

## 酸枣仁散对运输应激大鼠脑内 5-HT 表达的影响

王利利<sup>1</sup> 马彤辉<sup>1</sup> 俞明远<sup>1</sup> 汤林杰<sup>1</sup> 张文君<sup>1</sup> 许剑琴<sup>1</sup> 刘风华<sup>2</sup> 马云飞<sup>1\*</sup> 滕可导<sup>1</sup>

(1. 中国农业大学 动物医学院,北京 100193;

2. 北京农学院 动物科学技术学院,北京 102206)

**摘要** 为研究运输应激对脑内五羟色胺(5-hydroxytryptamine,5-HT)表达的影响及酸枣仁散对运输应激的调控作用,试验采用摇床模拟公路运输途中的摇晃、高温和拥挤等因素,建立大鼠运输应激模型(35℃,60 r/min,每天应激2 h,连续7 d)。将40只大鼠随机分为对照组、酸枣仁组、应激组和应激+酸枣仁组,分别处理7 d后,断头取脑,利用酶联免疫吸附法(ELISA)和免疫组化法检测各组大鼠脑区5-HT含量变化及分布。酶联免疫吸附法检测结果显示,与对照组相比,应激组大鼠中缝核、海马和纹状体等脑区5-HT表达量均明显减少( $P<0.05$ ),应激+酸枣仁组较应激组5-HT表达量显著增加( $P<0.05$ )。免疫组化结果显示,在中缝背核及其亚核DRDsh、DRv和DRc亚核,应激组大鼠5-HT灰度值与对照组相比显著下降( $P<0.05$ ),应激+酸枣仁组与应激组相比显著上升( $P<0.05$ )。以上结果表明,运输应激可以导致中枢神经系统部分脑区5-HT含量下降,而酸枣仁散可能通过上调脑内5-HT的含量来调控运输应激。

**关键词** 酸枣仁散;大鼠;应激;5-HT;脑;中缝背核

**中图分类号** S 852; S 853.74

**文章编号** 1007-4333(2015)04-0152-06

**文献标志码** A

## Effect of Suanzaoren San on 5-HT expression in the brain of transport stressed rats

WANG Li-li<sup>1</sup>, MA Tong-hui<sup>1</sup>, YU Ming-yuan<sup>1</sup>, TANG Lin-jie<sup>1</sup>, ZHANG Wen-jun<sup>1</sup>,  
XU Jian-qin<sup>1</sup>, LIU Feng-hua<sup>2</sup>, MA Yun-fei<sup>1\*</sup>, TENG Ke-dao<sup>1</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. College of Animal Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

**Abstract** In order to investigate the impact of transport stress on 5-HT in rat brain and the regulation of Suanzaoren San (named as SZR), a swing bed was used as transport stress module (named as TS) under condition of 35℃, 60 rpm and 2 h/d for 7 days. Forty rats were divided randomly into four groups: the control group, the SZR group, the TS group and the SZR + TS group. The brain tissues were taken after 7 days treatment. The level of 5-HT in different regions of the brain were detected using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The distribution and quantity of serotonergic neurons were also examined by immunohistochemical technique. The results of ELISA showed that the content of 5-HT was significantly decreased ( $P<0.05$ ) in dorsal raphe nucleus, hippocampus and striatum after transport stress. Moreover, 5-HT content in the SZR + TS group was significantly increased ( $P<0.05$ ) in these regions, compared with the TS group. The immunohistochemical results showed that 5-HT expression in the TS group was decreased significantly compared to control group in DRDsh, DRv and DRc ( $P<0.05$ ). While the level of 5-HT in the TS + SZR group was increased compared with the TS group. In conclusion, transport stress can decrease the level of 5-HT in different brain regions, and SZR could regulate transport stress by increasing the level of 5-HT.

