6和TNF- α 水平的测定

大鼠麻醉后,腹主动脉采集血液,3000 r/min离心15 min后取上清。按照试剂盒说明书检测各组大鼠血清中NO、ET-1、5-HT、Glu、GABA、IL-6和

TNF- α 水平。

2.5 激光斑点对比成像检测脑血流量

大鼠ip 10%水合氯醛(3.5 mg/kg)麻醉,将其头部固定于脑立体定位仪上。去除头皮、皮下结缔组织和骨膜,乙醇消毒,随后使用牙钻将颅骨轻轻磨薄,直到显示出内部致密的椎板,硬膜外血管和软脑膜血管清晰可见,在此过程中使用生理盐水时刻保持颅骨湿润。通过激光微循环血流成像仪检测脑血流量。

2.6 苏木素-伊红(HE)染色检测脑组织病理变化

取4%多聚甲醛固定的脑组织,石蜡包埋,切片(厚4 μ m)后进行染色。脱蜡、复水、苏木素染色、盐酸乙醇分化、伊红复染、无水乙醇脱水、二甲苯透明,中性树胶封片。玻片晾干后,显微镜下观察各组大鼠脑组织病理变化。

2.7 普鲁士蓝(LFB)染色检测脑组织髓鞘损伤情况

取脑组织石蜡切片(厚4 μ m),根据髓鞘染液试剂盒说明书进行操作。脱蜡、水化、染色、分化、脱水、透明,中性树胶封片。玻片晾干后,显微镜下观察各组大鼠脑组织髓鞘损伤情况。

2.8 TUNEL染色检测海马组织细胞凋亡情况

取各组大鼠脑组织,4%多聚甲醛固定30 min,0.25% TritonX-100处理10 min,3% H₂O₂作用2 min,PBS洗涤3次;加入TUNEL工作液,37℃避光孵育1 h;弃去液体,PBS洗涤3次,加入DAPI工作液,室温避光孵育15 min,于激光共聚焦显微镜下观察各组海马组织凋亡情况。

2.9 免疫荧光法检测海马CA3区中BDNF、Syn和PSD-95蛋白表达

取各组大鼠左侧大脑,多聚甲醛固定后进行石蜡包埋并切片,随后脱蜡和梯度乙醇脱水,以免疫组化笔圈出组织并进行抗原修复,然后用PBS漂洗3次,每次5 min。再用10%牛血清白蛋白封闭30 min,甩掉封闭液,随后分别在组织上滴加BDNF、Syn、PSD-95抗体,于湿盒内4℃过夜。第2天,取出玻片并于室温平衡10 min,随后用PBS漂洗4次,每次5 min。轻甩PBS,在组织上滴加二抗,室温避光孵育1 h。PBS漂洗4次,每次5 min。甩掉PBS,DAPI复染细胞核10 min,再用PBS漂洗3次,每次5 min。随后用抗荧光猝灭剂进行封片,并于荧光显微镜下观察和采集图像,分析海马CA3区中BDNF、Syn及PSD-95的荧光强度。

2.10 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD 和 Dunnett 法, 图表制作采用 GraphPad Prism 8.4.0 软件完成。

3 结果

3.1 健脑解郁方对 CSVDD 大鼠抑郁样行为的影响

3.1.1 各组大鼠糖水偏好率 如图 1 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠糖水偏好率显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 健脑解郁方高、中剂量组大鼠糖水偏好率均明显升高 ($P < 0.05$), 提示 CSVDD 大鼠存在明显的快感缺乏症状, 而健脑解郁方可显著提高 CSVDD 模型大鼠对快感的反应, 缓解其抑郁症状。

3.1.2 各组大鼠自主活动情况 如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠 4 min 内的水平和垂直活动均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 自主活动能力降低; 与模型组比较, 尼莫地平+丁苯酞+氟西汀组和健脑解郁方高剂量组大鼠的水平和垂直活动均明显增加 ($P < 0.05$)。

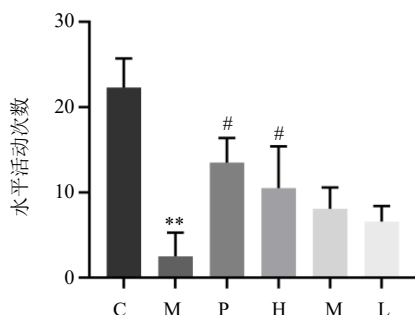
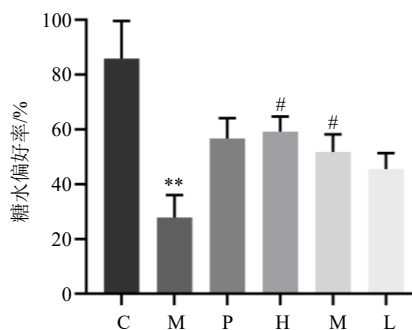


图 2 健脑解郁方对 CSVDD 大鼠自主活动的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effect of Jiannao Jieyu Formula on autonomous activity of CSVDD rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.1.3 各组大鼠游泳不动时间 如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠游泳不动时间明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 尼莫地平+丁苯酞+氟西汀组和健脑解郁方高剂量组大鼠游泳不动时间均显著降低 ($P < 0.05$)。

3.1.4 各组大鼠学习和记忆能力 如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠逃避潜伏期和目標象限潜伏期均明显延长 ($P < 0.05$ 、 0.01), 提示大鼠的学习和记忆能力下降且认知功能发生障碍; 与模型组比较, 尼莫地平+丁苯酞+氟西汀组和健脑解郁方高、中剂量组大鼠逃避潜伏期和目標象限潜伏期均显著缩短 ($P < 0.05$ 、 0.01)。



