

逍遥散通过 PI3K/AKT/mTOR 通路调节 mPFC-BLA 髓鞘功能改善 VaD 小鼠焦虑抑郁行为

单楠¹, 谭子虎^{1,2}, 杨冰³, 尹茜茜¹, 马峥玲¹

(1. 湖北中医药大学中医临床学院, 湖北 武汉 430065; 2. 湖北省中医院老年病科, 湖北 武汉 430061; 3. 湖北省第三人民医院中医科, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 研究逍遥散(XYP)对血管性痴呆(VaD)小鼠焦虑抑郁行为表型的作用及可能机制。方法 3月龄雄性C57BL/6小鼠,采用双侧颈总动脉狭窄术(BCAS)并给予慢性束缚应激(CRS),构建VaD伴焦虑抑郁小鼠模型。将造模小鼠分为模型组、氟西汀(阳性对照)组以及逍遥散低、中、高剂量组,对照组为假手术无束缚组。逍遥散低、中、高剂量组予逍遥散水煎剂(5、10、20 g·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃,氟西汀组给予氟西汀(10 mg·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃,对照组、模型组给予等体积生理盐水灌胃,共计4周,给药期间给予束缚应激,每日维持6 h;旷场实验、强迫游泳实验、高架十字迷宫实验、糖水偏好实验检测小鼠焦虑抑郁行为表型,免疫荧光法检测小鼠前额叶皮层(mPFC)、基底外侧杏仁核(BLA)和胼胝体(CC)髓鞘碱性蛋白(MBP)荧光表达水平;Western blot 分别检测小鼠 mPFC 和 BLA 神经核团中磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)、磷酸化磷脂酰肌醇-3-激酶(p-PI3K)、蛋白激酶 B(AKT)、磷酸化蛋白激酶 B(p-AKT)、雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、磷酸化雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)以及 MBP、少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、髓鞘相关糖蛋白(MAG)的蛋白表达水平;LFB 髓鞘染色观察小鼠 CC 的髓鞘形态。结果 行为学检测结果显示:与对照组相比,模型组小鼠在高架十字迷宫和糖水偏好实验中进入开放臂时间百分比、开放臂次数百分比、糖水偏好率均下降($P<0.01$),在强迫游泳实验中不动时间明显增加($P<0.01$),旷场实验中总运动距离、中心区域运动时间明显减少($P<0.01$);与模型组相比,逍遥散中、高剂量组小鼠不动时间缩短($P<0.05, P<0.01$),糖水偏好率增加($P<0.01$),开放臂时间百分比、开放臂次数百分比均增加($P<0.05, P<0.01$),逍遥散高剂量组总运动距离、中心区域运动时间明显增加($P<0.01$)。免疫荧光结果显示:与对照组相比,模型组小鼠在 CC、mPFC、BLA 脑区的荧光强度显著降低($P<0.01$),中、高剂量逍遥散,氟西汀均可不同程度增加 MBP 荧光强度($P<0.05, P<0.01$),其中逍遥散高剂量组最为明显($P<0.01$)。在 LFB 染色中,与对照组相比,模型组小鼠 CC 髓鞘纤维排列疏松,髓鞘染色变浅,存在脱髓鞘改变,逍遥散可以改善模型组小鼠 CC 髓鞘结构损伤,效应在中、高剂量组显著($P<0.05, P<0.01$)。Western blot 结果显示:与对照组相比,模型组小鼠 mPFC、BLA 脑区中 MBP、MOG、MAG 表达下降($P<0.01$);逍遥散中、高剂量组显著逆转上述趋势($P<0.05, P<0.01$),氟西汀对 MAG 蛋白表达下降有一定的逆转作用($P<0.05$),对 MBP、MOG 表达无明显影响。与对照组相比,模型组小鼠 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 水平明显降低($P<0.01$),而在给予中、高剂量逍遥散,氟西汀干预后, p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 蛋白表达水平明显增加($P<0.05, P<0.01$)。结论 逍遥散可能通过激活 PI3K/AKT/mTOR 通路促进 mPFC-BLA 神经环路髓鞘再生并增加髓鞘结构完整性,改善 VaD 小鼠焦虑抑郁表型。

关键词:血管性痴呆;逍遥散;焦虑;抑郁;髓鞘;前额叶皮层;基底外侧杏仁核;PI3K/AKT/mTOR 通路

中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-0482(2022)03-0212-08

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2022.0212

引文格式:单楠,谭子虎,杨冰,等. 逍遥散通过 PI3K/AKT/mTOR 通路调节 mPFC-BLA 髓鞘功能改善 VaD 小鼠焦虑抑郁行为[J]. 南京中医药大学学报,2022,38(3):212-219.

Xiaoyao Powder Modulates the Myelin Function of mPFC-BLA Neural Circuit through PI3K/AKT/mTOR Pathway to Alleviates the Anxiety and Depression Phenotype in VaD Mice
SHAN Nan¹, TAN Zi-hu^{1,2}, YANG Bing³, YIN Xi-xi¹, MA Zheng-ling¹
(1. Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 2. Department of Geriatrics, Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China; 3. Department of Traditional Chinese Medicine, The Third People's Hospital in Hubei Province, Wuhan 430030, China)

收稿日期:2021-05-18
基金项目:武汉市科技计划应用基础前沿项目(2020020601012244)
第一作者:单楠,女,博士研究生,E-mail:shannan0116@163.com
通信作者:谭子虎,男,主任医师,教授,博士生导师,主要从事中医药防治心脑血管疾病的临床与基础研究,E-mail:tanzihu2008@163.com

