

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.14.009
文章编号: 1005-8982 (2021) 14-0047-05

实验研究·论著

乌灵胶囊对卒中后抑郁大鼠海马P13K/Akt/mTOR通路和神经递质的影响*

孙微¹, 王一帆¹, 李贺², 刘影³

(1. 深圳市萨米医疗中心, 广东 深圳 518118; 2. 北华大学, 吉林 吉林 132013;
3. 上海市松江区中心医院, 上海 201600)

摘要: **目的** 探讨乌灵胶囊对卒中后抑郁大鼠海马P13K/Akt/mTOR通路和神经递质影响。**方法** 选取健康SD大鼠48只, 随机分为对照组、模型组、低剂量组和高剂量组, 每组12只。采用改良Zea-Longa法复制大鼠中动脉缺血大鼠模型(MCAO模型), MCAO模型复制成功后皮下注射利血平复制卒中后抑郁模型。对照组和模型组给予等剂量双蒸水灌胃; 低剂量组于模型复制成功后第2天给予40 mg乌灵胶囊; 高剂量组于模型复制成功后第2天给予80 mg乌灵胶囊, 1次/d。各组大鼠灌胃21 d。采用Western blotting检测大鼠海马组织PI3K、p-Akt和p-mTOR蛋白相对表达量; 高效液相色谱法测定海马组织NE、DA和5-HT含量。**结果** 模型组、低剂量组和高剂量组大鼠Zea Longa评分高于对照组($P < 0.05$), 海马组织PI3K、p-Akt和p-mTOR蛋白相对表达量低于对照组($P < 0.05$), 海马组织NE、DA和5-HT含量低于对照组($P < 0.05$); 而低剂量组和高剂量组大鼠Zea Longa评分低于模型组($P < 0.05$), 海马组织PI3K、p-Akt和p-mTOR蛋白相对表达量高于模型组($P < 0.05$), 海马组织NE、DA和5-HT含量高于模型组($P < 0.05$)。**结论** 乌灵胶囊可改善卒中后抑郁大鼠行为, 且可调节海马P13K/Akt/mTOR通路, 调节神经递质水平。

关键词: 卒中; 抑郁; 乌灵胶囊; P13K/Akt/mTOR通路; 神经递质
中图分类号: R743.3 **文献标识码:** A

Effects of Wuling Capsule on PI3K/Akt/mTOR pathway and neurotransmitters in hippocampus of post-stroke depression rats*

Wei Sun¹, Yi-fan Wang¹, He Li², Ying Liu³

(1. Shenzhen Samii Medical Center, Shenzhen, Guangdong 518118, China; 2. Beihua University, Jilin, Jilin 132013, China; 3. Shanghai Songjiang District Central Hospital, Shanghai 201600, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of Wuling Capsule on PI3K/Akt/mTOR pathway and neurotransmitters in hippocampus of post-stroke depression rats. **Methods** The 48 healthy SD rats were randomly divided into control group, model group, low-dose group and high-dose group with 12 rats in each group. The modified Zea Longa method was used to establish the model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats, followed by subcutaneous injection of reserpine to prepare post-stroke depression model. The control group and model group were given the same dose of double distilled water by gavage. The low-dose group was given 40 mg Wuling Capsule since the second day after successful modeling, while the high-dose group was given 80 mg Wuling Capsule since the second day after successful modeling. Rats in each group were gavaged once a day for 21 days. The protein expression of PI3K, p-Akt and p-mTOR in hippocampus was determined by Western blotting, and the contents of NE, DA and 5-HT in hippocampus were determined by HPLC. **Results** The Zea Longa scores of rats in

