

DOI 10.19656/j.cnki.1002-2406.XXXXXX01

XXXX

引火汤对长、短期双侧卵巢摘除术小鼠抑郁焦虑样行为的作用

邢淑荣¹, 刘爽², 张悦², 邱琦², 徐红丹^{1,2,3✉}

(1. 佳木斯大学, 黑龙江 佳木斯 154007; 2. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040;

3. 无锡卫生高等职业技术学校, 江苏 无锡 214028)

【摘要】目的:观察引火汤对长期和短期双侧卵巢摘除术(bilateral ovariectomies, OVX)小鼠抑郁焦虑样行为的治疗作用是否存在差异性,并与雌激素替代疗法进行比较。方法:将80只ICR小鼠随机分为长期和短期OVX焦虑抑郁样行为模型小鼠,各分为假手术组(Sham)、模型组(OVX)、雌二醇组(E₂)和引火汤组(YHT),采用双侧卵巢摘除联合慢性不可预见性温和应激(CUMS)复制OVX焦虑模型。采用强迫游泳实验(FST)、悬尾实验(TST)及高架十字迷宫实验(EPM)等行为学指标观察各组小鼠抑郁焦虑样行为。结果:YHT可减少长期、短期OVX小鼠各组在FST、TST中不动时间($P < 0.01$, $P < 0.001$),增加EPM中的开放臂停留时间百分比(OAT)和开放臂进入次数百分比(OAE)($P < 0.01$)。雌二醇可减少短期OVX小鼠各组在FST、TST中不动时间($P < 0.001$),增加EPM中的OAT%和OAE($P < 0.01$, $P < 0.01$),但对长期OVX小鼠的在上述指标均无明显改善作用。结论:雌激素可改善短期OVX小鼠的抑郁焦虑样行为,但对长期OVX小鼠的抑郁焦虑样行为无改善作用;引火汤对长期和短期OVX小鼠抑郁焦虑样行为均有改善作用。

【关键词】引火汤;雌激素;长期OVX;短期OVX;抑郁症

【引用格式】

邢淑荣,刘爽,张悦,等.引火汤对长、短期双侧卵巢摘除术小鼠抑郁焦虑样行为的作用[J].中医药信息,XXXX,XX(X):1-5.

XU H D, LIU S, LIU G L, et al. Therapeutic effect of yinhuo decoction on depression and anxiety-like behavior in long-term and short-term ovx mice[J]. Information on TCM, XXXX, XX(X):1-5.

据世界卫生组织(WHO)统计^[1],全球抑郁症患者超过3.5亿,截至2017年,中国超过5400万人患有抑郁症,其中女性发病率为65%,多发生于绝经期,严重损害其身心健康^[2]。雌激素撤退被认为是导致女性抑郁症发病的主要内因。因此,雌激素替代疗法(estrogen replacement therapy, ERT)是临床主要的治疗方案,但因其应用有严格的时间窗限制,只能在围绝经期或绝经早期应用,并保持一定的雌激素水平才会

对认知功能起到保护作用。而在女性绝经期,雌激素分泌急剧下降,ERT将不能发挥治疗作用^[3-4]。中医学认为,肾阴虚而心火上炎是更年期抑郁症的主要发病机制,治疗更年期抑郁症的关键在于补肾^[5]。引火汤出自陈士铎《辨证录》,原方组成为熟地黄、巴戟天、麦冬、茯苓、五味子,具有滋补肾阴、引火归元的功效^[6]。本课题组前期对引火汤治疗更年期抑郁症的研究发现,引火汤可显著改善OVX小鼠术后1周的体质量、睡

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(82003975);黑龙江省卫生健康委科研课题(2020-301);无锡市卫生健康委科研项目面上项目(M202170)

