

神经病学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000476

抑郁症大鼠海马 CA1 区及齿状回毛细血管的体视学研究

谭川雪¹, 王飞飞¹, 陈林木¹, 黄春霞², 高原³, 蒋林¹, 张毅¹, 周春妮¹, 晁凤蕾¹, 张蕾¹, 唐勇¹

(1. 重庆医科大学基础医学院组织学与胚胎学教研室、干细胞与组织工程研究室, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学基础医学院生理学教研室, 重庆 400016; 3. 重庆医科大学附属第一医院老年科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究慢性不可预见性刺激(chronically unpredicted stress, CUS)所致抑郁症模型大鼠海马 CA1 区和齿状回(dentate gyrus, DG)体积及毛细血管的改变。**方法:**选取 Sprague Dawley (SD) 大鼠, 经筛选后随机分为对照组 10 只和模型组 10 只。模型组采取慢性不可预见刺激建立抑郁症模型, 共给予应激 35 d, 对照组不给予应激。利用糖水偏好实验和开场实验检测模型是否建立成功。建模成功后, 分别从模型组和对照组中各随机选取 5 只 SD 大鼠, 运用体视学和免疫组化染色相结合的方法对大鼠海马 CA1 区和 DG 毛细血管进行定量研究, 剩余 5 只进行相关分子生物学研究。**结果:**模型组大鼠和对照组大鼠在体质量[(314.81 ± 31.52) g, (349.18 ± 28.23) g, $t=2.569$, $P=0.019$]、糖水偏好实验[(82.37 ± 8.44)%, (89.33 ± 3.97)%, $t=2.359$, $P=0.03$]、开场实验结果[(48.30 ± 39.49) 分, (87.70 ± 38.32) 分, $u=-1.988$, $P=0.047$]具有统计学差异, 模型组较对照组大鼠海马总体积[(88.84 ± 7.51) mm³, (99.89 ± 12.55) mm³, $t=2.388$, $P=0.028$]、海马 CA1 区[(27.78 ± 1.84) mm³, (32.38 ± 3.69) mm³, $t=3.522$, $P=0.004$]和 DG[(21.02 ± 2.61) mm³, (24.20 ± 3.33) mm³, $t=2.377$, $P=0.029$]体积明显减少, 模型组较对照组大鼠海马 CA1 区毛细血管总长度[(8.454 ± 1.010) m, (11.012 ± 1.642) m, $t=2.967$, $P=0.018$]、总体积[(0.104 ± 0.019) mm³, (0.151 ± 0.021) mm³, $t=3.720$, $P=0.006$]、总表面积[(1.025 ± 0.113) cm², (1.589 ± 0.313) cm², $t=3.794$, $P=0.013$]、平均直径[(3.884 ± 0.458) μm, (4.580 ± 0.419) μm, $t=2.509$, $P=0.036$]下降以及 DG 毛细血管的总体积[(0.078 ± 0.021) mm³, (0.117 ± 0.024) mm³, $t=2.716$, $P=0.026$]、总表面积[(0.838 ± 0.184) cm², (1.133 ± 0.074) cm², $t=3.32$, $P=0.011$]、平均直径[(3.611 ± 0.493) μm, (4.630 ± 0.635) μm, $t=2.834$, $P=0.022$]下降, 结果具有统计学意义。**结论:**抑郁症模型大鼠大脑海马萎缩, CA1 区、DG 毛细血管改变, 海马结构与毛细血管的改变可能参与了抑郁症的发病机制。

【关键词】抑郁症; 海马; CA1; 齿状回; 毛细血管; 体视学**【中图分类号】**R311; R322.81; R329.4; R749.4**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-08-04

Stereological study of capillaries in CA1 of hippocampus and dentate gyrus in depression model rats

Tan Chuanxue¹, Wang Feifei¹, Chen Linmu¹, Huang Chunxia², Gao Yuan³, Jiang Lin¹,
Zhang Yi¹, Zhou Chunni¹, Chao Fenglei¹, Zhang Lei¹, Tang Yong¹(1. Teaching and Research Section of Histology and Embryology, College of Basic Medicine,
Laboratory of Stem Cells and Tissue Engineering, Chongqing Medical University;
2. Department of Physiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University;
3. Department of Geriatrics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)**【Abstract】Objective:** To investigate the changes of the capillaries in the CA1 of hippocampus and dentate gyrus (DG) in the depression rats induced by chronically unpredicted stress (CUS). **Methods:** Male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into the control group ($n=10$) and the model group ($n=10$). The depression作者介绍: 谭川雪, Email: cxtan0111@163.com,
研究方向: 神经生物学。