**Key words** SZR; rat; stress; 5-HT; brain; dorsal raphe nucleus

收稿日期: 2014-11-20

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD34B01); 公益性行业(农业)科研专项(201003060-10); 中央高校基本科研业务费专项资金(2011JS008)

第一作者: 王利利, 硕士研究生, E-mail: wangli0324@163.com

通讯作者: 马云飞, 副教授, 主要从事动物组织胚胎学与神经生物学研究, E-mail: yunfeima@cau.edu.cn

动物在运输过程中由于内外环境因素的变化会产生应激反应,如身体的损伤,精神、情志的变化以及行为的异常等<sup>[1]</sup>,严重时会导致畜禽死亡,给养殖业造成巨大经济损失。目前,对于抗运输应激药物的研究主要集中在化学药物上,其中以安定类药物为主<sup>[2]</sup>,但由于安定类药物的获得越来越难,并且药物残留也是一个不容忽视的问题,因此,安定类药物作用于抗运输应激的前景并不乐观。鉴于此,研发中兽药饲料添加剂应用于动物生产过程中以减缓环境应激对家畜的影响,从而保证畜禽生产健康持续发展,其意义重大。中药酸枣仁汤是我国传统经典镇静安神方,酸枣仁散是由酸枣仁汤加减方改进而成,主要由酸枣仁为君药组成。前期的药效学研究表明,酸枣仁散具有减少小鼠自主活动次数,镇静催眠、耐高温和耐缺氧等作用。另有研究发现<sup>[3]</sup>,酸枣仁汤可以改变大鼠脑内单胺类递质的含量,脑内5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)作为中枢神经系统中一种重要的单胺类神经递质,与精神活动、睡眠、情绪控制和认知等有密切关系,脑内5-HT发挥这些作用与中缝核、海马和下丘脑等部位有关<sup>[4-6]</sup>,中枢神经系统5-HT能神经元主要集中在中脑中缝背核区域,中缝背核又可根据5-HT神经元的分布特点分为中缝背核背侧核区(DRDc)、背侧壳区(DRDsh)、翼侧区(DRL)、腹侧区(DRV)、中缝背核嘴侧(DRr)和中缝背核尾侧(DRc)等亚核<sup>[7]</sup>。目前关于中药抗运输应激的研究鲜见报道,本试验研究运输应激对不同脑区5-HT含量、以及中缝背核各核区5-HT表达分布的影响,探索酸枣仁散对运输应激的调控机制,旨在为中兽药应用于临床提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验分组及设计

SD雄性大鼠(购自北京大学实验动物中心(SCXK(京)2012-0001)),体重200~220 g,随机分为对照组、酸枣仁散(5 g/kg BW)组、应激组和应激+酸枣仁散(5 g/kg BW)组。酸枣仁散由北京中农劲腾生物技术有限公司提供(批号:20120503),主要由酸枣仁为君药组成。酸枣仁散剂量由本实验室前期药效学研究结果确定,酸枣仁散组和应激+酸枣仁散组以酸枣仁散溶于蒸馏水后灌胃给药,对照组与单纯应激组灌服等体积生理盐水。试验周期7 d,试验期间采用摇床模拟

公路运输途中的摇晃、高温、拥挤和噪音等因素,建立大鼠运输应激模型(35 ℃, 60 r/min, 每天应激2 h)<sup>[8-9]</sup>。末次灌服后1 h,动物称重,急性处死并分离脑组织用于酶联免疫吸附(ELISA)法检测,或灌流固定后取脑,制作冰冻切片用于免疫组化检测。

### 1.2 ELISA法检测

大鼠断头取脑后,在解剖显微镜下对照大鼠脑图谱于冰浴上分离中缝核、海马、下丘脑、纹状体和皮质区,各脑区组织块用分析天平精密称重后,分别加入9倍量的生理盐水,在冰浴中匀浆,3 000 r/min,离心10 min,分离上层清液。将低温保存的5-HT含量测定试剂盒(028308,南京建成生物技术公司产品)从冰箱中取出,在室温条件下平衡30 min,按照试剂盒说明书进行5-HT含量测定。