收稿日期: 2021-02-01

* 基金项目: 吉林省中医药管理局课题(No:2018108); 吉林省卫生与健康技术创新项目(No:2018J094)

the model group, low-dose group, and high-dose group were all higher than those in the control group ($P < 0.05$); the protein expressions of PI3K, p-Akt and p-mTOR in hippocampus were all lower than those in the control group ($P < 0.05$); and the contents of NE, DA and 5-HT in hippocampus were lower than those in the control group ($P < 0.05$). Besides, the Zea Longa scores of rats in the low-dose and high-dose groups were lower than those in the model group ($P < 0.05$); the protein expressions of PI3K, p-Akt and p-mTOR were higher than those in the model group ($P < 0.05$); and the contents of NE, DA and 5-HT in hippocampus were higher than those in the model group ($P < 0.05$). **Conclusions** Wuling Capsule can improve the behavior of post-stroke depression rats, and regulate PI3K/Akt/mTOR pathway and neurotransmitter level.

Keywords: stroke; depression; Wuling Capsule; PI3K/Akt/mTOR pathway; neurotransmitter

卒中后抑郁是最常见的一种卒中相关情绪障碍,主要是指在脑卒中后发生的由多种复杂因素导致的一种情感障碍性疾病^[1-2]。临床调查显示,卒中后抑郁发病率呈不断上升趋势,严重影响人们生活质量^[3]。卒中后抑郁不仅直接影响神经功能,而且会增加脑卒中的致残率及病死率,给社会和家庭带来沉重负担^[4]。卒中后抑郁具体发病机制较为复杂,其中神经递质在卒中后抑郁中发挥重要作用,认为神经递质与记忆、睡眠及情感等密切相关,其功能或水平下降,是抑郁症发病的生物学基础^[5]。近年来中医药在卒中后抑郁方面有较大进展,且获得良好效果,乌灵胶囊是一种中成药,具有养心安神、清心化痰、补肾健脑功效,用于抑郁症方面获得良好效果^[6]。因此,本文研究通过探讨乌灵胶囊对卒中后抑郁大鼠海马PI3K/Akt/mTOR通路和神经递质的影响,为治疗卒中后抑郁及其相关作用机制的研究提供参考,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物和药物

健康SD大鼠48只,体重(200±20)g,雌雄各半。适应性饲养1周,自由饮食饮水。SD大鼠购自中国中医科学院实验动物中心,动物生产许可证号:SCXK2018-0001,动物使用许可证号:SYXK2018-0001。乌灵胶囊购自浙江佐力药业股份有限公司,规格0.33g,国药准字Z19990048。

1.2 主要试剂

大鼠去甲肾上腺素(Norepinephrine, NE)和多巴胺(Dopamine, DA)试剂盒购自北京博蕾德生物科技有限公司,大鼠5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)购自北京博蕾德生物科技有限公司,PI3K抗体、p-Akt抗体、p-mTOR抗体购自美国Abcam公司。

1.3 方法

1.3.1 卒中后抑郁模型的复制 采用改良Zea-Longa法复制大脑中动脉缺血大鼠模型(MCAO模型),具体方法:术前大鼠禁水、禁食24h,腹腔注射0.35 ml/100 g的8%水合氯醛麻醉,大鼠麻醉成功后取仰卧位,将其固定于操作台,常规备皮消毒,沿大鼠颈正中行1.5~2.0 cm纵行切口,切口处皮下组织采用钝行分离,沿大鼠右侧颈前肌群和胸锁乳突肌间分离右侧颈内动脉(internal carotid artery, ICA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)和颈总动脉(common carotid artery, CCA),分离颈外动脉和颈内动脉分叉处的迷走神经。ICA和CCA采用微动脉夹暂时夹闭,在ICA近心端置一根丝线,再于ECA和CCA分叉3 mm处剪开一小口,再取鱼线插入ICA且轻推,最后将微动脉夹取掉。手术完成后逐层缝合并消毒,术后大鼠腹腔注射40 000 u/(次·d)青霉素,共3 d,以预防电解质紊乱和感染。模型复制成功后于第2天大鼠单笼饲养,皮下注射利血平复制卒中后抑郁模型,4 mg/kg, 1次/d,连续15 d;对照组等量皮下注射相同天数的生理盐水。