ABSTRACT;OBJECTIVE To study the effect of Xiaoyao Powder (XYP) on anxiety and depression behavior phenotype in vascular dementia (VaD) mice and its possible mechanism. **METHODS** Three-month-old male C57BL/6 mice were treated with bilateral carotid artery stenosis (BCAS) and chronic restraint stress (CRS) to construct the VaD mice model with anxiety and depression. The model mice were divided into model group, fluoxetine positive drug group and XYP low-dose, medium-dose and high-dose groups. The control group were treated with sham operation and unbound. XYP low, medium and high groups were given XYP water Decoction ($5, 10, 20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) by intragastric administration, fluoxetine positive control group was given fluoxetine ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) by intragastric administration, control group and model group were given equal volume of normal saline for 4 weeks. And restraint stress was maintained for $6 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ during drug intervention. The open field test, forced swimming test, elevated cross maze test and sucrose preference test were used to detect the behavioral phenotypes of anxiety and depression in mice. The fluorescence expression levels of myelin basic protein (MBP) in the prefrontal cortex (mPFC), basolateral amygdala (BLA) and corpus callosum (CC) were detected by immunofluorescence assay. Western blot was used to test the protein expression levels in mPFC and BLA of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K), phosphorylated phosphatidylinositol-3 kinase (p-PI3K), protein kinase B (AKT), phosphorylated protein kinase B (p-AKT), target of rapamycin (mTOR), phosphorylated target of rapamycin (p-mTOR), as well as oligodendrocyte glycoprotein (MOG), myelin associated glycoprotein (MAG) and MBP. The myelin forms of CC in mice were observed by LFB staining. **RESULTS** Compared with the control group, the percentages of open arm time and open arm entries in open field test and the sucrose preference in sucrose preference test decreased in model group ($P < 0.01$), and the immobility time of model group increased significantly in forced swimming test ($P < 0.01$). In open field test, the total distance of movement and the time in the center area significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with model group, the immobility time of mice in XYP high-dose and medium-dose groups decreased ($P < 0.05$), the percentage of sucrose preference increased ($P < 0.01$), the percentages of open arm time and open arm entries increased ($P < 0.05, P < 0.01$). The total distance of movement and the time of movement in the center area significantly increased ($P < 0.01$). Immunofluorescence results showed that, compared with the control group, the fluorescence intensity of model mice in the brain regions of CC, mPFC and BLA significantly decreased ($P < 0.01$), and the fluorescence intensity of MBP in XYP medium-dose and high-dose groups and fluoxetine increased to varying degrees ($P < 0.05, P < 0.01$), among which the XYP high-dose group was the most obvious ($P < 0.01$). In the LFB staining, compared with the control group, the myelin fibers in CC of the model group loosed arrangement, became lighter in colour and demyelinated. XYP could improve the damage of the myelin structure in the model group. Western blot results showed that, compared with the control group, the expressions of MBP, MOG and MAG in the brain regions of mPFC and BLA in model group decreased ($P < 0.01$). The above trends were significantly reversed in XYP high-dose and medium-dose groups ($P < 0.05, P < 0.01$). Fluoxetine had a certain effect on the decreasing trend of MAG ($P < 0.05$), but had no significant effect on the expressions of MBP and MOG. Compared with the control group, the levels of p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT and p-mTOR/mTOR in model mice significantly decreased ($P < 0.01$), while the protein expression levels of p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT and p-mTOR/mTOR in model mice significantly increased after XYP and fluoxetine intervention ($P < 0.05, P < 0.01$). **CONCLUSION** XYP may alleviate the anxiety and depression phenotype of VaD mice by activating PI3K/AKT/mTOR pathway to promote the regeneration of myelin in the mPFC-BLA neural circuit and increase the structural integrity of myelin.

KEYWORDS: vascular dementia; Xiaoyao Powder; anxiety; depression; myelin sheath; mPFC; BLA; PI3K/AKT/mTOR pathway

血管性痴呆(Vascular dementia, VaD)是仅次于阿尔茨海默病的第二大痴呆类型^[1]。随着心脑血管疾病患病率的显著增加, VaD 发病率也呈明显上升趋势^[2]。获得性认知能力下降是痴呆的主要特征,但越来越多的证据表明,神经精神症状在 VaD 中非常普遍,最常见的行为和情绪症状是抑郁、冷漠、躁动和易怒^[3]。痴呆伴随的精神行为异常,导致医疗和社会负担加重、预后恶化,与认知障碍一起作为两大核心标准被纳入诊断指南^[4]。目前对其机制还缺乏足够清晰全面的阐释。仅以神经元死亡难以解释精神症状的波动性^[5],提示其他病理机制存在的可能。

少突胶质细胞(Oligodendrocyte, OL)和髓鞘异常与精神性疾病发病密切相关^[6-8]。一些脱髓鞘疾病如多发性硬化症等,除运动-感觉功能异常外,也会有部分精神异常症状^[9]。白质病变和脱髓鞘是 VaD 的重要病理特征,而 VaD 患者缺血性白质损伤可以导致脑内功能网络结构紊乱和功能连接障碍^[10]。提示髓鞘受损很可能是 VaD 合并焦虑抑郁独立于神经元死亡以外的重要病理基础。

目前,痴呆伴随精神行为异常缺乏安全有效的治疗方法,非药物干预在临床实践中常难以得到执行,而抗精神病药物的使用反而加剧认知功能恶化^[11],增加死亡风险^[12]。有研究显示,使用 5-羟色胺再摄取抑制剂类抗抑郁药舍曲林,12 周治愈率仅为 33%^[13],因此,针对 VaD 伴随精神行为异常进行机制研究和药物开发,显得尤为迫切。逍遥散(Xi-aoyao Powder, XYP)源于宋代《太平惠民和剂局方》,已有临床研究初步发现,逍遥散可以改善 VaD 伴随的抑郁症状,降低康奈尔痴呆抑郁量表评分及中医证候积分^[14-15]。因此,本研究拟采用 VaD 合并焦虑抑郁动物模型,深入研究逍遥散对髓鞘结构和功能的影响及其具体作用机制,从而为逍遥散在痴呆伴随精神行为异常中的应用提供更充分的研究证据。

1 材料

1.1 动物

60 只 3 月龄 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,体质量 24~30 g,购于湖北省实验动物中心,许可证号:SCXK(鄂)2020-0018,饲养于湖北省中医院实验动