通信作者: 唐勇, Email: ytang062@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 31300985、81171238、31271288、81301149); 重庆市委自然科学基金资助项目 (编号: CSTC2011jjA10066); 重庆市首批“百名学术学科领军人才”培养计划 (2012)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150308.2130.002.html>
(2015-03-08)

model was established by giving rats CUS for five weeks. The rats in control group did not receive CUS. The sucrose consumption test and open-field test were used to confirm whether the depression rat model was successfully made. After the depression model of rats was successfully made, 5 rats were randomly selected from each group. The immunohistochemical technique and the stereological methods were used to quantitatively inves-

tigate the capillaries in the CA1 of hippocampus and the DG. The other 5 rats in each group were used for the related molecular biology studies. **Results:** The rat weight $[(314.81 \pm 31.52) \text{ g}, (349.18 \pm 28.23) \text{ g}, t=2.569, P=0.019]$, the results of the sugar water preference $[(82.37 \pm 8.44)\%, (89.33 \pm 3.97)\%, t=2.359, P=0.03]$ and the results of the open-field test $[(48.30 \pm 39.49), (87.70 \pm 38.32), u=-1.988, P=0.047]$ were significantly different between two groups. The volumes of the hippocampus $[(88.84 \pm 7.51) \text{ mm}^3, (99.89 \pm 12.55) \text{ mm}^3, t=2.388, P=0.028]$, the CA1 $[(27.78 \pm 1.84) \text{ mm}^3, (32.38 \pm 3.69) \text{ mm}^3, t=3.522, P=0.004]$ and the DG $[(21.02 \pm 2.61) \text{ mm}^3, (24.20 \pm 3.33) \text{ mm}^3, t=2.377, P=0.029]$ in model group were significantly lower than those in the control group. The total length $[(8.454 \pm 1.010) \text{ m}, (11.012 \pm 1.642) \text{ m}, t=2.967, P=0.018]$, total volume $[(0.104 \pm 0.019) \text{ mm}^3, (0.151 \pm 0.021) \text{ mm}^3, t=3.720, P=0.006]$, total surface area $[(1.025 \pm 0.113) \text{ cm}^2, (1.589 \pm 0.313) \text{ cm}^2, t=3.794, P=0.013]$ and average diameter $[(3.884 \pm 0.458) \mu\text{m}, (4.580 \pm 0.419) \mu\text{m}, t=2.509, P=0.036]$ of the capillaries in the hippocampal CA1 and the total volume $[(0.078 \pm 0.021) \text{ mm}^3, (0.117 \pm 0.024) \text{ mm}^3, t=2.716, P=0.026]$, total surface area $[(0.838 \pm 0.184), (1.133 \pm 0.074) \text{ cm}^2, t=3.32, P=0.011]$ and average diameter $[(3.611 \pm 0.493) \mu\text{m}, (4.630 \pm 0.635) \mu\text{m}, t=2.834, P=0.022]$ of the capillaries in the DG were significantly decreased in model group than in control group. **Conclusion:** Hippocampal capillary changes can be observed in the CA1 and the DG in depression model rats, which might be involved in the pathogenesis of depression.

[Key words] depression; capillary; CA1; dentate gyrus; hippocampus; stereology

抑郁症是一种常见的心理疾病^[1],以显著而持久的心境低落为主要临床特征,严重者可出现自杀念头和行为,给患者本人及家庭带来了严重的精神痛苦与经济损失。据世界卫生组织报道,全球共有 3.5 亿抑郁症患者,到 2020 年抑郁症可能成为仅次于心脏病的第二大疾病^[2],抑郁症已经成为 1 个突出的社会卫生问题。迄今为止,抑郁症的病因仍然不明,目前关于抑郁症的发病机制主要有单胺递质假说、神经营养因子假说、神经可塑性假说、神经内分泌功能失调假说等,其中最被广泛认同的是单胺递质假说。根据单胺递质假说所开发出来的一系列临床一线抗抑郁药物,在治疗时虽然可以改善抑郁症患者症状,但是仅对部分患者有效,药物起效慢,复发率高且需要长期治疗^[3]。因此探讨抑郁症的其他可能发病机制从而研制新型抗抑郁药,帮助抑郁症患者康复已经迫在眉睫。

近年来,越来越多的研究表明抑郁症并非只是功能性精神障碍,而是伴有脑部结构改变的疾病^[4]。文献报道抑郁症患者额叶、颞叶、边缘系统存在不同程度的脑血流灌注降低^[5-7]。边缘系统包括额下回、颞上回、前扣带回、海马和丘脑等结构,是情感行为的解剖学基础或中枢结构。边缘系统的局部脑血流量灌注降低与抑郁症患者情感障碍密切相关。核磁共振成像发现抑郁患者全脑体积与正常人相比无显著差异,但是抑郁患者存在海马体积明显缩小^[8-10]。抑郁症死亡患者尸检结果^[11]也表明抑郁症海马结构

存在明显变化。Gould 等^[12]首次揭示了海马齿状回(dentate gyrus, DG)的颗粒细胞层(subgranular zone, SGZ)新生神经元的形成在情感调节中的作用,SGZ 区细胞分裂被抑制时,加重了动物和人类的抑郁症状。这些研究均表明,脑血流量减少、海马结构改变和抑郁症的发生发展三者有着密切关系,研究抑郁症海马毛细血管的改变对于揭示抑郁症发病机制有着重要意义。虽然以前的研究表明,抑郁症患者存在一些脑区内脑血流灌注降低及海马体积下降,但是运用三维定量方法(现代体视学方法)对抑郁症动物模型海马内毛细血管的改变进行准确、客观的定量研究,国内外尚未见研究报道。本实验采取体视学方法与免疫组织化学染色相结合的方法,对抑郁症模型大鼠海马毛细血管进行定量研究,探讨其结构改变在抑郁症发生发展过程中的作用,为研究抑郁症的发病机制提供形态学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 清洁级 Sprague Dawley (SD) 雄性大鼠,体质量 180~220 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。将大鼠置于室温 22℃~24℃、昼夜节律、自由摄食饮水等条件下,适应性饲养 7 d。然后进行糖水适应性训练 7 d,采用开场实验和糖水偏好实验进行行为学测定,按照开场实验评分和糖水偏好实验结果淘汰不合格大鼠,将剩余大鼠随机分为对照组和模型组,每组 10 只。对照组大鼠每笼 5 只;模型组大鼠每笼 1 只。

