维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2006)04-0509-04

抗抑郁药物对抑郁模型大鼠海马星形胶质细胞的作用

王敏建，况　利，李大奇

（重庆医科大学附属第一医院心理卫生中心，重庆　400016）

【摘　要】目的：探讨抗抑郁药物对抑郁模型大鼠海马星形胶质细胞的作用及机制。方法：采用孤养与 CUMS 联合建立抑郁模型，旷场分析和液体消耗实验进行行为学观察。对抑郁模型进行氟西汀、噻奈普汀、生理盐水灌胃 30 天，GFAP 免疫组化观察星型胶质细胞数量。结果：应激＋氟西汀组、应激＋噻奈普汀组与应激＋生理盐水组比较旷场分析、液体消耗试验及免疫组化图像分析均有显著性差异。结论：抗抑郁药物能促进抑郁模型大鼠海马星形胶质细胞增生，星形胶质细胞可能参与抑郁症的病理生理机制。

【关键词】抑郁症；海马；氟西汀；噻奈普汀；星型胶质细胞

【中国图书分类法分类号】R749　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2006-03-03

Effect of antidepressant on astrocyte in the rat hippocampus of depression model

WANG Minjian, et al

(Center of Mental Health,the First Affiliated Hospital,Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To study the mechanism of antidepressant in the astrocyte in the rat hippocampus of depression model. *Mehtods:* The depression model of rat was produced by separation and chronic unpredicted mild stress.The behavior was measured by open-field and fliud consumption test. The number of astrocyte in hippocampus was assessed by GFAP immunohistochemisty after intragastric administration with fluoxetine,tianeptine and normal sodium for 30 days. *Results:* The number of astrocyte in hippocampus was decreased in stress group compared with normal group. After administration for 30 days, the number of astrocyte in hippocampus was increased in fluoxetine group and tianeptine group as compared with normal sodium group. *Conclusions:* Chronic antidepressant treatment significantly increases the astrocyte in the rat hippocampus of depression model.Astrocytes may be correlated with the pathophysiology of depression.

【Key words】Depression；Hippocampus；Fluoxetine；Tianeptine；Astrocyte

星形胶质细胞（Astrocyte，AST）作为中枢神经系统中数量最多的一类细胞，在中枢神经系统中占有非常重要的地位，对神经元有支持、营养、修复及维持离子平衡等作用，有效促进了神经元的生存，发育，再生和分化。目前研究表明神经元再生在成年哺乳动物海马（Hippocampal formation）脑区的降低是导致抑郁症发生的重要因素，抗抑郁药物或电休克治疗后能促神经元再生[1]，但作为对神经元正常发挥功能所必须的星形胶质细胞在抑郁症的病理生理过程和治疗中所发挥的作用还很少见报道。而 AST 不仅具有营养和保护神经元的作用，而且参与了脑的高级功能活动，是 CNS 功能活动中不可缺少的组成成分，故弄清楚抑郁症与海马胶质细胞的关系对抑郁症病理生理机制的了解、新型抗抑郁药物的研发有重要作用。本文就应激对大鼠海马胶质细胞以及抗抑郁药物对海马星形胶质细胞的作用进行探讨。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　成年雄性 SD 大鼠 40 只，由第三军医大学实验动物中心提供，体重 200 ± 20g。

1.1.2　药品　氟西汀（Fluoxetine），美国礼来亚洲公司生产，进口药品注册证编号 H20030004，20mg/ 片。噻奈普汀（Tianeptine），法国施维雅药厂生产，进口药品注册证编号

作者介绍：王敏建（1981-　），男，硕士生，
主要研究方向：心境障碍生物学机制，青少年心理。

基金项目：重庆市科委资助项目（渝科发计字[2004]54 号）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

BH20020470,12.5mg/片。

1.1.3 试剂 兔抗 GFAP 多克隆抗体来自 Santa Cruz 公司,SP 试剂盒、DAB 显色剂来自北京中杉公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及模型建立 大鼠购置后先熟悉饲养环境 1 周,每天人工触摸 2min。1 周后随机分为对照组、应激组、应激 + 生理盐水组、应激 + 氟西汀组、应激 + 噻奈普汀组,每组 8 只。行旷场分析、液体消耗试验,结束后对照组即取标本,余 32 只单笼饲养,行 21 天慢性不可预见性中等强度应激(CUMS)处理[2]。第 22 天行旷场分析、液体消耗试验,试验后应激组即取标本,应激 + 氟西汀组行氟西汀(1.8mg/kg/天)灌胃,应激 + 噻奈普汀组行噻奈普汀(3.375mg/kg/天)灌胃,应激 + 生理盐水组行等体积生理盐水灌胃,持续灌胃 4 周,4 周后行旷场分析和液体消耗试验,结束后均取标本。

