

酸枣仁汤对焦虑大鼠海马离子型谷氨酸受体的表达及突触可塑性的作用研究

王红坤, 何金铭, 颜岳衡, 汪子皓, 李若暄, 王艳艳*
(黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

[摘要] 探讨酸枣仁汤对条件性恐惧致焦虑大鼠海马离子型谷氨酸受体 *N*-甲基-D-天冬氨酸受体 (*N*-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR) 和 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异唑丙酸受体 (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor, AMPAR) 的表达及突触可塑性的影响。通过旷场实验、高架十字迷宫实验和明暗箱实验考察酸枣仁汤对焦虑大鼠行为学的影响; 利用酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测大鼠海马中谷氨酸 (glutamate, Glu) 和 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 含量; 采用实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR)、蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测大鼠海马区离子型谷氨酸受体的基因及蛋白表达; 采用透射电镜技术观察大鼠海马区神经突触超微结构的变化, 并通过在体长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 检测技术记录各组大鼠海马区的群峰电位 (population spike, PS) 幅值变化率。行为学结果显示, 与模型组相比, 酸枣仁汤能有效增加焦虑大鼠的开臂次数、开臂运动时间、开臂占总运动时间百分比、开臂占入臂总次数百分比 ($P < 0.01$), 显著升高明箱时间和穿梭次数 ($P < 0.01$), 跨格次数、进入中央格次数、进入中央格时间有增加趋势, 表现出明显的抗焦虑作用; ELISA 结果显示, 与模型组相比, 酸枣仁汤组大鼠海马组织中的 Glu 含量和 Glu/GABA 比值显著降低 ($P < 0.01$), GABA 含量显著升高 ($P < 0.01$); 此外, 与模型组相比, 酸枣仁汤能明显降低 NMDAR (GluN2B、GluN2A)、AMPA (GluA1、GluA2) 的基因和蛋白表达。透射电镜结果表明, 酸枣仁汤组海马区的突触、神经元细胞及细胞器较模型组均有改善。LTP 检测结果显示, 与模型组比较, 酸枣仁汤组大鼠海马区的 PS 幅值变化率在 5~35 min 显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。综上, 酸枣仁汤具有显著的抗焦虑作用, 其作用机制可能与减少 NMDAR、AMPA 表达水平以及改善神经突触可塑性有关。

[关键词] 酸枣仁汤; 焦虑; *N*-甲基-D-天冬氨酸受体 (NMDAR); α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异唑丙酸受体 (AMPA); 突触可塑性

Effect of Suanzaoren Decoction on expression of ionotropic glutamate receptors and synaptic plasticity in hippocampus of anxiety rats

WANG Hong-kun, HE Jin-ming, YAN Yue-heng, WANG Zi-hao, LI Ruo-xuan, WANG Yan-yan*
(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] This study investigated the effect of Suanzaoren Decoction on the expression of *N*-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptors (AMPA) in the hippocampus and synaptic plasticity in rats with conditioned fear-induced anxiety. The effect of Suanzaoren Decoction on rat behaviors were evaluated through open field experiment, elevated plus maze experiment, and light/dark box experiment. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the levels of glutamate (Glu) and γ -aminobutyric acid (GABA) in the rat hippocampus. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blot were employed to assess the gene and protein expression of ionotropic glutamate

[收稿日期] 2023-04-17

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82003974); 黑龙江省自然科学基金项目 (LH2022H086); 哈尔滨市科技局项目 (2013RFQXJ070); 黑龙江省中医药科研项目 (LH2023)

[通信作者] * 王艳艳, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药改善睡眠及抗焦虑作用机制, E-mail: wyy2891@126.com

[作者简介] 王红坤, 硕士研究生, E-mail: 1642049764@qq.com

receptors in the hippocampal region. Transmission electron microscopy was utilized to observe the changes in the ultrastructure of synaptic neurons in the hippocampal region. Long-term potentiation (LTP) detection technique was employed to record the changes in population spike (PS) amplitude in the hippocampal region of mice in each group. The behavioral results showed that compared with the model group, the Suanzaoren Decoction group effectively increased the number of entries into open arms, time spent in open arms, percentage of time spent in open arms out of total movement time, number of entries into open arms out of total entries into both arms ($P < 0.01$), and significantly increased the time spent in the light box and the number of shuttle crossings ($P < 0.01$). There was an increasing trend in the number of grid crossings, entries into the center grid, and time spent in the center grid, indicating a significant anxiolytic effect. ELISA results showed that compared with the model group, the Suanzaoren Decoction group exhibited significantly reduced levels of Glu, Glu/GABA ratio ($P < 0.01$), and significantly increased levels of GABA ($P < 0.01$) in the rat hippocampus. Furthermore, Suanzaoren Decoction significantly decreased the gene and protein expression of NMDAR (GluN2B and GluN2A) and AMPAR (GluA1 and GluA2) compared with the model group. Transmission electron microscopy results demonstrated improvements in synapses, neuronal cells, and organelles in the hippocampal region of the Suanzaoren Decoction group compared with the model group. LTP detection results showed a significant increase in the PS amplitude changes in the hippocampal region of Suanzaoren Decoction group from 5 to 35 min compared with the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In conclusion, Suanzaoren Decoction exhibits significant anxiolytic effects, which may be attributed to the reduction in NMDAR and AMPAR expression levels and the improvement of synaptic plasticity.