1.2 实验方法

1.2.1 建模 对照组大鼠除每天抓取 1 次外不做特殊处理。模型组大鼠给予慢性不可预见性应激(chronically unpredicted stress, CUS), 建立抑郁模型^[13-14]。应激包括: 鼠笼 45 度倾斜 24 h, 潮湿垫料 24 h, 4 °C 冰水游泳 5 min, 45 °C 热水游泳 5 min, 禁食禁水 24 h, 夹尾 1 min, 80 db 噪音 1 h, 通宵照明 12 h, 120 Hz 水平震荡 5 min。上述应激随机出现, 每日给予大鼠 1 种应激, 每种应激平均出现 3、4 次, 且同种应激出现时间至少间隔 4 d, 应激 35 d。

1.2.2 体质量测量 建模前对大鼠进行体质量测量, 建模后每 7 d 对大鼠进行体质量测量。

1.2.3 糖水偏好实验 建模前对大鼠进行糖水适应性训练 7 d, 建模后每 7 d 对大鼠进行糖水偏好实验。糖水偏好实验在上午 8:00~9:00 进行, 实验前禁食禁水 24 h。给予大鼠 1% 蔗糖水和日常饮用水双瓶供饮, 24 h 后称量, 计算大鼠糖水消耗量和糖水偏好百分比。糖水偏好实验用于评价大鼠快感缺失程度^[13]。

1.2.4 开场实验 建模前与建模完成后对大鼠进行开场实验。开场实验仪器为长 100 cm, 宽 100 cm, 高 50 cm 的木箱, 底部等分为 25 个小格。对大鼠进行 5 min 的行为学测试, 评分包括中央格停留时间、水平穿越格数、竖立次数、理毛次数及粪便粒数。开场实验用于评定大鼠探究活动和情绪反应^[14]。

1.2.5 标本取材与固定 行为学测试完成后, 从 2 组中各随机选取 5 只大鼠, 剩下 5 只进行相关生物分子学研究。对大鼠腹腔注射戊巴比妥钠进行麻醉。麻醉后, 打开胸腔暴露心脏, 将灌注针头插入左心室时剪开右心耳, 固定针头, 利用灌注泵以 18 ml/min 用 0.9% 生理盐水进行灌注 70 ml, 再以 18 ml/min 用 4% 多聚甲醛进行灌注 150 ml, 以颈部僵直为灌注良好指标。去除头骨, 完整取出大脑, 沿大脑裂将大脑左右半球分开。随机选取一侧半球, 行冠状方向 1 mm 厚连续脑组织切片。每张脑片枕侧面朝上, 用 Nikon 解剖显微镜放大 10 倍拍照。

1.2.6 切片制备与染色 分离脑片中海马, 利用随机等距抽样原则在脑片海马结构中 CA1 区、DG 分别取得长宽高均为 1 mm 正方体脑组织, 用包埋剂在 Isector 包埋模具中进行包埋。将所有包埋好的组织块在恒冷冰冻切片机上切取 4 μm 厚的切片, 即各向同性切片, 保证了各个方向分布的毛细血管都有相同的概率被抽样。切片经 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液进行热抗原修复 10 min、3% 过氧化氢 37 °C 恒温水浴孵育 15 min、山羊血清 37 °C 恒温水浴孵育 30 min、CD31 单克隆抗体 (1:500 稀释, Abcam 公司) 4 °C 过夜。次日 37 °C 复温 30 min、生物素二抗 37 °C 恒温水浴孵育 30 min、辣根酶标记链霉卵白素工作液 37 °C 恒温水浴孵育 30 min (以上每步间用 PBS 液漂洗 5 min × 3 次)、DAB 显色后脱水、透明、封片。在 100 倍油镜下, 每张切片随机选取 10 个视野进行拍照, 将照片上被标记且直径 ≤ 10 μm 的血管定义为毛细血管。

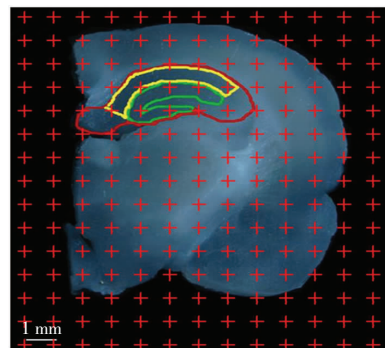
1.2.7 体视学分析

1.2.7.1 海马体积计算 利用卡瓦列里原理^[15]计算海马总体

积及 CA1、DG 分区体积:

$$V(\text{hip}) = t \times a(p) \times \sum P(\text{hip}) \times 2 \quad (1)$$

式中 $V(\text{hip})$ 代表所测区总体积, $a(p)$ 为每一测点所对应的面积, t 为切片厚度, $\sum P(\text{hip})$ 为落在一侧海马上的测点数 (图 1)。