物中心,温度(21 ± 3) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(60 ± 5)%,自由摄食饮水,12 h 明暗交替。本实验获得湖北省中医院伦理委员会批准,伦理审批号:HBZY2020-C47-01。

1.2 药物

逍遥散剂量参照《方剂学》^[16]所载(60 kg 成人日用量),由柴胡 9 g,当归 9 g,白术 9 g,白芍 9 g,茯苓 9 g,生姜 9 g,炙甘草 4.5 g,薄荷 1.5 g 组成,均购于湖北省中医院药剂科,浸泡 30 min 后,分 3 次煎煮,过滤合并水煎液,生药浓度为 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,低剂量逍遥散用超纯水稀释至生药浓度为 $0.5\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的水煎液,高剂量逍遥散浓缩至生药浓度为 2 g/mL 的水煎液,分装后 -20°C 保存。盐酸氟西汀胶囊(每粒 20 mg,法国 Patheon 公司,批号:J20170012)购于湖北省中医院,氟西汀溶于生理盐水制成浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。

1.3 试剂

DAPI、BCA 试剂盒、ECL 显影液购于上海碧云天生物技术有限公司(批号:C1006、P0012、P0018AM),一抗 MAG、MOG、GAPDH 购于武汉三鹰生物技术有限公司(批号:14386-1-AP、12690-1-AP、60004-1-Ig);MBP、PI3K、p-PI3K(Tyr458/Tyr199)、AKT、p-AKT(Ser473)、mTOR、p-mTOR(Ser2448)抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司(批号:78896、4249、17366、2920、4060、2972、5536);化学二抗羊抗鼠、羊抗兔购于美国 Jackson ImmunoResearch 公司(批号:115-005-003、111-005-003),荧光二抗驴抗兔 AF555 购于 Southern-Biotech(批号:6441-32)。

1.4 仪器

蛋白电泳及转印装置(美国 Bio-Rad 公司,044BR8277),超声破碎仪(上海净信实业发展有限公司,XM-650T),全自动倒置荧光显微镜(德国 Carl Zeiss 公司,Observer Z1),酶标仪(上海科华生物工程股份有限公司,KHB ST-360),高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司,AllegraX-30R),体视显微镜(上海光学仪器厂,PXS-1040)。

2 方法

2.1 双侧颈总动脉狭窄(Bilateral carotid artery stenosis,BCAS)法构建 VaD 小鼠模型

术前 12 h 予各组小鼠禁食不禁水,1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,剪开颈部正中皮肤,分离小鼠双侧颈总动脉。在体视显微镜下,将微型线圈(直径 0.08 mm,内径 0.18 mm,螺距 0.5 mm,全长

2.5 mm)以螺旋转入方式固定于双侧颈总动脉,造成 BCAS。2 周后进行水迷宫实验,筛选认知功能障碍小鼠应用于后续实验。假手术组只分离颈总动脉,不予弹簧圈置入。

2.2 慢性束缚应激(Chronic restraint stress,CRS)方法

将通过筛选的 VaD 小鼠给予束缚应激(50 mL 离心管管壁均匀开小窗,供小鼠呼吸及散热,束缚期间禁食禁水),于每日固定时间 9:00 am 开始,束缚 6 h,假手术组只禁食禁水,不予束缚。

2.3 动物分组及给药

其中 10 只假手术+无束缚小鼠为对照组,将 50 只 BCAS+CRS 造模小鼠随机分为模型组,氟西汀组以及逍遥散低、中、高剂量组,每组 10 只,给药过程中同时继续 CRS 维持。其中逍遥散低、中、高剂量组小鼠给予的生药剂量分别为 5、10、20 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,氟西汀组小鼠按 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 剂量给予氟西汀溶液,对照组和模型组每日予等量生理盐水,每日 1 次,共计 4 周。

2.4 行为学检测方法

2.4.1 强迫游泳实验 强迫游泳实验测试工具为透明塑料圆筒(20 cm $\times$ 10 cm),水面高 12 cm,温度(22 ± 3) $^{\circ}\text{C}$ 。实验开始时将小鼠放入水中,测试时间为 6 min,视频记录整个过程,统计每只小鼠在测试后 4 min 内的不动时间。

2.4.2 旷场实验 将小鼠放置在一个 50 cm $\times$ 50 cm $\times$ 40 cm 的白色敞箱中,敞箱底面平均划分为 16 个小方格。统计 5 min 内小鼠在旷场内的运动总距离、旷场中心区域时间,评估小鼠焦虑状态。

2.4.3 高架十字迷宫实验 将小鼠置于中央区为 5 cm $\times$ 5 cm,开放臂和闭合臂长为 35 cm,距离地面 50 cm 的高架十字迷宫装置中。记录小鼠在高架十字迷宫装置 5 min 内进入开放臂和封闭臂的次数,在开放臂和在封闭臂内的停留时间。进入开放臂次数百分比=开放臂进入次数/(开放臂进入次数+封闭臂进入次数) $\times 100\%$;开放臂停留时间百分比=开放臂停留时间/(开放臂停留时间+封闭臂停留时间) $\times 100\%$ 。

2.4.4 糖水偏好实验 测试前训练小鼠适应含糖饮水,每笼同时放置 2 个水瓶,第 1 个 24 h 内,2 瓶均为 1%蔗糖水,随后的 24 h 内,1 瓶盛 1%蔗糖水,另 1 瓶为纯水。正式测试时,首先禁食禁水 24 h,再予每只小鼠事先定量好的 1 瓶 1%蔗糖水和 1 瓶纯

水,测试期间每 6 h 更换水瓶位置,24 h 后,取 2 瓶水称量,计算小鼠糖水偏好率=糖水消耗量/总液体消耗量×100%。

2.5 动物处理及取材

行为学检测后,每组随机取 4 只小鼠,1%戊巴比妥钠麻醉,4%多聚甲醛心脏灌注后取脑,蔗糖溶液梯度脱水,包埋,冰冻切片后置入防冻液,-20℃保存,用于免疫荧光和 LFB 染色;剩余 6 只小鼠取新鲜脑组织,取前额叶皮层(Medial prefrontal cortex, mPFC)、基底外侧杏仁核(Basolateral amygdala, BLA)装于不同 EP 管,-80℃保存,用于 Western blot 实验。

