



论 文

中国知名大学及研究院所专栏 北京中医药大学专辑

颐脑解郁方对脑出血后抑郁大鼠核磁共振波谱的干预作用

赵瑞珍^①, 唐启盛^{①*}, 田青^①, 黄育玲^①, 李宁^②, 臧凤超^③, 胡京红^④, 黄翔^④^① 北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029;^② 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450008;^③ 东南大学, 江苏省分子影像与功能影像重点实验室, 南京 210009;^④ 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029

* 联系人, E-mail: tangqisheng@263.net

收稿日期: 2016-04-06; 接受日期: 2016-05-20

国家自然科学基金(批准号: 81473658)、教育部高等学校博士学科点专项科研基金(批准号: 20130013130002)和北京中医药大学自主选题项目(批准号: 2014-JYBZZ-JS-065)资助

摘要 采用尾壳核胶原酶注射诱发脑出血模型, 结合不可预知慢性应激建立出血性脑卒中后抑郁模型, 通过行为学评估筛选符合结局动物, 研究活体正常大鼠(*Rattus norvegicus*)和 PSD 模型大鼠脑部 MRI T1, T2 加权成像和局域质子谱(1H MRS)的变化, 观察脑组织形态学和神经元代谢物 N-乙酰天门冬氨酸(NAA)、肌酸(Cr)、胆碱(Cho)和谷氨酸(Glu)及肌醇(mI)等指标变化及颐脑解郁方的干预作用。建立脑出血后抑郁大鼠模型, 筛选行为评估合格动物, 麻醉状态下固定头部于 7.0T 核磁共振成像仪上扫描, 分别扫描横断面位及矢状位图像; 之后选择感兴趣区, 采用 PRESS 序列采集 1H 谱, 确定肌酸、胆碱化合物、谷氨酸、肌醇(mI)等信号。经行为学评估测试, 造模后及 6 周后的模型组蔗糖水消耗量均减少, 与正常组、中药组、西药组比较有统计学意义($P<0.05$); 敞箱实验模型大鼠水平得分及垂直得分均小于正常组、中药组、西药组, 组间比较有显著性差异($P<0.05$); 水迷宫测定中, 模型大鼠错入盲端次数增加, 与正常组、中药组和西药组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。脑出血后抑郁大鼠磁共振平扫脑正中裂增宽, 中脑导水管面积扩大, 提示大鼠存在脑萎缩。波谱提示模型组海马区 NAA/Cr, Cho/Cr 比值降低($P<0.05$), 中药组有显著升高($P<0.05$)。通过采用磁共振波谱技术观察颐脑解郁方对脑出血后抑郁大鼠的干预作用, 发现其对于神经元的功能修复和保护的作用尤为突出。同时, 也发现磁共振波谱技术确实可无损地获得脑内物质代谢的信息, 可以反映药物的干预作用。

关键词 核磁共振影像, 波谱, 脑卒中后抑郁, 颐脑解郁方

引用格式: 赵瑞珍, 唐启盛, 田青, 等. 颐脑解郁方对脑出血后抑郁大鼠核磁共振波谱的干预作用. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 959–968
Zhao R Z, Tang Q S, Tian Q, et al. Intervention of cerebral hemorrhage in depression rat magnetic resonance spectroscopy by Yinaojieyu prescription. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 959–968, doi: 10.1360/N052016-00024

脑卒中后抑郁(post stroke depression, PSD)是发生于脑卒中神经功能损伤基础上,以情绪持续低落、睡眠障碍、兴趣下降、学习记忆能力减退等为主要特征的一类病证。因其可加重脑卒中症状,影响患者功能康复,增加病死率,目前越来越受到重视。临床上,中医在辨证治疗基础上,用药讲究配伍,副作用小,治疗费用较低,病人易于接受,具有广泛的应用前景。目前对脑卒中后抑郁发病机制尚不十分清楚,基于影像学的核磁共振及波谱方向的深入研究,可以直观地分析脑区改变及物质能量的变化,有助于了解 PSD 发病,发现抗抑郁中药的新作用靶标。

脑卒中后抑郁包括出血性和缺血性 PSD 两类,之前通过对缺血性脑卒中后抑郁动物模型观察,磁共振下发现相关脑区的物质能量发生改变^[1]。项目组继续研究脑出血后脑卒中抑郁大鼠(*Rattus norvegicus*)模型的相关变化,通过检索文献建立脑出血模型^[2],采用尾状核注射胶原酶获得脑出血效果,之后结合慢性不可预知的温和刺激形成脑出血后抑郁大鼠模型。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

取二级雄性健康 Wistar 大鼠 50 只,由上海中国科学院动物实验中心提供(合格证编号: SCXK(沪)2007-0005),5~6 月龄,体重(200±20) g。采用颗粒型普通大鼠饲料(蛋白 23%,脂肪 4.7%,钠盐 0.24%)饲养,饮用自来水,光照周期 12 h 以模拟正常昼夜生理节奏(7:00~19:00 光照,19:00~7:00 黑暗),室温度(23±1)℃,相对湿度 60%~70%。

1.2 实验药品

胶原酶(Sigma, type VII 型,美国),水合氯醛(分析纯,北京化工厂,北京),0.9%生理盐水(石家庄四药有限公司),75%酒精、碘伏(上海利康消毒高科技),注射用青霉素钠(华北制药集团有限责任公司,石家庄);蔗糖(分析纯,北京化工厂,北京),颐脑解郁方(刺五加 20 g, 栀子 10 g, 五味子 10 g, 郁金 10 g)由北京康仁堂药业有限公司提供配方颗粒,按灌胃剂量溶解药物,浓度为 0.62 g 生药/mL。盐酸氟西汀胶囊(礼来苏州制药有限公司,苏州,产品批