1.3.2 旷场分析 (Open-field test) 及液体消耗试验(Fluid comsumption test) 旷场分析箱(80cm × 80cm × 40cm)周壁为黑色,底面为面积相等的 25 块方格,将大鼠放入中央格,观察 3min 活动情况。主要观察指标为中央停格时间、穿越格子数、站立次数、粪便粒数。另大鼠购置后熟悉环境期间,训练动物适应含糖饮水,每笼同时放置 2 个水瓶,第 1 天,两瓶均为 1% 蔗糖水,随后几天每笼大鼠 1 瓶 1% 蔗糖水,1 瓶纯水。在应激试验前 1 天,应激第 22 天,灌胃 4 周后进行动物的基础糖水、纯水消耗试验。计算动物的总液体消耗、糖水消耗、纯水消耗,最后计算大鼠的糖水偏爱(糖水偏爱 = 糖水消耗 / 总液体消耗 × 100%)[2]。

1.3.3 取材和免疫组化 麻醉动物,经左心室 - 主动脉插管,先用 100ml 生理盐水快速灌注冲洗,随后用 400ml4% 多聚甲醛 PBS 液,先快后慢,共需约 40 ~ 60min。小心开颅取脑并修块,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 48h。梯度酒精脱水、透明、石蜡包埋、冠状切片、片厚约 10μm。切片脱蜡至水,3% H_2O_2 封闭过氧化物酶,按照 SP 试剂盒上实验方法进行(GFAP 浓度 1:200),DAB 显色,苏木素复染,二甲苯透明,中性树胶封片。所有阴性照片不着色或者呈淡背景色。

1.3.4 图像分析

采用北航医学图像分析管理系例 - 真彩色病理图像分析系统(4.0),对免疫组化结果进行分析。指标包括平均灰度、平均光密度及面密度,灰度和光密度显示染色强度,面密度显示阳性面积。每只动物取五张切片,每张切片双测海马 CA1 区、CA3 区、齿状回(DG 区)平均值代表这张切片的值,五张切片的平均值为该只动物的值。

1.3.5 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验作统计学处理,检验标准采用 $\alpha = 0.05$。

2 结 果

2.1 旷场分析结果

旷场分析结果表明,应激后各指标均与应激前有极显著差异($P<0.01$),应激后表现出明显的抑郁状态,活动能力下降、兴趣丧失。经灌胃 4 周后应激 + 氟西汀组的中央停格时间、穿越格子数、站立次数与应激 + 生理盐水组比较有显著差异($P<0.05$),应激 + 噻奈普汀组的中央停格时间、穿越格子数与应激 + 生理盐水组比较有显著差异($P<0.05$),两者站立次数有极显著差异($P<0.01$)。应激 + 氟西汀组与应激 + 噻奈普汀组各指标无统计学差异。

2.2 液体消耗试验结果

液体消耗试验结果表明,应激后各指标均较应激前有极显著差异($P<0.01$),应激后表现出明显的快感缺乏。应激 + 氟西汀组糖水消耗与应激 + 生理盐水组有极显著差异($P<0.01$),两组在纯水消耗、糖水偏爱方面均有显著差异($P<0.05$),应激 + 噻奈普汀组与应激 + 生理盐水组在液体消耗试验中未发现显著差异,两组结果无统计学意义。应激 + 氟西汀组与应激 + 噻奈普汀组液体消耗试验结果无统计学差异。

表 1 旷场分析结果

组 别(n)	中央停格时间(s)	穿越格子数(个)	站立次数(次)	粪便粒数(粒)
应激前(32)	2.5 ± 0.7	45.1 ± 10.2	27.4 ± 5.5	4.3 ± 1.9
应激后(32)	6.1 ± 2.5**	26.3 ± 8.6**	12.5 ± 3.9**	7.1 ± 2.5**
应激 + 生理盐水组(8)	5.6 ± 1.7	28.1 ± 8.8	12.9 ± 3.8	6.4 ± 2.5
应激 + 氟西汀组(8)	4.2 ± 1.4△	36.8 ± 8.9△	18.4 ± 5.2△	4.9 ± 3.1
应激 + 噻奈普汀组(8)	4.0 ± 1.5△	37.6 ± 7.5△	19.4 ± 4.9△△	5.1 ± 2.5