### 1.3 免疫组化法检测

大鼠灌流固定取脑,经4%多聚甲醛溶液后固定24 h,置于30%蔗糖溶液中过夜至脑块沉底,制作30 μm厚的冰冻冠状连续切片。切片制备2套,1套用于免疫组化染色,另1套做阴性对照。免疫组化ABC法染色主要步骤:先用2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>室温孵育切片15 min,以消除内源性过氧化物酶的活性;滴加1:4 000兔抗5-HT多克隆抗体(S5545,美国Sigma公司产品),4 ℃孵育过夜;滴加1:100生物素化的驴抗兔IgG(711-067-003,美国Jackson公司产品),室温孵育2 h;依据说明书滴加1:100 ABC复合物试剂盒(美国Vector公司产品)中的试剂,室温孵育30 min;DAB(美国Sigma公司产品)显色。以上各步骤之间均用含0.3% TritonX-100的5 mmol/L PBS(pH7.4)冲洗3次,每次10 min。切片常规脱水、透明和中性树脂封片。显微镜观察可见免疫反应阳性产物呈棕黄色。阴性对照:用PBS代替一抗,其余步骤同上。

### 1.4 统计学分析

每组随机取9张含有中缝核群的切片,对免疫组化阳性区域用显微照相系统采集图片,用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件测量阳性表达区域的平均光密度值。试验所得数据均采用SPSS 17.0软件进行One-way ANOVA单因素方差分析,结果用“平均值±标准差”表示, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 各组大鼠不同脑区 5-HT 的含量

与对照组比较,各试验组大鼠体重无明显变化。应激后,与对照组大鼠相比,应激组大鼠扎堆行为消失,蜷缩少动,情绪不稳,胆小易惊,皮毛发枯,无光泽。应激+酸枣仁散组大鼠行为表现与应激组相似。单独饲喂酸枣仁散的大鼠与对照组大鼠相比,行为表现亦无明显差异。

用 ELISA 法对各组大鼠不同脑区 5-HT 的含

量进行分析(表 1)。在中缝核、海马和纹状体部位,应激组大鼠 5-HT 含量与对照组相比显著减少( $P < 0.05$ ),而应激+酸枣仁散组较应激组 5-HT 含量显著增加( $P < 0.05$ );在下丘脑和皮质部位,应激组 5-HT 含量减少,但与对照组比较差异不显著( $P > 0.05$ ),应激+酸枣仁散组 5-HT 含量较应激组有升高趋势,但差异亦不显著( $P > 0.05$ )。试验结果表明,运输应激模型大鼠部分脑区(中缝核、海马和纹状体)5-HT 含量明显减少,使用酸枣仁散可以通过提高 5-HT 的含量来缓解应激。

表 1 不同处理组各脑区 5-HT 的含量

Table 1 Content of 5-HT in different brain regions of rats in each group

ng/mL

组别 Groups	中缝背核 Dorsal raphe nuclei	海马 Hippocampus	纹状体 Striatum	下丘脑 Hypothalamus	前额皮质 Prefrontal cortex
空白组 Control group	519.83±7.18 b	322.83±41.61 a	509.91±16.59 b	366.96±7.57 ab	352.01±44.15 a
酸枣仁组 SZR group	565.58±35.58 a	339.08±20.38 a	565.69±26.48 a	378.78±22.01 a	353.41±71.11 a
应激组 TS group	469.07±16.92 c	255.99±120.07 b	365.57±32.68 c	348.36±6.44 b	324.96±28.55 a
应激+酸枣仁组 TS+SZR group	508.36±11.11 b	310.71±22.28 a	488.25±22.89 b	370.44±15.49 ab	344.86±61.98 a

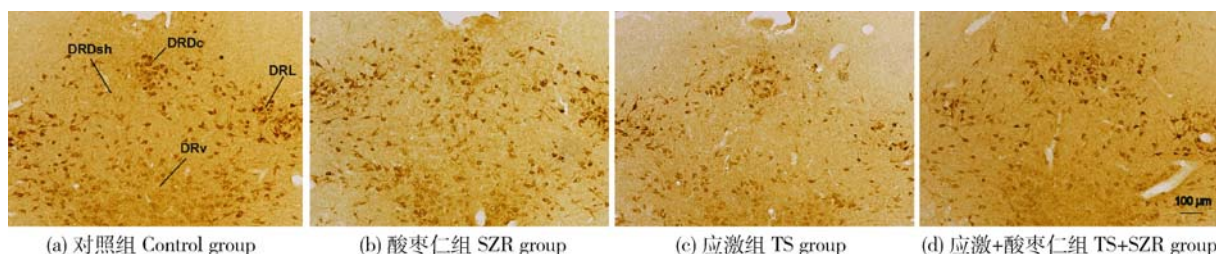
注:同列字母相同表示差异不显著( $P > 0.05$ ),字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Note: Different letters in the same row means significant difference between the treatments ( $P < 0.05$ ), same letter in the same row means not significant difference between treatments ( $P < 0.05$ ).

