



开心散对慢性应激抑郁模型大鼠学习记忆的影响

刘明^{1,2}, 闫娟娟^{1,2}, 周小江¹, 胡园¹, 刘屏^{1*}

(1. 解放军总医院 临床药理研究室, 北京 100853; 2. 天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] **目的:**研究经典古方开心散对慢性应激抑郁模型(CMS)大鼠学习记忆能力的影响及可能的作用机制。**方法:**将大鼠随机分为正常组、模型组、阳性药物组(盐酸氟西汀 10 mg·kg⁻¹)、开心散各剂量组(1 000, 500, 250, 125 mg·kg⁻¹), 建立 CMS 大鼠模型, 连续灌胃 21 d; 采用糖水消耗试验、旷场试验评价开心散抗抑郁行为学活性, 采用 Morris 水迷宫评价开心散对 CMS 大鼠学习记忆能力的影响, 并测定各组大鼠全脑中单胺类递质、乙酰胆碱(Ach)和乙酰胆碱酯酶(AchE)活性和海马中脑源性神经营养因子(BDNF)蛋白水平。**结果:**行为学测试结果表明开心散能明显提高 CMS 大鼠的糖水偏好度和旷场试验总路程, 明显缩短 Morris 水迷宫定位导航的潜伏期, 增加空间探索中的穿越平台次数、原平台所在象限游泳距离和时间; 增加动物全脑中 5-羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)、去甲肾上腺素(NE)和 Ach 的含量, 并提高海马内 BDNF 的水平, 减少 AchE。**结论:**开心散可明显改善 CMS 大鼠的抑郁行为, 增强 CMS 大鼠学习记忆的能力, 其作用的机制可能与增加全脑中单胺递质和 Ach 含量, 提高海马神经营养能力有关。

[关键词] 慢性应激抑郁模型; Morris 水迷宫; 学习记忆; 开心散

认知功能障碍是抑郁症一个主要共存症状, 涉及注意力、记忆功能、执行力功能等多个方面。经抗抑郁治疗后, 由于抑郁引起的某些认知功能损害会有所改善, 但不能达到正常水平, 特别是记忆功能和执行力功能。目前还没有抗抑郁药物对认知功能障碍有着持久而稳健的作用。研究表明, 单胺类神经递质对注意力、记忆力和反应能力有着重要的调节作用^[1]; 中枢胆碱能系统与信息存储和回忆密切相关, 且该系统也参加了对精神活动的调节^[2]; 脑源性神经营养因子(BDNF)通过调控神经细胞的生长和发生, 对抗慢性应激抑制的海马区神经细胞再生及突触可塑性, 保护应激引起的神经元损伤, 影响学习记忆的功能^[3]。

开心散是一首治疗中医情志病的代表方, 由人参、远志、茯苓、石菖蒲组成, 前期研究发现开心散表现出了明显的抗抑郁作用^[4-7], 但其对抑郁模型动物认知能力影响的研究尚未见报道。本文采用慢性应激方法建立大鼠抑郁模型, 采用 Morris 水迷宫评价

慢性应激大鼠抑郁发生发展过程中学习记忆能力的变化以及开心散对其的影响, 并探讨可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠, 雄性, 体重 180 ~ 220 g, 由解放军总医院实验动物中心提供, 合格证号 SCXK(京) 2009-0007。

1.2 药品 开心散提取物, 1 g 相当于 7.14 g 生药。由中国中医科学院提供, 批号 20091012; 盐酸氟西汀片由常州四药制药厂提供, 批号 20091106。

1.3 仪器及试剂 旷场试验视频分析系统和 Morris 水迷宫均由上海移数公司提供; 5-羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)、去甲肾上腺素(NE)、乙酰胆碱(Ach)、乙酰胆碱酯酶(AchE)的 ELISA 试剂盒均来自 R&D 公司; 脑源性神经营养因子(BDNF)多克隆抗体购自 Abcom 公司(ab46176)。