第一作者简介:邢淑荣(1994-),女,硕士研究生,主要从事中医药防治精神性疾病的作用及机制研究工作。

✉通讯作者简介:徐红丹(1984-),女,副教授,博士,主要从事中医药防治和护理精神性疾病的作用及机制研究工作。

眠,修饰攻击样行为,并有神经细胞保护作用^[7-8]。然而,引火汤是否存在与 ERT 相同的治疗窗口期限制,仍是需要研究的科学问题。本研究采用双侧卵巢摘除(bilateral ovariectomies, OVX)联合慢性不可预知性温和应激刺激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)的方法模拟雌激素剥夺性抑郁症,观察引火汤对长期和短期 OVX 小鼠抑郁焦虑样行为的治疗作用,并与雌二醇做对比。

1 材料

1.1 实验动物

16 周龄雌性 ICR 品系小鼠 80 只,体质量 20~25 g,购自于黑龙江中医药大学 GLP 实验中心,合格证号:SCXK(黑)2013-0004。将小鼠饲养于清洁级动物室,给予适宜温湿度(22~24℃,50%~60%),自然光源,12 h 明暗交替,自由给水进食。为使小鼠适应环境,在实验开始之前适应性饲养 1 周,本研究经黑龙江中医药大学伦理委员会批准,批准号:2018121103。

1.2 实验试剂

引火汤由熟地黄、巴戟天、茯苓、麦冬及北五味子组成(购于北京同仁堂哈尔滨连锁药店);补佳乐(戊酸雌二醇片,批号:214A 剂,拜耳医药保健有限公司广州分公司);青霉素钠粉(批号:15040312-2,哈药集团制药总厂)。

2 方法

2.1 实验分组

小鼠适应性饲养 1 周后,随机分为长期和短期 OVX 小鼠,再各分为 4 组,分别为假手术组(Sham 组)、模型组(OVX 组)、阳性药组(E₂组)和引火汤组(YHT 组),每组各 10 只,短期 OVX 4 组小鼠在术后第 1 周开始给予慢性不可预知性温和刺激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)并同时给药,为期 3 周。长期 OVX 4 组小鼠在术后第 8 周开始 CUMS 和给药,为期 3 周。

2.2 双侧卵巢摘除术

将小鼠用 10% 水合氯醛(0.4 mL/100 g)腹腔注射麻醉后进行 OVX 手术。小鼠置俯卧位,在背部大腿根部内侧斜上 0.5 cm 处剪毛、消毒皮肤,剪开皮肤并钝性撕开肌层,寻找并结扎子宫,止血后剥离菜花状卵巢并将其摘除,依次缝合肌层及皮肤切口,涂少许青霉素钠粉防感染。同法摘取另一侧卵巢。Sham 组暴露卵巢后,摘取同体积的脂肪,回纳卵巢。

2.3 阴道涂片

OVX 术后,通过阴道涂片观察脱落细胞组成及形态来判断 OVX 手术是否成功。具体方法为 OVX 术后

第 5~8 天,每日上午 9:00 取各组小鼠阴道分泌物涂于载玻片上,晾干后进行 HE 染色。

2.3 慢性不可预知性温和刺激(CUMS)

长期和短期 OVX 各组小鼠在实验计划时间内进行 CUMS 刺激。CUMS 方法为,每天在下列七种躯体刺激中随机选取一种对小鼠进行刺激,包括:断食 24 h、断水 24 h、潮湿垫料、倾斜鼠笼、摇晃鼠笼、黑白颠倒、超声刺激 20 min,同种刺激 1 周内不重复出现,连续 3 周。

2.4 给药剂量及方法

长期和短期 OVX 小鼠 CUMS 刺激同时给药,阳性药组(E₂组)给予戊酸雌二醇片,给药量为 0.13 mg/kg,浓度为 0.013 mg/mL;引火汤组(YHT 组)给药量为 23.4 mg/kg,浓度 2.34 g/mL。每日灌胃体积为 0.1 mL/10 g 体质量,假手术组(Sham 组)和引火汤组(OVX 组)给予等量蒸馏水,连续给药 3 周。