分别计数落在海马(红线所绘区域)、CA1 区(黄线所绘区域)及 DG(绿线所绘区域)的点数(标尺为 1 mm)

图 1 海马结构定位和体视学计算各区域体积的方法

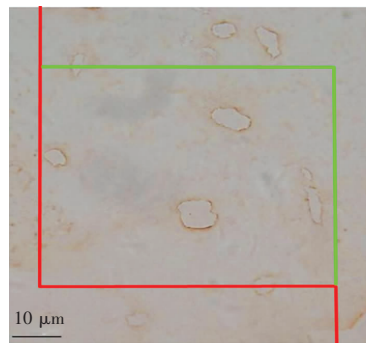
Fig.1 Method for outlining the regions of hippocampal structure and stereological method for calculating the regional volume

1.2.7.2 毛细血管的长度密度与总长度 在所得到的毛细血管照片上随机叠加无偏计数框, 计数框内及仅与计数线相交的毛细血管断面数, 由以下公式^[16-18]分别计算每只动物的 CA1 区、DG 毛细血管长度密度和毛细血管总长度:

$$LV(\text{cap}/\text{hip}) = 2 \times \sum Q(\text{cap}) / \sum A \quad (2)$$

$$L(\text{cap}/\text{hip}) = LV(\text{cap}/\text{hip}) \times V(\text{hip}) \quad (3)$$

式中 $\sum Q(\text{cap})$ 为毛细血管总断面数, $\sum A$ 为计数框总面积, $V(\text{hip})$ 为海马体积 (图 2)。



在所得到的毛细血管照片上随机叠加无偏计数框, 计数处于计数框内或者只与计数线(绿线)相交的毛细血管断面, 排除任何与禁止线(红线)相交的毛细血管断面(标尺为 10 μm)

图 2 海马毛细血管的长度密度的测定

Fig.2 Determination of the length density of the capillaries in the hippocampus

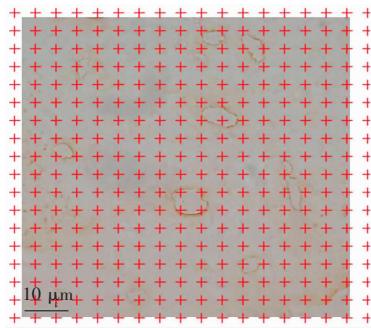
1.2.7.3 毛细血管的体积密度与总体积 在所得到的毛细血管照片上随机叠加等距测试点, 分别计数落在整个 CA1 区、DG 以及各区域毛细血管上的测试点数, 由以下公式^[16-18]分别

计算每只动物的 CA1 区、DG 毛细血管体积密度和毛细血管总体积:

$$VV(\text{cap}/\text{hip}) = \Sigma P(\text{cap}) / \Sigma P(\text{hip}) \quad (4)$$

$$V(\text{cap}/\text{hip}) = VV(\text{cap}/\text{hip}) \times V(\text{hip}) \quad (5)$$

式中 $\Sigma P(\text{cap})$ 为海马毛细血管测试点数, $\Sigma P(\text{hip})$ 为海马测试点数(图 3)。



在所得到的毛细血管照片上随机叠加等距测试点, 分别计数落在海马和毛细血管上的测试点 (标尺为 10 μm)

图 3 海马毛细血管的体积密度的测定

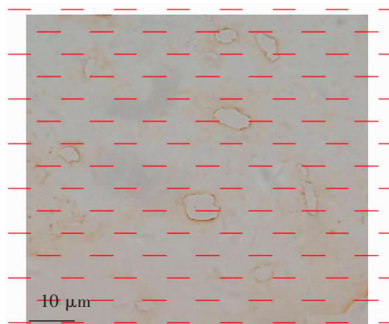
Fig.3 Determination of the volume density of the capillaries in the hippocampus

1.2.7.4 毛细血管的表面积密度与总表面积 在所得到的毛细血管照片上随机叠加等距测试线, 分别计数落在整个 CA1 区、DG 的测试线总长度以及测试线与海马分区毛细血管交叉点数, 由以下公式^[16-18]分别计算每只动物的 CA1 区、DG 毛细血管表面积密度和毛细血管总表面积:

$$SV(\text{cap}/\text{hip}) = 2 \times \Sigma I(\text{cap}) / \Sigma L \quad (6)$$

$$S(\text{cap}/\text{hip}) = SV(\text{cap}/\text{hip}) \times V(\text{hip}) \quad (7)$$

式中 $\Sigma I(\text{cap})$ 为测试线与海马毛细血管交叉点数, ΣL 为各区域测试线总长度(图 4)。



在所得到的毛细血管照片上随机叠加等距测试线, 计数测试线与毛细血管外表面的交叉点数(标尺示 10 μm)

图 4 海马毛细血管的表面积密度的测定

Fig.4 Determination of the surface area density of the capillaries in the hippocampus