2 方法

2.1 慢性应激抑郁大鼠模型的建立^[8-9] 建立慢性应激大鼠模型前, 采用旷场试验筛选出水平得分和垂直得分相近的大鼠进行慢性应激试验。

2.2 动物分组、造模及给药 将筛选出的合格大鼠, 随机分为正常组、模型组、阳性药物组(盐酸氟西汀 10 mg·kg⁻¹)、开心散各剂量组(1 000, 500, 250, 125 mg·kg⁻¹), 每组 10 只。正常组每笼 5 只饲养, 正常饮食饮水, 不给任何刺激; 其余组每笼 1

[稿件编号] 20110826018

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2008ZXJ09004-028)

[通信作者] *刘屏, 博士生导师, Tel/Fax: (010) 66936676, E-mail: liuping126@126.com

[作者简介] 刘明, 硕士研究生, Tel: (010) 66936678, E-mail: liuming342523@163.com



只孤养,并每日接受不可预知的应激刺激 1 次,包括:高速水平震荡 15 min,冰水游泳(10 ℃)5 min,停食 24 h,24 h 不间断照明,停水 24 h,45°倾斜鼠笼 12 h,束缚 2 h 等。从试验第 22 天开始给予灌胃开心散,每日 1 次,应激刺激期给药 14 d;Morris 水迷宫测定期继续给药 7 d,共给药 21 d。正常组和模型组每天灌胃等体积蒸馏水。

2.3 糖水消耗试验 参照文献方法^[10],分别于试验第 0,21,35 天,进行糖水消耗试验。经停食停水 24 h 后进行糖水消耗试验:同时给予每只大鼠事先定量的 1% 蔗糖水和纯水各 1 瓶。60 min 后取出,记录蔗糖水消耗量(g),纯水消耗量(g)。计算动物的蔗糖偏嗜度。

2.4 旷场试验 于试验的第 35 天利用旷场试验行为分析系统记录大鼠在 3 min 内活动的总路程。

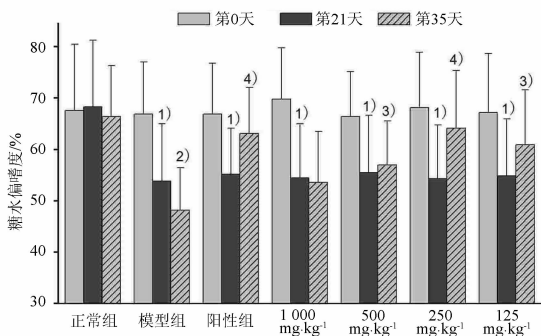
2.5 Morris 水迷宫行为学测定 参照文献方法^[11],从试验第 36 天到第 40 天为 Morris 水迷宫训练,每天训练 1 次;于第 41 天进行定位航行试验,记录大鼠 120 s 内找到平台所需的时间(即潜伏期);第 42 天撤出平台,进行空间探索试验,记录大鼠在 120 s 内穿越原平台所在位置的次数,原平台所在象限游泳距离和时间。

2.6 样品采集及相关物质的测定 行为学测试结束后,在冰上剥离大脑,平分左右脑,取左半脑,称重后加入脑重的 9 倍量生理盐水匀浆,低温离心 10 min,取上清置于 -20 ℃ 冻存;右脑分离海马并称重,置于 -80 ℃ 冻存,待测。按试剂盒说明书测定脑匀浆上清液中 5-HT,DA,NE,Ach,AchE 的含量。用 Western-blot 法检测大鼠海马中 BDNF 的表达水平。

2.7 数据统计 实验数据采用单因素方差分析,组间差异采用 Dunnett's 后检验,量反应资料数据 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 开心散对糖水偏嗜度的影响 在第 0 天各组之间糖水偏嗜度没有显著性差异;在第 21 天,与正常组相比,应激刺激组的大鼠糖水偏嗜度均显著下降($P < 0.05$);在第 35 天,阳性组和开心散 125 ~ 500 mg · kg⁻¹ 组的偏嗜度较模型组升高($P < 0.05$),以开心散 250 mg · kg⁻¹ 组为最佳剂量组($P < 0.01$),见图 1。