1.3.2 实验分组及干预方法 48只大鼠随机分为对照组、模型组、低剂量组和高剂量组,每组12只,雌雄各6只。对照组和模型组予以等剂量双蒸水灌胃;低剂量组于模型复制成功后第2天开始将40 mg乌灵胶囊溶于1 ml双蒸水灌胃,1次/d;高剂量组于模型复制成功后第2天开始将80 mg乌灵胶囊溶于1 ml双蒸水灌胃,1次/d。各组大鼠灌胃21 d。

1.4 检测指标

1.4.1 行为学检测 采用大鼠Zea Longa神经行为学评分:无任何神经功能缺损症状为0分(无缺损);抓取尾部提拎大鼠离开地面,大鼠前爪无法完全伸展为1分(轻度缺损);大鼠左前肢肌力减

弱, 及大鼠行走时向左侧旋转为 2 分(中度缺损); 大鼠向左侧倾倒或无法行走为 3 分(重度缺损); 大鼠意识丧失昏迷为 4 分(无神经功能)。评分越高表示神经功能损伤越严重。

1.4.2 Western blotting 检测大鼠海马组织 PI3K、p-Akt 和 p-mTOR 蛋白相对表达量 采用 RIPA 裂解液匀浆提取总蛋白, 蛋白定量测定采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒。聚丙烯酰胺凝胶电泳后将蛋白转印至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂奶粉, 置于室温条件下封闭 1 h。采用 TBST 溶液洗涤 3 次, 8 min/次, 分别加入 PI3K(1:200)、p-Akt(1:500)、p-mTOR 一抗(1:1 000)及 GAPDH(1:3 000), 4℃ 条件下孵育过夜。采用 TBST 溶液洗脱 3 次, 10 min/次, 加入 IgG 二抗(1:3 000)室温条件下孵育 1 h, 再以 TBST 溶液洗涤 3 次, 8 min/次。ECL 化学发光试剂盒处理后凝胶成像仪显影, 采用 Image Lab 图像处理软件分析条带灰度值。

1.4.3 海马组织神经递质水平检测 取大鼠脑组织, 快速剪取右侧海马组织, 称重大鼠海马组织后放置于液氮速冻, 置入 -80℃ 冰箱冷冻保存待测。

取海马组织加入二羟基苯甲酸, 于冰浴上超声匀浆 30 s, 半径 15 cm, 15 000 r/min 离心 12 min, 取上清液, 采用高效液相色谱法测定海马组织 NE、DA 和 5-HT 含量。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 23.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 比用方差分析, 进一步两两比较用 SNK-*q* 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠海马区组织病理损伤程度

对照组大鼠海马 CA1 区神经元结构正常, 数量丰富, 并且细胞形态规则染色均一, 胞质丰富清亮; 模型组大鼠海马 CA1 区神经元数量明显减少, 且脑组织结构松散, 细胞染色浅及排列紊乱不对称; 低剂量组和高剂量组大鼠海马 CA1 区神经元数量较模型组增加, 且脑组织结构好转, 细胞数量较模型组增加。见图 1。

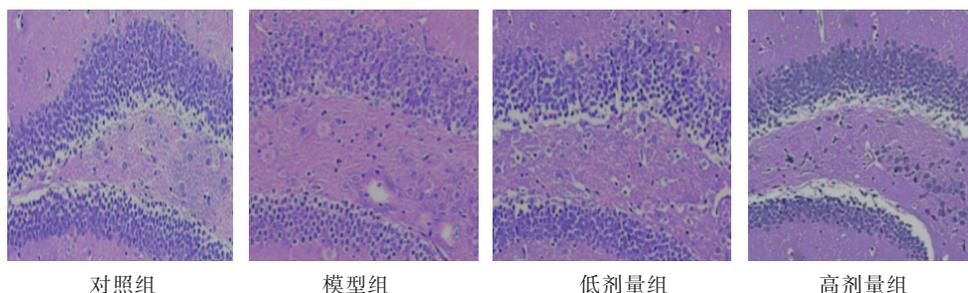


图 1 各组大鼠海马 CA1 区组织病理损伤程度 (HE 染色 × 200)