1.2.7.5 毛细血管的直径 假设毛细血管为均质的圆柱体, 可根据下面的数学公式求得每只动物毛细血管平均直径的近似值 $\bar{d}$:

$$\bar{d} = S(\text{cap}) / \pi L(\text{cap}) \quad (8)$$

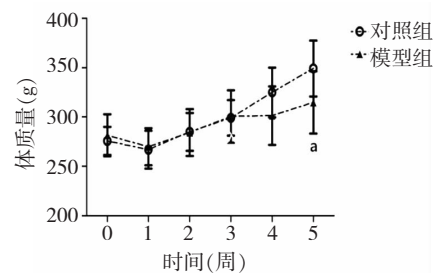
1.3 统计学处理

实验数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行统计学分析。经过正态分布检验后, 对正态分布资料采用独立样本 t 检验进行组间数据比较, 对不符合正态分布的资料进行非参数检验中的两独立样本的 Wilcoxon 秩和检验 (Mann-Whitney U 检验), 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 体质量测量结果

建模前, 对照组大鼠体质量为 (275.82 ± 14.02) g, 模型组大鼠体质量为 (281.66 ± 21.23) g, 2 组大鼠之间无明显统计学差异 ($P > 0.05$)。建模开始后, 模型组大鼠体质量增长较对照组大鼠缓慢。5 周建模完成后, 模型组大鼠体质量 (314.81 ± 31.52) g 明显较对照组大鼠体质量 (349.18 ± 28.23) g 减少, 差异具有统计学意义 ($t = 2.569, P = 0.019$) (图 5)。



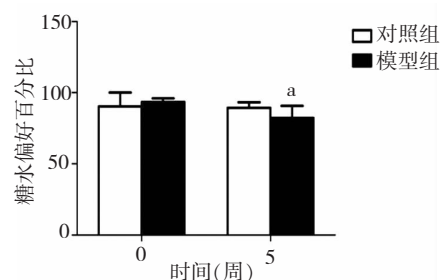
a. 与对照组相比 $P < 0.05; n = 10, \bar{x} \pm s$

图 5 建模期间对照组和模型组大鼠体质量比较

Fig.5 Comparison of the rat weight within modeling between the control group and the model group

2.2 糖水偏好实验结果

建模前, 对照组与模型组大鼠糖水偏好百分比分别为 $(90.35 \pm 9.84)\%$, $(93.51 \pm 2.55)\%$, 差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。建模后, 模型组大鼠糖水偏好百分比 $(82.37 \pm 8.44)\%$ 较对照组大鼠糖水偏好百分比 $(89.33 \pm 3.97)\%$ 明显降低 ($t = 2.359, P = 0.03$) (图 6)。



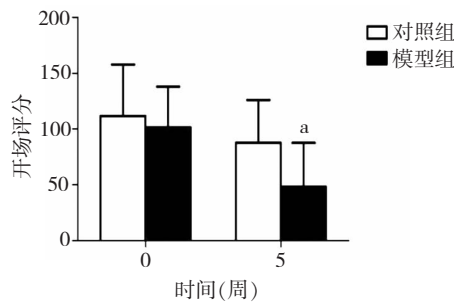
a. 与对照组相比 $P < 0.05; n = 10, \bar{x} \pm s$

图 6 建模前后对照组与模型组大鼠糖水偏好实验结果

Fig.6 Results of the sucrose consumption test between control group and model group before and after modeling

2.3 开场实验结果

建模前,对照组与模型组大鼠表现活跃,开场实验(111.5 ± 46.47)分、(101.60 ± 36.50)分,差异不具有统计学意义($P>0.05$)。建模后,模型组大鼠较对照组大鼠活动明显减少($n_1=48.30 \pm 39.49, n_2=87.70 \pm 38.32, u=-1.988, P=0.047$) (图 7)。



a.与对照组相比 $P<0.05; n=10, \bar{x} \pm s$

图 7 建模前后对照组与模型组大鼠开场实验结果

Fig.7 Results of the open field test between control group and model group before and after modeling

2.4 海马体积

5 周建模完成后,与对照组[(99.89 ± 12.55) mm³, (32.38 ± 3.69) mm³, (24.20 ± 3.33) mm³]比较,模型组大鼠海马总体积[(88.84 ± 7.51) mm³]减少了 11.06% ($t=2.388, P=0.028$),并且海马 CA1 区体积[(27.78 ± 1.84) mm³]减少了 14.21% ($t=3.522, P=0.004$),DG 体积[(21.02 ± 2.61) mm³]减少了 13.14% ($t=2.377, P=0.029$),均具有统计学差异(表 1)。

2.5 海马 CA1 区毛细血管

与对照组大鼠海马 CA1 区毛细血管的总长度(11.012 ± 1.642) m、总体积(0.151 ± 0.021) mm³、总表面积(1.589 ±

0.313) cm²、平均直径(4.580 ± 0.419) μm 相比,模型组大鼠海马 CA1 区毛细血管总长度(8.454 ± 1.010) m 减少了 23.23% ($t=2.967, P=0.018$),毛细血管总体积(0.104 ± 0.019) mm³ 减少了 31.13% ($t=3.720, P=0.006$),毛细血管总表面积(1.025 ± 0.113) cm² 减少了 35.49% ($t=3.794, P=0.013$),毛细血管平均直径(3.884 ± 0.458) μm 减少了 15.20% ($t=2.509, P=0.036$),均具有统计学差异(表 2)。

