

氟西汀对卒中后抑郁大鼠行为学及海马神经元凋亡的影响

赵立波¹, 徐露^{2*}, 车科珂², 覃彬³ (1.重庆市第三人民医院, 重庆 400014; 2.重庆医科大学生化与分子药理学重点实验室, 重庆 400016; 3.重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆 400016)

摘要: 目的 探讨以氟西汀为代表的 SSRIs 对卒中后抑郁(post-stroke depression, PSD)大鼠行为学和神经元凋亡的影响。
方法 用大脑中动脉线栓法(MCAO)建立大鼠局灶性脑缺血模型, 再结合慢性不可预见的温和性应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)和孤养法建立 PSD 模型, 加以 10 mg·kg⁻¹ 氟西汀干预。比较各组大鼠体质量与糖水消耗量; 旷野实验测定直立活动和水平活动得分; 流式细胞仪分析神经元细胞的凋亡率。**结果** 应激 14 d 后, 与 PSD 组大鼠比较, 氟西汀干预组大鼠体质量和糖水消耗比例低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 水平和垂直试验得分下降($P<0.01$), 海马神经元凋亡率较高($P<0.01$)。**结论** 氟西汀对 PSD 有一定的治疗作用。

关键词: 卒中后抑郁; 氟西汀; 神经元凋亡

中图分类号: R964 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2014)07-0794-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.07.005

基金项目: 重庆市卫生局 2011 年医学科研计划项目(2011-3-323); 重庆市第六届“步长杯”脑血管病科学研究基金面上项目(BCB2012010)

作者简介: 赵立波, 男, 博士, 主任医师 Tel: 13618233732 E-mail: 1154289840@qq.com *通信作者: 徐露, 女, 博士, 讲师 Tel: (023)63508680 E-mail: 106334600@qq.com

Effects of Fluoxetine on the Ethology and Apoptosis of Hippocampal Neurons in Rats with Post-stroke Depression

ZHAO Libo¹, XU Lu^{2*}, CHE Keke², QIN Bin³(1.Department of Neurology, Third People's Hospital of Chongqing City, Chongqing 400014, China; 2.Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3.Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To discuss the effects of fluoxetine as the representative of SSRIs on the ethology and apoptosis of hippocampal neurons in rats with post-stroke depression(PSD). **METHODS** The focal cerebral ischemia novel model was set up by blocking the middle cerebral artery(MCAO) and then the rats in model group were separately raised and put into chronic unpredictable mild stress(CUMS) for inducing the PSD model. Rats in PSD+fluoxetine group were administered 10 mg·kg⁻¹ fluoxetine, ip. Weights, sugar-water consumption, locomotor activity and apoptosis rate of hippocampal neurons were detected respectively. **RESULTS** On the 14th day after CUMS, the PSD group showed significantly less weights, locomotor activity and sugar-water consumption($P<0.05$ or $P<0.01$) and higher apoptosis rate of hippocampal neurons compared with the PSD+fluoxetine group($P<0.01$). **CONCLUSION** Fluoxetine is effective for the treatment of PSD.

KEY WORDS: post-stroke depression; fluoxetine; apoptosis of hippocampal neurons

在脑卒中的并发症中,卒中后抑郁(post-stroke depression, PSD)的发病率高达30%以上,而且PSD直接影响了运动功能、认知功能的康复^[1]。有报道^[2],卒中患者9年生存率为35.7%,应用抗抑郁药物氟西汀的患者生存率增至67.9%。PSD正成为脑血管病整体治疗中一个严重问题,需要给予全面的认识和充分的诊治。本研究用大脑中动脉线栓法(middle cerebral artery occlusion, MCAO)建立大鼠脑缺血模型,结合慢性不可预见的温和性应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)和孤养法,建立PSD大鼠模型,从而探讨氟西汀对PSD大鼠行为学及海马神经元凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

60只成年健康SD大鼠,♂,体质量(220±20)g,由重庆医科大学动物中心提供,动物合格证号:XCXK(渝)20020001。氟西汀(美国礼来公司,批号:A067371);流式细胞仪(美国贝尔曼库尔特有限公司)。

60只大鼠随机分为5组,对照组12只:进行假手术处理;抑郁组12只:CUMS结合孤养法建立慢性应激抑郁模型;将成功建立的脑缺血大鼠随机再分为3组:卒中组12只、PSD组12只(MCAO术后第2天加以CMUS结合孤养法)、氟西汀组12只(每日以10 mg·kg⁻¹氟西汀腹腔注射干预)。