与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (图 2~4,表 1,2 同)。

图 1 开心散对 CMS 大鼠糖水偏嗜度的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Fig. 1 Effect of Kaixin San(KXS) treatment on the percentage of sucrose consumption in CMS rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.2 开心散对旷场试验中总路程的影响 模型组大鼠运动的总路程明显少于正常组($P < 0.01$),阳性组和开心散各个剂量组均明显增加大鼠运动总路程($P < 0.01$),见图 2。

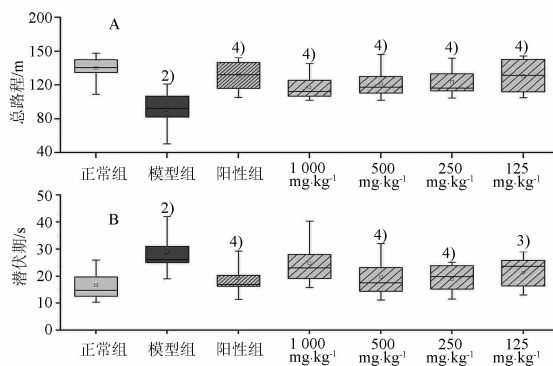


图 2 开心散对 CMS 大鼠在旷场试验中总路程的影响(A)和在定位导航试验中潜伏期的影响(B)($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effects of KXS treatment on the total distance in the open-field test (A) and the latency in the hidden platform test (B) in Morris water maze testing($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.3 开心散对 Morris 水迷宫定位导航试验中潜伏期的影响 模型组潜伏期明显长于正常组($P < 0.01$);与模型组比较,阳性组和开心散 125 ~ 500 mg · kg⁻¹ 组均能明显地缩短潜伏期($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),见图 2。

3.4 开心散对大鼠在 Morris 水迷宫空间探索的影响 与模型组比较,阳性组、开心散均可明显增加穿

越平台次数、原平台所在象限游泳距离和时间 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 见表 1。

表 1 开心散对 CMS 大鼠在 Morris 水迷宫空间探索中的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of KXS treatment on the probe trial testing in Morris water maze test in CMS rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg · kg ⁻¹	穿越平台 次数	原平台所在象 限游泳距离/m	原平台所在象 限游泳时间/s
正常	-	4.25 ± 1.64	6.99 ± 1.45	43.68 ± 9.31
模型	-	1.88 ± 0.78 ²⁾	4.91 ± 1.04 ²⁾	27.09 ± 7.59 ²⁾
阳性	10	3.89 ± 1.37 ⁴⁾	6.63 ± 1.15 ⁴⁾	38.74 ± 7.40 ⁴⁾
开心散	1 000	2.25 ± 0.97	6.20 ± 1.02 ³⁾	33.99 ± 6.46
	500	3.25 ± 1.20 ³⁾	6.30 ± 1.12 ³⁾	36.76 ± 7.85 ³⁾
	250	3.75 ± 0.97 ⁴⁾	6.75 ± 1.15 ⁴⁾	41.19 ± 9.53 ⁴⁾
	125	3.11 ± 1.20 ³⁾	6.03 ± 0.94 ³⁾	37.00 ± 8.66 ³⁾

3.5 开心散对 CMS 大鼠全脑中单胺类递质的影响
与正常组相比, CMS 可明显降低模型大鼠全脑中 5-HT, DA 及 NE 的含量 ($P < 0.01$), 开心散 (250 ~ 1 000 mg · kg⁻¹) 组可明显升高 CMS 大鼠全脑中 5-HT 和 DA 的含量 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 开心散 (125 ~ 500 mg · kg⁻¹) 组可明显升高 CMS 大鼠全脑中 NE 的含量 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 开心散对 CMS 大鼠全脑中 5-HT, DA, NE 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of KXS treatment on 5-HT, DA, NE levels in brain of CMS rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg · kg ⁻¹	5-HT /ng · L ⁻¹	DA /ng · L ⁻¹	NE /ng · L ⁻¹
正常	-	707.2 ± 56.3	82.97 ± 11.41	122.09 ± 5.60
模型	-	471.2 ± 76.3 ²⁾	59.74 ± 10.34 ²⁾	71.73 ± 9.31 ²⁾
阳性	10	690.9 ± 30.7 ⁴⁾	80.78 ± 11.33 ⁴⁾	118.77 ± 18.68 ⁴⁾
开心散	1 000	680.1 ± 46.4 ⁴⁾	75.52 ± 10.22 ⁴⁾	80.77 ± 9.83
	500	726.6 ± 70.0 ⁴⁾	78.65 ± 8.93 ⁴⁾	88.55 ± 10.17 ⁴⁾
	250	549.1 ± 56.2 ³⁾	82.42 ± 10.68 ⁴⁾	101.49 ± 12.44 ⁴⁾
	125	537.2 ± 69.4	69.85 ± 9.21	116.30 ± 19.20 ⁴⁾

