

## 水蛭素对小鼠脑卒中后抑郁的改善作用及其机制

赵丹, 史博, 魏志玄, 崔群建

(南阳医学高等专科学校第一附属医院神经外科, 河南 南阳 473058)

**[摘要]** **目的:** 探讨水蛭素对小鼠脑卒中后抑郁(PSD)的影响,并阐明其可能的作用机制。**方法:** 60只雄性C57BL/6小鼠随机分为对照组、PSD组、PSD+低剂量水蛭素组、PSD+中剂量水蛭素组和PSD+高剂量水蛭素组,每组12只。采用大脑中动脉栓塞(MCAO)法建立小鼠脑卒中模型,采用慢性不可预见的中等应激刺激(CUMS)结合孤养法建立小鼠抑郁模型,PSD+低剂量水蛭素组、PSD+中剂量水蛭素组和PSD+高剂量水蛭素组小鼠在建立抑郁模型的同时分别经尾静脉注射10、20及40 U·kg<sup>-1</sup>水蛭素干预,对照组和PSD组小鼠经尾静脉注射等量生理盐水。记录CUMS刺激第0、7、14和21天时各组小鼠体质量,计算各组小鼠LONGA神经功能评分,糖水偏好实验、悬尾实验和强迫游泳实验检测各组小鼠糖水偏好率、悬尾及强迫游泳不动时间,HE染色观察各组小鼠内侧前额叶皮质(mPFC)脑区组织病理形态表现,生化试剂盒检测各组小鼠内侧前额叶皮质(mPFC)脑区组织中丙二醛(MDA)和还原性谷胱甘肽(GSH)水平及超氧化物歧化酶(SOD)活性,2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针法检测各组小鼠mPFC脑区组织中活性氧(ROS)阳性率,实时荧光定量PCR(RT-qPCR)和Western blotting法检测各组小鼠mPFC脑区组织中核氧化还原蛋白(NXN)mRNA及蛋白表达水平。**结果:** 与对照组比较,CUMS刺激第0、7、14和21天PSD组小鼠体质量均明显降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );与PSD组比较,CUMS刺激第14和21天PSD+低剂量水蛭素组、PSD+中剂量水蛭素组及PSD+高剂量水蛭素组小鼠体质量均明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),神经功能评分均明显降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。糖水偏好实验、悬尾实验和强迫游泳实验,与对照组比较,PSD组小鼠糖水偏好率明显降低( $P<0.01$ ),悬尾和强迫游泳不动时间均明显增加( $P<0.01$ );与PSD组比较,PSD+低剂量水蛭素组、PSD+中剂量水蛭素组和PSD+高剂量水蛭素组小鼠糖水偏好率均明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),悬尾和强迫游泳不动时间均明显减少( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。HE染色,对照组小鼠mPFC脑区组织细胞形态正常,结构清晰,大小分布均匀;PSD组和PSD+低剂量水蛭素组小鼠mPFC脑区组织细胞明显减少,并出现严重空泡样变性,核仁固缩;PSD+中剂量水蛭素组和PSD+高剂量水蛭素组小鼠mPFC脑区组织细胞较PSD组明显增多,空泡样变性和核仁固缩明显改善。生化试剂盒和DCFH-DA荧光探针法,与对照组比较,PSD组小鼠mPFC脑区组织中GSH水平和SOD活性均明显降低( $P<0.01$ ),MDA水平和ROS阳性率均明显升高( $P<0.01$ );与PSD组比较,PSD+低剂量水蛭素组、PSD+中剂量水蛭素组和PSD+高剂量水蛭素组小鼠mPFC脑区组织中GSH水平及SOD活性均明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),MDA水平和ROS阳性率均明显降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。RT-qPCR和Western blotting法,与对照组比较,PSD组小鼠mPFC脑区组织中NXN mRNA和蛋白表达水平均明显降低( $P<0.01$ );与PSD组比较,PSD+低剂量水蛭素组、PSD+中剂量水蛭素组和PSD+高剂量水蛭素组小鼠mPFC脑区组织中NXN mRNA及蛋白表达水平均明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。**结论:** 水蛭素可促进PSD小鼠

[收稿日期] 2024-06-14 [录用日期] 2024-08-09

[基金项目] 河南省卫健委医科科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20210983)

[作者简介] 赵丹(1982-),男,河南省南阳市人,主治医师,医学硕士,主要从事脑血管相关疾病方面的研究。

[通信作者] 赵丹,主治医师(E-mail: zhaod820518@163.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部,开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

mPFC脑区组织氧化还原平衡, 修复其神经功能损伤, 改善PSD。

[关键词] 水蛭素; 脑卒中; 抑郁; 内侧前额叶皮质; 核氧化还原蛋白

[中图分类号] R749.13 [文献标志码] A

## Improvement effect of hirudin on post-stroke depression in mice and its mechanism

ZHAO Dan, SHI Bo, WEI Zhixuan, CUI Qunjian

(Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Nanyang Medical College, Nanyang 473058, China)