1.2 方法

1.2.1 建立PSD模型 ①MCAO模型建立:参考

罗勇等^[3-4]的方法,采用插线法建立局灶性脑缺血/再灌注模型;②慢性不可预见的温和性应激模型建立:参考Willner等^[5]的方法,实验动物进行为期21d的慢性应激试验,第1天禁水,第2天夹尾,第3天冰水游泳,第4天振荡,第5天昼夜颠倒,第6天禁食,第7天热烘,第8天禁水,第9天热烘,第10天禁食,第11天昼夜颠倒,第12天冰水游泳,第13天振荡,第14天夹尾,第15天禁水,第16天冰水游泳,第17天夹尾,第18天热烘,第19天昼夜颠倒,第20天禁食,第21天振荡。③孤养法:将抑郁和PSD大鼠单笼饲养。

1.2.2 行为学观察 ①体质量指标的测量:于应激开始前和应激第7,14,21天测量大鼠的体质量;②糖水实验:于应激前和应激第7,14,21天进行糖水消耗实验。测定断水24h后,饮用1%蔗糖溶液的量,蔗糖溶液的饮用量反映了大鼠快感反应;③旷野实验:于应激前、应激第7,14,21天进行旷野实验。旷野试验的水平活动反映了大鼠的运动活动性水平,垂直活动的多少则反映其兴趣高低^[6]。

1.2.3 流式细胞仪测定缺氧海马神经元凋亡率 分别于21d和28d时,各分批处死6只大鼠。动物断头取脑,将新鲜缺血侧脑组织在冰冷的PBS液中研磨,研磨后匀浆用PBS稀释为10 mL。反复用大号吸管吹打30次,再沉淀5 min,取1 mL上清液,用400目尼龙网过滤2次,制成单细胞悬液,以1 000 r·min⁻¹的速度离心10 min,使得细

胞浓度为 $2 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。取 1 mL 细胞悬液加入 RNase($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)，在 37°C 水浴中孵育 30 min，PBS 冲洗 2 次。再次离心，用 0.4 mL PBS 溶解沉淀，加入 $400 \mu\text{g PI}(50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ 。在 4°C 避光条件下进行 30 min 的 DNA 染色，用流式细胞仪检测细胞凋亡率，氩离子激发光波长 488 nm，测定每样本计数 10 000 个细胞，经计算机系统分析出凋亡率。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 18.0 软件，结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，各组数据组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 大鼠体质量

大鼠 MACO 术后 7 d 起，PSD 组较对照组、卒中组体质量增加显著减慢($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；氟西汀组自 14 d 起与 PSD 组相比体质量增加显著加快($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；抑郁组与 PSD 组体质量比较差异无统计学意义。结果见表 1。

表 1 各组大鼠应激前后不同时段体质量比较($n=12, \bar{x} \pm s$)
Tab. 1 Comparison of weight in each group on different periods before and after stress($n=12, \bar{x} \pm s$)

组别	体质量/g			
	应激前	应激第 7 天	应激第 14 天	应激第 21 天
对照组	230±10	231±12	255±16 ¹⁾	277±15 ²⁾
抑郁组	221±14	229±15	232±11	246±17
卒中组	219±16	230±14	250±15 ¹⁾	274±16 ²⁾
PSD 组	222±15	234±15	236±12	230±15
氟西汀组	227±12	232±16	252±14 ¹⁾	273±12 ²⁾

注：与 PSD 组比较，¹⁾ $P < 0.05$ ，²⁾ $P < 0.01$
Note: Compared with PSD group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

2.2 糖水实验

自 CUMS 14 d 起，脑卒中组和氟西汀组大鼠蔗糖水消耗量低于对照组，但差异无统计学意义($P > 0.05$)；抑郁组与 PSD 组明显低于对照组($P < 0.01$)；抑郁组与 PSD 组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)；与 PSD 组相比，氟西汀组糖水消耗量显著增加($P < 0.01$)。结果见表 2。

2.3 旷野实验

自第 14 天起，PSD 组比对照组和卒中组水平活动与垂直活动得分显著降低($P < 0.01$)；氟西汀组得分较 PSD 组显著增加($P < 0.01$)；PSD 组较抑郁组差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表 3 和表 4。