2.6 免疫荧光染色

取脑片贴于玻片上,待干,组化笔画圈,0.5% Triton 破膜 40 min, PBS 洗 3 遍,5%BSA 封闭 1 h,一抗(MBP 1:1 000 稀释)4℃过夜,弃一抗,PBS 洗 3 遍,二抗(AF555 1:500 稀释)室温孵育 4 h 后,弃二抗,PBS 洗 3 遍,DAPI 封片,荧光显微镜采集图像。

2.7 Western blot 检测

分别取适量脑组织加入 RIPA 裂解液,在超声下破碎,离心后取上清,BCA 试剂盒检测蛋白浓度,配平待测。电泳、转膜,5%脱脂奶粉封闭 2 h,一抗(均按 1:1 000 稀释)4℃过夜;PBS 洗 3 遍,二抗室温孵育 2 h(1:10 000);PBS 洗 3 遍,ECL 发光液使

条带可视化,Image J 测条带灰度值进行分析。

2.8 LFB 染色

将冰冻切片贴于明胶包被的玻片,待干后复水 2 次,然后置于 0.1%LFB 中,在 28℃恒温箱中过夜。次日用 95%乙醇去除多余染料、蒸馏水漂洗,再用 0.05%碳酸锂分化,梯度脱水,二甲苯透明后封片,随后进行图像采集。

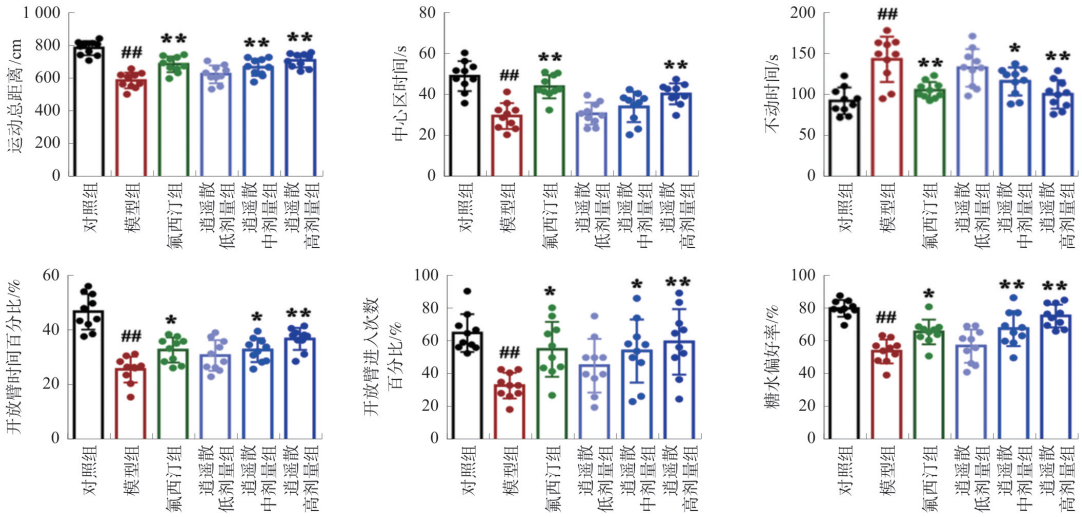
2.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism8.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示;采用单因素方差分析,组间比较采用 Tukey 事后检验;以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 逍遥散对小鼠焦虑抑郁表型的影响

与对照组相比,模型组小鼠存在明显抑郁、焦虑行为,表现在旷场实验中运动总距离、中心区运动时间,高架十字迷宫中开放臂停留时间百分比、进入次数百分比减少($P<0.01$);给予高剂量逍遥散干预后,运动总距离、中心区运动时间,开放臂停留时间百分比、进入次数百分比增加($P<0.01$)。与对照组相比,模型组小鼠表现出不动时间增加($P<0.01$),糖水偏好率降低($P<0.01$)。中、高剂量逍遥散干预后,模型小鼠糖水偏好率增加($P<0.01$),不动时间缩短($P<0.05, P<0.01$)。见图 1。



注:与对照组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。 $\bar{x}\pm s, n=10$ 。

图 1 逍遥散对小鼠焦虑抑郁表型的影响

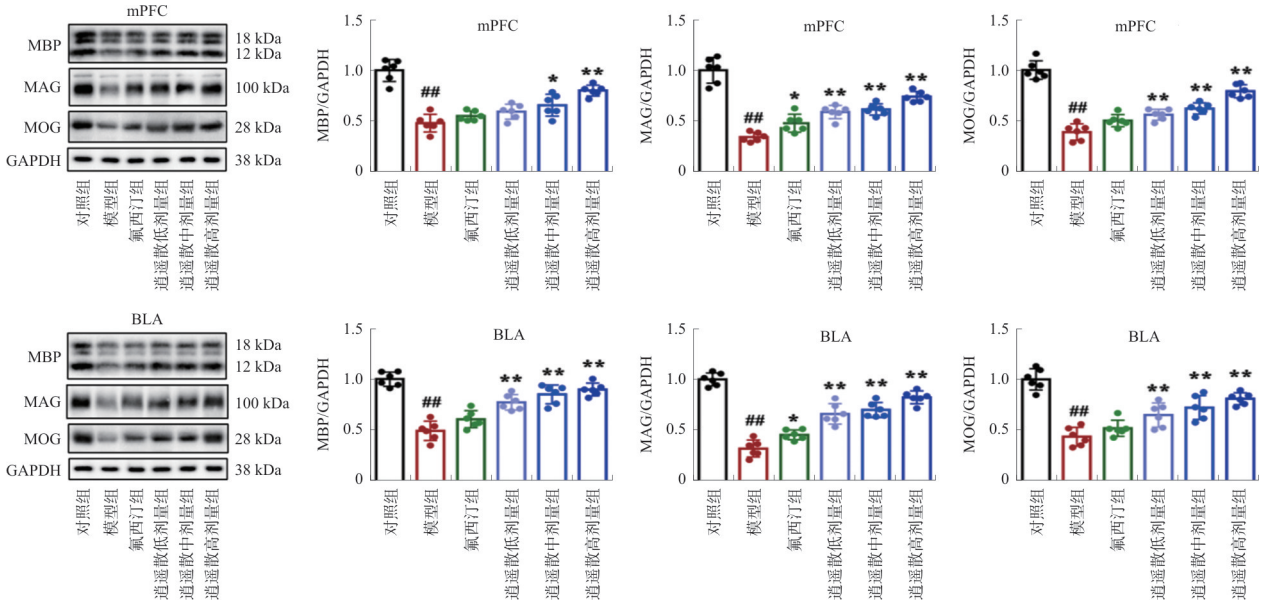
Fig.1 Effect of XYP on anxiety and depression phenotype in mice