3.6 开心散对 CMS 大鼠全脑中 Ach 和 AchE 含量的影响
大鼠脑浆上清中 Ach 和 AchE 含量检测结果显示, 与模型组相比, 阳性组和 250 ~ 1 000 mg · kg⁻¹ 开心散可显著升高大鼠全脑中 Ach ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 125 和 1 000 mg · kg⁻¹ 开心散可降低全脑中 AchE ($P < 0.01$), 见图 3。

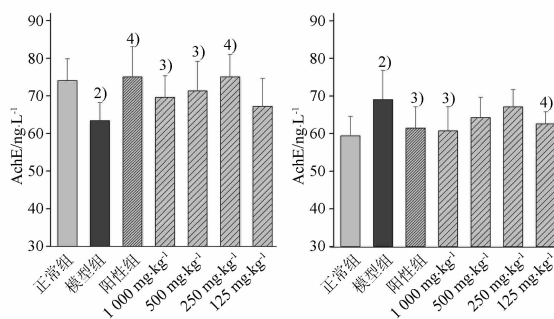


图 3 开心散对 CMS 大鼠全脑中 Ach, AchE 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Effects of KXS treatment on Ach, AchE levels in brain of CMS rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.7 开心散对 CMS 大鼠海马 BDNF 表达的影响
与正常组比较, 模型组大鼠海马中 BDNF 表达明显降低, 与模型组相比, 阳性组和开心散 250 mg · kg⁻¹ 组可显著升高大鼠海马的 BDNF 表达 ($P < 0.01$), 见图 4。

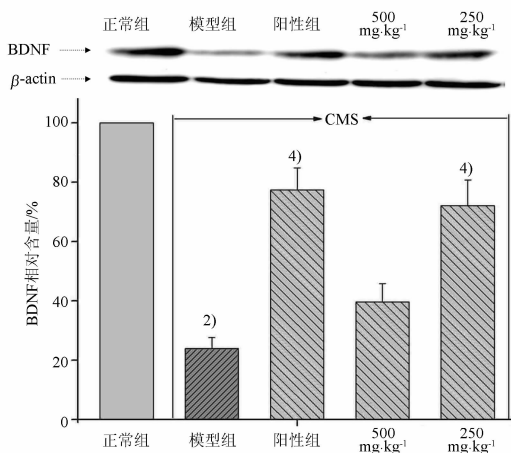


图 4 开心散对 CMS 大鼠海马 BDNF 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 4 Effect of KXS treatment on brain-derived neurotrophin factor (BDNF) expression in the hippocampus of CMS rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

4 讨论

不可预知慢性应激 (CMS) 模型模拟了抑郁症的环境诱因, 模型动物的行为特征改变模拟了人类抑郁症的核心症状, 大鼠在旷场中活动减少反映了抑郁症病人精神运动迟滞的症状, 对糖水摄入的减少反映了抑郁症患者兴趣缺失, 并且二者都还伴有



体重下降等症状^[12]。本研究表明开心散能显著增加 CMS 大鼠蔗糖偏嗜度,增加旷场试验中大鼠总路程,以上结果表明,开心散可以明显改善 CMS 所致抑郁大鼠的行为学症状。

实验结果表明,CMS 大鼠在 Morris 水迷宫定位导航试验中潜伏期明显延长,空间探索试验中原平台所在象限游泳距离和时间显著缩短,提示慢性应激造成大鼠学习记忆障碍。而给予开心散治疗的大鼠,明显缩短 Morris 水迷宫定位导航的潜伏期,增加空间探索穿越平台次数、原平台所在象限游泳距离和时间。该结果显示了开心散能减轻慢性应激造成的大鼠学习记忆能力的降低。