**与应激应激前比较 $P<0.01$,△与应激 + 生理盐水组比较 $P<0.05$,△△与应激 + 生理盐水组比较 $P<0.01$

2.3 免疫组化图像分析

免疫组化图像分析结果显示应激组平均灰度值、面密度较对照组有极显著差异($P<0.01$),两组

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 液体消耗试验结果

组 别(n)	糖水消耗(ml/24h)	纯水消耗(ml/24h)	糖水偏爱(%)
应激前(40)	13.5 ± 3.8	3.1 ± 1.2	82.5 ± 6.8
应激后(32)	7.6 ± 3.2**	6.9 ± 2.2**	56.7 ± 13.4**
应激 + 生理盐水组(8)	9.8 ± 2.9	5.2 ± 1.4	65.3 ± 9.8
应激 + 氟西汀组(8)	12.6 ± 2.1△△	4.1 ± 0.8△	75.6 ± 7.9△
应激 + 噻奈普汀组(8)	11.5 ± 2.4	4.8 ± 0.9	72.5 ± 9.4

**与应激应激前比较 $P<0.01$,△与应激 + 生理盐水组比较 $P<0.05$,△△与应激 + 生理盐水组比较 $P<0.01$

表 3 GFAP 免疫组化结果

组 别(n)	平均灰度值	平均光密度	面密度
对照组(8)	155.8 ± 11.3	0.15 ± 0.03	0.0525 ± 0.0046
应激组(8)	173.0 ± 13.5**	0.13 ± 0.01*	0.0418 ± 0.0079**
应激 + 生理盐水组(8)	155.1 ± 10.5	0.15 ± 0.01	0.0476 ± 0.0074
应激 + 氟西汀组(8)	146.3 ± 9.1△	0.16 ± 0.04	0.0571 ± 0.0101△
应激 + 噻奈普汀组(8)	144.7 ± 11.4△	0.17 ± 0.02△	0.0595 ± 0.0093△△

*与应激前比较 $P<0.05$, ** 与应激应激前比较 $P<0.01$

△与应激 + 生理盐水组比较 $P<0.05$, △△与应激 + 生理盐水组比较 $P<0.01$

平均光密度有显著差异($P<0.05$)。应激 + 氟西汀组与应激 + 生理盐水组比较平均光密度、面密度有显著差异($P<0.05$),应激 + 噻奈普汀组与应激 + 生理盐水组比较平均灰度值、平均光密度有显著差异($P<0.05$),面密度有极显著差异($P<0.01$)。应激 + 氟西汀组与应激 + 噻奈普汀组图像分析结果无统计学差异。

3 讨 论

本实验采用单笼饲养与 CUMS 建立抑郁模型,应激后大鼠呈明显的活动能力下降、兴趣丧失、快感缺乏,抑郁动物模型建立可靠[2]。本实验中两种药物在旷场分析实验、液体消耗试验都未发现统计学差异,两药物疗效相当。胶原纤维酸性蛋白(GFAP)特异性地存在于 AST 中,且在活性 AST 中表达相对增多,本实验免疫组化结果表明抑郁模型大鼠海马 AST 较对照组明显减少,应激 + 氟西汀组、应激 + 噻奈普汀组较应激 + 生理盐水组显著增多,氟西汀与噻奈普汀抗抑郁机理完全不同,但都对海马 AST 有促增生作用。应激组 AST 数量少于对照组,GFAP 深染,也有文献报道短期应激后 AST 增加,随着应激时间增加,GFAP 阳性 AST 数量下降[3],可能是长期应激使 AST 调亡或死亡大大超过了增殖所致。