### 2.2 各组大鼠中缝背核 5-HT 的分布及表达

DAB 显色后光镜观察可见,5-HT 免疫反应阳性细胞呈现深浅不均的棕黄色(图 1)。5-HT 免疫反应阳性产物主要位于神经元胞体和树突内,阳性神经元胞体多呈卵圆形、椭圆形,偶见三角形。大鼠

中脑中缝背核各亚核,均出现了 5-HT 阳性神经元胞体分布,中缝背核背侧亚核核区(DRDc)和中缝背核翼侧亚核(DRL)5-HT 呈强阳性表达,背侧亚核壳区(DRDsh)有少量的 5-HT 阳性表达。阴性对照试验显示免疫组化结果为阴性(数据未显示)。



DRDc, 中缝背核背侧亚核核区; DRDsh, 中缝背核背侧亚核壳区; DRL, 中缝背核翼侧亚核; DRv, 中缝背核腹侧亚核。

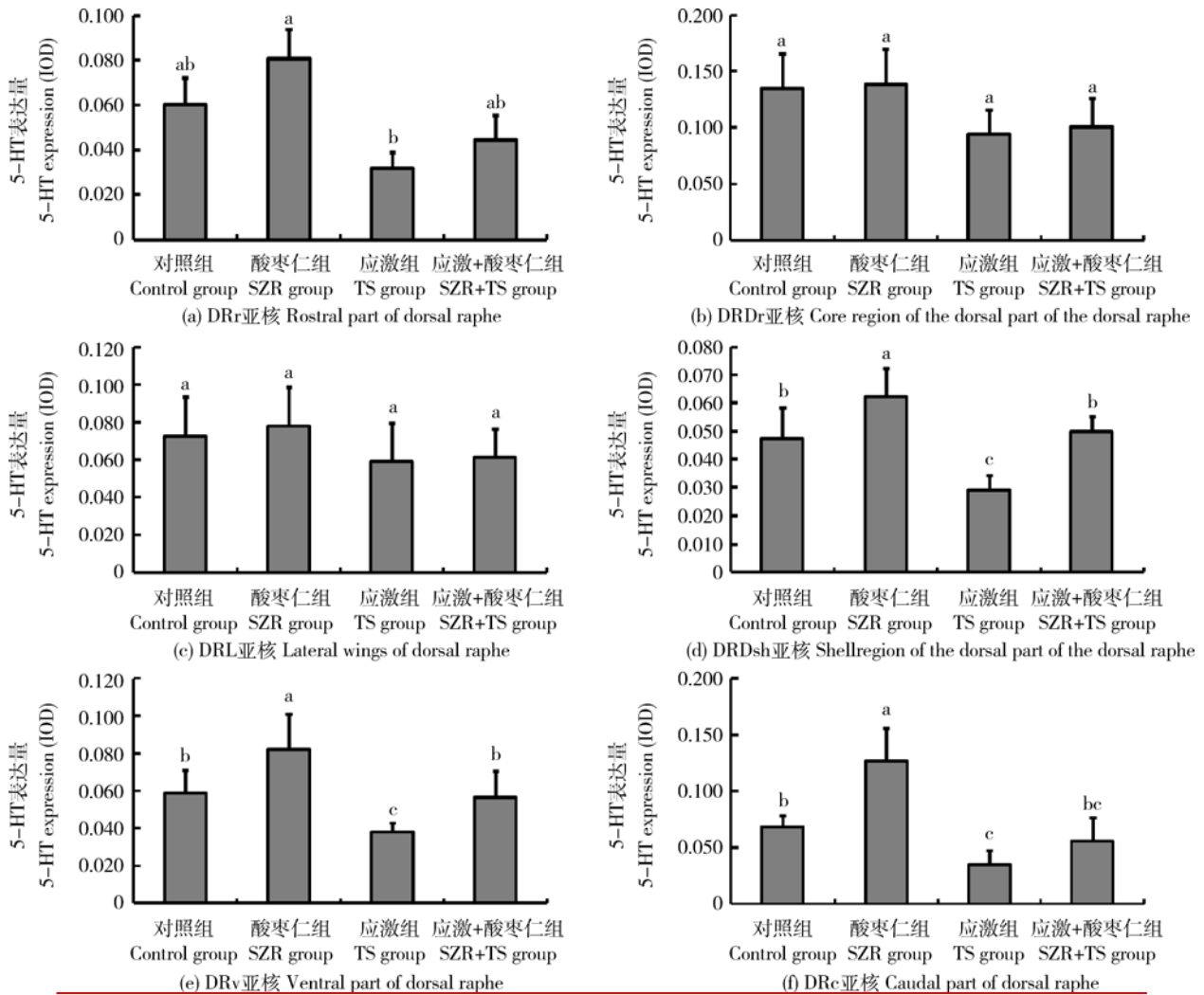
DRDc, core region of the dorsal part of the dorsal raphe; DRDsh, shell region of the dorsal part of the dorsal raphe; DRL, the lateral wings of dorsal raphe; DRv, ventral part of dorsal raphe.