引火汤组方:熟地黄 15 g,麦冬 10 g,茯苓 5 g 和五味子 5 g。8 倍水浸泡生药 2 h,水煎 1 h,收集滤液,药渣加入等量水继续煎煮 1 h,过滤后合并 2 次煎煮所得滤液,在旋转蒸发仪中浓缩至 2.34 g/mL,置 4℃ 冰箱备用。

2.5 行为学检测方法

长期和短期 OVX 各组小鼠均在给药 3 周后进行行为学测试。

2.5.1 强迫游泳实验(forced swimming test, FST)

将小鼠被迫放在直径 10 cm 容器中,水温 20~25℃。水面高度以小鼠后爪不着地且头部刚好露出水面为准。每只小鼠测试完后换水,排除排泄物对受试小鼠的影响。实验环境保持安静,记录各组小鼠入水 6 min 后出现 4 min 的不动时间。

2.5.2 悬尾实验(tail suspension test, TST)

将小鼠置于独立操作箱内,用胶带将其尾部距末端约 1 cm 处固定于箱内支架上,头部朝下距离地面 20 cm,使小鼠周围无攀爬的地方。每只小鼠测试完清理粪便,保持环境安静。记录各组小鼠悬尾状态 6 min 后出现 4 min 的不动时间。

2.5.3 高架十字迷宫实验(elevated plus maze, EPM)

EPM 设备由两只相对开放臂和闭合臂,以及交叉区的中央平台组成,距离地面高 50 cm。将小鼠放置中央平台,背对操作者面向开放臂。每只小鼠测试完毕,95% 酒精擦拭 EPM 设备,保持环境安静。记录各组小鼠 5 min 内开放臂停留时间百分比(OAT)和开放臂进入次数百分比(OAE)。

2.6 数据分析及图像处理

HE 染色图采用 Image – pro – Plus (IPP) 6.0 软件进行分析。采用 SPSS19.0 软件进行数据的统计分析,数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。符合正态分布且总体方差齐的数据采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间均数两两比较应用最小显著性差异法 (LSD) 检验,应用 SNK 进行统计后校正; 方差不齐的数据采用 Tamhane's T2 法进行组间比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

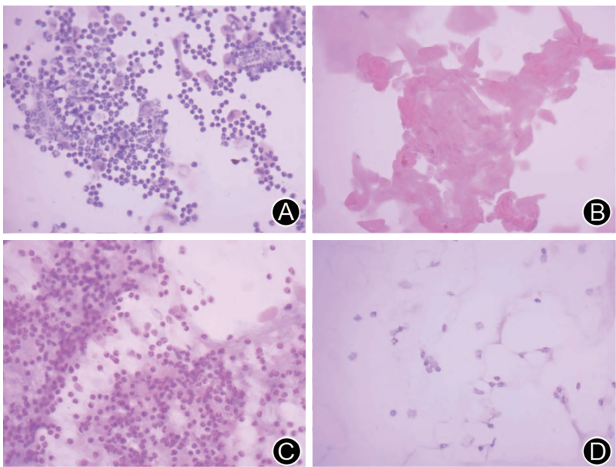
3.1 阴道涂片检查结果

正常小鼠阴道细胞种类及特点随着性周期的变化呈现出动情前期、动情期、动情后期和动情间期的周期性变化。阴道涂片结果显示,OVX 组小鼠阴道细胞周期性变化消失,持续处于动情间期,特点为大量的白细胞伴有少量的上皮细胞。Sham 组小鼠阴道细胞则出现典型的周期性变化。结果见图 1,其中图 1A 可见上皮细胞完整;图 1B 可见大量角化细胞且密集成片分布;图 1C 可见大量白细胞伴随角化细胞;图 1D 可见白细胞伴少数有核上皮细胞。