C-对照组 M-模型组 P-尼莫地平+丁苯酞+氟西汀组 L-健脑解郁方低剂量组 M-健脑解郁方中剂量组 H-健脑解郁方高剂量组 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 下图同
C-control group M-model group P-nimodipine + butylphthalide + flouxetine group L-Jiannao Jieyu Formula low-dose group M-Jiannao Jieyu Formula medium-dose group H-Jiannao Jieyu Formula high-dose group * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group, same as below figures

图 1 健脑解郁方对 CSVDD 大鼠糖水偏好率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effect of Jiannao Jieyu Formula on sugar water preference rate of CSVDD rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

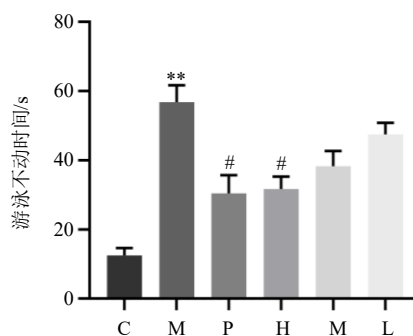
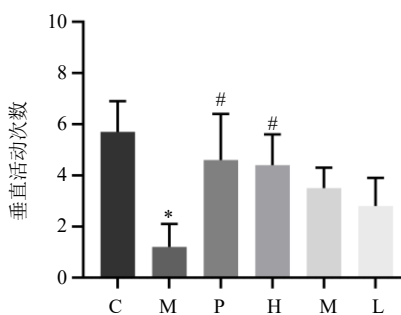


图 3 健脑解郁方对 CSVDD 大鼠游泳不动时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Effect of Jiannao Jieyu Formula on swimming immobility time of CSVDD rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

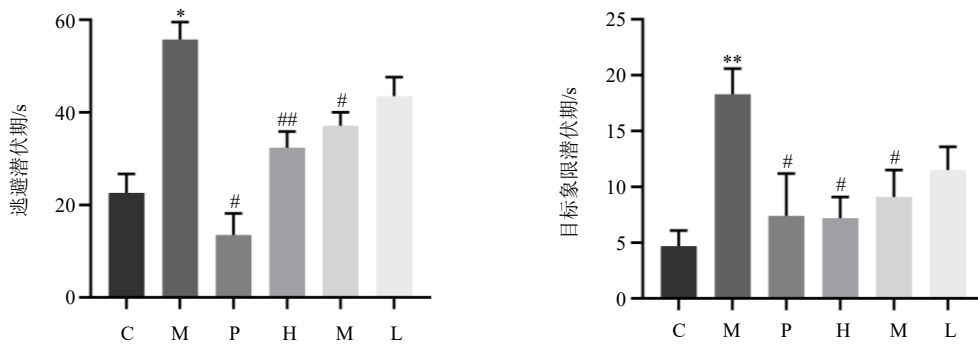


图4 健脑解郁方对 CSVDD 大鼠学习和记忆能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 4 Effect of Jiannao Jieyu Formula on learning and memory abilities of CSVDD rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.2 健脑解郁方对 CSVDD 大鼠血管舒缩功能的影响

如图5所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中NO水平显著下降 ($P < 0.01$), ET-1水平显著上升 ($P < 0.01$);与模型组比较,尼莫地平+丁苯酞+氟西汀组和健脑解郁方高、中剂量组血清中NO和

ET-1水平均明显改善 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.3 健脑解郁方对 CSVDD 大鼠脑血流量的影响

如图6所示,第5周(BCAS造模后1周)检测大鼠脑血流量,与对照组比较,其余各组大鼠脑血流量均显著降低 ($P < 0.01$)。给予药物干预后,

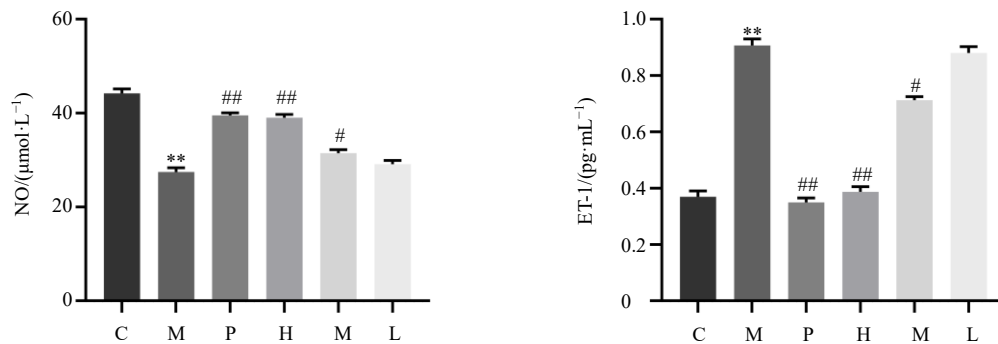


图5 健脑解郁方对 CSVDD 大鼠血清中NO和ET-1水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of Jiannao Jieyu Formula on NO and ET-1 levels in serum of CSVDD rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

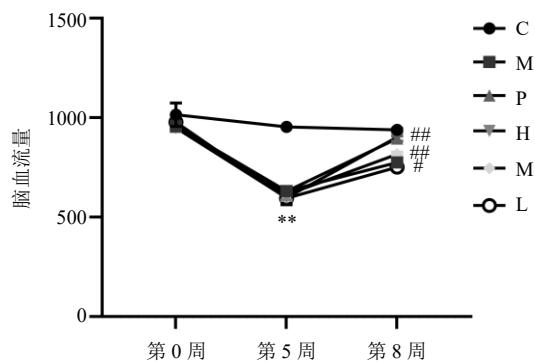


图6 健脑解郁方对 CSVDD 大鼠脑血流量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of Jiannao Jieyu Formula on cerebral blood flow of CSVDD rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