2.6 DG 毛细血管

与对照组大鼠海 DG 毛细血管的总长度(7.946 ± 1.477) m、总体积(0.117 ± 0.024) mm³、总表面积(1.133 ± 0.074) cm²、平均直径(4.630 ± 0.635) μm 相比,模型组大鼠 DG 毛细血管总体积(0.078 ± 0.021) mm³ 减少了 33.33% ($t=2.716, P=0.026$),毛细血管总表面积(0.838 ± 0.184) cm² 减少了 26.04% ($t=3.32, P=0.011$),毛细血管平均直径(3.611 ± 0.493) μm 减少了 22.01% ($t=2.834, P=0.022$),模型组大鼠 DG 毛细血管总长度(7.508 ± 1.947) m 减少了 5.51%,但是结果不具有统计学差异($P>0.05$)(表 3)。

表 1 对照组与模型组大鼠海马总体积和 CA1 区、DG 体积比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of the volumes of the hippocampus, the CA1 and the DG between control group and model group ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	海马总体积 (mm ³)	海马 CA1 区体积 (mm ³)	海马 DG 区体积 (mm ³)
对照组	99.89 ± 12.55	32.38 ± 3.69	24.20 ± 3.33
模型组	88.84 ± 7.51 ^a	27.78 ± 1.84 ^b	21.02 ± 2.61 ^a
<i>t</i> 值	2.388	3.522	2.377
<i>P</i> 值	0.028	0.004	0.029

注:a.与对照组相比 $P<0.05$;b.与对照组相比 $P<0.01$

表 2 对照组与模型组大鼠 CA1 区毛细血管体视学结果 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab.2 Stereological results of capillaries in the CA1 between control group and model group ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	CA1 区毛细血管长度(m)	CA1 区毛细血管总体积(mm ³)	CA1 区毛细血管总表面积(cm ²)	CA1 区毛细血管平均直径(μm)
对照组	11.012 ± 1.642	0.151 ± 0.021	1.589 ± 0.313	4.580 ± 0.419
模型组	8.454 ± 1.010 ^a	0.104 ± 0.019 ^b	1.025 ± 0.113 ^a	3.884 ± 0.458 ^a
<i>t</i> 值	2.967	3.720	3.794	2.509
<i>P</i> 值	0.018	0.006	0.013	0.036

注:a.与对照组相比 $P<0.05$;b.与对照组相比 $P<0.01$

表 3 对照组与模型组大鼠 DG 毛细血管体视学结果 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab.3 Stereological results of capillaries in the DG between control group and model group ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	DG 毛细血管长度(m)	DG 毛细血管总体积(mm ³)	DG 毛细血管总表面积(cm ²)	DG 毛细血管平均直径(μm)
对照组	7.946 ± 1.477	0.117 ± 0.024	1.133 ± 0.074	4.630 ± 0.635
模型组	7.508 ± 1.947	0.078 ± 0.021 ^a	0.838 ± 0.184 ^a	3.611 ± 0.493 ^a
<i>t</i> 值	0.401	2.716	3.320	2.834
<i>P</i> 值	0.700	0.026	0.011	0.022

注:a.与对照组相比 $P<0.05$

3 讨 论

本研究采取 CUS 模型,选用轻度、不可预见的应激,模拟人的应激性生活事件,与人长期、慢性、低强度的应激原促使抑郁症发生发展的机制更为接近,是近年来国内外广泛应用的探讨抑郁症发病机制的动物模型。抑郁模型建立成功与否是本研究的关键。本研究结果显示,在建模 35 d 后,与对照组大鼠比较,模型组大鼠大鼠体质量下降,糖水偏好程度显著降低。开场实验中,模型组大鼠运动、探究减少,对陌生环境兴奋性降低。这些表现与抑郁症患者临床表现具有极高的相似度,表示本研究抑郁症大鼠模型建立较为理想。