3.2 逍遥散对模型小鼠 mPFC 和 BLA 中髓鞘相关蛋白表达的影响

Western blot 结果显示:与对照组相比,模型组

小鼠 mPFC 和 BLA 中髓鞘相关蛋白 MBP、MAG、MOG 均显著下降($P<0.01$);与模型组比较,逍遥散中、高剂量组 mPFC 和 BLA 中髓鞘相关蛋白 MBP、

MAG、MOG 显著上调($P<0.01$)。见图 2。



注:与对照组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。 $\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。

图 2 逍遥散对小鼠 mPFC-BLA 髓鞘相关蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of XYP on the expressions of myelin associated-proteins in mPFC and BLA of mice

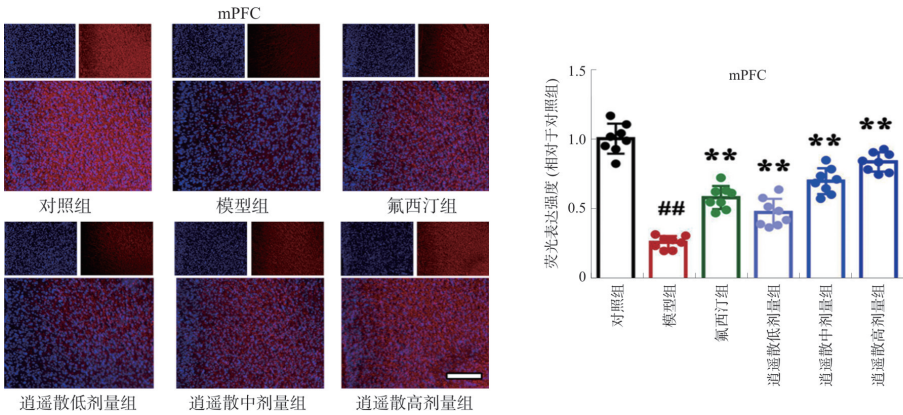
3.3 逍遥散对模型小鼠 mPFC 和 BLA 髓鞘蛋白 MBP 荧光表达的影响

与对照组相比,模型组小鼠 mPFC 和 BLA 中 MBP 荧光强度明显降低($P<0.01$),结构显示不清;与模型组比较,逍遥散各剂量组和氟西汀组荧光强度均显著增加($P<0.05$, $P<0.01$)。见图 3~4。

3.4 逍遥散对模型小鼠胼胝体(Corpus callosum, CC)髓鞘损伤的影响

免疫荧光染色结果显示:与对照组相比,模型组

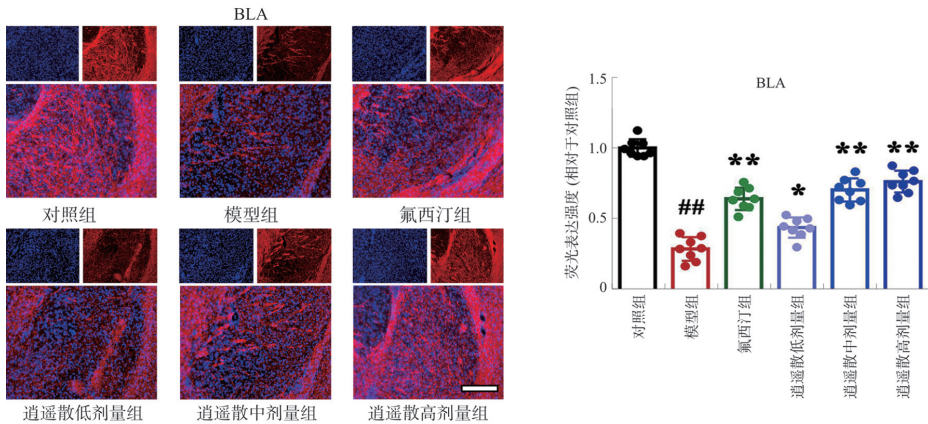
小鼠 CC 中 MBP 荧光强度明显降低($P<0.01$),结构欠清晰,通过药物干预后,各组小鼠 MBP 荧光强度有不同程度增加($P<0.01$)。LFB 染色结果显示:对照组小鼠 CC 髓鞘蓝染清晰,无脱髓鞘改变;模型组小鼠 CC 着色变浅,髓鞘纤维排列疏松,提示在模型组小鼠中存在明显脱髓鞘变化。给予中、高剂量逍遥散和氟西汀干预后,小鼠 CC 染色程度及髓鞘结构有所恢复。见图 5~6。



注:与对照组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。 $\bar{x}\pm s$, $n=4$ 。bar=400 μm 。