[Key words] Suanzaoren Decoction; anxiety; *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR); α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor (AMPA); synaptic plasticity

DOI: 10.19540/j.cnki.cjmm.20230704.401

焦虑障碍已成为严重危害人类健康的精神性疾病。据研究报告统计,在六大类精神障碍中,焦虑障碍患病率及终身患病率最高,全球约有2.73亿人患有焦虑障碍,约占总人口的4.5%^[1-3]。既往对于焦虑障碍发病生物机制的研究,主要集中在5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)及去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)递质通路。与之相对应的一线临床用药主要是苯二氮䓬类和选择性5-羟色胺再摄取抑制剂、5-羟色胺和去甲肾上腺素再摄取抑制剂类等^[4],但用药后存在过度镇静、胃肠道反应、自主神经功能障碍等不良反应,且治疗无效或治疗后再次复发的问題尚未得到有效解决^[5]。因此,从中医药学的宝库中寻找抗焦虑药物,并探讨其抗焦虑作用机制,对焦虑症的治疗和中医药的发展具有十分重要的意义。

酸枣仁汤(Suanzaoren Decoction)始载于汉代张仲景的《金匱要略》,由酸枣仁、知母、川芎、茯苓、甘草组成,是一剂补血调肝、养心安神、清热除烦的经典名方。本课题组前期开展了酸枣仁及酸枣仁汤的抗焦虑作用研究^[6-7],分别阐明了酸枣仁汤抗焦虑作用的药效物质基础,比较了生与炒酸枣仁配伍对状态性焦虑模型大鼠单胺类和氨基酸类神经递质表达的影响等^[8-9]。近几年来,谷氨酸受体成为新型抗焦虑药的靶标,其中,离子型谷氨酸受体对神经元的长

时程增强(long-term potentiation, LTP)效应在恐惧习得的神经机制中起主要的作用,主要影响突触的功能可塑性。海马作为边缘系统的重要组成部分,与焦虑障碍的发生密切相关,研究发现,母爱剥夺可导致成年后雌性仔鼠海马体积缩小,海马神经发生减少,焦虑及抑郁样行为增多^[10-11]。因此,本实验以海马为靶部位,采用条件性恐惧致焦虑大鼠模型,利用行为学实验及分子生物学实验技术,考察酸枣仁汤对焦虑大鼠行为学、海马区离子型谷氨酸受体的表达以及突触可塑性的影响,为深入阐明酸枣仁汤的抗焦虑作用机制提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 雄性SPF级SD大鼠45只,体质量(240±20)g,由黑龙江中医药大学GLP实验室提供,许可证号SCXK(黑)2018-007。12h的明暗光照周期处理,温度(22±2)℃,相对湿度45%~50%,噪声≤40dB。本实验经黑龙江中医药大学实验动物伦理审查委员会批准(编号2021013102)。

1.2 药品 酸枣仁汤[酸枣仁(炒)30g,知母12g,茯苓12g,川芎12g,甘草6g]所用饮片购于北京同仁堂有限责任公司,批号分别为20220711、20220508、20220630、20220520、20220630,以上药品经黑龙江中医药大学樊锐锋教授鉴定为正品。地西洋片(批号191006,山东信谊制药有限公司)。

1.3 试剂 大鼠谷氨酸(Glu) ELISA 试剂盒(批号 202112)、大鼠 GABA ELISA 试剂盒(批号 202112)均购于江苏晶美生物科技有限公司; anti-GluA1(批号 4000000657)、anti-GluA2(批号 4000000572)、anti-GluN2A(批号 4000000410)、anti-GluN2B(批号 5500005546)均购于武汉爱博泰克生物科技有限公司; IRDye 800cw 羊抗兔 IgG(H+L)(批号 A110112197,北京博奥森生物技术有限公司); PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser [批号 AL61909A,宝生物工程(大连)有限公司]; PCR 引物由宝生物工程(大连)有限公司设计并合成,具体引物序列见表 1。

表 1 引物序列信息

Table 1 Information for primer sequences

基因	序列(5'-3')
GluA1-F	GACTGTGAATCAGAACGCCTCAAC
GluA1-R	GTCACATTGGCTCCGCTCTC
GluA2-F	CATCCAGATGGCAGCTGACC
GluA2-R	CTCTGCAGCAGAATCCAGAACA
GluN2A-F	ACCTGGCTCTGCTCCAGTTTG
GluN2A-R	CCGCCATGTTATCGATGTCC
GluN2B-F	GAAGCCATCGCTCAGATCCTC
GluN2B-R	GATAGACGGGCCAAACTGGAA
β -actin-F	GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA
β -actin-R	GACTCATCGTACTCTGCTTGCTG

1.4 仪器 条件性恐惧实验监测系统(型号 XR-XC404-2,上海欣软信息科技有限公司); 双色荧光成像系统(型号 Odyssey CLx System,美国 LI-COR 公司); 酶标仪(型号 SMATBCD,美国伯腾仪器有限公司); 实时荧光定量 PCR 仪(型号 QuantStudio3,美国 ThermoFisher Scientific 公司)。

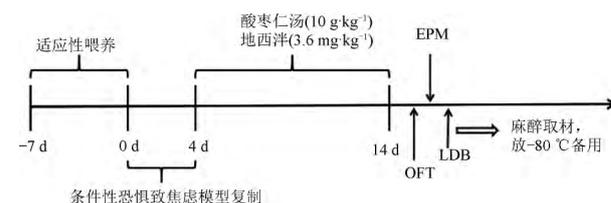
2 方法

2.1 药液的制备 按《金匱要略》中所记载酸枣仁汤各药材的处方剂量以及实验室前期的研究结果,称取炒酸枣仁粗粉 30 g,川芎、知母、茯苓粗粉各 12 g,甘草粗粉 6 g,加入 1 600 mL 蒸馏水,浸泡 1 h 后,水煎煮提取 2 次,每次 25 min,过滤,合并药液,浓缩即得 $1.25 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (生药量)的酸枣仁汤提取物 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,备用。准确称取地西洋 22.5 mg,定容至 50 mL,即得 $0.45 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的地西洋混悬液。