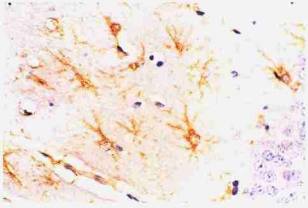


图 1 (应激组)GFAP 免疫组化 SP 法 × 400

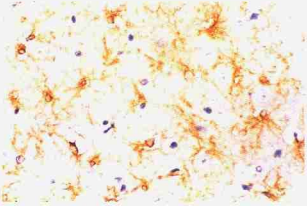


图 2 (应激+氟西汀组)GFAP 免疫组化 SP 法×400

脑的功能活动不是神经元网络单独完成,而是由相互作用的神经元和胶质细胞构成的神经元 – 胶

维普资讯 http://www.cqvip.com

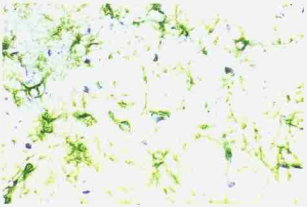


图 3 (应激+噻奈普汀组)GFAP 免疫组化 SP 法×400

质信号网络实现的,在中枢神经系统中,突触周围一般都有 AST 的突起包绕。GFAP 阳性 AST 在正常海马结构内呈明显的板层构筑形式的规则排列,这种有序性有利于神经元与 AST 之间建立固定的位置关系和稳定的功能关系,从而更好地调节神经元的功能。AST 可以通过这些变化来改变其与神经元之间的生理联系,进而影响突触的可塑性,发挥其对神经信息的调节作用[6]。实验中也发现应激组 GFAP 阳性 AST 排列紊乱,GFAP 染色较深,有可能也是导致抑郁的一个因素,应激导致 AST 表形改变,合成大量 GFAP,但我们实验发现经抗抑郁药物 4 周治疗后,海马 AST 排列仍不规则。

我们实验中发现氟西汀和噻奈普汀都能促 AST 增生,两种药物对 AST 的具体作用机制尚不明确。抗抑郁药物不仅作用于神经元,通过各种途径对神经递质、细胞因子等产生的作用还可影响 AST,甚至可通过胶质细胞发挥更大的抗抑郁作用。有实验表明[9]细胞培养发现氟西汀可以促进神经干细胞、AST 的增殖,这可能是其治疗抑郁症的重要机制之一。氟西汀能独立迅速激活细胞外信号调节激酶(ERK)和 P38,刺激大鼠脑 AST 内促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号级联系统,最终在转录水平诱导调节神经蛋白的基因,使大鼠胶质细胞源性神经生长因子 mRNA (GDNFmRNA) 上调,促 GDNF 释放,促进神经存活,保护应激损伤的神经元[6]。神经胶质 5-HT 转运体(SERT)在 5-HT 重吸收中起重要作用,RT-PCR 表明胶质细胞表达 SERT 的 mRNA 与神经元表达 SERT 的 mRNA 同样具有特征性,胶质细胞的 5-HT 重吸收机制可能与神经元相同。氟西汀可能抑制 AST 的 5-HT 重吸收,但噻奈普汀促进 5-HT 重吸收与氟西汀在 5-HT 重吸收方面机制不同[7],且噻奈普汀对于细胞培养方面的研究资料尚不足,故噻奈普汀对于海马 AST 增殖作用具体机理更有待研究。

实验表明慢性应激使大鼠海马结构表达 GFAP 阳性 AST 减少,长期抗抑郁药物能促进大鼠脑海马表达 GFAP 阳性 AST 的增多,AST 可能参与抑郁症的病理生理以及治疗过程。如果能弄清楚抑郁症与 AST 的关系将为今后抑郁症的发病机制研究、治疗药物的开发与选择提供新的理论依据,但是其具体的理论机制尚需进一步的实验研究证实。

[通讯作者:巩利(1962-),女,教授,主要研究方向:精神疾病生物学机制,医学心理学。]

参 考 文 献

[1] Malberg JE, Schechter LE. Increasing hippocampal neurogenesis: a novel mechanism for antidepressant drugs[J]. Curr-Pharm-Des, 2005; 11(2): 145-155.

[2] 许 晶,李晓铁.慢性应激抑郁模型的建立及评价[J].中国行为医学科学,2003;12(1):14-16.

[3] 宿长军,段 丽,陵志仁,等.大鼠束缚后脑内星形胶质细胞的反应[J].神经解剖学杂志,2004;20(5):459-462.

[4] 胡 容,吴喜贵,杨 忠,等.大鼠星形胶质细胞在突触形成中的作用及机制[J].解剖学报,2005;36(3):225-230.

[5] Benninghoff J,Schmitt A,Mossner R,et al. When cells become depressed: focus on neural stem cells in novel treatment strategies against depression[J].J Neural Transm, 2002;109(5.6):947-962.

[6] Mercier G,Lennon AM,Renouf B,et al. MAP kinase activation by fluoxetine and its relation to gene expression in cultured rat astrocytes [J]. J Mol Neurosci, 2004;24(2):207-216.

[7] Preskorn SH.Tianeptine: a facilitator of the reuptake of serotonin and norepinephrine as an antidepressant[J]. J-Psychiatr-Pract, 2004; 10(5): 323-330.