3.2 各组小鼠不同时期 FST、TST 水平比较

与 Sham 组比较,短期 OVX 组小鼠在 FST、TST 实

验中的不动时间均显著增加 ($P < 0.001$),说明 OVX 导致的雌激素剥夺状态可诱发明显的抑郁样状态。与短期 OVX 组比较,YHT 组、 E_2 组小鼠在 FST、TST 测试中不动时间均显著减少 ($P < 0.001$)。与 Sham 组比较,长期 OVX 组小鼠在 FST、TST 实验中的不动时间均显著增加 ($P < 0.001$);与 OVX 组比较,长期 YHT 组在 FST、TST 测试中的不动时间均显著减少 ($P < 0.01$);与 E_2 组比较,差异无统计学意义。见表 1。



注: A 为动情前期; B 为动情期; C 为动情后期; D 为动情间期。

图1 各组小鼠阴道涂片(HE染色,×400)

表1 各组小鼠不同时期 FST、TST 情况比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	短期		长期	
	FST	TST	FST	TST
Sham 组	23.02 ± 7.47	59.67 ± 11.54	70.97 ± 9.81	74.37 ± 15.26
OVX 组	159.42 ± 50.37***	131.05 ± 19.00***	160.32 ± 40.04***	141.81 ± 18.89***
E_2 组	69.86 ± 7.65***	55.23 ± 7.42***	140.62 ± 20.12	124.64 ± 23.64
YHT 组	65.32 ± 7.96***	46.75 ± 17.08***	74.67 ± 30.89**	67.35 ± 15.43**

注:与 Sham 组比较,*** $P < 0.001$,与 OVX 组比较,** $P < 0.001$,*** $P < 0.001$ 。

3.3 各组小鼠不同时期 OAT、OAE 情况比较

高架十字迷宫 (EPM) 实验显示,与 Sham 组比较,短期 OVX 组小鼠在 EPM 实验的开放臂停留时间百分比 (OAT)、开放臂进入次数百分比 (OAE) 均显著减少 ($P < 0.01$),说明 OVX 导致的雌激素剥夺状态可诱发明显的抑郁样状态。与 OVX 组比较,短期 YHT 组、 E_2

组小鼠 OAT 和 OAE 均显著增加 ($P < 0.01$)。与 Sham 组比较,长期 OVX 组小鼠的开放臂停留时间百分比、开放臂进入次数百分比均显著减少 ($P < 0.01$);与 OVX 组比较,长期 YHT 组小鼠 OAT 和 OAE 均显著增加 ($P < 0.01$);与 E_2 组比较,差异无统计学意义。见表 2。

表2 引火汤对长短期 OVX 小鼠在 EPM 实验中各指标的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	短期		长期	
	OAT	OAE	OAT	OAE
Sham 组	24.74 ± 4.41	52.00 ± 6.05	26.04 ± 5.27	51.32 ± 6.82
OVX 组	12.14 ± 3.03**	35.87 ± 6.05**	12.63 ± 3.56**	31.83 ± 4.16**
E_2 组	25.18 ± 6.57**	51.74 ± 7.80**	14.88 ± 2.18	31.67 ± 7.38
YHT 组	22.23 ± 4.01**	52.87 ± 7.53**	22.45 ± 5.04**	44.74 ± 4.95**