2.2 动物分组及条件性恐惧致焦虑大鼠模型复制 将大鼠随机分为空白组、模型组、阳性药(地西

泮)组和酸枣仁汤组,每组 10 只。模型组、阳性药组与酸枣仁汤组大鼠分别置于电刺激箱中适应 3 min 后,给予大鼠 5 s 的声音信号(1 000 Hz,75 dB),最后 1 s 同时给予 0.5 mA 足底电刺激,间隔 55 s 开始下一轮声音和电击,共重复 15 次,实验结束后适应 3 min 取出,连续 4 d。空白组操作方法相同但只给予声音信号^[12-13]。

2.3 给药 条件性恐惧模型建立后,按照本实验室前期的药效学考察结果,分别灌胃给予酸枣仁汤($10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)和地西洋($3.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),空白组和模型组给予等体积的蒸馏水,每日 1 次,连续 10 d。末次给药 1 h 后进行行为学检测,之后麻醉取材,放入 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。实验流程见图 1。



EPM.高架十字迷宫实验;OFT.旷场实验;LDB.明暗箱实验。

图 1 实验流程

Fig.1 Experimental flow

2.4 行为学检测 旷场实验(open field test, OFT): 大鼠末次给药后,放于实验环境中适应 1 h,将大鼠放于装置正中央,用软件自动记录分析 5 min 内大鼠的跨格次数、进入中央格次数、进入中央格时间。

高架十字迷宫实验(elevated plus-maze test, EPM): 高架十字迷宫装置参考文献[12],旷场实验结束后,将每只大鼠头面向开放臂放入中央开阔平台,记录 5 min 内大鼠进入开臂次数和开臂时间,并计算大鼠开臂次数占入臂总次数的百分比即开臂/总入臂次数,同时计算进入开臂时间占总时间的百分比即开臂/总运动时间。

明暗箱实验(light dark box, LDB): 高架十字迷宫实验结束后,将大鼠背对暗箱放入明箱中央,记录分析 5 min 内大鼠的明箱停留时间及穿梭次数。

2.5 海马组织分离 明暗箱实验结束后,麻醉各部分大鼠,取全脑并剥离出海马脑区,放于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.6 酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测 将海马组织从 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取

出加入生理盐水在冰水浴中充分研磨,研磨后 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min 取上清液。按照试剂盒说明书进行操作检测大鼠海马组织中Glu和GABA的吸光度,再根据标准曲线及稀释倍数,计算出大鼠海马脑区中Glu、GABA的含量和Glu/GABA的比值。

2.7 实时荧光定量PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR) 检测 将海马组织移至预冷的研钵中,充分研磨至粉状,加入TRIzol试剂提取细胞的总RNA,按照试剂盒操作步骤进行PCR实验。cDNA合成的反应条件为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}\ 15\text{ min}$, $85\text{ }^{\circ}\text{C}\ 5\text{ s}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 终止。RT-PCR反应体系共 $50\ \mu\text{L}$ 。PCR反应条件为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}\ 30\text{ min}$; $95\text{ }^{\circ}\text{C}\ 5\text{ min}$, $60\text{ }^{\circ}\text{C}\ 34\text{ min}$, 40 个循环; $95\text{ }^{\circ}\text{C}\ 15\text{ min}$; $60\text{ }^{\circ}\text{C}\ 1\text{ h}$; $95\text{ }^{\circ}\text{C}\ 15\text{ min}$ 。相对表达量的计算采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。

2.8 蛋白免疫印迹(Western blot)分析 将各组大鼠的海马组织放置于预冷的研钵中充分研磨至粉状,加入裂解液匀浆使其完全裂解。离心,取上清液,测定蛋白浓度,电泳,转膜,PBS-T漂洗,封闭,加入一抗 β -actin(1:100 000)、GluA1(1:1 000)、GluA2(1:1 000)、GluN2A(1:1 000)、GluN2B(1:1 000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。加入荧光二抗孵育 2 h ,利用荧光成像系统进行显影成像,采用ImageJ图像分析系统进行分析。

2.9 透射电镜观察 将剥离的海马放入 2.5% 戊二醛溶液中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下进行预固定,脱水和包埋,切片,分别于 $11\,000$ 倍镜下观察神经元的细胞形态, $28\,000$ 倍镜下观察神经元超微结构。

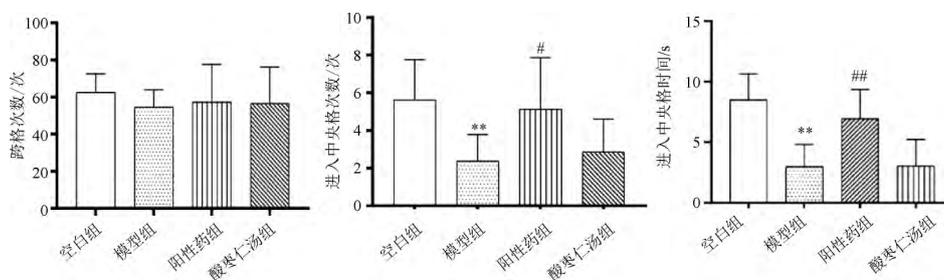
2.10 LTP测定^[14-15] 另取雄性SD大鼠36只,造模、分组与给药方法同2.2、2.3项,末次给药 30 min 后,麻醉,将大鼠头部固定,备皮,暴露头骨,以前囟为原点,记录电极埋植于海马区[前囟后(anteropos-