与模型组比较,尼莫地平+丁苯酞组和健脑解郁方高、中剂量组大鼠脑血流量均显著上升 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.4 健脑解郁方对 CSVDD 大鼠血清中神经递质水平的影响

如图7所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中5-HT和GABA水平显著下降 ($P < 0.05, 0.01$), Glu水平显著上升 ($P < 0.01$);与模型组比较,尼莫地平+丁苯酞+氟西汀组和健脑解郁方高剂量组血清中GABA水平显著上升 ($P < 0.05$),尼莫地平+丁苯酞+氟西汀组和健脑解郁方高、中剂量组血清中5-HT水平显著上升 ($P < 0.05$), Glu水平明显下降 ($P < 0.05$)。

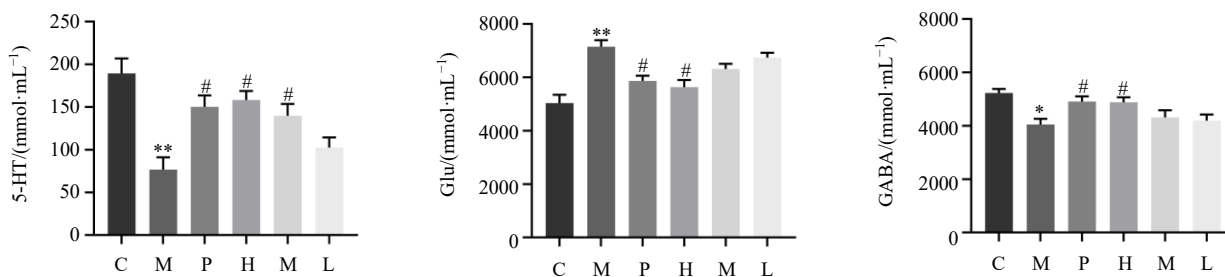


图7 健脑解郁方对 CSVDD 大鼠血清中 5-HT、Glu 和 GABA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 7 Effect of Jiannao Jieyu Formula on 5-HT, Glu and GABA levels in serum of CSVDD rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.5 健脑解郁方对 CSVDD 大鼠血清中炎症因子水平的影响

如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组血清中 IL-6 和 TNF- α 水平显著上升 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 尼莫地平+丁苯酞+氟西汀组和健脑解郁方高剂量组 IL-6、TNF- α 水平显著下降 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.6 健脑解郁方对 CSVDD 大鼠海马 CA3 区病理变化的影响

如图 9 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠海马 CA3 区可见明显的血管周围间隙扩张, 表现为椭圆形或圆形, 主要环绕于血管周围, 有较多丝状物附着, 具有透明腔隙; 与模型组比较, 尼莫地平+丁苯酞+氟西汀组和健脑解郁方高剂量组海马 CA3 区血管周围间隙扩张情况有所改善, 数量减少, 无

明显丝状物附着。

3.7 健脑解郁方对 CSVDD 大鼠海马胼胝体区髓鞘结构变化的影响

如图 10 所示, 对照组大鼠胼胝体内包含致密的深蓝色丝状物延伸, 髓鞘蓝染清晰, 无脱髓鞘改变; 模型组胼胝体大面积呈浅蓝色, 髓鞘着色少而浅, 纤维纹理不清, 排列疏松, 结构紊乱变形, 呈空泡或空网状改变; 尼莫地平+丁苯酞+氟西汀组和健脑解郁方高剂量组胼胝体染色程度及髓鞘结构有所恢复, 板层清晰, 结构致密, 形态完整。

3.8 健脑解郁方对 CSVDD 大鼠海马 CA3 区神经元凋亡的影响

如图 11 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠海马 CA3 区 TUNEL 阳性细胞数量明显增多 ($P < 0.01$),

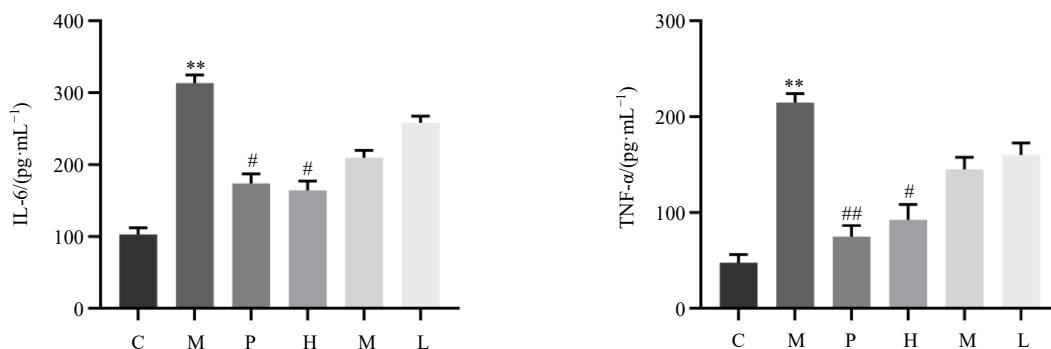


图8 健脑解郁方对 CSVDD 大鼠血清中 IL-6 和 TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 8 Effect of Jiannao Jieyu Formula on IL-6 and TNF- α levels in serum of CSVDD rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