2.2 各组大鼠 Zea Longa 评分比较

对照组、模型组、低剂量组和高剂量组大鼠 Zea Longa 评分分别为(0.00 ± 0.00)分、(2.70 ± 0.43)分、(2.04 ± 0.2)分和(1.12 ± 0.26)分, 经方差分析, 差异有统计学意义($F = 68.511, P = 0.000$)。进一步两两比较结果: 模型组、低剂量组和高剂量组高于对照组($P < 0.05$); 低剂量组和高剂量组低于模型组($P < 0.05$); 高剂量组低于低剂量组($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠海马组织 PI3K、p-Akt 和 p-mTOR 蛋白相对表达量比较

对照组、模型组、低剂量组和高剂量组大鼠海马组织 PI3K、p-Akt 和 p-mTOR 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

进一步两两比较结果: 模型组、低剂量组和高剂量组低于对照组($P < 0.05$); 低剂量组和高剂量组高于模型组($P < 0.05$); 高剂量组高于低剂量组($P < 0.05$)。见表 1。

2.4 各组大鼠海马组织 NE、DA 和 5-HT 含量比较

对照组、模型组、低剂量组和高剂量组大鼠海马组织 NE、DA 和 5-HT 含量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: 模型组、低剂量组和高剂量组 NE、DA 和 5-HT 含量低于对照组($P < 0.05$); 低剂量组和高剂量组 NE、DA 和 5-HT 含量高于模型组($P < 0.05$); 高剂量组 NE、DA 含量高于低剂量组($P < 0.05$); 高剂量组 5-HT 含量低于低剂量组($P < 0.05$)。见表 2。

表1 各组大鼠海马组织PI3K、p-Akt和p-mTOR蛋白表
相对表达量比较 ($n=12, \bar{x} \pm s$)

组别	PI3K蛋白	p-Akt蛋白	p-mTOR蛋白
对照组	0.94 ± 0.15	1.53 ± 0.28	1.23 ± 0.32
模型组	0.25 ± 0.07 ^①	0.59 ± 0.13 ^①	0.45 ± 0.14 ^①
低剂量组	0.52 ± 0.10 ^{①②}	0.84 ± 0.18 ^{①②}	0.79 ± 0.11 ^{①②}
高剂量组	0.71 ± 0.13 ^{①②③}	1.17 ± 0.15 ^{①②③}	0.97 ± 0.16 ^{①②③}
F值	60.491	8.502	43.812
P值	0.000	0.000	0.000

注：①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$; ③与低剂量组比较, $P < 0.05$ 。

表2 各组大鼠海马组织NE、DA和5-HT含量比较
($n=12, \text{ng/ml}, \bar{x} \pm s$)

组别	NE	DA	5-HT
对照组	95.42 ± 13.24	413.24 ± 46.56	197.45 ± 24.31
模型组	47.83 ± 7.86 ^①	243.12 ± 30.28 ^①	103.21 ± 17.87 ^①
低剂量组	59.98 ± 10.10 ^{①②}	308.29 ± 25.45 ^{①②}	165.42 ± 20.98 ^{①②}
高剂量组	78.54 ± 15.42 ^{①②③}	365.21 ± 34.29 ^{①②③}	130.34 ± 26.56 ^{①②③}
F值	21.444	49.029	23.906
P值	0.000	0.000	0.000

注：①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$; ③与低剂量组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