表 2 各组大鼠应激前后不同时段糖水饮用量比较($n=12, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of sugar-water consumption in each group on different periods before and after stress($n=12, \bar{x} \pm s$)

组别	糖水消耗量/g			
	应激前	应激第 7 天	应激第 14 天	应激第 21 天
对照组	28.25±4.27	26.22±3.45	26.46±5.37 ¹⁾	25.76±6.28 ¹⁾
抑郁组	27.63±4.52	26.08±3.24	18.25±4.10	14.69±3.83
卒中组	25.89±3.11	27.12±4.67	22.66±3.93 ¹⁾	23.85±4.02 ¹⁾
PSD 组	26.78±4.20	24.17±4.33	17.37±3.65	15.01±3.76
氟西汀组	27.54±5.16	27.02±3.36	25.68±4.59 ¹⁾	25.02±4.34 ¹⁾

注：与 PSD 组比较，¹⁾ $P < 0.01$
Note: Compared with PSD group, ¹⁾ $P < 0.01$

表 3 各组大鼠不同时段旷野实验水平活动得分($n=12, \bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Comparison of horizontal activity in each group on different periods($n=12, \bar{x} \pm s$)

组别	水平得分			
	应激前	应激第 7 天	应激第 14 天	应激第 21 天
对照组	62.67±28.32	55.31±21.20	50.04±25.36 ¹⁾	51.45±17.86 ¹⁾
抑郁组	66.93±31.78	60.44±29.62	23.30±11.64	20.86±16.23
卒中组	58.06±24.85	59.99±22.47	48.33±18.80 ¹⁾	52.15±23.11 ¹⁾
PSD 组	60.08±27.41	58.32±20.55	25.47±19.86	21.63±15.03
氟西汀组	59.00±26.78	62.94±26.78	44.20±15.58 ¹⁾	48.14±12.66 ¹⁾

注：与 PSD 组比较，¹⁾ $P < 0.01$
Note: Compared with PSD group, ¹⁾ $P < 0.01$

表 4 各组大鼠不同时段旷野实验垂直活动得分($n=12, \bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Comparison of vertical activity in each group on different periods($n=12, \bar{x} \pm s$)

组别	垂直得分			
	应激前	应激第 7 天	应激第 14 天	应激第 21 天
对照组	17.55±6.43	16.82±5.68	19.81±5.05 ¹⁾	23.00±5.46 ¹⁾
抑郁组	16.24±5.11	14.08±6.81	11.33±4.69	6.46±2.89 ²⁾
卒中组	15.72±6.04	15.44±5.45	16.01±5.23 ¹⁾	20.57±7.00 ¹⁾
PSD 组	15.66±4.87	9.83±6.75	4.08±3.76	3.65±2.10
氟西汀组	14.88±4.20	17.23±6.81	18.74±5.96 ¹⁾	21.36±7.03 ¹⁾

注：与 PSD 组比较，¹⁾ $P < 0.01$
Note: Compared with PSD group, ¹⁾ $P < 0.01$

2.4 神经元凋亡结果

应激第 21 天和 28 天，氟西汀组与对照组凋亡率无显著差异($P > 0.05$)；与 PSD 组相比，氟西汀组凋亡率显著降低($P < 0.01$)，说明氟西汀具有一定的抑制海马神经细胞凋亡的作用。结果见图 1~2 和表 5。

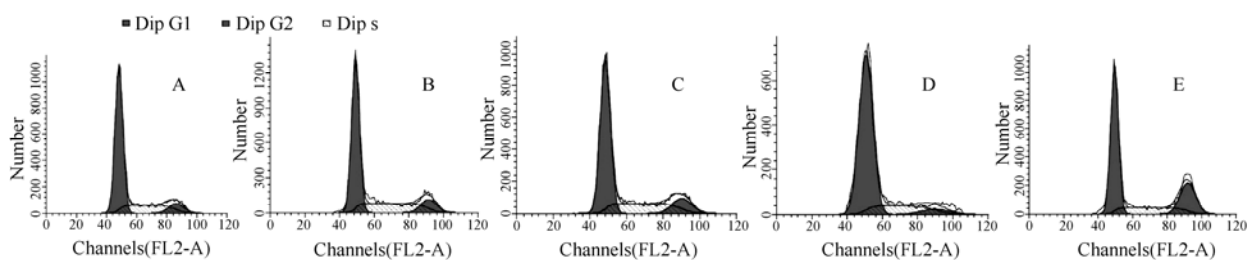


图 1 21 d 各组海马神经元凋亡情况
A-对照组; B-抑郁组; C-卒中组; D-PSD 组; E-氟西汀组

Fig. 1 Apoptosis of Hippocampal Neurons in Each Group on 21 d
A-control group; B-depression group; C-stroke group; D-PSD group; E-fluoxetin group

