

[文章编号] 1000-4718(2008)08-1557-04

西酞普兰对慢性应激大鼠海马 CA1、CA3 区神经细胞凋亡的影响*

俞爱月¹, 苏巧荣¹, 刘学红², 王岚³, 张剑⁴(¹ 绍兴文理学院医学院心理学教研室, ² 组织胚胎学教研室, ³ 基础医学实验中心, ⁴ 药理教研室, 浙江 绍兴 312000)

【摘要】 目的: 探讨西酞普兰对慢性应激大鼠海马 CA1、CA3 神经细胞凋亡的影响。方法: 将 40 只雄性 SD 大鼠随机分为空白、对照(生理盐水灌胃)、实验 1-3 组(分别以 $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 氢溴酸西酞普兰灌胃), 每组 8 只, 采用强迫游泳制造慢性应激大鼠模型, 用大鼠悬尾实验、力竭实验观察行为学, 苏木素伊红(HE)染色观察 CA1、CA3 神经细胞凋亡, 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)检测和尼康图像分析(NIS BR)软件测量 CA1、CA3 神经细胞凋亡数量及积分吸光度值。结果: 对照组静止不动时间延长、挣扎次数减少, 实验组静止不动时间缩短、力竭时间延长、挣扎次数增多; 对照组 CA1、CA3 区阳性细胞增多, CA3 区阳性细胞积分吸光度值变小; 各实验组阳性细胞数量减少, 实验 1、3 组 CA1、CA3 区阳性细胞积分吸光度值增大。结论: 西酞普兰对慢性应激大鼠海马 CA1、CA3 神经细胞具有保护作用, 提示西酞普兰对慢性应激引起的神经精神疾病的治疗机制, 可能是通过拮抗 CA1、CA3 区神经细胞凋亡而起作用。

【关键词】 细胞凋亡; 应激; 海马; 西酞普兰**【中图分类号】** R363 **【文献标识码】** A

Preventive function of citalopram on neuro-cell apoptosis caused by long-term stress in CA1 and CA3 region of hippocampus

YU Ai-yue¹, SU Qiao-rong¹, LIU Xue-hong², WANG Lan³, ZHANG Jian⁴*(¹ Psychological Science Teaching and Research Section; ² Department of Histology and Embryology, ³ Basic Medicine Experimental Center; ⁴ Pharmacological Science Teaching and Research Section, Shaoxing College of Arts and Sciences Medical Faculty, Shaoxing 312000, China. E-mail: aiyue@zscas.edu.cn)*

【ABSTRACT】 **AIM:** To explore the preventing effect of citalopram on neuro-cell apoptosis caused by long-term stress in CA1 and CA3 region of hippocampus. **METHODS:** Forty male Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into five groups including blank group, control group (the control group was filled the stomach by 0.9% saline) and three experimental groups (intra-gastric administration of citalopram hydrobromide at doses of $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectively). Rat stress model was made by compulsory swimming everyday for 4 weeks. Cell apoptosis in CA1 and CA3 region of hippocampus was observed by HE staining method. Apoptotic cell numbers and integral optical density in CA1 and CA3 region were tested and analyzed by terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling (TUNEL) method and Norton Internet Security BR (NIS BR) software. *t*-test was applied to compare apoptosis cell numbers and integral optical density. **RESULTS:** Control rats showed more static time and less struggling times. Conversely, static time was shorter and rats spent more time after exhaustive exercise, and more struggling times in the experimental group. Rats in control group showed more positive cells in CA1 and CA3 regions and higher integral optical density in CA3 region than those in blank group. Rats in experimental groups showed fewer positive cells in CA1 and CA3 regions. Rats in experimental group 1 and group 3 showed higher integral optical density in CA1 and CA3 regions than that in control group. **CONCLUSION:** Long-term stress might cause neuro-cell apoptosis in CA1 and CA3 region of hippocampus. Citalopram might have prophylactic effect on apoptosis caused by long-term stress in CA1 and CA3 region, and the prophylactic effect might not be influenced by citalopram. Our study suggests that the treatment mechanism of citalopram in neural and mental illness by long-term stress may involve in a major role by antagonizing neuronal apoptosis in both the CA1 and CA3.