图 1 5-HT 在各组大鼠中缝背核的分布

Fig. 1 Distribution of 5-HT immunoreactivity in the dorsal raphe nucleus of rats in each group

对各组大鼠中缝背核各亚核 5-HT 阳性物质相对表达量进行分析(图 2),结果显示,中缝背核嘴侧(DRr)亚核、DRDc 亚核以及 DRL 亚核,应激组 5-HT 表达量与对照组相比无明显差异( $P>0.05$ ) (图 2(a)、(b)、(c));DRDsh 亚核和中缝背核腹侧(DRv)亚核,应激组 5-HT 表达量显著低于对照组( $P<0.05$ ),而应激+酸枣仁组 5-HT 表达量显著

高于应激组( $P<0.05$ )(图 2(d)、(e));对于中缝背核尾侧(DRc)亚核,应激组 5-HT 表达量显著低于对照组( $P<0.05$ ),而应激+酸枣仁组 5-HT 表达量升高,但与应激组比较差异不显著( $P>0.05$ )(图 2(f))。试验结果表明,运输应激模型大鼠中缝背核部分亚核(DRDsh 和 DRv)5-HT 表达显著减少,使用酸枣仁散可以通过提高 5-HT 的表达量来缓解应激。



柱上不同字母表示组间差异显著( $P<0.05$ )。

Column marked with no common letters are significantly different ( $P<0.05$ ) within groups.

图 2 各组大鼠中缝背核各亚核 5-HT 表达的变化

Fig. 2 Level of 5-HT in different dorsal raphe nucleus of rats in each group

### 3 讨论

#### 3.1 运输应激对不同脑区 5-HT 表达的影响

动物的运输随着社会的发展越来越频繁,然而运输期间的摇晃、高温、拥挤以及缺乏饮水和食物供

给等外界因素会导致动物对环境突然变化的恐惧,相互之间打斗引起的损伤和情志变化等一系列的生理、心理和代谢过程改变,造成动物运输应激反应<sup>[10]</sup>。运输应激反应表现多样,机制及其复杂,对机体的神经、免疫和内分泌等方面均有影响。