号: 7114E),按照成人用量 0.33 mg kg⁻¹ 天⁻¹的 7 倍计算大鼠用量为 2.31 mg kg⁻¹ 天⁻¹。临用时溶于蒸馏水中混匀,浓度为 0.231 mg/mL。

1.3 实验仪器

游泳用水箱(塑料箱,广东),台式电热恒温鼓风干燥箱(苏州三清仪器有限公司),HZQ-C 空气振荡浴(哈尔滨市东明医疗仪器厂),夹尾器(自制)、自制大鼠夹尾瓶;遮光布;Open-Field 敞箱(自制)。

双臂数显脑立体定位仪(北京众实迪科技发展有限公司),微量进样器(上海安亭微量进样器厂),颅骨钻及钻头(深圳市瑞沃德生命科技有限公司),眼科剪(上海浦伦医疗器械有限公司),弯剪(上海医疗器械有限公司手术器械厂),止血钳(上海浦伦医疗器械有限公司),2 mL 注射器,磁共振成像仪(德国 Bruker PharmaScan 70/16)。

2 实验方法

2.1 模型制备及分组

动物购进后适应性喂养 7 天,第 8 天禁水 24 h,次日进行蔗糖水消耗实验、OPEN-FIELD 行为学评分,评分相近大鼠随机分为 5 组:正常组、脑出血后抑郁模型组、假手术组、中药治疗组、西药对照组。

脑出血后抑郁模型制作^[2]出血性脑卒中模型:采用尾壳核注射胶原酶诱发脑出血模型。具体手术方法如下:用 10%水合氯醛麻醉后,将大鼠固定在脑立体定位仪上,切开头部正中皮肤,暴露颅骨,以前囟为原点,向左旁开 4 mm,向后 1 mm,在颅骨表面钻孔,直径 1 mm,向下进针 5 mm,用自动推进器向右侧尾状核内缓慢注入 0.5 μL 胶原酶,于 10 min 内注定,缝合皮肤。

出血脑卒中假手术模型:10%水合氯醛(400 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉下,切开头部正中皮肤,暴露颅骨,缝合皮肤。于术后 12, 24 h 观察形态变化。

卒中后抑郁(PSD)模型:胶原酶注射诱发脑出血手术后,预养 1 周,筛选手术成功者接受 21 天的慢性不可预知的温和应激结合孤养法造成脑出血后抑郁模型。慢性不可预知的温和性应激,即大鼠在 21 天内随机安排以下 7 种应激方法,每天随机选取 1 种,每种方法在 21 天内各应用 3 次。

(i) 禁食: 从早上 7:00 开始断食 24 h.

(ii) 禁水: 从早上 7:00 开始断水 24 h.

(iii) 通宵照明: 早上 7:00 开始闭灯、用遮光布覆盖鼠笼, 使动物处于黑暗状态; 19:00 开始取下遮光布、开灯处于光照状态, 到次日 7:00 结束.

(iv) 冰水游泳: 动物放入盛有 4℃冰水的水箱中(深约 15 cm, 使大鼠的后足刚及桶底)5 min 取出.

(v) 热烘: 动物放入 45℃的恒温烘箱中 5 min 后取出.

(vi) 夹尾: 大鼠放于自制的固定瓶子中露出尾部. 用夹尾器夹住距离尾根部约 1 cm 处, 持续约 1 min 后, 放回笼中(注意不要用力太大, 使大鼠发出哀叫即可).

(vii) 振荡: 大鼠放入水平振荡器中, 160 转/min 高速振荡 30 min.

孤养法: 单只动物单笼饲养. 脑出血假手术组、中药治疗组、西药对照组模型处理同上.

2.2 给药方法

慢性应激结束, 进行行为学观察后, 模型组、中药治疗组、西药对照组开始分别灌胃双蒸水、中药、西药. 根据动物体重变化每周调整灌胃量, 1 mL/100 g, 共灌胃 6 周. 正常组: 不予任何处理, 正常饮食.

灌胃结束后, 剔除衰弱、严重感染以及合并其他系统病变的大鼠, 进行行为学测定. 选取 5 只/组进行磁共振波谱测试.

2.3 行为学评估

(1) 蔗糖水消耗量. 于应激结束、给药结束后测定. 各组动物饮用 1%蔗糖水, 1 h 后计算各组动物蔗糖水消耗量, 即蔗糖水消耗量=测定前瓶重-测定后瓶重. 蔗糖水消耗量体现实验大鼠对奖赏的快感反应.

(2) 敞箱(OPEN-FIELD)实验. 于应激结束、给药结束后应用 OPEN-FIELD 敞箱测定. 敞箱为长、宽均为 80 cm, 高 40 cm 的内空无盖立方体, 四壁涂为黑色, 底面用黑线划分为等面积的 25 块方格. 以动物穿行方格数(动物四爪均进入方格内为准)作为水平活动的得分, 以直立次数(两前肢均离地为标准)为垂直活动得分. 每只动物测定 1 次, 每次 3 min. 室内隔音, 遮光, 每次测试前保持敞箱内干净.

(3) 水迷宫测定. 于应激完成后开始训练. 检测大鼠分辨学习能力. 水迷宫由棕色塑料板制成, 分终点区、A 区、B 区、C 区. 含 4 个盲端, 终点有一高出水面的安全区. 条件控制在室温(22±2)℃, 水温(24±1)℃. 每个区至终点作为一个阶段的训练. 实验分 2 天进行, 第 1 天训练 A 区至终点 3 次、B 区至终点 3 次、C 区至终点 3 次. 每次训练时间均限定在 3 min 内. 训练完成后测定 C 区至终点的时间(到达时间)和进入盲端的次数(错误次数). 第 2 天测 C 区至终点的时间和进入盲端的次数. 以训练期 C 点到达时间和错误次数的均值作为学习成绩; 以测试期 C 点到达时间和错误次数作为记忆成绩.