[收稿日期] 2008-02-01

[修回日期] 2008-06-03

* [基金项目] 浙江省绍兴市 2007 重点科研资助项目 (No. 2007A23005)

E-mail: aiyue@zscas.edu.cn

[KEY WORDS] Apoptosis; Stress; Hippocampus; Citalopram

慢性应激引起神经内分泌、神经递质、神经可塑性和行为学的改变,特别是引起海马神经细胞形态结构、功能状态的改变,并在抑郁障碍的发生中起到十分重要的作用已得到公认,国内外许多学者进行了不少研究^[1-4]。抗抑郁药物、神经营养因子、中药针灸等对应激大鼠海马神经细胞的保护作用也有相关报道^[5-10]。氢溴酸西酞普兰是新颖的选择性5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)的摄取抑制剂,对5-HT再摄取抑制的相对选择性在同类药物中最高,研究证明西酞普兰对于脑卒中后抑郁、老年抑郁症、慢性应激所引起广泛性焦虑症及抑郁症状均具有较好的治疗效果,其作用机制是对5-HT的作用,但是否通过拮抗CA1、CA3区神经细胞凋亡起作用,目前尚缺乏研究。本研究试图通过不同剂量氢溴酸西酞普兰对慢性应激大鼠行为学改变及海马CA1、CA3区神经细胞凋亡影响情况的比较研究,探讨干预慢性应激引起的海马神经细胞凋亡的机制与方法,为临床慢性应激的预防和治疗提供理论依据。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 动物 雄性SD大鼠(浙江中医药大学实验动物中心提供,许可证号SCXK沪2007-005,绍兴文理学院生命科学院实验基地动物室饲养)40只,体重 $240\text{ g} \pm 20\text{ g}$ 。

1.2 试剂 检测细胞凋亡脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法^[8](terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling, TUNEL)所用试剂由罗氏公司生产,北京中杉金桥生物技术有限公司提供,序列号11684217910。

2 方法

2.1 大鼠饲养 大鼠按分组分箱饲养,每组8只,每箱4只,共10箱,进食饮水自由,适应1周后,进入实验程序。

2.2 造模方法 饲养环境为光/暗周期12/12h,光照时间为7AM-7PM,室温 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。空白组不做任何处理,实验1至3组分别以 $8\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $4\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $1\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 氢溴酸西酞普兰灌胃,对照组以等体积生理盐水灌胃。并将对照组、实验组大鼠每天置于 $80\text{ cm} \times 40\text{ cm} \times 40\text{ cm}$,水深25cm、水温 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的长方体水缸中强迫游泳15min,共4周,制成慢性应激模型。强迫游泳实验作为经典的抑郁应激模型,在应激相关研究以及抗抑郁药物疗效评定中得到广泛应用。

2.3 行为学观察 (1)大鼠悬尾实验:操作者握住大鼠尾巴根部1/3处,将大鼠头部向下,由两位实验人员进行操作和记录,每只大鼠观察5min。实验要求在单盲的条件下进行。观察指标:不动时间指大鼠处于完全放松静止不动状态的累计时间;挣扎次数指大鼠由倒挂向上翻转的总次数。(2)大鼠力竭实验:将大鼠放至水池内游泳,至头部沉入水中10s即为体力耗竭,计算力竭时间。

2.4 标本制备 实验第29d,用2%戊巴比妥钠($60-70\text{ mg/kg}$)腹腔麻醉后,开胸经左心室快速灌注 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生理盐水(含适量肝素)100-150mL,然而灌注4%中性多聚甲醛溶液[用磷酸盐缓冲液(public broadcasting service, PBS)配制, $\text{pH} = 7.4$]200-250mL。持续30-40min后,取脑组织,并置于4%中性多聚甲醛溶液中固定48h。每只大鼠取左半脑常规石蜡包埋,内侧矢状面隔二取一切片,厚 $4\text{ }\mu\text{m}$ 。

2.5 苏木素伊红(hematoxylin and eosin staining, HE)染色和细胞凋亡检测 用TUNEL法,按照试剂盒说明书操作如下:切片常规脱蜡至水→微波修复5min-7min→3%双氧水(H_2O_2)灭活内源性酶→加试剂1和2混合液(1:9)→湿盒 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60min→加酶标记抗荧光素抗体(POD) $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30min→DAB显色[在以上各步之间均用PBS(0.01 mol/L , $\text{pH}7.4$)洗涤5min×3次]→苏木精轻度复染→中性树胶封片,光镜观察。用已知阳性片做阳性对照,用标记液代替TUNEL反应液做阴性对照。