研究证实,单胺类递质之间相互制约处于平衡状态对学习记忆有着密切关系,慢性应激导致大鼠全脑中单胺类递质含量减少,打破递质之间的平衡状态,损伤学习记忆^[13]。本研究表明,开心散可逆转由慢性应激导致 NE,5-HT,DA 含量的下降,提示开心散可能参与调节全脑中单胺类递质的代谢,维持递质之间的平衡状态,以达到提高大鼠学习记忆能力。

乙酰胆碱(Ach)是中枢胆碱能神经系统主要的神经递质,通过 Ach 受体发挥生物学效应,Ach 由胆碱乙酰基转移酶(ChAT)合成,经乙酰胆碱酯酶(AchE)分解失活,ChAT 与 AchE 共同维持着 Ach 的动态平衡,这是维持学习记忆正常进行的必要条件^[14]。黄玉芳等^[15]发现,开心散能够显著抑制记忆获得障碍模型小鼠脑组织的 AchE 活性,限制了 Ach 降解,使模型小鼠记忆的改善。本研究结果跟上述研究结果一致,提示开心散改善动物记忆功能的作用与调节胆碱能神经系统的功能有关。

目前研究表明,慢性应激导致大鼠海马区 BDNF 表达明显降低^[16],对慢性应激大鼠抗抑郁治疗后可使大鼠海马中 BDNF 的表达升高^[10]。此外,BDNF 与学习记忆关系已备受关注。研究发现,BDNF 通过前脑胆碱能神经系统对学习记忆发挥作用。BDNF 能增加大鼠海马胆碱能突触体释放 Ach,说明 BDNF 对胆碱能神经元具有正向性效应^[17]。本研究显示慢性应激大鼠海马中 BDNF 表达和全脑中 Ach 含量均显著降低。灌胃 250 mg · kg⁻¹ 开心散不仅使大鼠海马 BDNF 的表达明显提高,而且也使全脑中 Ach 含量得到明显升高。因此 BDNF 和 Ach 具有相同的变化趋势,进一步映证了

BDNF 与 Ach 之间存在正反馈作用^[18]。

综上,慢性不可预知应激刺激可导致动物抑郁行为,并表现出明显的学习记忆能力的降低。给予开心散治疗后能显著改善抑郁模型动物的行为学和学习记忆能力的异常,表现出抗抑郁及改善抑郁造成的认知功能缺损的作用。其作用机制可能与其增加全脑中单胺神经递质含量,调节中枢胆碱能系统,提高海马 BDNF 表达水平。

[参考文献]

- [1] 温福春,许家洁,王玉红,等. 安神补脑液对未成年小鼠学习记忆功能及脑内单胺神经递质含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(2):46.
- [2] 王敏建,祝利,黎雪梅,等. 噻奈普汀对抑郁模型大鼠学习记忆能力及海马胆碱能纤维的作用[J]. 中国行为医学科学,2006,15(5):426.
- [3] 马允香. 抑郁症神经生物学机制研究进展[J]. 河北医科大学学报,2006,27(6):594.
- [4] 刘屏,汪进良,王燕,等. 开心散类方配伍及抗抑郁作用研究[J]. 中华中医药杂志,2005,20(5):279.
- [5] 汪进良,刘屏,陈孟莉,等. 开心散对强迫游泳小鼠中枢神经递质及血浆皮质醇的影响[J]. 北京中医药大学学报,2005,28(2):36.
- [6] Hu Yuan, Liu Ping, Guo Daihong, et al. Behavioral and biochemical effects of Kaixin-San, a traditional Chinese medicinal empirical formula[J]. Drug Dev Res,2008,69:267.
- [7] 汪进良,刘屏,王东晓,等. 开心散对慢性应激大鼠行为及海马 p-CREB 表达的影响[J]. 中国中药杂志,2007,32(15):1555.
- [8] Paul Willner. Validity reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation[J]. Psychopharmacology,1997,134:319.
- [9] Yuan Hu, Liao Hong-Bo, Guo Dai-Hong, et al. Antidepressant-like effects of 3,60-disinapoyl sucrose on hippocampal neuronal plasticity and neurotrophic signal pathway in chronically mild stressed rats [J]. Neurochem Int, 2010,56(3):461.
- [10] Qing-Qiu Mao, Zhen Huang, Xiao-Ming Zhong, et al. Effects of SYJN, a Chinese herbal formula, on chronic unpredictable stress-induced changes in behavior and brain BDNF in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2010,128:336.
- [11] Charles V Vorhees, Michael T Williams. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory[J]. Nat Protoc, 2006,1(2):848.
- [12] Gal Yadid, Rachel Nakash, Llana Deri, et al. Elucidation of the neurobiology of depression: insights from a novel genetic animal model[J]. Prog Neurobiol,2000,62:353.
- [13] BIRTHELMER A, STEMMELIN J, JACKISCH R, et al. Presynaptic modulation of acetylcholine, noradrenaline, and serotonin release in the hippocampus of aged rats with various levels of memory im-