2.4 影像学观察

(1) 动物准备. 动物在 10%水合氯醛(400 mg/kg 体重)腹腔麻醉下, 俯卧位于扫描床上, 头部固定, 在大鼠躯干覆盖棉布保温, 连接呼吸监控接收装置. 扫描过程中保持室内温度在 20℃~22℃, 同时监测大鼠的呼吸频率, 使其保持在 70~80 次/min.

(2) T2 加权成像. 分别扫描横断位及矢状位图像. 重复时间(TR)=4200 ms, 回波时间(TE)=36 ms, 采样矩阵 256×256, 扫描层厚 0.8 mm, 层间距 1 mm, 共 13 层, 视野 3.5 cm×3.5 cm. 扫描结束后, 测量大脑正中裂的宽度和中脑导水管面积以及双侧前皮质、海马、杏仁核等脑区信号强度.

(3) 磁共振波谱测定. 在左侧海马及左侧前皮质部位, 分别选择一 3 mm×3 mm×3 mm 大小的立方体感兴趣区, 经匀场和抑水后, 采用 PRESS 序列采集 ¹H 谱, 谱宽 1500 Hz, 采样点数 2048, TR=2500 ms, TE=20 ms, 累加次数 500 次, 所得 ¹H 谱经傅立叶变换, 基线校正后, 指定水峰的化学位移为 4.7, 从而确定 ¹H 谱上位于 δ 2.02 的氮-乙酰天门冬氨酸(NAA)、δ 3.0 的肌酸(Cr)、δ 3.22 的胆碱化合物(Cho)、δ 2.35 的谷氨酸(Glu)及 δ 3.56 的肌醇(mI)等信号. 测定这些谱峰的高度, 计算 NAA/Cr, Cho/Cr, Glu/Cr, mI/Cr.

2.5 统计学处理

所得行为学实验数据采用统计软件 SPSS12.0 软件进行统计学分析, 以 $\bar{x} \pm SD$ 表示, 组间比较用方差分析(ANOVA/LSD), 以 ($P < 0.05$) 作为显著性差异的标准.

3 实验结果

3.1 行为学结果

(1) 蔗糖水消耗量. 造模后测试发现, 模型组、假手术组大鼠饮用蔗糖水量减少, 与正常组比较有统计学意义($P<0.05$); 6 周后, 与正常组比较有显著性差异($P<0.01$), 说明模型大鼠快感缺乏. 经用药治疗后, 中药治疗组和西药对照组蔗糖水摄入量明显增加, 与模型组相比有统计学意义($P<0.05$)(表 1).

(2) 敞箱实验. 模型组、假手术组大鼠水平及垂直得分均小于正常组, 有显著性差异($P<0.01$). 说明模型组、假手术组动物活动减少, 兴趣缺乏. 治疗组及对照组治疗结束后, 水平和直立次数增加, 得分与模型组比较, 有统计学意义($P<0.05$); 与正常组相比无统计学意义(表 2 和 3).

(3) 水迷宫测定. 模型组、假手术组大鼠游到终点的时间延长, 错入盲端次数增加, 与正常组相比, 差异有统计学意义($P<0.05$; $P<0.01$), 模型组和中药组、西药组大鼠错入盲端次数较正常增加($P<0.05$);

表 1 各组大鼠蔗糖水消耗量的变化($\bar{x} \pm SD, n=5$)^{a)}

组别	造模前	造模后	治疗后(6 周)
正常组	25.33±6.32	27.07±4.22	30.22±7.86
模型组	23.96±2.90	20.11±4.06*	18.98±3.82**
假手术组	25.01±6.61	23.37±5.25*	20.50±4.88**
中药治疗组	24.83±4.30	21.21±1.62	26.80±4.30 ^Δ
西药对照组	23.37±3.71	21.65±2.98	25.64±4.08 ^Δ

a) *: 与正常组比较, $P<0.05$; **: 与正常组比较, $P<0.01$; Δ : 与模型组相比, $P<0.05$

表 2 各组大鼠敞箱实验水平得分的变化($\bar{x} \pm SD, n=5$)^{a)}

组别	造模后	治疗后
正常组	74.20±13.38	71.30±14.42
模型组	43.78±21.71**	35.67±16.05**
假手术组	43.44±17.10**	37.44±15.18**
中药治疗组	49.33±19.39	57.89±22.91 ^Δ
西药对照组	48.11±24.43	55.78±19.28 ^Δ

表 4 各组大鼠学习记忆水平比较($\bar{x} \pm SD, n=5$)^{a)}

组别	学习游出时间(s)	学习错误次数	记忆游出时间(s)	记忆错误次数
正常组	30.04±17.33	1.43±1.62	43.71±25.40	2.28±1.25
模型组	137.68±44.55**	4.86±2.85*	140.42±33.02**	5.57±2.22*
假手术组	36.78±11.62*	4.10±1.05*	40.50±10.45*	5.00±1.41*
西药对照组	35.46±12.34 ^Δ	3.71±3.77	86.78±35.86 ^Δ *	3.86±1.35
中药治疗组	43.07±27.40 ^Δ	2.43±2.44	102.12±48.75*	2.57±1.40 ^Δ

a) 与正常组相比, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; 与模型组相比, Δ : $P<0.05$, $\Delta\Delta$: $P<0.01$

表 3 各组大鼠敞箱实验垂直得分的变化($\bar{x} \pm SD, n=5$)^{a)}

组别	造模后	治疗后
正常组	17.40±5.12	16.90±3.21
模型组	9.22±3.19**	8.33±2.35**
假手术组	9.90±4.28**	8.90±3.96**
中药治疗组	9.55±4.25	11.22±3.03 ^Δ
西药对照组	9.00±2.12	10.78±2.28 ^Δ

a) **: 与正常组比较, $P<0.01$; Δ : 与模型组相比, $P<0.05$

中药组和西药组学习或记忆游出时间较模型组减少($P<0.05$), 中药组记忆错入盲端数减少($P<0.05$)(表 4).