2.6 图像分析 用日本尼康图像分析(Norton Internet Security BR, NIS BR)软件,统计海马阳性细胞数量及积分吸光度值(integral absorbance, IA)。每只动物随机取切片1-2张,显微镜下分别在CA1、CA3区域各选取2-3个视野($\times 400$)。阳性凋亡细胞判别标准:核浓缩,呈圆形、椭圆形、月牙形或不规则形,颜色为棕色、黄色、深浅不一。

3 统计学处理

数据用SPSS 11.5统计软件分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本t检验对组间均数进行比较。

结 果

1 各组大鼠行为学变化

对照组与空白组比较,静止不动时间延长、挣扎次数减少,差异显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);实验组与对照组比较静止不动时间缩短、力竭时间延长、挣扎次数增多,差异显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表1。

表 1 各组大鼠行为学观察结果比较

Tab 1 Behaviour observed in different groups($\bar{x} \pm s, n = 8$)

	Blank	Control	Experimental group 1	Experimental group 2	Experimental group 3
Static time(s)	181.63 ± 35.47 ^{△△}	279.14 ± 52.67	164.86 ± 54.35 ^{△△}	158.57 ± 59.49 ^{△△}	200.38 ± 70.95 ^{△△}
Exhaustive time(min)	22.88 ± 1.81 ^{△△}	38.29 ± 5.09	46.43 ± 4.04 ^{△△}	69.29 ± 17.59 ^{△△}	54.38 ± 2.93 ^{△△}
Struggling times(number)	23.88 ± 3.04 [△]	19.86 ± 3.13	24.43 ± 4.12 [△]	32.29 ± 9.83 [△]	36.75 ± 16.13 ^{△△}

[△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ vs control group.

2 HE 染色观察 CA1、CA3 神经细胞凋亡情况

光镜(目镜 10 倍、物镜 40 倍)下可见,空白组 CA1、CA3 区神经细胞形态完整、细胞间质均匀致密,偶见(1-2 个/高倍)凋亡小体;对照组有较多细胞核浓缩、染色质靠边、凝集,出现较多(>5 个/高倍)凋亡小体;实验组部分细胞核浓缩、染色质靠边、凝集,有少量(3-4 个/高倍)凋亡小体存在。

3 TUNEL 染色观察 CA1、CA3 神经细胞凋亡情况

3.1 光镜观察 可见对照组比空白组 TUNEL 染色

阳性细胞的细胞体明显变小,细胞核浓缩,呈圆形、椭圆形、月牙形或不规则形,颜色为棕黄色或黄色(图 1A-D);实验组阳性细胞数量明显减少,核浓缩现象减轻,染色变淡(图 1E-F)。

3.2 对照组与空白组 CA1、CA3 区的阳性细胞数和积分吸光度值比较 表 2 可见,对照组 CA1、CA3 区的阳性细胞数增多,CA3 区阳性细胞积分吸光度值变小,差异显著($P < 0.05$)。