5-HT, 又称血清素(Serotonin), 是脑内十分重要的单胺类神经递质, 参与机体情绪、食欲和睡眠等多种生理功能的调节。如果体内 5-HT 的浓度降低, 神经元间信号传递就会延缓, 中枢内尤其是一些重要脑区 5-HT 浓度的变化是高等动物对应激的一种调节反应。脑内的 5-HT 能神经元起源于脑中缝核群, 其神经纤维投射到几乎整个中枢<sup>[11]</sup>。研究表明, 中枢的多个脑区如中缝核、海马、下丘脑、额叶皮质和杏仁核等参与了应激的生物过程<sup>[12]</sup>, 脑中缝核团对机体睡眠、觉醒周期、行为和情绪等活动有重要的调节作用, 海马不仅是应激反应的高级调节中枢也是应激损伤的敏感区<sup>[13]</sup>, 下丘脑、皮质和纹状体等也参与不同应激过程的调节<sup>[14]</sup>。本试验 ELISA 检测结果发现, 运输应激状态下大鼠多个脑区 5-HT 表达下调, 其中脑中缝核、海马和纹状体等部位 5-HT 含量均明显减少, 尤其是中缝核区域作为中枢 5-HT 能神经元胞体的主要聚集区, 其变化尤为显著。海马是对应激反应非常敏感而且容易受损的区域, 海马的 CA1 和 CA2 区域, 接受大量 5-HT 神经元投射。5-HT 通过海马神经回路来调节应激反应, 海马中 5-HT 浓度的变化影响学习记忆、行为、情绪变化等。另一方面, 海马有大量神经纤维投射到下丘脑, 影响下丘脑的分泌功能, 并对下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)进行负反馈调节。纹状体是 5-HT 能神经纤维投射的重要部位, 纹状体 5-HT 的含量与中枢疲劳与运动功能有着重要关系。近年研究表明<sup>[14]</sup>, 脑内 5-HT 含量的减少直接与精神以及情绪变化密切相关, 中枢 5-HT 耗竭的大鼠在应激后抑郁和焦虑的症状表现得更加明显, 认知和空间记忆能力显著下降, 提示 5-HT 在缓冲应激对机体造成影响的作用中, 扮演着及其重要的角色。本研究免疫组化结果表明, 应激大鼠中缝背核背侧亚核壳区(DRDsh)、中缝背核腹侧亚核(DRv)和中缝背核尾侧亚核(DRc)5-HT 表达量显著降低, 而中缝背核背侧亚核核区(DRDc)、中缝背核翼侧亚核(DRL)和中缝背核嘴侧亚核(DRr)5-HT 表达无明显变化。已有的研究证实中缝核群各核区在动物应激过程中发挥作用不尽相同<sup>[15]</sup>, 中缝背核尾侧 DRc 核区可以被不同的焦虑情形激活, 例如焦虑性药物<sup>[16]</sup>、社会失败和不可避免性冲击<sup>[17]</sup>等。神经解剖学研究发现, DRD(中缝背核背侧区)和 DRc(中缝背核尾侧区)都投射到与焦虑相关的重要脑区<sup>[18]</sup>。本试验的研究结果也表明, 应激对中缝背核不同亚

核的影响程度不同, 对应激反应的调控作用中, DRDsh、DRv 和 DRc 等亚核参与度更高, 结合 ELISA 结果, 以上亚核可能有较多神经元投射到海马、纹状体等部位。因此, 中枢神经系统不同脑区发挥抗焦虑作用与中缝核群 5-HT 能神经元有着密切关系。

### 3.2 酸枣仁散上调 5-HT 的表达, 缓解运输应激

酸枣仁汤是传统经典的镇静安神方, 有研究表明, 酸枣仁汤可以提高脑内单胺类递质的含量<sup>[19]</sup>。本试验中所用酸枣仁散是由酸枣仁汤加减方改进而成, 本实验室前期药效学试验以小鼠为研究对象, 结果表明, 酸枣仁散可以减少小鼠自主活动次数、增加戊巴比妥钠小鼠睡眠时间、提高耐缺氧和耐高温等能力, 表明酸枣仁散具有镇静催眠和抗应激之功效。而且中兽医临床试验也表明酸枣仁散可以有效缓解仔猪转群应激, 并有育肥的功效(数据未发表)。本试验研究结果表明, 在大鼠中缝核、海马和纹状体部位, 应激后 5-HT 含量明显减少, 经灌服酸枣仁散(应激+酸枣仁组)5-HT 含量又显著增加, 接近对照组水平, 而在下丘脑和皮质部位, 酸枣仁散处理后, 5-HT 含量变化不显著; 应激大鼠中缝背核背侧壳区(DRDsh)和中缝背核腹侧区(DRv)5-HT 表达量显著降低, 灌服酸枣仁散后 5-HT 表达又明显回升, 而中缝背核其他亚核区域酸枣仁散的作用不明显。可见, 酸枣仁散可升高运输应激模型大鼠部分脑区及中缝背核部分亚核区 5-HT 的含量, 由此推测, 酸枣仁散可以通过提高脑内 5-HT 的表达来缓解运输应激。以上结果均表明, 酸枣仁散应用于临床具有广阔的前景, 但其发挥作用的具体机制和调控途径还有待于进一步研究。