3.2 影像学观察结果

(1) T1, T2 平扫. 形态学变化: 与正常大鼠比较, 模型组大鼠, 脑裂明显扩大($P<0.05$); 假手术大鼠脑裂亦有所扩大, 但与正常组相比, 无统计学意义. 经过 6 周的药物治疗后, 中药组脑裂宽度较模型组减小, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 西药组大鼠脑裂宽度较模型组有所减小, 但差异不具有统计学意义(表 5). 信号强度: 模型组大鼠、假手术大鼠额叶和海马区域的信号强度与正常组比较无明显差异, 且左右两侧信号强度一致. 经 6 周治疗后, 各组大鼠海马区域和额叶信号强度无明显变化.

(2) 磁共振波谱结果. 模型组、西药组大鼠海马 NAA/Cr 比值降低, 与正常组相比, 差异具有统计学意义($P<0.01$), 中药组大鼠 NAA/Cr 与模型组相比明显升高, 差异具有统计学意义($P<0.01$); 模型组、中药组、西药组 Cho/Cr 比正常组低, 差异具有统计学意义($P<0.01$), 但中药组、西药组 Cho/Cr 与模型组相比无统计学差异($P>0.05$); 中药组 Glu/Cr 比模型组升高, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 西药组 Glu/Cr 与正常组和模型组相比均降低, 且差异具有统计学意义($P<0.01$, $P<0.05$); 中药组 ml/Cr 与模型组相比升高, 而西药组则较模型组降低, 其差异具有统计学意义($P<0.01$, $P<0.01$)(表 6).

表 5 各组大鼠脑正中裂宽度和中脑导水管面积比较 ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=5$)

组别	中脑导水管面积(mm ²)	脑正中裂宽度(mm)
正常组	0.2198±0.0146	0.9840±0.2033
模型组	0.4472±0.0166**	1.4620±0.0832*
假手术组	0.3760±0.0179**	1.3060±0.1254
中药治疗组	0.4206±0.0249**	1.1080±0.1256 ^Δ
西药对照组	0.4470±0.0342**	1.2920±0.1903

a) 与正常组相比, *: $P<0.05$; 与模型组相比, Δ : $P<0.05$

中药组大鼠前皮质 NAA/Cr 显著升高, 与模型组相比, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$), 而西药组 NAA/Cr 与模型组相比显著下降, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$); 中药组 Cho/Cr 与模型组相比降低, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$), 而西药组 Cho/Cr 比模型组明显升高, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$); 中药组 Glu/Cr 比模型组升高, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$), 西药组 Glu/Cr 与模型组相比无明显变化; 西药组 mI/Cr 升高, 与模型组相比差异具有统计学意义 ($P<0.01$), 中药组 mI/Cr 与模型组相比无明显变化 (表 7)。

4 讨论

4.1 关于模型建立及行为学评估

本模型采用复合处理制备 PSD 大鼠模型, 以脑出血为内在因素, 以慢性不可预知温和应激和孤养

状态模拟人类脑卒中后抑郁的外在因素。脑内注入胶原酶诱导脑出血, 血肿快速形成, 可获得相对一致的脑出血损伤。该模型较好地模拟了卒中后抑郁的病理状态, 脑卒中后给予孤养、慢性温和应激, 使之更现实地模拟生活应激事件, 与临床上脑卒中患者发病后住院期间远离家庭和社会, 缺少关怀的心理状态, 以及卒中引起的偏瘫、行动不便症状较为相似。其理论依据与人类抑郁症中慢性、低水平的应激源促进疾病发生、加速疾病发展的机理更接近。

脑出血后抑郁模型的成功标志主要取决于蔗糖水的消耗量和大鼠水平活动、垂直活动次数^[1]。敞箱测试中的水平活动反映动物的活动度, 垂直活动反映动物对新鲜环境的好奇程度; 利用大鼠对蔗糖水嗜好特点模拟人类的兴趣感, 并将其作为发生抑郁行为的观测指标, 糖水消耗量降低是衡量慢性不可预见性应激造成抑郁状态动物模型快感下降的主要依据。水迷宫是学习记忆能力的有效测定工具, 它可以反映动物的空间学习记忆能力。

抑郁动物在行为上的表现为: 在规定时间内糖水消耗量降低、水平活动和垂直活动次数均减少, 同时水迷宫测定显示模型组大鼠游出时间延长, 错入盲端次数增加, 存在学习和记忆能力的下降。本模型动物表现出的抑郁状态、兴趣丧失、快感缺乏、运动迟滞、记忆力减退符合脑卒中后抑郁症的核心症状, 与 PSD 临床表现具有一定程度的相似性。研究结果显示, 大鼠行脑内注入胶原酶诱导脑出血后, 出现

表 6 各组大鼠海马 MRS 波峰比较 ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=5$)