卒中后抑郁发病机制较为复杂, 尚未完全阐明, 主要指脑卒中后发生的抑郁状态, 相比于普通抑郁症, 卒中后抑郁几乎均有神经功能缺损体征, 且患者日常生活能力明显下降, 给生活质量带来严重影响, 故而卒中后抑郁引起广泛关注^[7-11]。乌灵胶囊主要由单一成分乌灵菌粉构成, 从真菌乌灵参中分离获得的菌种。乌灵胶囊成分包括含赖氨酸、GABA、Glu、Asp等多种氨基酸, 以及微量元素、鸟苷、腺嘌呤、腺苷等^[12-13]。现代药理研究表明, 乌灵胶囊可促进GABA和Glu进入脑内, 激活GABA受体^[14-16]。本研究结果表明, 低剂量组和高剂量组大鼠Zea Longa评分低于模型组, 提示乌灵胶囊可改善卒中后抑郁大鼠行为。

细胞自噬主要是对包括神经系统在内的组织结构与功能产生影响。LC3是重要的自噬标记蛋白, Beclin1是自噬活化的一种关键因子, 自噬形成时LC3B-I会降解一小段多肽转变为LC3B-II,

而其中LC3B-II/I能够衡量细胞自噬水平。而其中mTOR是自噬发生的抑制性激酶之一, 其激活后能够抑制细胞自噬。PI3K/Akt/mTOR是自噬关键的调节作用。本研究结果表明, 卒中后抑郁模型大鼠PI3K、p-Akt和p-mTOR蛋白相对表达量降低, 而给予乌灵胶囊可上调PI3K、p-Akt和p-mTOR蛋白的表达, 但其具体作用机制尚未完全明确, 还需后续增加样本量进一步研究。

大脑皮质与人的高级神经活动、抽象思维及情绪相关, 是脑内重要的一种情感整合中枢。“海马区”是大脑皮质的一个内褶区, 在许多病理解剖学和结构影像学中发现, 抑郁症患者以海马区为主的边缘结构出现体积萎缩、神经减退等病理现象。海马区的功能在抑郁症发病过程中严重减退, 甚者可发生体积明显缩小。卒中后抑郁发病与社会心理因素、环境因素和遗传因素有关, 原发性内源性学说是其重要的发病机制。现代药理研究发现, 脑卒中损害干扰神经透射, 造成单胺类神经递质包括NE、5-HT含量变化及功能缺陷, 导致抑郁症发生。抑郁症存在前额皮质体积减小, 而前皮质改变与抑郁症发生有关^[17-18]。NE和5-HT都有神经纤维上行透射至海马, NE和5-HT能神经元胞体位于皮质, 可影响区域内NE和5-HT的神经通路, 使海马区NE和5-HT含量下降而造成抑郁。本研究结果表明, 低剂量组和高剂量组大鼠海马组织NE、DA和5-HT含量高于模型组, 提示乌灵胶囊可通过上调海马组织NE、DA和5-HT含量而调节神经递质水平。在今后的工作中, 需进一步探讨单胺类神经递质与神经元损伤及卒中后抑郁行为改变的关系, 深入阐明乌灵胶囊治疗卒中后抑郁的作用机制。

综上所述, 乌灵胶囊可改善卒中后抑郁大鼠行为, 且可调节海马PI3K/Akt/mTOR通路, 调节神经递质水平。

参考文献:

- [1] BAKER C, WORRALL L, ROSE M, et al. Stroke health professionals' management of depress after post-stroke aphasia: a qualitative study[J]. Disabil Rehabil, 2021, 43(2): 217-228.
- [2] DAJPRATHAM P, PUKRITTAYAKAMEE P, ATSARIYASING W, et al. The validity and reliability of the PHQ-9 in screening for post-stroke depression[J]. BMC Psychiatry, 2020, 20(1): 291.