terior,AP) 6.0 mm ,中缝右(mediolateral,ML) 5.5 mm ,颅骨平面向下(dorsoventral,DV) 4.5 mm],分别植入刺激电极和记录电极。将电极与BL-420F生物机能实验系统连接,找到稳定的群峰电位(population spike,PS)信号。记录使用单个方波(波宽 1 ms ,频率 1 Hz ,采样率 $1\,000\text{ Hz}$),记录不随刺激强度增加而增大时的PS幅值^[16-17]。调试后进行基础水平的检测,经刺激电极给予1次高频强直电刺激(high frequency stimulation,HFS),串长 100 ,频率 100 Hz ,强度为基础水平测试时的刺激强度^[16]。上述检测后,将刺激参数调回基础水平检测参数继续记录,每 5 min 给予1次刺激,持续 60 min 。本实验观察指标为实验动物的PS幅值变化率,以时间为横坐标,以PS幅值变化率为纵坐标绘制LTP的动态变化图。计算公式如下:基线值=HFS前PS幅值的平均值 $\times 100\%$;PS幅值变化率=各时间点的相应PS幅值/基线值 $\times 100\%$ 。

2.11 统计学处理 采用SPSS 23.0统计软件进行数据处理,数据绘图应用GraphPad Prism 7.0,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。实验数据组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较采用LSD- t 检验, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

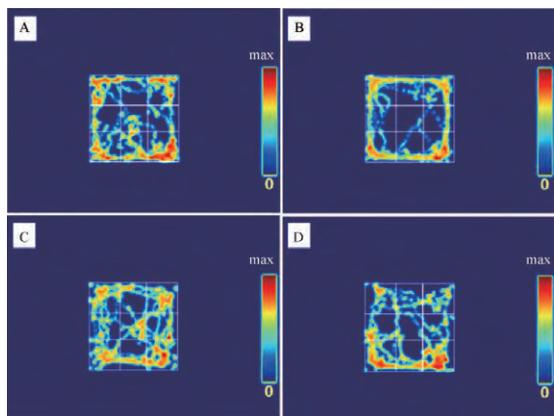
3.1 酸枣仁汤对焦虑大鼠OFT中焦虑样行为的影响 与空白组相比,模型组大鼠进入中央格次数及进入中央格时间均显著降低($P<0.01$),运动轨迹图中运动距离减少,跨格次数有降低趋势;与模型组相比,阳性药组大鼠进入中央格次数和时间显著增加($P<0.05$, $P<0.01$),运动距离增加,跨格次数有增加趋势,而酸枣仁汤组大鼠跨格次数、进入中央格次数、进入中央格时间和运动距离有增加趋势,见图2、3。



与空白组相比* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组相比# $P<0.05$,## $P<0.01$ (图4~8、12同)。

图2 旷场实验结果($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Fig.2 Results of the open field test($\bar{x}\pm s$, $n=10$)



A.空白组; B.模型组; C.阳性药组; D.酸枣仁汤组(图9~11同)。

图3 大鼠在旷场实验中5 min内的运动轨迹

Fig.3 Movement trajectories of rats within 5 min during the open field test

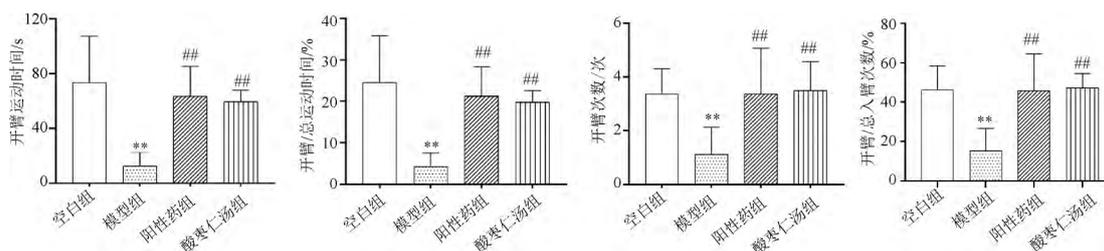


图4 高架十字迷宫实验结果($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

Fig.4 Results of the elevated plus-maze test($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

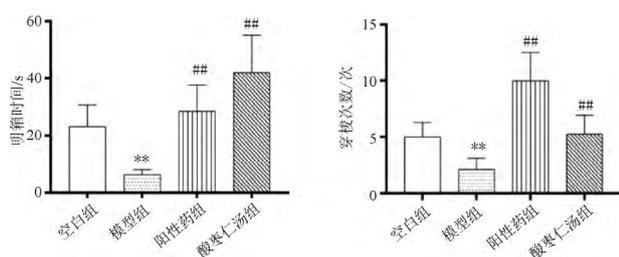


图5 明暗箱实验结果($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

Fig.5 Results of the light/dark box test($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

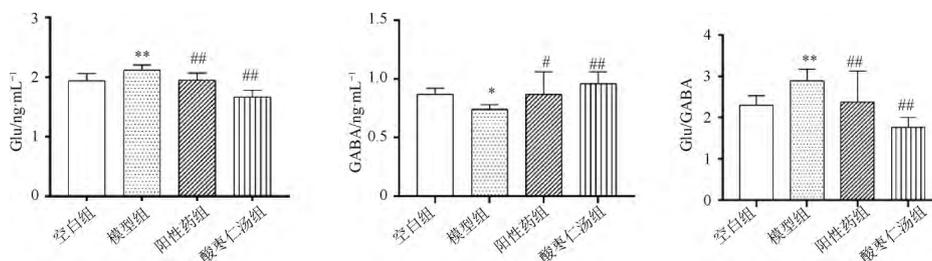


图6 酸枣仁汤对大鼠海马区 Glu、GABA 含量及 Glu/GABA 比值的影响($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

Fig.6 Effect of Suanzaoren Decoction on Glu and GABA content, and Glu/GABA ratio in rat hippocampus($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