组别	NAA/Cr	Cho/Cr	Glu/Cr	mI/Cr
正常组	1.25±0.055	0.73±0.016	0.23±0.009	0.36±0.015
模型组	1.14±0.029*	0.64±0.017**	0.21±0.018	0.43±0.013**
假手术组	1.16±0.078*	0.70±0.024*	0.21±0.014 [#]	0.44±0.012** [#]
中药组	1.20±0.041 ^{##}	0.68±0.012**	0.24±0.014 [#]	0.50±0.010** ^{##}
西药组	1.16±0.057**	0.66±0.024**	0.17±0.029** [#]	0.40±0.008** [#]

a) 与正常组相比, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$; 与模型组相比, #: $P<0.05$; ##: $P<0.01$ 表 7 各组大鼠前皮质 MRS 波峰比较 ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=5$)^{a)}

组别	NAA/Cr	Cho/Cr	Glu/Cr	mI/Cr
正常组	1.33±0.111	0.63±0.007	0.28±0.015	0.25±0.005
模型组	1.17±0.044**	0.56±0.022**	0.24±0.011**	0.28±0.016*
假手术组	1.16±0.056*	0.61±0.022	0.26±0.011	0.28±0.003
中药组	1.26±0.026 ^{##}	0.50±0.012 ^{***}	0.32±0.015 ^{***}	0.29±0.031**
西药组	1.24±0.026 ^{**##}	0.69±0.024 ^{***}	0.25±0.014**	0.33±0.015 ^{**##}

a) 与正常组相比, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$; 与模型组相比, #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$

了对侧肢体轻度功能障碍, 术后 1~2 周出现易激惹, 复合慢性应激 2 周后出现活动减少, 蜷卧少动。在应用药物治疗后, 治疗组和对照组实验动物的糖水摄入量显著增加, 在敞箱中的水平运动及垂直运动得分明显增加, 与模型组相比, 有显著性差异。提示中药颐脑解郁方能够改善 PSD 模型大鼠的行为障碍, 提高动物的活动性, 兴趣感及学习能力。

大鼠慢性不可预测的温和应激造成抑郁模型的理论依据与人类抑郁症中慢性、低水平的应激源促进疾病发生、加速疾病发展的机理更接近。同时, 采用复合方法复制 PSD 模型结合了中医 PSD 的发病特点。本实验中采用的慢性应激刺激, 可模拟中医“恐伤肾”的状态, 且慢性应激作为不良的环境和精神刺激因素, 与中医“七情”相类似, 在一定程度上模拟了气郁的形成, 损伤皮层血管造成的局灶性出血损伤造成瘀血内阻, 与本课题组提出的 PSD 中医病机肾虚肝郁相吻合。

4.2 关于磁共振形态观察

本实验结果显示, 脑出血后抑郁大鼠脑正中裂增宽, 中脑导水管面积扩大, 提示大鼠存在脑萎缩。假手术组大鼠亦出现中脑导水管面积扩大现象。因假手术未行血管手术, 而只经过孤养和 21 天慢性应激, 因此推断孤养加慢性应激也会大鼠的脑形态结构产生影响。以上结果提示, 长期应激可导致脑器质性改变, 脑萎缩可能是动物抑郁行为的重要解剖学基础。

大量的临床研究表明, 抑郁症患者也存在神经解剖环路(边缘系统-皮质-纹状体-苍白球-丘脑环路)的结构异常, 尤其是额叶皮质、杏仁核和海马。其可能的机制包括: 糖皮质激素的神经毒性, 脑源性生长因子的减少, 神经细胞再生减少及可塑性的丧失^[3]。大多数 MRI 研究结果认为, 抑郁症患者额叶皮质体积缩小。王智光等人^[4]经过对抑郁症患者尸检发现重症抑郁患者有几个前额叶皮质区域体积与对照组相比明显减少。包括神经元体积下降、神经元及神经胶质细胞数量的减少。朱玉英等人^[5]提示, 抑郁症存在神经元萎缩和细胞凋亡。认为抑郁症是由于个体对应激的适应能力受到损害所致。应激或糖皮质激素治疗时可以引发海马神经元的萎缩甚至凋亡。

综上所述, 无论是原发抑郁或者是脑出血后继发抑郁状态, 都会出现脑形态结构的变化, 前额皮

质、海马等脑区神经细胞萎缩、凋亡, 脑整体结构异常, 可能是抑郁产生的解剖学基础。

4.3 关于磁共振波谱

(1) 感兴趣区的选择。参与人情感活动的神经组织有中枢和周围神经系统, 情感障碍中枢神经系统有功能和器质性改变。与前额叶紧密相连的皮质和皮质下回路在认知功能和边缘系统调节能力方面起着重要作用。海马的功能是参与情绪的控制和反应, 与抑郁症关系密切, 在学习和记忆功能以及调节神经内分泌和自主神经活动中起着重要作用。海马也是介导应激反应的重要脑区, 对认知性应激反应尤为重要。海马富含各种信使受体, 是应激激素作用的一个靶区, 也是大脑具有可塑性和极易受损的一个脑区。有研究发现抑郁症左侧海马体积缩小^[6]。

目前高场强小磁共振的 ¹H 波谱测定的序列为 PRESS, 一次只能测定一个部位的波谱, 且每次波谱采集时间较长, 因此在众多与抑郁相关的脑区中选取了两个最为重要的脑区进行波谱测定, 即左侧前额叶皮质和左侧海马。

(2) 脑出血后抑郁大鼠磁共振波谱变化。本实验结果显示, 脑出血后抑郁大鼠左侧海马 NAA/Cr 降低, mI/Cr 升高, Cho/Cr, Glu/Cr 与正常组相比无明显变化; 左侧前皮质 NAA/Cr, Cho/Cr 和 Glu/Cr 比正常组降低, mI/Cr 升高。提示在左侧海马和前皮质存在神经元数目、结构和/或功能异常, 神经胶质细胞增生以及前皮质的谷氨酸代谢异常。