- [3] 张海文, 邢红燕. 百合知母汤联合俞原配穴针刺治疗老年脑卒中后抑郁的临床效果[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(23): 5001-5004.
- [4] 顾翠英, 范玉岩, 冯春雨, 等. 中药组方联合盐酸帕罗西汀治疗老年脑卒中后抑郁的近期疗效观察[J]. 世界中西医结合杂志, 2020, 15(4): 757-759.
- [5] 王恒敏, 严小宏, 田蕾. 艾司西酞普兰联合氯吡格雷对老年脑卒中后抑郁患者的临床疗效和安全性[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(8): 1683-1685.
- [6] 黄荣娥, 张学川. 乌灵胶囊联合黛力新治疗对脑卒中后抑郁患者神经功能及日常生活活动能力的影响[J]. 中医学报, 2016, 44(2): 80-82.
- [7] KUMAR R, KATARIA N, KUMAR N, et al. Poststroke depression among stroke survivors in Sub-Himalayan region[J]. J Family Med Prim Care, 2020, 9(7): 3508-3513.
- [8] 秦晓峰, 郑文权, 李玉方, 等. 森田疗法联合舍曲林在脑卒中后抑郁患者的应用及对负性情绪、心理韧性、希望水平的影响[J]. 中国健康心理学杂志, 2020, 28(4): 534-538.
- [9] DONG L, SÁNCHEZ B N, SKOLARUS L, et al. Sex difference in prevalence of depression after stroke[J]. Neurology, 2020, 94(19): 1973-1983.
- [10] 周智恩, 卢萍, 徐向文, 等. 安神解郁汤联合针刺百会穴治疗脑卒中后抑郁多中心随机平行对照研究[J]. 陕西中医, 2020, 41(3): 390-393.
- [11] 吴清珍, 罗东辉, 史文莉. 血府逐瘀汤加减方对脑卒中后抑郁患者自主神经功能及生活质量的影响[J]. 中国医院用药评价与分析, 2020, 20(9): 1056-1059.
- [12] 谢燕, 高志玉, 王雪花, 等. 乌灵胶囊联合西药治疗脑卒中抑郁患者临床疗效及对患者血清炎症反应因子和NPY的影响[J]. 世界中医药, 2018, 13(3): 679-682.
- [13] 白彩云, 刘玉霞, 李佳蓉. 乌灵胶囊联合黛力新治疗对脑卒中后抑郁患者神经功能及日常生活活动能力的影响分析[J]. 贵州医药, 2019, 43(12): 1899-1900.
- [14] 郑双双, 钟根龙, 黎普刚, 等. 乌灵胶囊联合腹针治疗脑卒中后疲劳的疗效分析[J]. 中国现代医生, 2020, 58(21): 106-109.
- [15] 杨志华, 张春美, 岳红. 黛力新联合乌灵胶囊治疗脑卒中后抑郁患者 80 例临床分析[J]. 贵州医药, 2020, 44(1): 64-66.
- [16] 陶珍, 郭洪伟, 高丽, 等. 乌灵胶囊联合文拉法辛配合针灸治疗脑卒中后抑郁的疗效观察[J]. 中国医院用药评价与分析, 2020, 20(6): 678-681.
- [17] 薛海兵, 覃佐爱, 吴清明, 等. 电针"四关"对缺血性脑卒中后抑郁大鼠海马组织单胺类神经递质含量的影响[J]. 国际中医中药杂志, 2015, (1): 65-69.
- [18] 孙培养, 蔡荣林, 李佩芳, 等. "通督调神"针刺对脑卒中后抑郁大鼠海马神经元保护作用及单胺类神经递质的影响[J]. 中国针灸, 2019, 39(7): 741-747.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 孙微, 王一帆, 李贺, 等. 乌灵胶囊对卒中后抑郁大鼠海马 P13K/Akt/mTOR 通路和神经递质的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31(14): 47-51.

Cite this article as: SUN W, WANG Y F, LI H, et al. Effects of Wuling Capsule on PI3K/Akt/mTOR pathway and neurotransmitters in hippocampus of post-stroke depression rats[J]. China Journal of Modern Medicine, 2021, 31(14): 47-51.