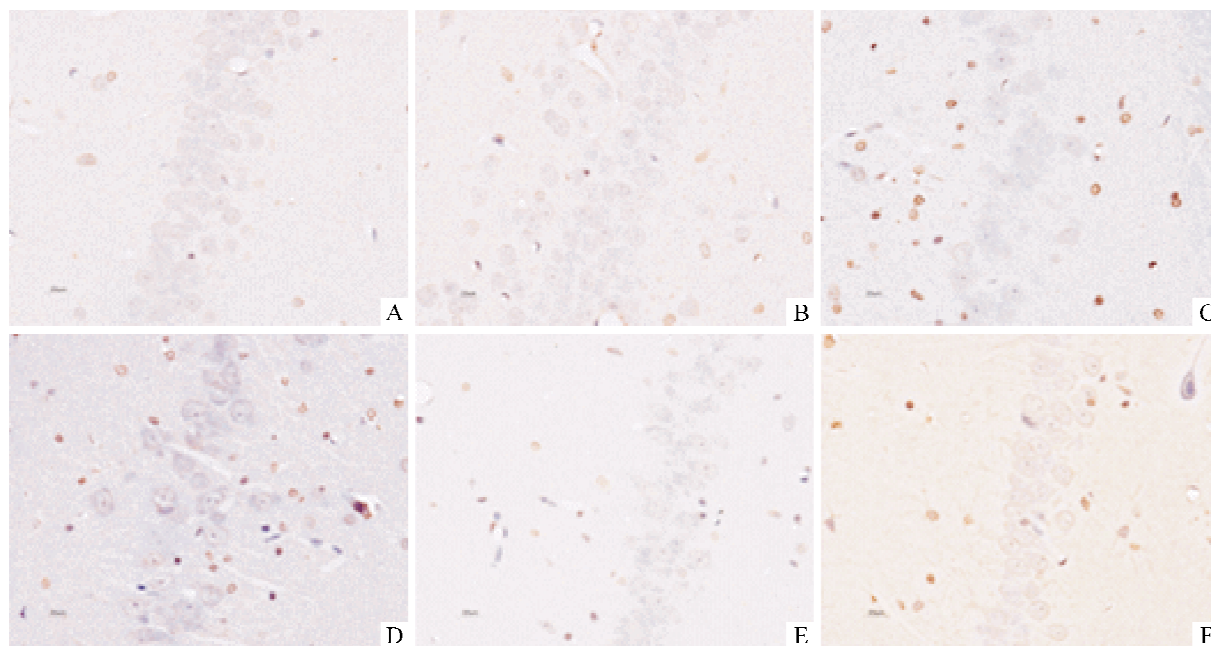


Fig 1 Apoptosis cells in CA1 and CA3 region of blank group were tested and analyzed by TUNEL method(A and B, ×400). Apoptotic cells in CA1 and CA3 region of control group were tested and analyzed by TUNEL method (C and D, ×400). Apoptotic cell in CA1 and CA3 region of experimental groups were tested and analyzed by TUNEL method (E and F, ×400).

图 1 TUNEL 法检测各组大鼠海马 CA1、CA3 区细胞凋亡情况

表 2 空白组、实验组、对照组 CA1、CA3 区阳性细胞数量、积分吸光度值比较

Tab 2 Apoptosis cell number and IA in CA1 and CA3 region ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

	Blank	Control	Experimental group 1	Experimental group 2	Experimental group 3
CA1 positive cell numbers	10.86 ± 3.85	15.00 ± 3.40 [*]	10.73 ± 5.87	10.60 ± 1.82 [△]	10.17 ± 3.66 [△]
CA1 IA	1 096.63 ± 126.62	1 119.42 ± 205.37	1 477.25 ± 474.54 [△]	1 064.76 ± 201.11	1 638.71 ± 544.56 ^{△**}
CA3 positive cell numbers	18.86 ± 3.13	27.20 ± 5.07 ^{**}	16.91 ± 5.49 ^{△△**}	13.40 ± 2.51 ^{△△**}	12.00 ± 4.98 ^{△△**}
CA3 IA	1 190.48 ± 138.92	1 029.93 ± 167.15 [*]	1 555.84 ± 289.31 ^{△△**}	1 055.61 ± 200.05	1 473.47 ± 316.97 ^{△△**}

^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs blank group; [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ vs control group.

3.3 实验组与对照组 CA1、CA3 区的阳性细胞数和积分吸光度值比较 表 2 可见,实验 1、3 组(大剂量、小剂量用药)与对照组比较,除实验 1 组 CA1 区阳性细胞数量增多无统计学差异,其余各指标差异均显著($P < 0.05$),即阳性细胞数量减少,积分吸光度值增大;实验 2 组(中等剂量用药)与对照组比较,CA1、CA3 区阳性细胞数量增多,差异显著($P < 0.01$)。

3.4 实验组与空白组 CA1、CA3 区的阳性细胞数和积分吸光度值比较 表 2 可见,实验组与空白组比较 CA3 区阳性细胞数减少,积分吸光度值增大,差异显著($P < 0.01$)。

讨 论

本研究通过较经典的强迫游泳方法制造大鼠应激模型^[11],结果可见,对照组大鼠静止不动时间延长,挣扎次数减少,较为客观地反映大鼠的体能状态及“失望”情绪,这与赵歆等^[12]研究结果一致,证实应激模型制造成功,而力竭时间延长与以往研究不一致,其原因可能是对照组大鼠(空白组未进行游泳训练)对游泳的适应。另外实验各组与对照组比较静止不动时间缩短、力竭时间延长、挣扎次数增多,表明西酞普兰可对抗应激造模所产生的心理抑郁和体力不足状态。