神经元损伤。本实验结果显示, 脑出血后抑郁大鼠存在左侧海马和前皮质的神经元损伤。这一结果与现有对卒中后抑郁磁共振波谱的临床研究结果不一致。李浩然等人^[7]发现, 患者额叶的异常改变主要位于白质, 而非灰质区。表明抑郁患者左额叶白质区有异常的神经生理改变, 这可能与此区富含与其他大脑皮质、边缘系统和皮质下区的传入和传出纤维有关。关于胆碱升高而 NAA 没有改变可能表明卒中后抑郁的病理生理过程是非神经元性的。

但临床上对单纯抑郁患者的磁共振研究则与本实验结果一致。吴磊^[8]对抑郁患者进行 ¹H-MRS 扫描, 结果显示, PSD 组双侧前额叶 Cho/Cr 比值显著升高, 左侧前额叶 NAA/Cr 比值显著下降($P=0.002$), 右侧前额叶 NAA/Cr 比值差异无统计学意义。现有的动物实验研究结果也显示抑郁症大鼠前脑、下丘脑区

NAA/Cho、NAA/PCr 和 NAA/(Cho/PCr)比值显著降低^[9]. 认为抑郁症大鼠前脑和下丘脑存在神经元的丢失和损伤, 这可能是引起脑萎缩的可能原因之一.

研究者们可以推断脑出血后抑郁状态大鼠左侧海马和前皮质存在神经元数目、结构和/或功能异常, 这一结果符合近年提出的“海马神经再生障碍假说”, 提示海马的神经功能损伤及再生障碍可能是PSD的发病机制之一, 同时也是潜在的治疗靶点之一.

对 Cho 峰的解读. 磁共振波谱研究目前处于起步阶段, 尚有很多问题的认识未达成共识. 其中, 对于 Cho 的解读就存在不同的认识. Cho 是脑内胆碱类物质的总合, 既包括细胞膜的组成部分, 也包括神经递质乙酰胆碱的前体. 细胞膜的代谢状态和脑内乙酰胆碱的代谢情况都会引起 Cho 峰的变化, 因此, 对抑郁状态脑 ¹H-MRS 的 Cho 峰变化的解读也就存在不同的结论.

Cho 浓度的降低可能与有反复发作史的慢性抑郁患者海马的萎缩相关. 而也有认为 PSD 脑内乙酰胆碱递质代谢异常, 而引起 Cho 升高, 且抗抑郁治疗可使升高的 Cho 降低.

本实验结果显示, 海马和前皮质区 Cho 出现下降的趋势, 分析其原因可能与局灶性脑出血和慢性应激造成的脑损伤引起脑内细胞破坏, 神经细胞再生障碍有关, 而是否存在乙酰胆碱代谢异常则不能确定, 需要结合其他的研究手段, 综合分析, 才能得出准确结论.

谷氨酸和肌醇. 谷氨酸是中枢神经系统内最主要的一种兴奋性神经递质, 在神经元的分化、迁移、生长和生存过程中具有重要作用; 由于许多突触中都存在谷氨酸, 在突触稳定性的维持及可塑性变化中起关键作用; 谷氨酸可以调制某些神经元(如多巴胺能神经元)的突触后电位, 影响其他神经递质的生理作用; 谷氨酸还可调节突触的效能, 参与学习记忆过程^[10]. Glu 在中枢神经系统分布不均, 以大脑皮质、海马、小脑和纹状体含量最高, 脑干和下丘脑次之.

谷氨酸的正常代谢依赖神经元和神经胶质细胞功能的完整, 因此有学者^[11]认为, 抑郁症患者脑内谷氨酸水平的降低正好与抑郁症患者海马和皮质形态学上的改变即神经元、胶质细胞数量改变的结果相一致, 说明谷氨酸能系统功能异常. 同时肌醇(mI)作为第二信使可以影响多种神经递质系统之间功能的平

衡, 从而在调整神经信号和其下游的细胞分子反应中起到重要作用. 同时, mI 与乙酰胆碱、谷氨酸盐及其他神经递质, 可能在维护神经胶质细胞功能和调节突触活动中起重要作用^[12]. mI 的升高证实了第二信使系统失调在重性抑郁症的病理机制中发挥作用.

本实验结果显示, 脑出血后抑郁大鼠海马和前皮质 mI 升高、前皮质 Glu 降低, 提示第二信使系统功能失调以及胶质细胞的增生、谷氨酸系统功能异常可能是脑出血后抑郁状态的病理改变.

4.4 颐脑解郁方的立方依据

中医理论认为, 中风病后痰瘀互结为害, 痰瘀郁积, 气机受阻, 加之病后情志不遂, 肝气郁滞, 久则气滞血瘀, 加重痰瘀之阻, 脑络失充, 脑神失养而致郁; 且中风病多脏腑虚衰, 尤以肾虚为要, 肾虚髓海失充, 元神失养, 虚实相杂致郁证外现. 卒中后抑郁以肾精亏虚为本, 气滞血瘀痰郁为标, 治法当以固本解郁为要, 而又虚实兼顾, 补虚不忘调气通络, 治实不忘补肾健脑.