3.2 酸枣仁汤对焦虑大鼠 EPM 中焦虑样行为的影响 与空白组比较,模型组大鼠开臂运动时间、开臂次数、开臂/总运动时间和开臂/总入臂次数均显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,阳性药组和酸枣仁汤组大鼠开臂运动时间、开臂次数、开臂/总运动时间和开臂/总入臂次数均显著升高($P < 0.01$),见图4。

3.3 酸枣仁汤对焦虑大鼠 LDB 中焦虑样行为的影响 与空白组比较,模型组大鼠明箱时间和穿梭次数均显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,阳性药组和酸枣仁汤组大鼠明箱时间和穿梭次数均显著升高($P < 0.01$),见图5。

3.4 酸枣仁汤对焦虑大鼠海马区神经递质含量的影响 与空白组比较,模型组大鼠海马区中 Glu 含量及 Glu/GABA 比值增加,GABA 含量降低,差异

均具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组相比,阳性药组和酸枣仁汤组大鼠海马区中 Glu 含量及 Glu/GABA 比值降低,GABA 含量升高,差异均具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),见图6。

3.5 酸枣仁汤对焦虑大鼠海马区谷氨酸受体基因表达的影响 与空白组相比,模型组大鼠海马区中的谷氨酸受体 NMDAR(GluN2A、GluN2B)、AMPA(GluA1、GluA2) 基因表达显著升高($P < 0.05$, $P <$

0.01);与模型组相比,阳性药组、酸枣仁汤组大鼠海马区中的谷氨酸受体 NMDAR (GluN2A、GluN2B)

及 AMPAR (GluA1、GluA2) 基因表达显著降低 ($P < 0.01$),见图 7。

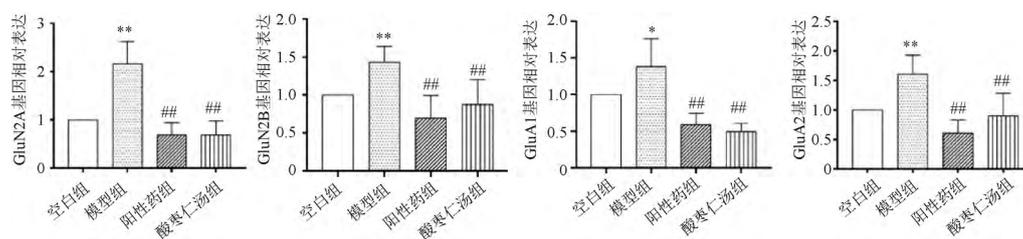


图 7 酸枣仁汤对焦虑大鼠海马脑区 NMDAR (GluN2A、GluN2B) 及 AMPAR (GluA1、GluA2) 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig.7 Effect of Suanzaoren Decoction on the gene expression of NMDAR (GluN2A and GluN2B) and AMPAR (GluA1 and GluA2) in the hippocampal region of anxious rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3.6 酸枣仁汤对焦虑大鼠海马区谷氨酸受体蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠海马区中 GluN2A 和 GluN2B 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.01$);与模型组相比,阳性药组和酸枣仁汤组大鼠 GluN2B 和 GluN2A 蛋白表达量显著降低

($P < 0.01$);与空白组比较,模型组大鼠海马中 GluA1、GluA2 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.01$);与模型组相比,阳性药、酸枣仁汤组大鼠海马中 GluA1、GluA2 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.01$),见图 8。