图 3 逍遥散对 mPFC 中 MBP 荧光表达的影响

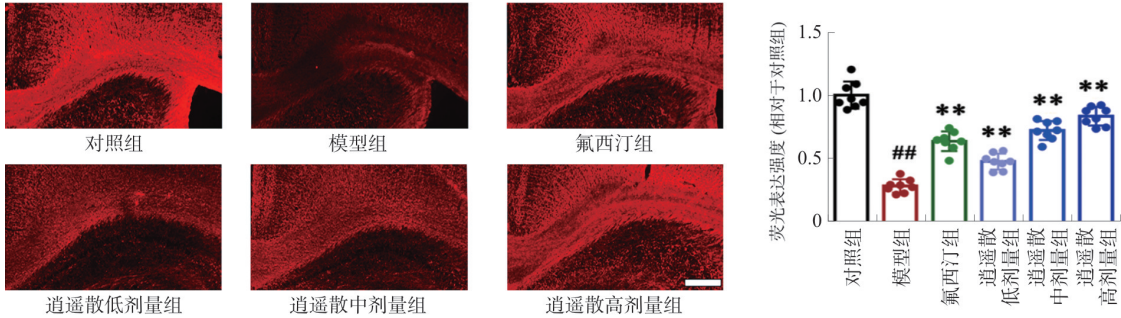
Fig. 3 Effect of XYP on the fluorescence expression of MBP protein in mPFC



注:与对照组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。 $\bar{x}\pm s$, $n=4$ 。bar=200 μm 。

图4 逍遥散对 BLA 中 MBP 荧光表达的影响

Fig. 4 Effect of XYP on the fluorescence expression of MBP protein in BLA



注:与对照组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$ 。 $\bar{x}\pm s$, $n=4$ 。bar=400 μm 。

图5 各组小鼠 CC 中 MBP 免疫荧光图及相对荧光强度统计图

Fig. 5 Immunofluorescence diagram and relative fluorescence intensity statistical diagram of MBP in CC in each group

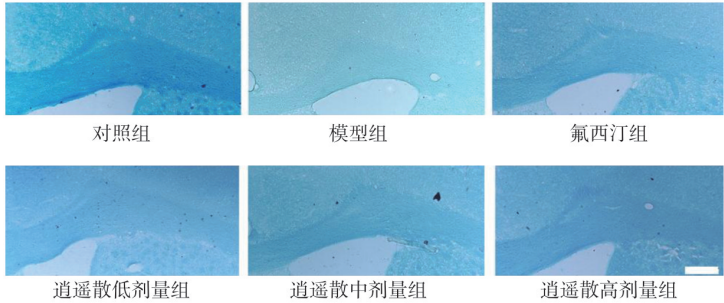


图6 各组小鼠 CC LFB 染色代表图

Fig. 6 Representative diagram of LFB staining in CC in each group

3.5 逍遥散对模型小鼠 mPFC 和 BLA 中 PI3K/AKT/mTOR 通路蛋白表达的影响

Western blot 结果显示:与对照组相比,模型组小鼠 mPFC 和 BLA 中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达水平明显降低($P<0.01$);与模型组比较,逍遥散中、高剂量组及氟西汀组小鼠 mPFC 和 BLA 核团中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 蛋白相对表达水平有不同程度增加($P<0.01$)。见图7。

4 讨论

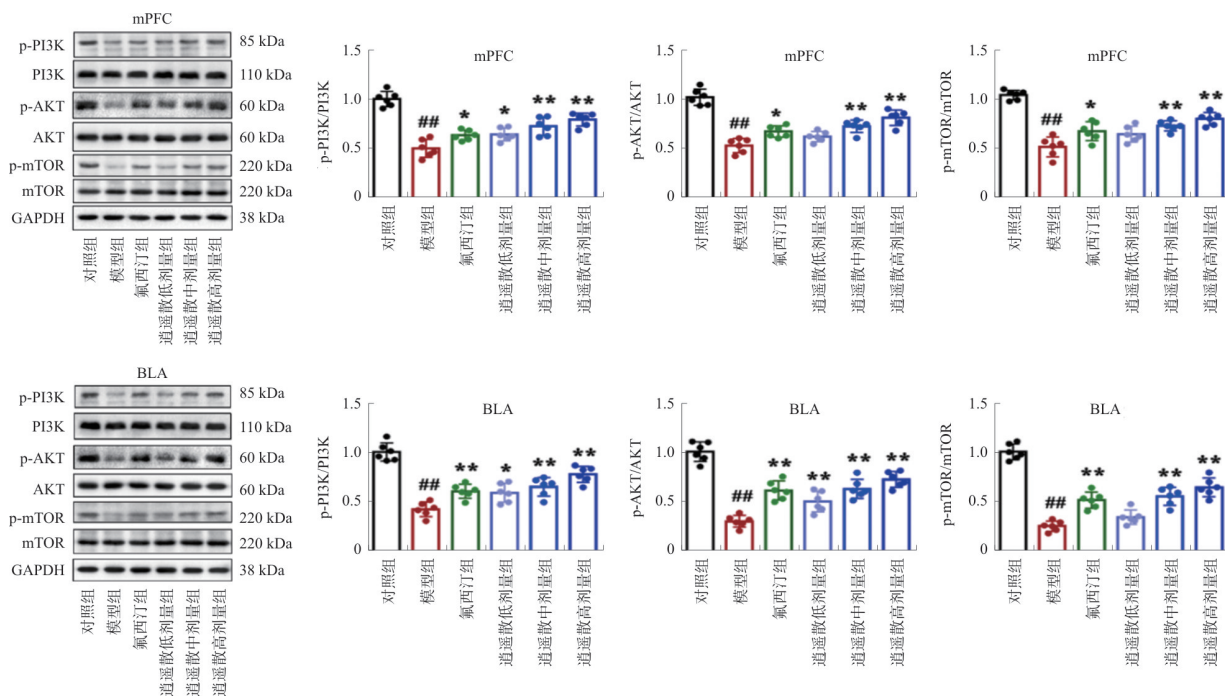
本研究通过 BCAS 模拟慢性脑低灌注,结合

CRS 模拟 VaD 常有的行动受限。在我们此前研究中,VaD 合并焦虑抑郁动物模型已被证实具有很好的表面效度和建构效度^[17]。本研究结果显示,与对照组相比,模型组小鼠表现出明显的焦虑抑郁行为:强迫游泳实验中小鼠不动时间显著增加,糖水偏好率降低,在旷场实验中表现出中心区活动时间明显减少,高架十字迷宫实验表现进入开放臂次数及时间明显减少。逍遥散干预后模型组小鼠的糖水偏好率以及在旷场实验中的中心区时间、高架十字迷宫实验中进入开放臂次数及时间均显著增加,强迫游泳实验中的不动时间减少。以上行为学测试结果表