注:与 Sham 组比较,** $P < 0.01$;与 OVX 组比较,** $P < 0.01$ 。

4 讨论

目前关于更年期抑郁症的神经生物学的发病机制尚不明确,但大量研究表明, E_2 撤退是更年期抑郁症发作的重要原因。因此,ERT是临床治疗抑郁症最常用的方法^[9]。但是,长期补充外源性雌激素具有患子宫内膜癌、卵巢癌等生殖系统疾病,甚至胰腺炎、非小细胞肺癌、脑卒中等非生殖系统疾病的风险^[10-13]。而且,ERT存在“关键窗口期”的限制,BRINTON^[14]提出,在围绝经期使用雌激素,有利于防止和延缓认知功能的下降;相反,在绝经期,使用雌激素会加剧神经退行性改变。胆碱能神经元既表达雌二醇受体(ER),又表达多个神经营养因子及其受体。雌激素可通过ER与神经营养因子相互调节对神经元起营养支持作用^[4]。据报道,海马胆碱能受损是导致甚至加剧认知功能损伤的重要原因^[15]。WINK等^[16]认为,随着年龄的增长,海马的完整性会受损,围绝经期女性的胆碱能输入相对完整,海马对胆碱输入的反应也更敏感,而绝经期女性海马中胆碱能的输入受损,可能是造成上述结果的原因。

引火汤方中熟地黄填精补髓,滋肾水之涸;巴戟天补肾助阳,引火归元;北五味子能收降浮火,补养肾阴^[17]。陈士铎^[6]认为,人之神志活动寓于心肾相交,即“心气通于肾,而夜能安;肾气通于心,而日亦安也”。可见,引火汤治疗更年期抑郁症具有独特优势,且在改善认知障碍、情志失衡等精神症状方面效果居佳。

本研究采用OVX联合CUMS方法复制更年期抑郁症模型,HE染色显示OVX小鼠阴道大量白细胞脱落伴有少量的上皮细胞,其细胞周期性变化消失持续处于动情间期,表明OVX手术造模成功。强迫游泳及悬尾实验可通过动物的行为绝望水平评估实验动物的抑郁样行为,高架十字迷宫通过动物对新环境的探究和对高悬开放臂的恐惧形成矛盾冲突的状态,来反映动物焦虑样行为。本研究经强迫游泳、悬尾、高架十字迷宫等行为学检测得出, E_2 可改善短期OVX小鼠的抑郁样行为,对长期OVX小鼠的抑郁焦虑样行为无改善作用,该结果与雌激素的使用存在“关键窗口期”的观点不谋而合。而引火汤对长期和短期OVX小鼠的抑郁样行为都有改善作用,由此可知,引火汤对OVX小鼠可持续发挥抗焦虑抑郁样作用,并且不受“关键窗口期”的限制。

综上所述,补肾方—引火汤与ERT疗法比较,不受“关键窗口期”的限制,可持续发挥抗焦虑抑郁样作用。未来我们将对引火汤改善长期OVX小鼠的抑郁行为的具体作用机制进行深入研究,为引火汤治疗绝经期抑郁症提供有效的实验依据。