既往研究认为抑郁症只是功能性的精神障碍,目前的研究观察到抑郁症患者也存在着脑形态结构的改变^[4]。影像学技术和尸检结果均表明抑郁症海马结构存在萎缩^[9-12],经过抗抑郁治疗可以缓解甚至部分逆转海马萎缩。临床研究发现,给予抑郁症患者电惊厥疗法治疗后,影像学研究成果提示其海马体积会相应增加^[19]。由此可以看出,海马的改变与抑郁症发生发展有着密切联系,抑郁症发生时海马体积减小,治疗后海马体积相应增加。那么,到底是抑郁症导致海马体积改变,还是海马体积改变导致抑郁症,目前尚不清楚^[20]。但是已经有研究表明海马萎缩会造成更差的抑郁症临床预后^[21],由此可见,不管海马结构改变和抑郁症发生发展的因果关系如何,海马结构改变的确在抑郁症发生发展中具有重要作用,缓解甚至逆转海马结构改变对抑郁症预后具有积极作用。海马结构由大脑颞内侧以及腹侧卷曲的海马回(CA1、CA2、CA3 区)、DG 和下托组成,每个部分又由不同的细胞组成,那么具体是哪个部分或哪几个部分与抑郁症有关呢?影像学技术能很好的进行活体研究,但通过影像学成像技术获取的海马数据仍然是间接且不精确的^[22],并且影像学技术无法对海马进行分区定位,无法对海马各区进行研究。因此,对抑郁症海马结构的精确定量研究,尤其是对海马各区的定量研究就变得格外重要,CA1 区对抑郁症造模时给予的应激刺激敏感,DG 终生存在新生神经元,而新生神经元的改变与抑郁症之间存在密切关系。本实验采用新的无偏体视学方法精确定量研究了抑郁症模型大鼠海马 CA1 区和 DG 的体积,观察到抑郁症模型大鼠海马总体积、海马 CA1 区和 DG 体积均减少。这一结果为抑郁症海马、海马 CA1 区和 DG 的形态学研究提供了数据支持。

有研究表明,脑卒中患者在脑血管疾病发生后 2 年内发生的脑卒中后抑郁的发病率为 25%~79%^[23]。而抑郁症患者罹患冠心病的风险也明显增高,在一个包括 80 000 名患者的 Meta 分析资料显示,抑郁是心血管疾病的独立危险因素^[24]。可见心血管疾病与抑郁症有着密切联系。已有研究表明抑郁症的治疗过程中,血管疾病得到改善。在对脑卒中患者的临床观察中^[25],发现采取选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂氟西汀治疗不仅可以改善情绪,并且能够减少抑郁症患者血栓形成的风险。Tomfohr 等^[26]的研究表明血管内皮功能与抑郁症状严重程度呈负相关。而处于长期慢性应激中并且有 5-羟色胺转运体基因相关多态性区域长等位基因的人群,易患抑郁症,并且冠心病发生发展的风险也相应增加^[27]。这些研究提示,血管疾病与抑郁症极有可能具有共同机制。随着影像学技术的发展,实现了对活体大脑血流、神经化学活动、代谢状况的动态观察,为抑郁症血管因素机制研究提供了更多数据支持。Ohgami 等^[28]的研究结果表明抑郁症患者脑血流降低,但是同一患者缓解期与发作期局部脑血流对比无显著差异。与此同时,也有研究显示抑郁症经治疗症状缓解后,抑郁症患者的异常血流状况得到不同程度的改善^[29-30]造成以上研究结果不同的原因可能是:①选取病例的患病严重程度不同;②采取的研究方法不同;③是否服用药物及对治疗的反应性不同;④年龄的不同^[31]。那么,直接对脑血管结构而不是血流量来进行测量,便可以更直观而准确研究抑郁症的脑血管改变。目前,影像学技术可以实现对血管三维结构的重建,但是只能对直径>2 mm 的血管进行重建,故而无法对小血管、毛细血管进行研究。而毛细血管是血管系统的重要组成部分,是执行血脑屏障功能的关键结构。毛细血管给组织细胞供血供氧、提供营养物质,其形态结构的完整性对新陈代谢起着至关重要的作用。毛细血管结构的病理改变可以引起微循环内血流动力学改变,从而导致缺血缺氧,造成机体异常代谢。对毛细血管的研究,为探讨抑郁症的发病机制有着重要作用。由于毛细血管为三维立体结构,毛细血管密度是二维平面信息,受毛细血管分布与走向的影响,使得不同切片方向和不同切片部位得到不同的结果,故采用毛细血管密度无法反映出毛细血管真实情况。本研究采取体视学与免疫组织化学染色相结合的方法,对抑郁症模型大鼠海马 CA1 区和 DG 毛细血管进行定量研究,更好的反映了抑郁症模型大鼠海马毛细血管的改变的真实情

况。本研究结果显示,较对照组相比,抑郁症模型大鼠海马 CA1 区毛细血管在长度、体积、表面积、平均直径均有所下降,DG 毛细血管在体积、表面积、平均直径也有所下降。

综上所述,本研究运用体视学方法对抑郁症模型大鼠海马 CA1 区及 DG 进行了定量研究,为抑郁症海马改变提供了形态学数据。本研究结果显示,大鼠海马 CA1 区及 DG 毛细血管发生改变在抑郁症的发病中起着重要的作用,为探讨抑郁症血管因素发病机制提供了重要的形态学数据支持。