根据中医理论, 结合多年的临床实践, 唐启盛教授^[13]认为, 卒中后抑郁的中医发病机理为中风后脏腑虚衰, 肾虚精亏, 气机失调, 水津输布不利, 痰瘀互结, 浊毒为害, 痹阻脑络, 元神失养, 神机失用而致抑郁症诸证外现, 因此其治疗当以补虚调气通络解郁安神为治疗原则, 以此立补肾调气之法, 以固本解郁为要, 而又虚实兼顾, 组成中药复方颐脑解郁方, 临床应用其对轻、中度抑郁症有很好疗效. 颐脑解郁方以刺五加、郁金等组成. 方中以刺五加为主药, 刺五加味辛, 微苦, 性温, 入心、脾、肾经. 刺五加见于《神农本草经》, 列为上品. 上品乃指无毒, 久服可以轻身、延年益寿而无害. 《名医别录》认为五加有“补中, 益精, 坚筋骨, 强意志”等功效. 明·李时珍《本草纲目》称:“刺五加, 以五叶交加者良, 故名五加, 又名五花. 五加治风湿, 壮筋骨, 其功良深…….”刺五加自古即被视为具有填精补髓及抗衰老作用的良药. 现代临床药理研究显示, 其有对中枢神经兴奋和抑制的双向调节功能^[14]. 动物实验表明, 刺五加有抗疲劳、抗应激的作用, 刺五加制剂对神经衰弱有显著疗效. 其注射液也已用于卒中后抑郁症的治疗^[15]. 郁金, 性辛、苦、寒, 归心、肝、胆经, 功能行气化瘀、清心解郁, 《本草汇言》:“郁金清气化痰散瘀血之药也, 其性轻扬, 能散郁滞, 顺逆气, 上达高巅,

善行下焦, 为心肺肝胃, 气血火痰郁遏不行者最验。故治胸胃膈痛, 两胁胀满, 肚腹攻疼, 饮食不思等证; 又治经脉逆行, 吐血衄血, 唾血血腥。此药能降气, 气降则火降, 而痰与血亦各循其安所之处而归原矣。”

《本草备要》:“行气, 解郁, 泄血, 破瘀。凉心热, 散肝郁, 治妇人经脉逆行。”药理研究显示其有调节免疫功能, 抑制中枢神经, 改善血液流变性等作用。主要有效成分之一郁金二酮有抑制中枢神经作用。全方可奏益肾填精, 疏肝解郁, 健脑安神之功^[16]。

4.5 颐脑解郁方对脑出血后抑郁大鼠影像学变化的干预作用

本实验结果显示, 脑出血后抑郁大鼠经颐脑解郁方干预后, 脑裂宽度和中脑导水管面积无明显变化, 从脑的大体形态结构上未发现颐脑解郁方对卒中后抑郁大鼠有干预作用。

从 ¹H-MRS 结果看, 颐脑解郁方可使脑出血后抑郁大鼠海马和前皮质 NAA 升高, 修复脑出血后抑郁大鼠海马和前皮质的神经元功能, 调节脑内谷氨酸水平, 并可以促使海马胶质细胞增生。

近年比较一致的观点认为, 抑郁症的发生与神经元再生障碍密切相关。目前研究显示, 神经递质水平、细胞内信号转导通路、神经营养因子水平等因素均可以影响神经元的再生和功能。但神经元再生是一个复杂的过程, 是多种因素共同作用的结果^[17]。本课题组^[18]在以往的研究中, 发现颐脑解郁方可改善脑内单胺递质水平及其受体的表达, 调节受体后信号转导系统, 增强神经营养因子的表达, 达到保护神经元, 促进神经元再生, 改善神经元功能的作用。其作用特点为多靶点、多途径、整体调节。本实验采用

磁共振波谱分析技术, 观察颐脑解郁方的作用, 发现其对脑内物质代谢具有调节作用, 可促进神经细胞的功能恢复, 这可能是其抗抑郁作用的主要机理。

对照组采用目前治疗卒中后抑郁的首选药物选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI)盐酸氟西汀进行干预, 现有研究显示, 长期使用氟西汀可促进递质的功能, 因而可能通过改善神经运动功能来促进脑损伤后的功能恢复^[19]。5-HT₂可以促进突触的形成, 促进 5-HT 能突触的传递功能, 促进脊髓运动神经元的功能。长期应用氟西汀可通过上调 5-HT₂受体功能以提高运动功能, 另 SSRI 类治疗脑卒中后抑郁对认知功能也有明显促进作用。本实验观察氟西汀对脑出血后抑郁大鼠的干预作用, 发现其可调节大鼠脑内谷氨酸水平, 促进胶质细胞增生, 但在磁共振波谱上未发现其修复神经元损伤, 改善神经元功能的作用。且在皮质区氟西汀作用后可使 Cho 明显增加, 这也与目前临床报道结果相悖。分析其原因可能与动物磁共振波谱检测方法与临床检测方法不同有关, 另外可能也与本实验样本量较小有关。这也提示, 因磁共振波谱技术的影响因素众多, 其检测的准确性仍有待提高, 这可能也是限制其在临床应用的重要因素之一。

综上所述, 通过采用磁共振波谱技术观察颐脑解郁方对脑出血后抑郁大鼠的干预作用, 发现其作用途径不是唯一的, 但其对于神经元的功能修复和保护的作用尤为突出。同时, 也发现磁共振波谱技术确实可无损伤地获得脑内物质代谢的信息, 可以反映药物的干预作用, 若将其应用于临床, 或许可作为检测药物疗效的手段之一, 但这依赖于其检测技术的成熟以及准确性和可靠性的提高。