- pairments[J]. *Brain Res Bull*, 2003, 60 (3):283.
- [14] 王永丽,魏芳,贾庆忠,等. 不同工艺醇提的定志小丸对老龄小鼠学习记忆的影响及机制研究[J]. *中国药理与临床*, 2008, 4(1):4.
- [15] 黄玉芳,卞慧敏,刘涛,等. 开心散对记忆障碍小鼠脑组织一氧化氮、胆碱酯酶含量的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2001, 24(4):40.
- [16] L Xiao, C Shu, J Tang, et al. Effects of different CMS on behaviors, BDNF/CREB/Bcl-2 expression in rat hippocampus[J]. *Biomed Aging Pathol*, 2011, 1(3):138.
- [17] Takei N, Kuramoto H, Endo Y, et al. NGF and BDNF increase the immunoreactivity of vesicular acetylcholine transporter in cultured neurons from the embryonic rat septum[J]. *Neurosci Lett*, 1997, 226(3):207.
- [18] Knipper M, Berzaghi M P, Blochl A, et al. Positive feedback between acetylcholine and the neurotrophins nerve growth factor and brain derived neurotrophic factor in the rat hippocampus[J]. *Eur J Neurosci*, 1994, 6(2):668.

Effect of Kaixin San on learning and memory in chronic stress depression model rats

LIU Ming^{1,2}, YAN Juanjuan^{1,2}, ZHOU Xiaojiang¹, HU Yuan¹, LIU Ping^{1*}

(1. Department of Clinical Pharmacology, Center of Pharmacy, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China;
2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of classic ancient prescription Kaixin San (KXS) on learning and memory abilities in chronic stress depression model rats and its possible mechanisms. **Method:** Rats were randomly assigned to six groups: the control group, the model group, the positive drug group (fluoxetine 10 mg · kg⁻¹) and KXS groups (1 000, 500, 250, 125 mg · kg⁻¹). KXS were orally administrated to CMS rats for 21 days. The anti-depression activity of KXS was assessed using the sucrose consumption and the open-field test. The protecting effect for learning and memory abilities was assessed using the Morris water maze (MWM) test. Furthermore, the levels of monoamine neurotransmitters, acetylcholine (Ach) and acetyl cholinesterase (AchE) in the total brain and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein in the hippocampus were determined. **Result:** The behavior test showed that KXS significantly increased the sucrose consumption and total distance in the open-field test and notably reduce the incubation period of location and navigation in the MWM test. It could also help increase the number of times passing through the platform, the swimming distance and time in quadrant of original platform, the levels of serotonin (5-HT) and dopamine (DA), noradrenergic (NE), Ach, BDNF protein and reduce the level of AchE in the CMS-induced rats. **Conclusion:** KXS can ameliorate the CMS-induced depression behavior in rats and improved their learning and memory abilities, which may be related to the increase in monoamine neurotransmitters, Ach and BDNF levels.

[Key words] chronic stress depression model; Morris water maze; learning and memory; Kaixin San

doi:10.4268/cjmm20121619

[责任编辑 张宁宁]