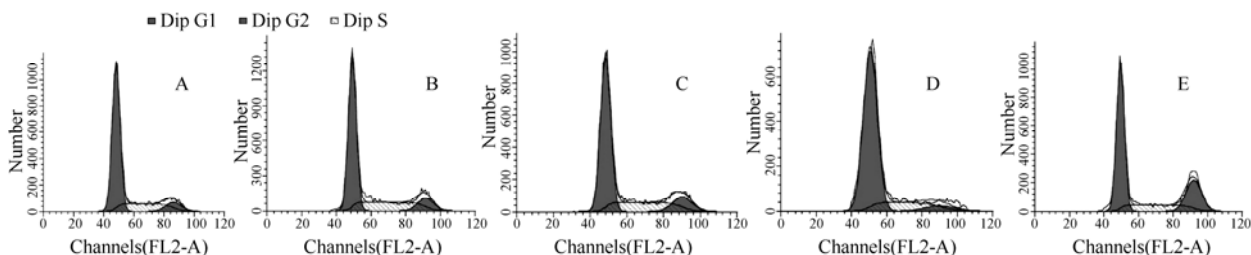


图 2 28 d 各组海马神经元凋亡情况
A-对照组; B-抑郁组; C-卒中组; D-PSD 组; E-氟西汀

Fig. 2 Apoptosis of Hippocampal Neurons in Each Group on 21 d
A-control group; B-depression group; C-stroke group; D-PSD group; E-fluoxetin group

表 5 各组不同时间段海马神经元细胞凋亡率的比较($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Comparison of apoptosis rate of hippocampal neurons in each group on different periods($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡率/%	
	21 d	28 d
对照组	2.0±0.12 ¹⁾	2.3±0.16 ¹⁾
抑郁组	12.55±3.14	14.86±3.46
卒中组	18.28±4.11	19.73±4.57
PSD 组	20.34±5.36	24.87±5.88
氟西汀组	6.60±1.04 ¹⁾	7.48±1.16 ¹⁾

注: 与 PSD 组比较, ¹⁾ $P<0.01$

Note: Compared with PSD group, ¹⁾ $P<0.01$

3 讨论

PSD 是非常值得关注的脑血管并发症。由于 SSRIs 类药物能选择性抑制 5-HT 的再摄取, 提高脑组织 5-HT 的含量, 减轻抑郁症状, 因此, 用 SSRIs 类代表药物氟西汀对 PSD 进行研究有着十分重要的意义。

对于慢性应激所导致的抑郁动物模型, 体质量变化、糖水实验和旷野实验是反映动物抑郁症状和躯体症状的重要指标。本实验用上述 3 个重要指标, 可以综合评价氟西汀对 PSD 大鼠的干预作用。

3.1 体质量变化指标

由于抑郁模型会出现食欲降低、消瘦的症状, 所以体质量的变化是衡量抑郁大鼠模型的量化指

标。本实验每周对大鼠进行一次体质量检测, 发现慢性应激后大鼠体质量发生明显变化, 在 21 d 后抑郁组和 PSD 组体质量出现了明显降低; 而给予氟西汀干预的 PSD 组, 能明显改善 PSD 大鼠的体质量增长情况, 表现为与抑郁组和 PSD 组相比, 体质量有显著性差异。这可能是由于氟西汀是选择性 5-HT 再摄取抑制剂, 抑制中枢神经系统对 5-HT 的再摄取, 有效纠正了脑中 5-HT 缺乏而引起的抑郁症状, 从而抑制大鼠体质量的下降。

3.2 糖水消耗实验

由于抑郁模型动物脑内神经元受损, 缺乏快乐体验能力, 因此大鼠嗜甜的本性受到抑制。该指标易于观察、简单易行, 因此国内外学者多用该方法来作为有效衡量快感缺乏的客观指标。在本实验中可发现, 21 d 后抑郁组和 PSD 组大鼠对糖水的消耗明显降低, 表明 2 组大鼠嗜甜本性受到抑制, 出现了明显的抑郁症状。而氟西汀干预的 PSD 组, 能显著增加 PSD 大鼠的糖水消耗量, 和对照组及卒中组无显著性差异。说明氟西汀能增加 PSD 大鼠对快乐事件的反应力, 减轻了抑郁症状。