## 4 结 论

运输应激可以显著减少中缝核、海马和纹状体等脑区单胺类递质 5-HT 的含量, 明显降低中缝背核群的 DRDsh、DRv 和 DRc 等核区 5-HT 的表达。酸枣仁散可以通过提高 5-HT 的含量来调控运输应激。

## 参 考 文 献

- [1] 邓红雨. 公路运输条件下牛的运输应激反应研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2013
- [2] 林藩平, 雷瑶, 张景生, 等. 药物防制生猪运输应激的效果观察

- [J]. 肉类研究, 1990, 3(4): 14-16
- [3] 王守勇, 谢鸣. 酸枣仁汤组分配方对高架十字迷宫大鼠海马单胺类递质及其代谢物的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2012(2): 117-120, 124
- [4] 黄欢捷, 邵蓓, 何大楼, 等. 帕罗西汀对心理应激大鼠海马5-HT的影响[J]. 中国现代医生, 2011(17): 14-15, 20
- [5] 黄欢捷, 邵蓓, 何大楼, 等. 帕罗西汀对心理应激大鼠海马5-HT及c-fos表达的影响[J]. 医学研究杂志, 2011(6): 114-116
- [6] 周建松, 李凌江, 曹霞, 等. 5-羟色胺及其突触后1A受体对慢性应激大鼠情绪和认知的影响[J]. 中南大学学报: 医学版, 2008(4): 305-311
- [7] Baker K, Halliday G, Tork I. Cytoarchitecture of the human dorsal raphe nucleus[J]. J Comp Neurol, 1990, 301: 147-161
- [8] 麻武仁. 运输应激对猪和大鼠肠黏膜免疫的影响及酸枣仁汤调控机制[D]. 北京: 中国农业大学, 2013
- [9] Changrong W, Peng Y, Xiaolong X, et al. Effect of simulated transport stress on the rat small intestine: A morphological and gene expression study[J]. Research in Veterinary Science, 2014, 96: 355-364
- [10] 李玉保. 长途运输应激猪组织损伤与hsps mRNA转录、HSPs表达相关性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2006
- [11] 高振平, 潘泽, 孟祥辉, 等. 5-羟色胺细胞在成人脑中缝核群的分布[J]. 白求恩医科大学学报, 1998(1): 38-39
- [12] 王竹风, 汪宝军, 岳广欣, 等. 慢性应激对脑区海马和杏仁核神经元影响的研究[J]. 辽宁中医杂志, 2009, 12: 2028-2031
- [13] Mckittrick C, Magarinos A, Blanchard D, et al. Chronic social stress reduced dendritic arbors in CA3 of hippocampus and decreases binding to serotonin transporter sites[J]. Synapse, 2000, 36: 85-94
- [14] 徐瑞鑫. 冲突性心理应激所致大鼠睡眠障碍的中枢5-HT的机制研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2013
- [15] Spiacii A, Coimbra C, Zangrossi H. Differential involvement of dorsal raphe subnuclei in the regulation of anxiety-and panic-related defensive behaviors[J]. Neuroscience, 2012, 227: 350-360
- [16] Staub D, Evans A, Lowry C. Evidence supporting a role for corticotrophin-releasing factor type 2 (CRF2) receptors in the regulation of subpopulations of serotonergic neurons[J]. Brain Research, 2006, 1070: 77-89
- [17] Paul E, Hale M, Lukkes J, et al. Repeated social defeat increases reactive emotional coping behavior and alters functional responses in serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus[J]. Physiol Behav, 2011, 104: 272-282
- [18] Hale M, Shekhar A, Lowry C. Stress-related serotonergic systems: Implications for symptomatology of anxiety and affective disorders[J]. Cell Mol Neurobiol, 2012, 32: 695-708
- [19] 杨新年, 张业, 李霏. 酸枣仁汤对抑郁模型大鼠行为学和脑组织单胺类神经递质的影响[J]. 河南中医学院学报, 2007(4): 14-17

责任编辑: 苏燕