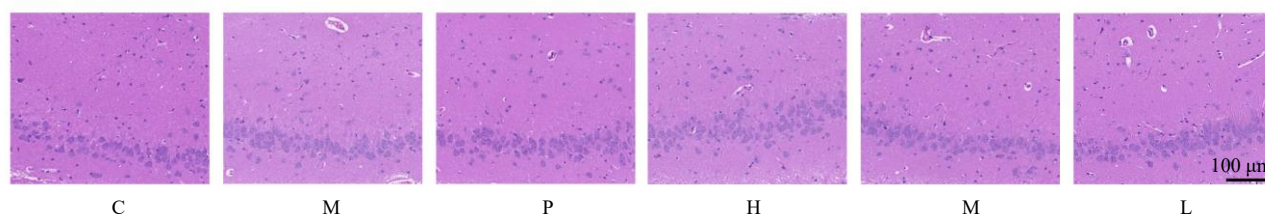


图9 各组大鼠海马 CA3 区病理变化 (HE, $\times 20$)

Fig. 9 Pathological changes in hippocampal CA3 region of rats in each group (HE, $\times 20$)

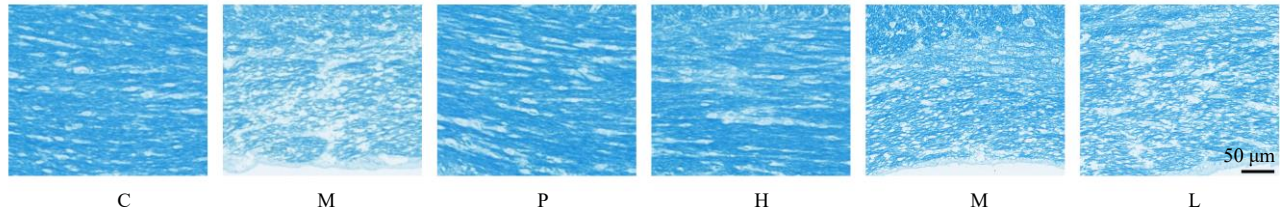


图 10 各组大鼠胼胝体区髓鞘结构变化 (LFB, ×40)

Fig. 10 Changes of myelin sheath structure in corpus callosum area of rats in each group (LFB, ×40)

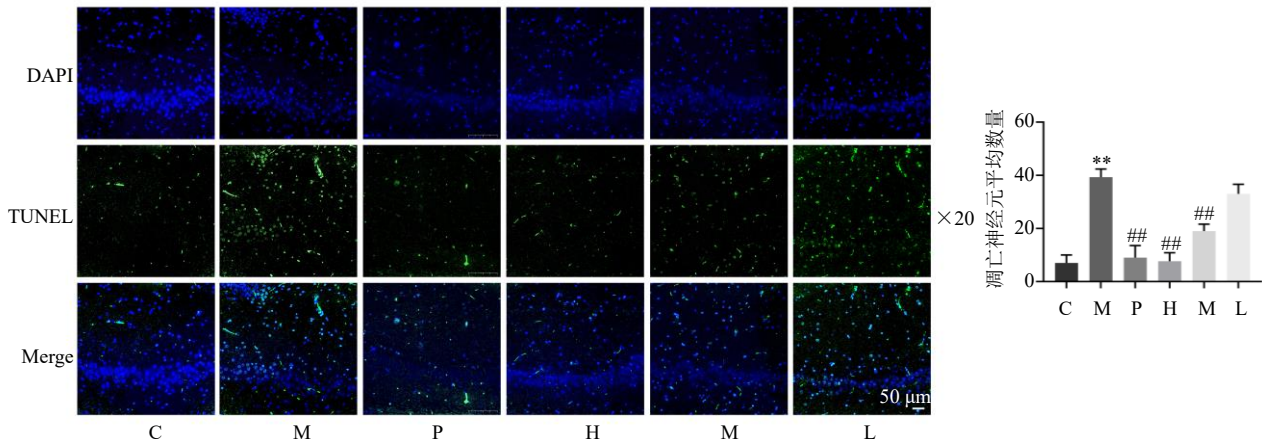


图 11 各组大鼠海马 CA3 区神经元凋亡情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Apoptosis of hippocampal CA3 neurons in each group of rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

呈染色质浓染的典型凋亡特征；与模型组比较，尼莫地平+丁苯酞+氟西汀组和健脑解郁方高、中剂量组海马 CA3 区 TUNEL 阳性细胞数量显著下降 ($P < 0.01$)。

3.9 健脑解郁方对 CSVDD 大鼠海马 CA3 区 BDNF 表达的影响

如图 12 所示，与对照组比较，模型组大鼠海马 CA3 区 BDNF 表达显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药组海马 CA3 区 BDNF 表达均显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.10 健脑解郁方对 CSVDD 大鼠海马 CA3 区 Syn 和 PSD-95 表达的影响

如图 13 所示，与对照组比较，模型组大鼠海马 CA3 区 Syn 和 PSD-95 阳性表达均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)；与模型组比较，尼莫地平+丁苯酞+氟西汀组和健脑解郁方高剂量组大鼠海马 CA3 区 PSD-95 阳性表达显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)，尼莫地平+丁苯酞+氟西汀组和健脑解郁方高、中剂量组大鼠海马 CA3 区 Syn 阳性表达显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)。