海马是慢性应激的敏感区,机体受到不良刺激时,会产生明显的神经细胞结构和功能的改变,并出现细胞凋亡。本研究用特异性强,灵敏度高,检测快,可以原位检测细胞凋亡的 TUNEL 法检测海马各区凋亡神经细胞,结果表明对照组(应激模型)CA1、CA3 区阳性细胞数量增多、CA3 区阳性细胞积分吸光度值变小,证实慢性应激可引起海马 CA1、CA3 神经细胞的凋亡,也说明本次实验造模取得成功。应激导致细胞凋亡的原因可能是海马神经元葡萄糖摄取和代谢障碍、兴奋性氨基酸(如 Glu)的神经毒性、神经营养因子下调及神经元可塑性降低等方面。另一方面,实验 1、3 组(大、小剂量用药)与对照组比较,CA1、CA3 区凋亡细胞数量减少,积分吸光度值增大;实验 2 组(中等剂量用药)与对照组比较,CA1、CA3 区阳性细胞数量减少,光镜观察实验组阳性细胞数量明显减少,核浓缩现象减轻,染色变淡,说明西酞普兰对慢性应激大鼠海马 CA1、CA3 区细胞凋亡有较好的拮抗作用,保护神经细胞,且基本不受剂量(仅在本实验用药量范围内)大小的影响;实验组与空白组比较 CA1、CA3 区阳性细胞数减少或无差异,积分吸光度值增大或无差异,进一步说明西酞普兰确实具有抗细胞凋亡作用。究其抗凋亡的机制,我们认为可能与细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2/Bax 调节有关,因前期研究结果显示:对照组比空白组在

CA1、CA3 区神经细胞中有更多更强的 Bax 表达,而 Bcl-2 表达减少减弱,实验组在使用西酞普兰后与对照组比较 CA1、CA3 区神经细胞中 Bax 表达减少减弱,而 Bcl-2 表达增多增强,证实 Bcl-2 和 Bax 基因调控与细胞凋亡的关系,即 Bcl-2 上调、Bax 下调,凋亡细胞减少,相反则增多。Bcl-2 能抑制细胞凋亡,而 Bax 则介导细胞凋亡(论文待发表)。另外,也有可能通过阻断突触前膜对 5-HT 的再摄取,提高突触间隙 5-HT 的浓度,使 5-HT 的功能增强,提高 BDNF 的作用,发挥抗凋亡的功能,其相关机制还有待于进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Hayley S, Poulter MO, Merall Z, et al. The pathogenesis of clinical depression: stressor and cytokine induced alterations of neuroplasticity[J]. *Neuroscience*, 2005, 135(3): 659-678.
- [2] McEwen BS, Magarinos AM. Stress and hippocampal plasticity: Implications for the pathophysiology of affective disorders [J]. *Hum Psychopharmacol*, 2001, 16(11): 17-19.
- [3] 张艳美, 杨 权, 许崇涛, 等. 慢性应激对大鼠海马 CA3 区锥体细胞形态结构的效应[J]. *中华精神科杂志*, 2002, 35(1): 22-24.
- [4] 柯江维, 王建红, 段 荣. 心理应激雌性大鼠海马-下丘脑-垂体雌激素受体的变化[J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(1): 98-100.
- [5] Duman RS, Malkerg J, Thome J. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment[J]. *Biol Psychiatry*, 1999, 46(9): 1181-1191.
- [6] 朱熊兆, 亓晓丽, 姚树桥, 等. 热休克蛋白 70 对小鼠海马 CA3 区神经元损伤的保护作用[J]. *中国心理卫生杂志*, 2006, 20(7): 425-429.
- [7] 秦晓松, 金魁舜, 丁宝坤. 银杏叶提取物联合盐酸文拉法辛对抑郁大鼠海马 nNOS 蛋白表达及 NO 水平的影响[J]. *中国心理卫生杂志*, 2003, 17(12): 828-831.
- [8] 苏巧荣, 苏雁林, 俞爱月, 等. 文拉法辛对慢性应激海马 CA3 区细胞萎缩与凋亡的干预效应[J]. *中国临床康复*, 2005, 9(12): 142-144.
- [9] 张艳美, 杨 权, 李康生, 等. 苯妥英钠对大鼠海马 NO 变化的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2002, 18(8): 981-984.
- [10] 刘辉国, 张志锋, 高永平, 等. N-乙酰半胱氨酸对慢性间歇缺氧大鼠海马神经元凋亡及氧化应激的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(1): 36-39.
- [11] Porsolt RD, Pichom ML, Jalfre M. Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatment[J]. *Nature*, 1977, 266(21): 730-732.
- [12] 赵 歆, 陈家旭, 杨建新. 疏肝中药复方对慢性束缚应激大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的调节[J]. *实验动物科学与管理*, 2003, 20(2): 6-11.