明逍遥散能有效地改善模型组小鼠焦虑抑郁行为表型。

mPFC 和 BLA 是参与抑郁症和焦虑症等精神疾病发病过程的关键核团^[18]。mPFC 与其他大脑区域的丰富联系在记忆、认知、决策、社会行为和情绪中起着关键作用^[19]。BLA 被认为是编码情绪效价并指导行为的关键结构,主导焦虑、恐惧及其他负面情绪形成。mPFC 通过对 BLA 的纤维投射形成自上而下的抑制性控制,这一过程需要环路神经元之间信号传递的高度协同^[20]。缺血导致的髓鞘受损引

起神经电传导延迟,使空间上离散的神经核团在信息传递的时间同步性上出现不协调,以致大脑在执行自发动作时产生预测错误,引起行为混乱^[21-22]。本研究结果显示:模型组小鼠 mPFC、BLA 髓鞘相关蛋白 MBP、MAG 和 MOG 表达显著降低,逍遥散可以部分逆转这一改变;同时,对 mPFC、BLA 及大脑重要的神经纤维束 CC 进行 MBP 免疫荧光染色和 LFB 染色,证实逍遥散能减轻髓鞘损伤,可能是其改善模型小鼠精神行为异常的重要作用机制。



注:与对照组比较, ^{##} $P < 0.01$;与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 6$ 。

图 7 逍遥散对小鼠 mPFC-BLA PI3K/AKT/mTOR 通路蛋白表达的影响

Fig. 7 Effect of XYP on the expression of mPFC and BLA PI3K/Akt/mTOR pathway protein in mice

髓鞘损伤后,机体启动包括少突胶质前体细胞(OPC)迁移、增殖、分化成新的 OL 并重新包裹轴突形成髓鞘等一系列复杂过程,以恢复轴突传导功能。有研究表明 PI3K/AKT/mTOR 是参与 OPC 迁移、增殖的重要信号通路^[23]。PI3K 是由调节亚基 p85 和催化亚基 p110 构成的二聚体,与生长因子受体结合后,可改变 AKT 蛋白结构使其活化,并以磷酸化作用激活下游 mTOR,从而调节 OPC 的增殖、分化以及迁移等^[24-25]。研究显示,上调 AKT/mTOR 信号通路明显增加小鼠 CC 髓鞘厚度及脑白质体积^[26],而条件性敲除 PI3K/AKT 上游抑制剂 PTEN 会导致小鼠中枢系统髓鞘明显增加^[27]。脑慢性低灌注会抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路的激活,使 OPC 募集及正常分化受阻,导致脑白质损伤加重^[28]。通过对逍

遥散中 136 种有效成分进行生信分析及体外验证显示,PI3K/AKT 信号通路是逍遥散减轻缺血性卒中损伤的主要效应通路^[29]。我们检测了 mPFC 和 BLA 神经核团中 PI3K/AKT/mTOR 信号通路蛋白表达变化。模型组小鼠 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 水平明显降低,而在给予逍遥散干预后,mPFC 和 BLA 神经核团中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 蛋白表达水平显著增加。提示逍遥散可能通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,参与调节 mPFC-BLA 神经环路髓鞘的形成,从而改善 VaD 焦虑抑郁表型。

VaD 伴抑郁、焦虑可归属于中医“郁证”范畴。郁证以气郁为先,总体虽可概括为虚、郁、瘀三个方面,但在脑血管疾病的病理基础下,气郁血滞则精血

不能上荣于头窍,瘀血阻滞于脑脉经络而致神机失用,则以“气郁”与“留滞”互为因果,病情更甚。逍遥散由柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、甘草、薄荷、生姜共 8 味药物组成,肝脾同调,气血兼顾,刚柔相济,疏散有度。针对 VaD 气郁血虚、脑窍失养的病机特点,逍遥散疏肝解郁、气血条达,精血津液之精华上达头目,充髓养神。逍遥散在长期临床应用中,其安全性和有效性得到了充分证实。我们的研究结果也表明,逍遥散可能是治疗 VaD 伴精神行为异常更好的选择。

综上所述,本研究从神经环路髓鞘功能角度探讨了逍遥散改善 VaD 伴随精神行为异常的作用机制,显示逍遥散可能通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,促进 mPFC-BLA 神经环路髓鞘再形成,增加神经核团间信息整合能力,从而改善 VaD 小鼠焦虑抑郁表型。在后续工作中我们将进一步利用光遗传学调控、在体场电位记录等工具,针对髓鞘病理在 VaD 合并焦虑抑郁中角色进行验证探索和更深入的药物机制研究,可能为这一临床棘手难题提供有希望的干预靶点和药物选择。

参考文献:

- [1] IADECOLA C, DUERING M, HACHINSKI V, et al. Vascular cognitive impairment and dementia: JACC scientific expert panel [J]. J Am Coll Cardiol, 2019, 73(25): 3326–3344.
- [2] HACHINSKI V. Brain health—curbing stroke, heart disease, and dementia: The 2020 Wartenberg lecture [J]. Neurology, 2021, 97(6): 273–279.
- [3] VERREAULT P, TURCOTTE V, OUELLET MC, et al. Efficacy of cognitive-behavioural therapy interventions on reducing burden for caregivers of older adults with a neurocognitive disorder: A systematic review and meta-analysis [J]. Cogn Behav Ther, 2021, 50(1): 19–46.
- [4] SUN LN, XU HP, WANG YF, et al. The mitochondrial-targeted peptide SBT-20 ameliorates inflammation and oxidative stress in chronic renal failure [J]. Aging, 2020, 12(18): 18238–18250.
- [5] KALES HC, GITLIN LN, LYKETOS CG. Assessment and management of behavioral and psychological symptoms of dementia [J]. BMJ, 2015, 350: h369.
- [6] HOWES OD, MURRAY RM. Schizophrenia: An integrated sociodevelopmental-cognitive model [J]. Lancet, 2014, 383(9929): 1677–1687.
- [7] HAGEMeyer N, GOEBBELS S, PAPIOL S, et al. A myelin gene causative of a cataptonia-depression syndrome upon aging [J]. EMBO Mol Med, 2012, 4(6): 528–539.
- [8] CZECH B, NAGY SA. Clinical findings documenting cellular and molecular abnormalities of Glia in depressive disorders [J]. Front Mol Neurosci, 2018, 11: 56.
- [9] POGGI G, BORETIUS S, MÖBIUS W, et al. Cortical network dysfunction caused by a subtle defect of myelination [J]. Glia, 2016, 64(11): 2025–2040.
- [10] DICHGANS M, LEYS D. Vascular cognitive impairment [J]. Circ Res, 2017, 120(3): 573–591.
- [11] VIGEN CL, MACK WJ, KEEFE RS, et al. Cognitive effects of atyp-

ical antipsychotic medications in patients with Alzheimer's disease: Outcomes from CATIE-AD [J]. Am J Psychiatry, 2011, 168(8): 831–839.

- [12] MAUST DT, KIM HM, SEYFRIED LS, et al. Antipsychotics, other psychotropics, and the risk of death in patients with dementia: Number needed to harm [J]. JAMA Psychiatry, 2015, 72(5): 438–445.
- [13] SHELINE YI, PIEPER CF, BARCH DM, et al. Support for the vascular depression hypothesis in late-life depression: Results of a 2-site, prospective, antidepressant treatment trial [J]. Arch Gen Psychiatry, 2010, 67(3): 277–285.
- [14] 周云. 逍遥散治疗肝郁脾虚型老年性痴呆伴抑郁患者的临床观察 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2015.
- [15] ZHOU Y. Clinical observation of Xiaoyao Powder in the treatment of senile dementia with depression of liver depression and spleen deficiency type [D]. Wuhan: Hubei University of Traditional Chinese Medicine, 2015.
- [15] 沈莹, 余鸽, 张海生. 逍遥丸联合盐酸多奈哌齐治疗血管性痴呆伴发抑郁疗效观察 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(7): 1724–1726.
- [15] SHEN Y, YU G, ZHANG HS. Xiaoyao Pill combined with donepezil hydrochloride in the treatment of vascular dementia with depression [J]. Chin J Tradit Chin Med, 2018, 36(7): 1724–1726.
- [16] 段富津. 方剂学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1995: 59.
- [16] DUAN FJ. Prescription Science [M]. Shanghai: Shanghai science and technology press, 1995: 59.
- [17] TAN ZH, QIU J, ZHANG YT, et al. Tetramethylpyrazine alleviates behavioral and psychological symptoms of dementia through facilitating hippocampal synaptic plasticity in rats with chronic cerebral hypoperfusion [J]. Front Neurosci, 2021, 15: 646537.
- [18] LIU WZ, ZHANG WH, ZHENG ZH, et al. Identification of a prefrontal cortex-to-amygdala pathway for chronic stress-induced anxiety [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2221.
- [19] KLUNE CB, JIN B, DENARDO LA. Linking mPFC circuit maturation to the developmental regulation of emotional memory and cognitive flexibility [J]. eLife, 2021, 10: 64567.
- [20] SEIDL AH, RUBEL EW, BARRIA A. Differential conduction velocity regulation in ipsilateral and contralateral collaterals innervating brainstem coincidence detector neurons [J]. J Neurosci, 2014, 34(14): 4914–4919.
- [21] WHITFORD TJ, FORD JM, MATHALON DH, et al. Schizophrenia, myelination, and delayed corollary discharges: A hypothesis [J]. Schizophr Bull, 2012, 38(3): 486–494.
- [22] PICARD F, FRISTON K. Predictions, perception, and a sense of self [J]. Neurology, 2014, 83(12): 1112–1118.
- [23] GAESSER JM, FYFFE – MARICICH SL. Intracellular signaling pathway regulation of myelination and remyelination in the CNS [J]. Exp Neurol, 2016, 283(Pt B): 501–511.
- [24] NORRMÉN C, SUTER U. Akt/mTOR signalling in myelination [J]. Biochem Soc Trans, 2013, 41(4): 944–950.
- [25] WOOD TL, BERCURY KK, CIFELLI SE, et al. mTOR: A link from the extracellular milieu to transcriptional regulation of oligodendrocyte development [J]. ASN Neuro, 2013, 5(1): e00108.
- [26] GOEBBELS S, OLTROGGE JH, KEMPER R, et al. Elevated phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in Glia triggers cell-autonomous membrane wrapping and myelination [J]. J Neurosci, 2010, 30(26): 8953–8964.
- [27] HARRINGTON EP, ZHAO C, FANCY SP, et al. Oligodendrocyte PTEN is required for myelin and axonal integrity, not remyelination [J]. Ann Neurol, 2010, 68(5): 703–716.
- [28] SHU Y, ZHANG H, KANG T, et al. PI3K/Akt signal pathway involved in the cognitive impairment caused by chronic cerebral hypoperfusion in rats [J]. PLoS ONE, 2013, 8(12): e81901.
- [29] XU Y, CHEN W, CHEN Z, et al. Mechanism of action of Xiaoyao San in treatment of ischemic stroke is related to anti-apoptosis and activation of PI3K/Akt pathway [J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 753–767.

(编辑: 杨巍敏)