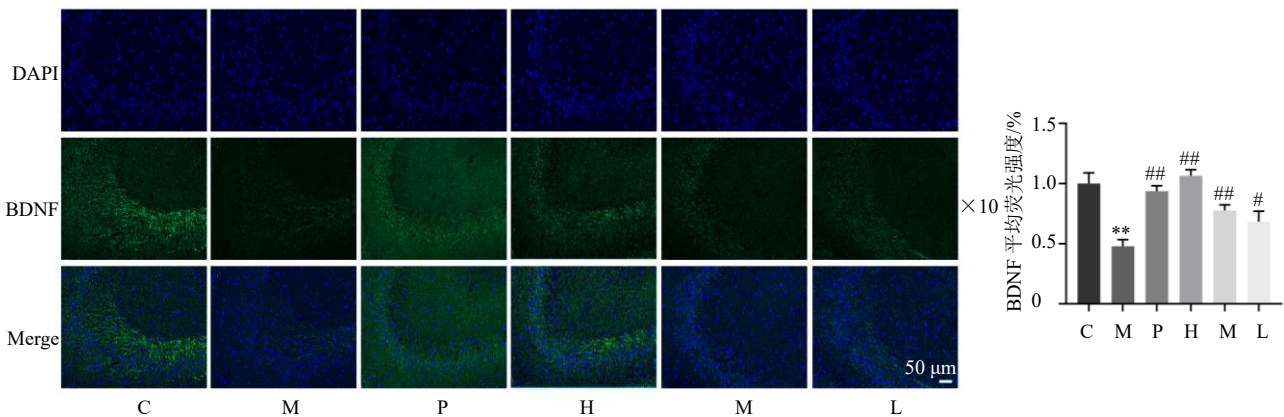


图 12 各组大鼠海马 CA3 区 BDNF 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 12 BDNF expression in hippocampal CA3 region of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

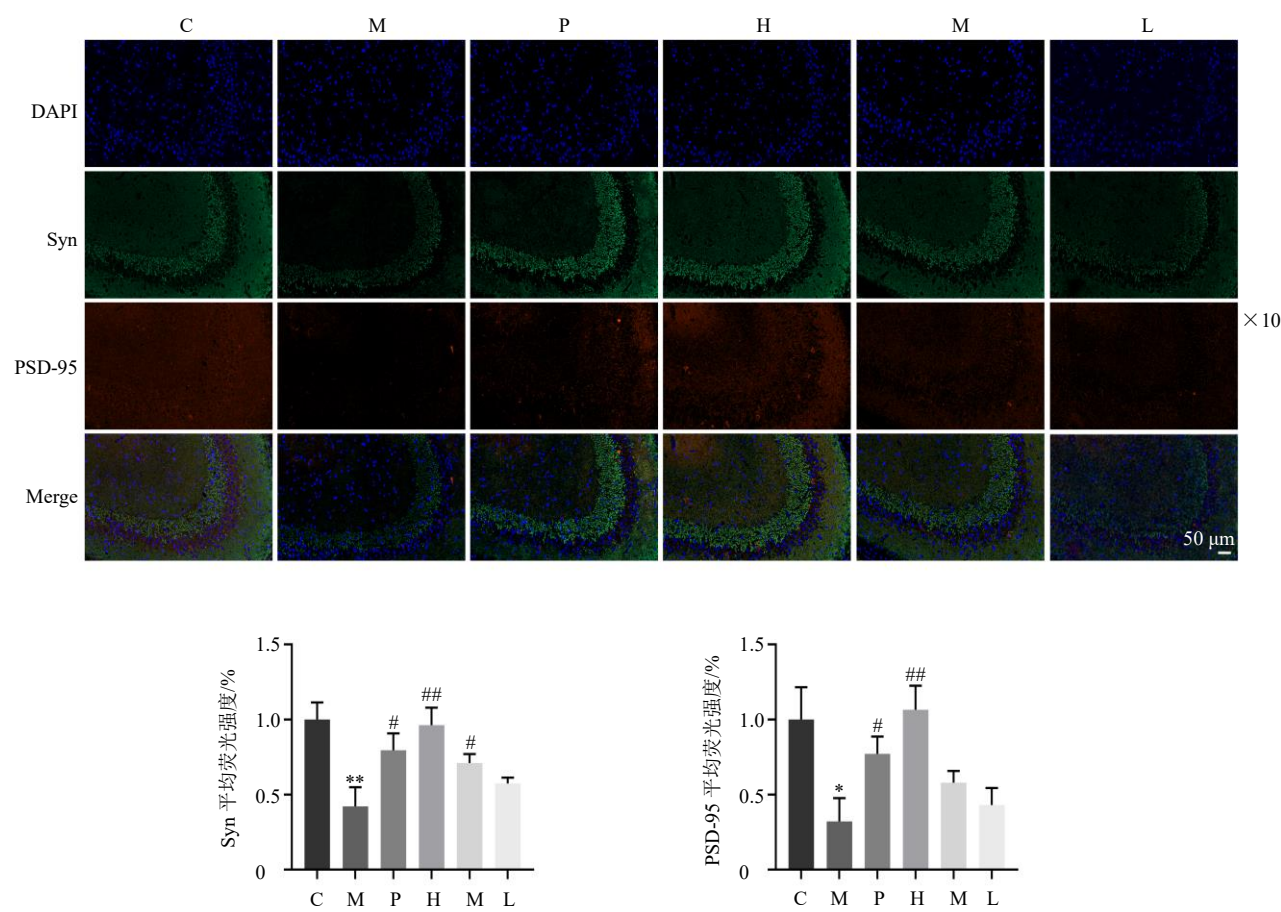


图 13 各组大鼠海马 CA3 区 Syn 和 PSD-95 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 13 Expressions of Syn and PSD-95 in hippocampal CA3 region of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