参 考 文 献

- [1] Bjelland I, Dahl AA, Haug TT, et al. The validity of the hospital anxiety and depression scale: An updated literature review[J]. *J Psychosom Res*, 2002, 52(2): 69–77.
- [2] Holden C. Mental health. Global survey examines impact of depression[J]. *Science*, 2000, 288(5463): 39–40.
- [3] Masi G, Brovedani P. The hippocampus, neurotrophic factors and depression: possible implications for the pharmacotherapy of depression[J]. *CNS Drugs*, 2011, 25(11): 913–931.
- [4] Drevets WC. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive–emotional features of mood disorders[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2001, 11(2): 240–249.
- [5] Mervaala E, Kononen M, Fohr J, et al. SPECT and neuropsychological performance in severe depression treated with ECT[J]. *J Affect Disord*, 2001, 66(1): 47–58.
- [6] Navarre V, Gasto C, Lomena F, et al. Frontal cerebral perfusion dysfunction in elderly late-onset major depression assessed by 99mTc-HMPAO SPECT[J]. *Neuroimage*, 2001, 14(1): 202–205.
- [7] Brody AL, Barsom MW, Bota RG, et al. Prefrontal–subcortical and limbic circuit mediation of major depressive disorder[J]. *Semin Clin Neuropsychiatry*, 2001, 6(2): 102–112.
- [8] Nifost F, Toffanin T, Follador H, et al. Reduced right posterior hippocampal volume in women with recurrent familial pure depressive disorder[J]. *Psychiatry Res*, 2010, 184(1): 23–28.
- [9] Ahliden J, Hviid LB, Chakravarty MM, et al. Longitudinal MR study of brain structure and hippocampus volume in major depressive disorder[J]. *Acta psychiatr Scand*, 2011, 123(3): 211–219.
- [10] Amico F, Meisenzahl E, Koutsouleris N, et al. Structural MRI correlates for vulnerability and resilience to major depressive disorder[J]. *Psychiatry Neurosci*, 2011, 36(1): 15–22.
- [11] Duman RS, Malberg J, Nakagawa S, et al. Neuronal plasticity and survival in mood disorders[J]. *Bio psychiatry*, 2000, 48(8): 732–739.
- [12] Gould E, Cameron HA, Daniels DC, et al. Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus[J]. *J Neurosci*, 1992, 12(9): 3642–3650.
- [13] Willner 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, 9(3): 358–364.
- [14] Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1981, 5(2): 247–251.
- [15] 卢伟, 黄春霞, 杨姝, 等. 大鼠海马结构有髓神经纤维体视学方法的建立[J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30(18): 1818–1820.
- [16] Tang Y, Nyengaard JR. A stereological method for estimating the total length and size of myelin fibers in human brain white matter[J]. *J Neurosci Methods*, 1997, 73(2): 193–200.
- [17] Shao WH, Li C, Chen L, et al. Stereological investigation of age-related changes of the capillaries in white matter[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2010, 293(8): 1400–1407.
- [18] Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis[J]. *APMIS*, 1988, 96(5): 379–394.
- [19] Nordanskog P, Dahlstrand U, Larsson MR, et al. Increase in hippocampal volume after electroconvulsive therapy in patients with depression: a volumetric magnetic resonance imaging study[J]. *J ECT*, 2010, 26(1): 62–67.
- [20] MacQueen G, Frodl T. The hippocampus in major depression: evidence for the convergence of the bench and bedside in psychiatric research?[J]. *Mol Psychiatry*, 2011, 16(3): 252–264.
- [21] Peper JS, Brouwer RM, Boomsma DI, et al. Genetic influences on human brain structure: a review of brain imaging studies in twins[J]. *Hum Brain Mapp*, 2007, 28(6): 464–473.
- [22] Scholz J, Klein MC, Behrens TE, et al. Training induces changes in white-matter architecture[J]. *Nat Neurosci*, 2009, 12(11): 1370–1371.
- [23] Lincoln NB, Flannaghan T. Cognitive behavioral psychotherapy for depression following stroke: a randomized controlled trial[J]. *Stroke*, 2003, 34(1): 111–115.
- [24] Van der Kooy K, van Hour H, Marwijk H, et al. Depression and the risk for cardiovascular diseases: systematic review and meta analysis[J]. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2007, 22(7): 613–626.
- [25] 程丰, 邵国富, 包仕尧. 脑卒中后抑郁及其对神经功能康复的影响[J]. *中国心理卫生杂志*, 2004, 18(8): 533–536.
- [26] Tomfohr LM, Martin TM, Miller GE. Symptoms of depression and impaired endothelial function in healthy adolescent women[J]. *J Behav Med*, 2008, 31(2): 137–143.
- [27] Otte C, McCaffery J, Ali S, et al. Association of a serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR) with depression, perceived stress, and norepinephrine in patients with coronary disease: the Heart and Soul Study[J]. *Am J Psychiatry*, 2007, 164(9): 1379–1384.
- [28] Ohgami H, Nagayama H, Akiyoshi J, et al. Contributing factors to changes of cerebral blood flow in major depressive disorder[J]. *J Affect Disord*, 2005, 87(1): 57–63.
- [29] Navano V, Gasto C, Lomena F, et al. Frontal cerebral perfusion after antidepressant drug treatment versus ECT in elderly patients with major depression: a 12-month follow-up control study[J]. *J Clin Psychiatry*, 2004, 65(5): 656–661.
- [30] Davies J, Lloyd KR, Jones IK, et al. Changes in regional cerebral blood flow with venlafaxine in the treatment of major depression[J]. *Am J Psychiatry*, 2003, 160(2): 374–376.
- [31] Bonne O, Krausz Y, Gorfine M, et al. Cerebral hypoperfusion in medication resistant, depressed patients assessed by Tc-99m HMPAO SPECT[J]. *J Affect Disord*, 1996, 41(3): 163–171.

(责任编辑: 关蕴良)