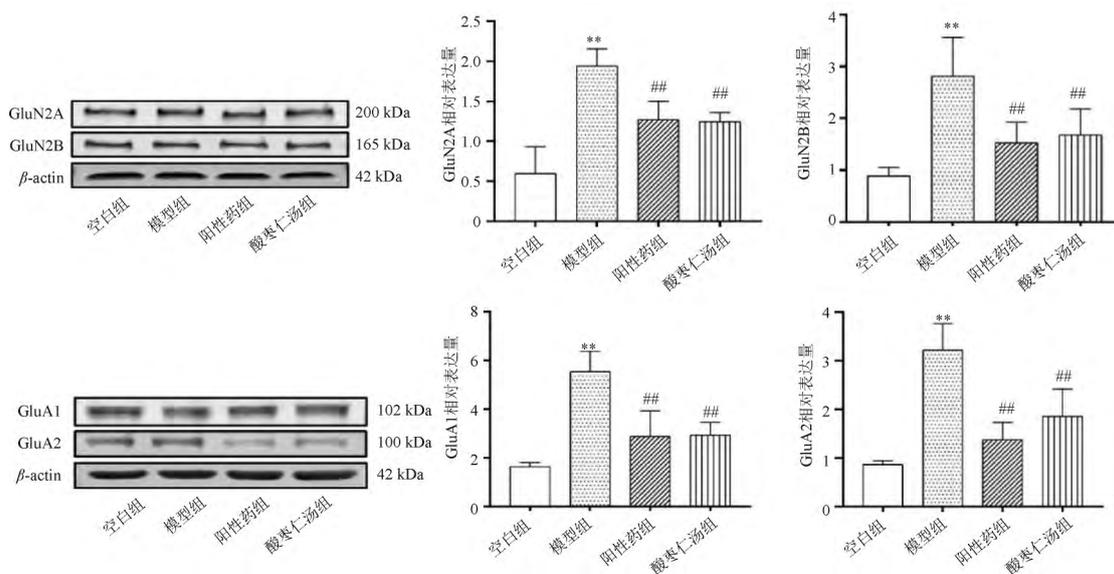


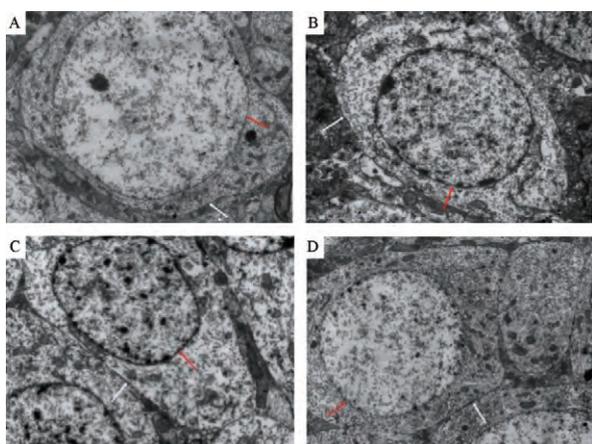
图 8 各组大鼠海马区 GluN2A、GluN2B、GluA1、GluA2 蛋白相对表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig.8 Relative expression of GluN2A, GluN2B, GluA1, and GluA2 proteins in the hippocampus of each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3.7 酸枣仁汤对海马区神经细胞超微结构的影响 空白组大鼠海马区的神经元细胞结构完整,且细胞膜和核膜边缘清晰完整,染色质分布均匀,胞内细胞器丰富且结构完整,未出现异常神经元;模型组大鼠海马区神经元细胞发生了肿胀,且细胞膜有破损,胞浆较为空亮;阳性药组大鼠海马区神经元细胞结构有轻微肿胀,细胞膜、核膜结构清晰

无破损,胞浆略微空亮;酸枣仁汤组神经元细胞结构完整且未见肿胀,核膜、细胞膜边界清晰完整,染色质分布均匀,见图 9。

3.8 酸枣仁汤对海马区神经元内细胞器超微结构的影响 空白组大鼠海马区神经元细胞内细胞器丰富,结构完整且均匀分布,粗面内质网较多,形状呈条索状,线粒体分布较多呈圆形或椭圆形,高尔基体

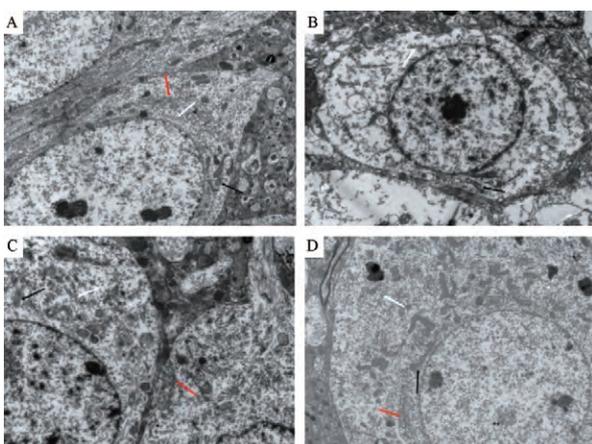


白色实线箭头指示细胞膜 红色箭头指示核膜。

图9 各组大鼠海马区神经细胞超微结构(柠檬酸铅+醋酸铀双重染色 $\times 11\ 000$)

Fig.9 Ultrastructure of neural cells in the hippocampus of rats in each group (double staining of lead citrate + uranium acetate , $\times 11\ 000$)

结构完整呈弓形; 模型组大鼠海马区胞内细胞器稀少 粗面内质网稀少且明显扩张, 线粒体稀少且肿胀; 阳性药组大鼠海马区神经元胞内细胞器较多 粗面内质网、线粒体略微肿胀, 高尔基体扁平囊肿胀; 酸枣仁汤组胞内细胞器较为丰富, 粗面内质网及线粒体数量较多, 且高尔基体扁平囊肿胀, 见图 10。

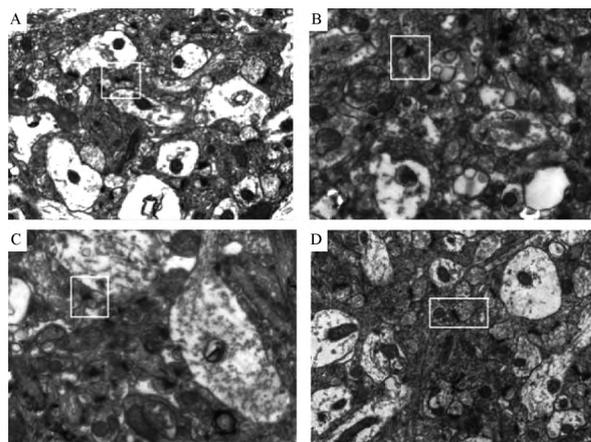


白色箭头指示粗面内质网 黑色箭头指示线粒体 红色箭头指示高尔基体。

图10 各组大鼠海马区神经元内细胞器超微结构(柠檬酸铅+醋酸铀双重染色 $\times 28\ 000$)

Fig.10 Ultrastructure of organelle in the hippocampus of rats in each group(double staining of lead citrate + uranium acetate , $\times 28\ 000$)

3.9 酸枣仁汤对海马区突触超微结构的影响 空白组大鼠海马区神经毡内突触结构完整且清晰, 突触前膜内的突触小泡多而清晰, 突触内的微管微丝丰富; 模型组大鼠海马区神经毡内突触轮廓模糊, 突触前膜和后膜边界不明显; 阳性药组大鼠海马区神经毡内突触结构较为清晰, 突触前膜的突触小泡较为丰富且分布均匀, 突触内的微管微丝较多; 酸枣仁汤组大鼠海马区神经毡内突触轮廓完整且结构清晰, 改善明显, 突触前膜的突触小泡丰富, 圆而清晰, 分布均匀, 见图 11。



方框内为单个完整结构的突触。

图11 各组大鼠海马区突触超微结构(柠檬酸铅+醋酸铀双重染色 $\times 36\ 000$)

Fig.11 Synaptic ultrastructure in the hippocampus of rats in each group (double staining of lead citrate + uranium acetate , $\times 36\ 000$)