根据临床表现, CSVD 可归属于中医“中风”“痴呆”“颤证”“眩晕”等的范畴, 抑郁症归属于中医“郁证”的范畴。CSVD 病位在脑, 与肾、肝、脾密切相关, 乃本虚标实之证。CSVD 与抑郁症互为因果, 相兼为病。CSVD 的基本病机可用“虚、瘀、郁”概括, 治疗当以“补肾健脾、理气活血、化痰通络、疏肝解郁”为法。本研究所采用的健脑解郁方由固元健脑方和百事乐方加减而成, 方中熟地黄滋阴补肾、益精填髓, 用以为君。臣以山茱萸补益肝肾, 助君药补肾固本; 山药脾肾双补; 石菖蒲开窍豁痰、醒神益智; 西红花活血化痰; 姜黄活血行气, 主治血瘀气滞诸证。佐以贯叶连翘活血解郁; 白芍养血柔肝、平抑肝阳; 炙甘草调和诸药, 用以为使。全方共奏补肾健脾、理气活血、化痰通络、疏肝解郁之功效。

CSVD 是指由于各种病因影响脑内小动脉、微动脉、毛细血管、微静脉和小静脉所导致的一系列临床、影像、神经病理综合征。主要表现为近期皮

质下小梗死、腔隙性梗死、白质高信号、血管周围间隙、微出血和脑萎缩等^[10], 其诱发的认知障碍、情绪和活动主动性减少等抑郁症状极大地降低了 CSVD 患者的生存质量及治疗效果^[11]。高血压是导致颅内小动脉和小静脉管壁增厚的主要因素, 引起脑内低灌注, 进而形成 CSVD, 同时会增大认知功能损害的风险^[12]。研究表明, CSVD 发病率与年龄呈正相关, 多发于 60 岁以上人群^[1]。其中, 67.92% 的老年 CSVD 认知障碍患者患有长期高血压^[13]。研究表明, 低灌注会导致脑白质病变, 是由深穿支动脉损害引起的慢性缺血。BCAS 可在一定程度上减少脑血流, 并在颈总动脉及其分支中保持残余血流量^[14]。由此可见, 高血压、衰老及低灌注模型三者联合作用导致疾病的发生。因此, 复合动物模型比单一的躯体应激或药物刺激更能模拟 CSVD 的临床表征。由于 CSVD 的发病机制尚不明晰, 更进一步滞后了该疾病的早期预防与诊断。既往研究表明, 采用不对称颈总动脉手术创建的 CSVD 小鼠模型会引发海马神经元萎缩及核固缩^[15]。脑损伤会导致突

触密度降低, 神经元结构破坏, 神经环路传递信息受损, 最终导致神经功能损伤^[16]。本研究采用 *D*-半乳糖 (400 mg/kg, 8周) 联合 BCAS (4周) 及 CUMS (4周) 制备 CSVDD 大鼠模型, 根据行为学评估结果, CSVDD 大鼠糖水偏好率和自发活动行为减少, 静止不动时间增加, 逃避潜伏期和目标的潜伏期明显延长, 表现出明显的认知障碍及情绪低落, 而给予高剂量的健脑解郁方治疗则可显著改善模型大鼠认知及情绪障碍。

NO 是大脑血管内的神经活性物质, 可在不同程度上调节血管张力并辅助细胞间的信息传递^[17]。ET-1 是一种血管收缩肽和血流调节因子, 与血管内皮功能有关, 研究证实血管内皮功能紊乱是引起脑小血管损伤的重要启动因子。脑缺血缺氧时, 炎症因子释放激活血管内皮损伤, 导致 ET-1 释放增加, 诱导脑白质损伤, 损伤神经纤维网, 引发认知功能损伤^[18]。研究表明, CSVD 大鼠小动脉中血流量及红细胞流速均显著降低^[19]。本研究结果显示, 模型组大鼠血清中 NO 水平显著下降, ET-1 水平显著上升, 而尼莫地平+丁苯酞+氟西汀组和健脑解郁方高、中剂量组 NO 水平显著上升, ET-1 水平明显下降。提示该方可通过调节血管舒缩功能及脑血流量来改善大鼠的抑郁状态。

动物的体内含有多种神经递质, 单胺类神经递质 5-HT 含量是评估抑郁模型的关键指标^[20]。大脑中大部分突触是以 Glu 为递质的兴奋性突触, 在感觉传递、运动控制中发挥重要作用, 其过度表达可导致神经元损伤及凋亡^[21]。GABA 则介导脑内的抑制性突触传递, 对中枢神经元产生普遍的抑制效果^[21]。研究表明, 脑内 Glu 水平的升高及 GABA 水平的降低与抑郁症的发病机制相关^[22-23]。研究结果显示, 模型组大鼠血清中 5-HT、GABA 水平显著下降, Glu 水平显著上升, 而健脑解郁方中剂量组 5-HT 水平显著上升, 尼莫地平+丁苯酞+氟西汀组和健脑解郁方高剂量组 5-HT、GABA 水平显著上升, Glu 水平明显下降。提示该方可通过调节神经内分泌指标的表达式来改善大鼠的抑郁状态。

临床实验研究表明, IL-6 和 TNF- α 等炎症细胞因子水平的升高, 会加重血管内皮功能障碍、血脑屏障渗漏及脑白质损伤^[24]。抑郁障碍被认为是一种精神神经免疫性失调, 其可能是由于炎症细胞因子作用导致的免疫激活, 进而引发神经内分泌系统及免疫系统功能紊乱^[25]。本研究结果表明, 模型组大鼠血