参考文献

- 1 黄育玲, 唐启盛, 徐向青, 等. 脑缺血后抑郁大鼠脑磁共振波谱研究及颐脑解郁方的干预作用. 中西医结合心脑血管病杂志, 2009, 7: 545-546
- 2 唐启盛, 罗斌, 司银楚, 等. 脑出血后抑郁状态动物模型的建立. 北京中医药大学学报, 2006, 29: 16-19
- 3 王欣欣, 马姗姗, 杨波, 等. 视知觉学习训练对海马神经细胞可塑性的影响及学习记忆功能的调控. 郑州大学学报(医学版), 2014, 5: 601-604
- 4 王智光, 牛广明, 韩晓东. 脑梗死 MRI 表现与患者认知功能障碍及抑郁关系的研究. 中风与神经疾病杂志, 2007, 24: 220-222
- 5 朱玉英, 熊佩黎, 纪荣静, 等. 抑郁症大鼠海马神经元改变的形态学研究. 河北联合大学学报, 2013, 15: 652-654
- 6 黄育玲, 唐启盛, 李宁, 等. 颐脑解郁方对抑郁大鼠脑¹H波谱的干预作用. 波谱学杂志, 2012, 29: 379-387
- 7 李浩然, 卢青, 汤浩, 等. 抑郁症额叶-边缘系统脑网络异常的动态变化——基于脑磁图的动态因果模型分析. 中华医学会第十次全国精神医学学术会议论文汇编, 2012, 10: 95
- 8 吴磊. 脑卒中后抑郁患者脑波谱、功能连接及灰质结构的磁共振研究. 硕士学位论文. 广州: 南方医科大学, 2014

- 9 齐薪蕊. 抑郁症患者前额叶中情感调节相关信号通路紊乱的分子基础. 博士学位论文. 安徽: 中国科学技术大学, 2013
- 10 王兴会, 杜克莘, 冯家豪, 等. 谷氨酸钠对小鼠学习记忆功能的影响. 西北药学杂志, 2012, 27: 442–443
- 11 蒋湘玲, 陈旺生, 郭敏. 首发抑郁症患者海马容积与磁共振波谱的研究. 中国临床心理学杂志, 2011, 19: 430–432
- 12 李褒曼. 抗单、双相抑郁症药物对星形胶质细胞作用的研究. 博士学位论文. 沈阳: 中国医科大学, 2009
- 13 唐启盛, 侯德明, 陈密文, 等. 颞脑解郁方治疗轻、中度抑郁症的开放性临床研究. 中国临床康复, 2002, 21: 3207
- 14 郑汉臣. 适应原药物——刺五加(五加参). 国外医学药学分册, 1981, 1: 40
- 15 胡福永, 祝红. 刺五加注射液治疗脑卒中后抑郁症 30 例. 中国中西医结合杂志, 2000, 20: 629
- 16 赵瑞珍, 唐启盛, 徐向青, 等. 脑出血后抑郁大鼠脑内 NMDA 受体 NR1 mRNA、NR2B mRNA 表达及中药干预作用. 中医药学报, 2008, 5: 14–17
- 17 唐启盛, 司银楚, 裴清华, 等. 颞脑解郁方对脑卒中后抑郁状态模型大鼠脑内 GFAP、BDNF、bFGF 的影响. 北京中医药大学学报, 2005, 7, 28: 34
- 18 唐启盛, 侯秀娟, 赵瑞珍. 中药颞脑解郁方对抑郁模型大鼠脑单胺递质的干预作用. 北京中医药, 2011, 9: 710–713
- 19 唐启盛, 主编. 抑郁障碍——中西医基础与临床. 北京: 人民卫生出版社, 2012

Intervention of Yinaojieyu prescription on post intracerebral hemorrhage depression rat by magnetic resonance spectroscopy

ZHAO RuiZhen, TANG QiSheng, TIAN Qing, HUANG YuLing, LI Ning,
ZANG FengChao, HU JingHong & HUANG Xiang

1 The Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2 The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

3 Jiangsu Provincial Key Laboratory of Molecular Imaging and Functional Imaging, Southeast University, Nanjing 210009, China;

4 School of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Intracerebral hemorrhage model was induced by the caudate putamen injection of collagenase, combined with unpredictable chronic stress to establish post stroke depression (PSD) model. The behavioral assessment was conducted to screen qualified animals. We studied MRI T1, T2, weighted imaging and localized proton spectroscopy (1H MRS) changes of the normal rats' and PSD model rats' brain to observe the cerebral tissue morphology and neural metabolites N-acetyl aspartate ammonia acid choline and (NAA), creatine/phosphocreatine Cr/Pcr (CHO) and glutamate (Glu) and myo inositol (MI), lactic acid (LAC) and index change and the intervention of Yinaojieyu prescription. We established post intracerebral hemorrhage depression rat model and screened behavior assessment qualified animals. The rats were anaesthetized and the heads were fixed on 7.0T MRI scanning. The transverse and sagittal images were scanned separately. The region of interest was selected, with press sequence acquisition 1H spectra, determinate signals of creatine, choline containing compounds, glutamic acid, and myo inositol (MI). According to the behavioral assessment test, after 6 weeks, the sucrose consumption in the model group was reduced, compared with that of the normal group, Chinese medicine group, and western medicine group ($P<0.05$). In open field experiment, the level scores and vertical scores of the model group were lower than those of the normal group, Chinese medicine group and western medicine group. The differences between the groups were significant ($P<0.05$). In water maze test, the times of fault into the blind end increased for the model group, compared with the normal group, Chinese medicine group and western medicine group ($P<0.05$). MRI plain scan indicated the median cleft was widened and the area of midbrain aqueduct expanded for the rats of model group, which indicated that cerebral atrophy occurred. The ratio of NAA/Cr and Cho/Cr in the hippocampus of the model group decreased ($P<0.05$), and that of the traditional Chinese medicine group was significantly higher ($P<0.05$). Through observation of the intervention effects of Yinaojieyu prescription on PSD by using magnetic resonance spectroscopy, we found that its role in neuronal function restoration and protection was particularly prominent. At the same time, we also found that magnetic resonance spectroscopy could get the information of the material metabolism in the brain without any damage, reflecting the effect of the drug exactly.

magnetic resonance imaging, spectroscopy, post-stroke depression, Yinaojieyu prescription

doi: 10.1360/N052016-00024