【参考文献】

- [1] NEWHOUSE P, ESTROGEN A K. Stress, and depression: a neurocognitive model[J]. JAMA Psychiatry, 2015, 72(7): 727–729.
- [2] ALBERT K M, NEWHOUSE P A. Estrogen, stress, and depression: cognitive and biological interactions [J]. Annual Review of Clinical Psychology, 2019, 15(9): 399–423.
- [3] 王睿, 吴睦霖, 王伟, 等. 左归丸对围绝经期抑郁症模型小鼠行为学影响及神经保护机制研究[J]. 医学研究杂志, 2020, 49(2): 135–139.
- [4] 刘颖. 绝经后不同时期长期激素替代治疗对OVX大鼠认知功能的影响[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2006: 3–10.
- [5] 王琨翎. 围绝经期抑郁症中医综合调摄研究[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2020: 3–10.
- [6] 莫雨平, 李多多, 吴永刚. 从“引火汤”的临床运用看中医学异病同治的妙用[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(8): 94–95.
- [7] 叶阳. 引火汤干预女性更年期综合征小鼠模型的实验研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2015: 3–10.
- [8] 刘爽, 吕鑫, 李炎, 等. 引火汤含药血清对 $A\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞损伤的抑制作用[J]. 中医药信息, 2013, 30(6): 55–57.
- [9] 刘晶, 吴敏, 孟凡涛, 等. 雌激素对雌鼠抑郁样行为和海马BDNF表达的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(9): 1400–1404.
- [10] WUNDERLE M, PRETSCHER J, BRUCKER S Y, et al. Association between breast cancer risk factors and molecular type in postmenopausal patients with hormone receptor – positive early breast cancer [J]. Breast cancer research and treatment, 2019, 174(2): 453–461.
- [11] ZHANG Y L, CHEN J H, LU W, et al. Efficacy of postoperative hormone replacement therapy on prognosis of patients with serous ovarian carcinoma [J]. Chinese Medical Journal, 2016, 129(11): 1316–1321.
- [12] BEZWADA P, SHAIKH A. The effect of transdermal estrogen patch use on cardiovascular outcomes: a systematic review [J]. Journal of Women's Health, 2017, 26(12): 1319–1325.
- [13] OSKARSSON V, ORSINI N, SADR – AZODI O. Postmenopausal hormone replacement therapy and risk of acute pancreatitis: a prospective cohort study [J]. CMAJ: Canadian Medical Association Journal, 2014, 186(5): 338–344.
- [14] BRINTON R D. Investigative models for determining hormone therapy induced outcomes in brain: evidence in support of a healthy cell bias of estrogen action [J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1052: 57–74.
- [15] DUMAS J, HANCUR – BUCCI C, NAYLOR M, et al. Estradiol interacts with the cholinergic system to affect verbal memory in postmenopausal women: evidence for the critical period hypothesis [J]. Horm Behav, 2008, 53(1): 159–169.
- [16] WINK A M, BERNARD F, SALVADOR R, et al. Age and cholinergic effects on hemodynamic and functional coherence of the human hippocampus [J]. Neurobiol Aging, 2006, 27(10): 1395–1404.
- [17] 林炜濠, 劳淑怡, 赖梅生. 阴火良方之引火汤求真刍议 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2016, 22(8): 1039–1040, 1056.

(收稿日期: 2022–05–19)

Therapeutic Effect of Yinhuo Decoction on Depression and Anxiety – Like Behavior in Long-Term and Short – Term OVX Mice

XING Shurong¹, LIU Shuang², ZHANG Yue², QIU Qi², XU Hongdan^{1,2,3✉}

(1. Jiamusi University, Jiamusi 154007, China; 2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 154040, China; 3. Wuxi Higher Health Vocational Technology School, Wuxi 214028, China)

【Abstract】 Objective: To observe the difference in therapeutic effect of Yinhuo Decoction on depression and anxiety – like behaviors in long – term and short – term OVX mice, and to compare it with estrogen replacement therapy. Methods: 80 ICR mice were randomly divided into the long – term and the short – term OVX depression and anxiety – like behavior model mice, and each was subdivided into the sham operation group, the model group, the E₂ group and the Yinhuo Decoction group. The OVX anxiety model was established by using bilateral ovariectomy combined with CUMS. Behavioral indicators including forced swimming test (FST), tail suspension test (TST) and elevated plus maze test (EPM) were used to observe the depression and anxiety – like behaviors of mice in each group. Results: Yinhuo Decoction could reduce the immobility time of FST and TST ($P < 0.01$, $P < 0.001$), and increase OAT and OAE of EPM in long – term and short – term OVX mice ($P < 0.01$). E₂ could reduced the immobility time of FST and TST of short – term OVX mice ($P < 0.001$), and increase OAT and OAE of EPM ($P < 0.01$, $P < 0.01$), but it had no obvious effect on long – term OVX mice. Conclusion: E₂ can improve the depression and anxiety – like behavior of short – term OVX mice, but has no effect on the depression and anxiety – like behavior of long – term OVX mice. Yinhuo Decoction can improve depression and anxiety – like behavior of long – term and short – term OVX mice.

【Key words】 Yinhuo Decoction; E₂; Long – term OVX; Short – term OVX; Depression