3.3 旷野实验

旷野实验是经典的反应大鼠对新环境的探索及情绪的实验, 水平活动主要反映其情绪, 垂直

活动反应其探索欲。旷野实验指标可综合衡量动物中枢神经系统处于兴奋或抑郁状态。本研究发现,抑郁组及 PSD 组大鼠水平及垂直活动得分降低,说明 2 组大鼠兴奋性及探索性降低,符合抑郁症状的表现。而氟西汀干预的 PSD 组大鼠,水平及垂直活动得分较以上 2 组明显增加,有显著性差异,说明氟西汀能改善 PSD 大鼠的抑郁症状。这也可能是由于氟西汀能使脑内的兴奋性神经递质 5-HT 含量增加,从而有效改善了动物的情绪,缓解了抑郁症状。

3.4 细胞凋亡实验

已经有许多证据表明海马区的改变与抑郁的发生有着重要的关系,而抑郁症状的发生通常与海马区的细胞凋亡密不可分^[7]。利用计算机断层扫描、正电子断层扫描和核磁共振等影响技术进行检查,发现抑郁症患者大脑及海马存在与慢性应激动物相似的整体形态的改变,机体可能通过一系列的神经生化机制导致脑组织器质性损害,而与情绪密切相关的边缘系统尤其是海马结构最易受到损害,表现为侧脑室扩大、脑沟变宽、前脑体积缩小、海马容量减少等^[8]。

目前的研究中,测定细胞凋亡主要依靠流式细胞术,其分析精确,重复性好,可定量分析细胞的凋亡情况。国外已有实验证实:在慢性应激下,海马区的神经元会发生损伤,这与本实验结果相一致^[9]。而氟西汀干预后的 PSD 组,其细胞凋亡率显著降低,表明氟西汀可对抗慢性应激损伤,保护海马神经元,从而显著改善动物的行为学指标。

综上所述,用 CUMS 结合孤养法诱导的 PSD 大鼠,在氟西汀干预后,其体质量、糖水饮用量、

水平和垂直活动指标都较 PSD 组高;且海马区神经元细胞凋亡数量显著低于 PSD 组;说明氟西汀能显著降低 PSD 模型海马神经元凋亡率,改善抑郁症状,对 PSD 有一定的治疗作用。

REFERENCES

- [1] TANG Q S, PEI Q H, HOU X J, et al. The establishment of animal model of depression after stroke [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med*(北京中医药大学学报), 2004, 27(3): 33-36.
- [2] LIU Y Z, LONG J. Poststroke depression effect on the prognosis and treatment progress [J]. *Foreign Med Sci*(国外医学: 脑血管分册), 2001, 9(4): 245-247.
- [3] LUO Y, DONG W W. An experimental study on focal cerebral ischemia/reperfusion model in wistar rats with suture method [J]. *J Chongqing Med Univ*(重庆医科大学学报), 2002, 27(1): 13.
- [4] HAN G, LI X D, TANG J J, et al. Protective effects and related mechanisms of pre-treated coenzyme Q₁₀ on rats suffered from focal cerebral ischemic-reperfusion injury [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2013, 30(7): 715-718.
- [5] WILLENR P, TOWELL A, SAMPSON D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1987, 93(3): 358-64.
- [6] FANG L Q, WANG Y G, ZHANG Z, et al. Effects of fluoxetine on the brain-derived neurotrophic factor levels in hippocampus of rats with post-stroke depression [J]. *J Haerbin Med Univ*(哈尔滨医科大学学报), 2011, 45(5): 438-441.
- [7] LI M H, CHI S H, WU Y Q. Introduction to the related problem of depression after stroke [J]. *J Chin Clin Med Res*(中华临床医学研究杂志), 2006, 12(7): 1815-1816.
- [8] BACHIS A, MALLEI A. Chronic antidepressant treatments increase basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor-binding protein in neurons [J]. *Neuropharmacology*, 2008, 55(7): 1114-1120.
- [9] BOLDRINI M, UNDERWOOD M D, HEN R, et al. Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus [J]. *Neuropsychopharmacol*, 2009, 34(11): 2376-2389.

收稿日期: 2013-11-05