3.10 酸枣仁汤对焦虑大鼠海马区神经突触功能可塑性的影响 HFS 后, 在 5~60 min 的刺激过程中, 与空白组比较, 模型组大鼠海马区的 PS 幅值变化率显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 阳性药组大鼠海马区的 PS 幅值变化率显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) 酸枣仁汤组的 PS 幅值变化率在 5~35 min 显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) 见图 12。

4 讨论

焦虑是对未来威胁的预期, 为正常的人类情感, 但当其影响到行为或造成痛苦时则发展成为焦虑障碍^[17]。随着焦虑障碍发病机制的深入研究, 有学者发现恐惧的过度泛化是焦虑障碍的一个重要潜在病因^[18]。故本实验选择条件性恐惧致焦虑大鼠模型, 考察酸枣仁汤的抗焦虑作用。该模型基于巴甫洛夫

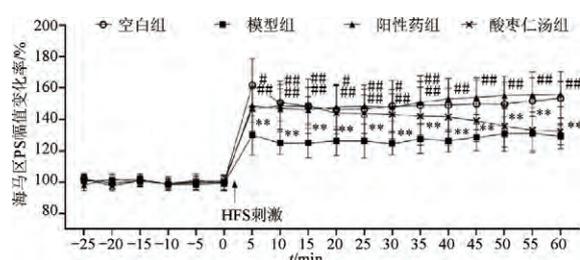
图12 各组大鼠海马区长时程增强检测($\bar{x} \pm s$ $n=9$)

Fig.12 Long-term potentiation detection of the hippocampus in rats of each group($\bar{x} \pm s$ $n=9$)

的条件反射建立,将较弱刺激通过训练与厌恶刺激建立条件反射,在没有刺激的情况下测量动物的行为,以评价其焦虑或恐惧的强度^[19-21]。在此模型基础上,本实验室前期进行了酸枣仁汤的药效学考察(剂量范围为 $1.25 \sim 20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),发现 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的酸枣仁汤具有显著的抗焦虑作用,故本实验选择此剂量进行后续研究。本实验行为学结果表明,酸枣仁汤能明显改善条件性恐惧致焦虑大鼠的焦虑样行为。

焦虑障碍的神经生物学机制非常复杂,其中,“谷氨酸学说”认为谷氨酸的兴奋性神经毒性是焦虑症的重要病理生理机制^[22]。其中谷氨酸的受体主要有两大类:离子型受体和代谢型受体,其中离子型受体主要包括NMDAR、AMPA以及海人藻酸受体(kainic acid receptor, KAR) 3种。NMDAR由GluNR1、GluNR2、GluNR3这3类亚基组成,AMPA主要有GluR1~GluR4这4种不同的亚基。中枢神经系统的兴奋性突触传递主要由NMDAR和AMPA介导。而突触传递效率的改变主要取决于突触前膜的神经递质释放量和聚集在突触后膜的相应受体数目。研究发现离子型谷氨酸受体NMDAR的竞争性拮抗剂AP5注射于杏仁核、内侧隔核、腹侧海马等部位表现出抗焦虑作用^[23]。本实验用ELISA测定大鼠海马组织中Glu和GABA的含量,结果显示酸枣仁汤可显著降低条件性恐惧致焦虑大鼠的Glu含量,并升高GABA含量,表明酸枣仁汤的抗焦虑作用机制可能与调节Glu和GABA含量有关。利用蛋白免疫印迹及qRT-PCR技术检测NMDAR和AMPA的表达,结果显示酸枣仁汤可显著降低条件性恐惧致焦虑大鼠的NMDAR和AMPA表达,表明酸枣仁汤发挥抗焦虑作用可能是通

过调节NMDAR和AMPA表达来实现的。

脑组织对刺激会产生适应性改变,这种改变也称为突触可塑性,突触可塑性包括突触功能可塑性和突触结构可塑性2个方面^[24-27]。突触功能可塑性的主要表现形式有LTP。LTP是在进行信号传输的过程中,2个神经元之间出现的持久的增强现象^[26]。突触的功能可塑性和结构可塑性被广泛认为是焦虑、抑郁、阿尔茨海默病等中枢神经系统相关疾病的病理基础之一^[28-30]。此外,突触可塑性的形成与谷氨酸神经递质的释放,谷氨酸相关受体密切相关。突触可塑性形成的机制研究表明,NMDAR依赖的LTP被认为是由于强直刺激使突触前大量神经递质谷氨酸同时释放,造成突触后神经元去极化,从而激活突触后NMDAR,使细胞内的 Ca^{2+} 浓度增大,使兴奋性突触后电流(excitatory post-synaptic current, EPSC)增加,通过一系列的细胞内机制,使突触传递效率LTP。NMDAR在LTP诱导和形成过程中起重要调控作用,与恐惧记忆习得和焦虑情绪调节密切相关,也在突触可塑性调节中发挥重要作用。本实验利用透射电镜和在体LTP检测技术分别考察了酸枣仁汤对焦虑大鼠海马区神经元的超微结构和LTP的变化,结果显示,酸枣仁汤可以明显改善焦虑大鼠海马区的突触形态结构,PS幅值变化率在一段时间内显著增加。突触的结构可塑性是功能可塑性的基础,因此,上述结果提示酸枣仁汤可能通过改善海马区的结构可塑性损伤,进而改善相关脑区突触功能可塑性。然而,突触可塑性的形成还与谷氨酸受体、钙离子/钙调素依赖性蛋白激酶II(Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II)、D-丝氨酸(D-serine, D-Ser)、胶质细胞等多种因素有关。本文初步探讨了酸枣仁汤对条件性恐惧致焦虑大鼠神经突触可塑性的影响,在后续研究中将进一步研究酸枣仁汤影响焦虑大鼠突触可塑性的其他因素。

[参考文献]

- [1] VOS T, FLAXMAN A D, NAGHAVI M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990—2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010[J]. Lancet, 2012, 380(9859): 2163.
- [2] 李锐铿. 药物、认知行为心理治疗联合应用于焦虑症患者的效果分析[J]. 中国实用医药, 2021, 16(27): 88.
- [3] HUANG Y Q, WANG Y, WANG H, et al. Prevalence of mental disorders in China: a cross-sectional epidemiological study [J].