清中 IL-6、TNF- α 水平显著上升, 而尼莫地平+丁苯酞+氟西汀组和健脑解郁方高剂量组 IL-6、TNF- α 水平显著下降。

海马是一个具有结构、功能可塑性的关键脑区, 分为 CA1、CA2、CA3、DG 4 区, 分别由锥体细胞和颗粒细胞形成。CA3 区被认为与空间辨别性学习记忆活动的关系尤为密切^[26]。血管周围间隙是指包绕血管或沿血管走行、直径小于 3 mm 的间隙, 而血管周围间隙扩大是 CSVD 脑磁共振成像的影像特征之一, 但其病因目前还不完全清楚^[27]。模型组大鼠海马 CA3 区可见明显的血管周围间隙扩张, 有较多丝状物附着, 展现出较大的透明腔隙, 而健脑解郁方高剂量组可显著减少血管周围间隙扩张数量。以上结果表明, 高剂量的健脑解郁方可减轻 CSVDD 大鼠病理损伤, 缓解抑郁症状。

大脑白质主要由神经元轴突、包裹轴突的髓鞘和胶质细胞组成。髓鞘可支持轴突与外界之间的信息传导^[28], 使神经系统具备快速高效的整合能力, 对于认知功能十分重要^[29]。胼胝体作为大脑中最大的白质带, 可清晰直观地进行观察。LFB 结果显示模型组大鼠胼胝体髓鞘纤维纹理不清, 排列疏松, 结构紊乱变形, 呈空泡或空网状改变, 而健脑解郁方高剂量组明显改善胼胝体的病理损伤, 髓鞘结构有所恢复, 板层清晰, 结构致密。

突触是构成神经元之间或神经元与非神经元之间神经网络的一种特化结构, 而突触可塑性是突触形态及功能发生改变的特性或现象^[7], 海马突触可塑性结构和功能的改变与抑郁程度密切相关^[30]。BDNF 是神经营养因子家族的核心成员, 是海马新突触发生、改建及传递效能等功能的重要调节因子, 在突触可塑性变化中发挥重要作用^[31]。临床研究表明, 血清中 BDNF 水平与 CSVD 患者的认知功能障碍有关, 且与病情严重程度相关^[32]。Syn 是一种突触前膜囊泡蛋白, 在神经递质的释放过程中起重要作用, 与突触结构和功能可塑性密切相关, Syn 的定量分析可推测突触的密度和分布^[33]。PSD-95 是由许多动态的蛋白复合体组成并附着于突触后膜, 可维持突触连接, 调控树突棘形态及突出功能。本研究结果表明, 模型大鼠海马 CA3 区 BDNF、Syn 和 PSD-95 的表达水平明显下调, 而给予尼莫地平+丁苯酞+氟西汀组和健脑解郁方高剂量治疗后, 海马 CA3 区 BDNF、Syn 和 PSD-95 的表达水平显著升高, 说明健脑解郁方可通过上调 CSVDD 大鼠海马

CA3 区 BDNF、Syn 和 PSD-95 的表达改善突触可塑性障碍, 达到抗抑郁的疗效。

本研究以尼莫地平、丁苯酞联合氟西汀为阳性对照药物, 通过 D-半乳糖 (400 mg/kg, 8 周) 联合 BCAS 和 CUMS 制备 CSVDD 大鼠模型, 评估大鼠认知功能及情绪变化, 检测血清中神经递质 5-HT、Glu、GABA 及炎症因子 IL-6、TNF- α 水平, 观察脑组织海马 CA3 区血管周围间隙病变及胼胝体髓鞘损伤情况, 检测海马 CA3 区神经元凋亡数量和 BDNF、Syn、PSD-95 蛋白表达。结果显示, 健脑解郁方高剂量可改善模型大鼠认知、情绪障碍, 提升血清中 5-HT、GABA 水平及降低 Glu 水平, 减轻海马血管周围间隙扩大及胼胝体髓鞘损伤, 减少海马 CA3 区神经元凋亡并上调 BDNF、Syn、PSD-95 蛋白表达。