- Lancet Psychiatry, 2019, 6(3): 211.
- [4] 武南南, 封芮芮, 张宇, 等. Synaptotagmin 1 基因敲除对小鼠行为的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2022, 38(2): 97.
- [5] LIMA E M, GOIS J, PAIVA M L, et al. Anxiety symptoms are the strongest predictor of quality of life in temporal lobe epilepsy [J]. Seizure, 2021, 88: 78.
- [6] 王浩博, 梁华, 李廷利, 等. 酸枣仁汤神经精神药理作用及临床应用[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(12): 198.
- [7] 耿欣, 杨悦, 叶晓楠, 等. 生与炒酸枣仁配伍对小鼠抗焦虑作用研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(8): 21.
- [8] 王艳艳, 汪郁琦, 闫金铭, 等. Box-Behnken 响应曲面法优化药对生-炒酸枣仁中总黄酮及总皂苷的提取工艺[J]. 化学工程师, 2020, 34(1): 10.
- [9] 张丽娟, 郭文成, 王艳艳, 等. 生与炒酸枣仁配伍对状态性焦虑模型大鼠行为学及单胺类和氨基酸类神经递质表达的影响[J]. 中医药学报, 2022, 50(2): 14.
- [10] 何伟, 刘瑜, 曹志宏, 等. 急救中心驾驶员创伤后应激障碍双侧海马体积变化研究[J]. 实用临床医药杂志, 2020, 24(24): 30.
- [11] BRAKE A D, YANG X, LEE C Y, et al. Reduced hippocampal volume and neurochemical response to adult stress exposure in a female mouse model of urogenital hypersensitivity [J]. Front Pain Res, 2022, 3: 809944.
- [12] 郭文成, 刘斌, 张丽娟, 等. 朱砂安神丸对条件性恐惧模型大鼠单胺类神经递质表达及其神经元 c-Fos 蛋白表达的影响[J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(1): 84.
- [13] YANG Y, WANG Y, BIAN H, et al. Effect of evaluation timing and duration of anxiety-like behaviors induced by conditioned fear in rats: assessment using the triple test [J]. Physiol Behav, 2022, 257: 113974.
- [14] 丁金兰, 韩芳, 石玉秀. 创伤后应激障碍大鼠杏仁核 LTP 及乙酰胆碱酯酶表达的变化[J]. 解剖科学进展, 2009, 15(2): 212.
- [15] 黄晏, 胡增晓, 刘港, 等. 六味地黄汤对 BALB/c 小鼠海马在体 LTP 的影响[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(5): 14.
- [16] 黄晏, 杨胜, 周文霞, 等. 小鼠在体海马长时程增强记录技术[J]. 中国应用生理学杂志, 2008, 24(3): 291.
- [17] BANDELOW B, BALDWIN D, ABELLI M, et al. Biological markers for anxiety disorders, OCD and PTSD: a consensus statement. Part I: neuroimaging and genetics [J]. World J Biol Psychiatry, 2016, 17(5): 321.
- [18] LISSEK S, KACZKURKIN A N, RABIN S, et al. Generalized anxiety disorder is associated with overgeneralization of classically conditioned fear [J]. Biol Psychiatry, 2014, 75(11): 909.
- [19] 兰嘉琦, 赵春阳, 吴镭, 等. 抗焦虑障碍药物非临床药效学评价体系探索[J]. 药学报, 2021, 56(4): 949.
- [20] WALF A A, FRYE C A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents [J]. Nat Protoc, 2007, 2(2): 322.
- [21] 李瑞洁, 张月月, 崔瑛. 黄连总碱片对实热焦虑模型的抗焦虑作用及机制[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(4): 2268.
- [22] STANIKA R I, PIVOVAROVA N B, BRANTNER C A, et al. Coupling diverse routes of calcium entry to mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(24): 9854.
- [23] 赵洪庆, 刘检, 孟盼, 等. 百合地黄汤对焦虑性抑郁症模型大鼠海马突触可塑性的影响[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(5): 1205.
- [24] 付雪琴, 兰瑞, 张勇, 等. 小续命汤对急性脑缺血再灌注大鼠突触可塑性的影响[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(14): 3882.
- [25] 连嘉惠, 张治楠, 梁丽艳, 等. 抑郁状态下海马突触可塑性变化及相关机制[J]. 医学综述, 2019, 25(13): 2541.
- [26] 孙树敏, 刘皓. 神经生长相关蛋白与突触可塑性[J]. 天津医科大学学报, 2007, 13(1): 118.
- [27] 陈伟恒, 陶长路, 时美玉, 等. 突触可塑性与脑疾病的神经发育基础[J]. 生命科学, 2014, 26(6): 583.
- [28] 邓洁, 李仲铭, 张航铭, 等. 神经可塑性与认知功能关系研究进展[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2019, 28(5): 462.
- [29] 胡梦芝, 江一静, 饶婷, 等. 基于突触可塑性探讨电针改善大鼠中动脉闭塞大鼠运动障碍的作用机制[J]. 世界中医药, 2022, 17(6): 790.
- [30] 王珏, 吴俞莹, 张新化. 海马突触可塑性与神经系统相关疾病关系的研究进展[J]. 神经解剖学杂志, 2019, 35(5): 557.

[责任编辑 马超一]