综上, 鉴于海马突触可塑性对神经功能的调控作用, 结合本研究的结果, 推测健脑解郁方可能通过促进海马突触可塑性, 提升神经细胞营养供给, 降低海马神经元凋亡, 以此改善脑组织海马及白质区域病理损伤, 调节神经内分泌指标的表达, 改善 CSVDD 模型大鼠认知及情绪障碍。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王伊龙, 陈玮琪, 叶瑾怡, 等. 脑小血管病: 回眸 2022 [J]. 中国卒中杂志, 2023, 18(1): 17-41.
- [2] 王香元, 余瑞宁, 方锐, 等. 脑小血管病实验动物模型及制备方法研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(18): 5851-5860.
- [3] Djernes J K. Prevalence and predictors of depression in populations of elderly: A review [J]. *Acta Psychiatr Scand*, 2006, 113(5): 372-387.
- [4] Abas M, Bowers T, Manda E, et al. Opening up the mind: Problem-solving therapy delivered by female lay health workers to improve access to evidence-based care for depression and other common mental disorders through the Friendship Bench Project in Zimbabwe [J]. *Int J Ment Health Syst*, 2016, 10: 39.
- [5] Sheline Y I, Pieper C F, Barch D M, et al. Support for the vascular depression hypothesis in late-life depression: Results of a 2-site, prospective, antidepressant treatment trial [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2010, 67(3): 277-285.
- [6] Rensma S P, van Sloten T T, Launer L J, et al. Cerebral small vessel disease and risk of incident stroke, dementia and depression, and all-cause mortality: A systematic review and meta-analysis [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2018, 90: 164-173.
- [7] 魏乐, 黄欣怡, 唐中秋, 等. 海马神经元突触可塑性在抑郁防治机制中的研究进展 [J]. 湖北民族大学学报: 医学版, 2021, 38(3): 73-76.
- [8] Wong F C C, Yatawara C, Low A, et al. Cerebral small vessel disease influences hippocampal subfield atrophy in mild cognitive impairment [J]. *Transl Stroke Res*, 2021, 12(2): 284-292.
- [9] Wang J X, Yang C Y, Wang H Y, et al. A new rat model of chronic cerebral hypoperfusion resulting in early-stage vascular cognitive impairment [J]. *Front Aging Neurosci*, 2020, 12: 86.
- [10] Pinter D, Ritchie S J, Doubal F, et al. Impact of small vessel disease in the brain on gait and balance [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41637.
- [11] Shi Y L, Wardlaw J M. Update on cerebral small vessel disease: A dynamic whole-brain disease [J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2016, 1(3): 83-92.
- [12] 刘春燕, 李勇, 唐茜茜. 脑小血管病患者认知功能障碍与 H 型高血压及脑血流动力学相关性分析 [J]. 神经损伤与功能重建, 2021, 16(2): 86-89.
- [13] 计畅, 杨云红, 刘彬. 影响老年脑小血管病患者发生认知功能障碍的危险因素分析 [J]. 中国老年保健医学, 2020, 18(1): 44-47.
- [14] 王翔翔, 柴湘婷, 谭兰. 脑白质改变发病机制的研究进展 [J]. 实用临床医学, 2016, 17(8): 97-100.
- [15] Ishida N, Saito M, Sato S, et al. Mizagliflozin, a selective SGLT1 inhibitor, improves vascular cognitive impairment in a mouse model of small vessel disease [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2021, 9(5): e00869.
- [16] Hasan T F, Hasan H, Kelley R E. Overview of acute ischemic stroke evaluation and management [J]. *Biomedicine*, 2021, 9(10): 1486.
- [17] 初桂兰, 辛玥, 程估, 等. 神经元型一氧化氮合酶在缺氧缺血新生大鼠脑组织的表达变化及其抑制剂 7-NI 的脑保护作用 [J]. 中华医学杂志, 2004, 84(2): 156-158.
- [18] Low A, Su L, Stefaniak J D, et al. Inherited risk of dementia and the progression of cerebral small vessel disease and inflammatory markers in cognitively healthy midlife adults: The PREVENT-Dementia study [J]. *Neurobiol Aging*, 2021, 98: 124-133.
- [19] Jandke S, Garz C, Schwanke D, et al. The association between hypertensive arteriopathy and cerebral amyloid angiopathy in spontaneously hypertensive stroke-prone rats [J]. *Brain Pathol*, 2018, 28(6): 844-859.
- [20] 赵洪庆, 韩远山, 柳卓, 等. 焦虑性抑郁模型大鼠脑区单胺递质含量与神经因子表达的变化 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(4): 373-379.

- [21] Bak L K, Schousboe A, Waagepetersen H S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: Aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer [J]. *J Neurochem*, 2006, 98(3): 641-653.
- [22] Madeira C, Vargas-Lopes C, Brandão C O, *et al.* Elevated glutamate and glutamine levels in the cerebrospinal fluid of patients with probable Alzheimer's disease and depression [J]. *Front Psychiatry*, 2018, 9: 561.
- [23] Luscher B, Shen Q, Sahir N. The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder [J]. *Mol Psychiatry*, 2011, 16(4): 383-406.
- [24] 王俊峰, 邢仪霞. 天钩石膝汤对脑小血管病性认知功能障碍患者炎症因子及血脑屏障功能的影响 [J]. *新中医*, 2019, 51(12): 4.
- [25] Maes M, Berk M, Goehler L, *et al.* Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways [J]. *BMC Med*, 2012, 10: 66.
- [26] 刘远新. 运动对大鼠学习记忆功能和海马 CA₃ 区 HDAC₂ 表达的影响 [J]. *陕西医学杂志*, 2012, 41(6): 655-657.
- [27] 刘艳, 赵凤丽, 周卫东. 血管周围间隙扩大与脑小血管病关系研究进展 [J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2017, 24(6): 430-434.
- [28] Hill R A, Grutzendler J. Uncovering the biology of myelin with optical imaging of the live brain [J]. *Glia*, 2019, 67(11): 2008-2019.
- [29] Filley C M, Fields R D. White matter and cognition: Making the connection [J]. *J Neurophysiol*, 2016, 116(5): 2093-2104.
- [30] Tolahunase M R, Sagar R, Faiq M, *et al.* Yoga-and meditation-based lifestyle intervention increases neuroplasticity and reduces severity of major depressive disorder: A randomized controlled trial [J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2018, 36(3): 423-442.
- [31] 曾九僧, 陈力, 彭希, 等. 逍遥散拆方药队醋酸乙酯部位抗抑郁作用的 HPA 轴-神经可塑性关联调控机制研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(11): 3534-3547.
- [32] 陈妙, 周荣, 黄祖秀, 等. 脑源性神经营养因子和胰岛素样生长因子-1 水平与脑小血管病所致认知功能障碍的关系 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2022, 32(21): 2623-2626.
- [33] 马小娟, 冯振宇, 赵杰, 等. 助阳开郁方对抑郁症大鼠行为及海马神经可塑性的影响 [J]. *中药材*, 2018, 41(5): 1215-1219.

[责任编辑 李亚楠]