**ABSTRACT** **Objective:** To discuss the effect of hirudin on post-stroke depression (PSD) in the mice, and to clarify its potential mechanism. **Methods:** Sixty male C57BL/6 mice were randomly divided into control group, PSD group, PSD+low dose of hirudin group, PSD+medium dose of hirudin group, and PSD+high dose of hirudin group, and there were 12 mice in each group. The stroke model was established by middle cerebral artery occlusion (MCAO), and the depression model was induced by chronic unpredictable mild stress (CUMS) combined with solitary housing. The mice in PSD+low dose of hirudin, PSD+medium dose of hirudin, and PSD+high dose of hirudin groups were intravenously injected with 10, 20, and 40 U·kg<sup>-1</sup> hirudin, respectively, while the mice in control and PSD groups received equal volumes of saline. The body weights of the mice were recorded on days 0, 7, 14, and 21 of CUMS. The LONGA neurological function score was calculated. Sucrose preference test, tail suspension test, and forced swimming test were used to detect the sucrose preference rate, immobility time in tail suspension, and forced swimming in various groups, respectively; HE staining was used to observe the histopathological changes in the medial prefrontal cortex (mPFC); biochemical kits were used to detect the levels of malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) as well as superoxide dismutase (SOD) activity in mPFC tissue of the mice in various groups; 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescence probe method was used to detect the reactive oxygen species (ROS) positive rate in mPFC tissue of the mice in various groups; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting method were used to detect the expression levels of nucleoredoxin (NXN) mRNA and protein in mPFC tissue of the mice in various groups. **Results:** Compared with control group, the body weight of the mice in PSD group was significantly decreased on days 0, 7, 14, and 21 of CUMS ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Compared with PSD group, the body weights of the mice in PSD+low dose of hirudin, PSD+medium dose of hirudin, and PSD+high dose of hirudin groups were significantly increased on days 14 and 21 of CUMS ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), and the neurological function scores were significantly decreased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). The sucrose preference test, tail suspension test, and forced swimming test results showed that compared with control group, the sucrose preference rate of the mice in PSD group was significantly decreased ( $P<0.01$ ), while the immobility times in tail suspension and forced swimming were significantly increased ( $P<0.01$ ). Compared with PSD group, the sucrose preference rates of the mice in PSD+low dose of hirudin, PSD+medium dose of hirudin, and PSD+high dose of hirudin groups were significantly increased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), and the immobility times were significantly decreased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). The HE staining showed normal cell morphology, clear structure, and uniform size distribution in mPFC tissue in control group. In PSD and PSD+low dose of hirudin groups, the number of the cells in mPFC tissue was significantly reduced, with severe vacuolar degeneration and pyknotic nuclei. Compared with PSD group, the numbers of the cells in PSD+medium dose of hirudin and PSD+high dose of hirudin

groups were significantly increased, and the vacuolar degeneration and nuclear pyknosis were alleviated. The Biochemical and DCFH-DA fluorescence probe assays results showed that compared with control group, the GSH level and SOD activity in mPFC tissue of the mice in PSD group were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), while the MDA level and ROS positive rate were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with PSD group, the GSH levels and SOD activities of the mice in PSD+low dose of hirudin, PSD+medium dose of hirudin, and PSD+high dose of hirudin groups were significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), while the MDA levels and ROS positive rates were significantly decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The RT-qPCR and Western blotting results showed that compared with control group, the expression levels of NXN mRNA and protein in mPFC tissue of the mice in PSD group were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). Compared with PSD group, the expression levels of NXN mRNA and protein in mPFC tissue of the mice in PSD+low dose of hirudin, PSD+medium dose of hirudin, and PSD+high dose of hirudin groups were significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Hirudin promotes redox balance in mPFC of the PSD mice, repairs neurological damage, and improves PSD.

**KEYWORDS** Hirudin; Stroke; Depression; Medial prefrontal cortex; Nucleoredoxin

近年来,随着溶栓、抗凝和抗血小板等多种治疗方式的临床应用,脑卒中患者死亡率逐渐降低,但其伴随的多种并发症依然威胁患者的生命健康,其中脑卒中后抑郁(post-stroke depression, PSD)是最容易被忽视的并发症,如不及时防范,抑郁严重患者会有轻生的可能。然而,目前临床常用的5-羟色胺等抗抑郁药物一般需要服用3~6个月甚至更长时间才能完全消除抑郁症状,导致患者的生活质量难以在短时间内得到提高<sup>[1]</sup>。因此,通过探索PSD的发病机制,开发靶向作用药物,可能缩短治疗周期,尽快恢复患者的日常生活和社交能力。氧化应激是脑卒中常见的继发性损害机制之一,机体内氧化平衡被打破时,大量自由基产生引起脑功能障碍<sup>[2]</sup>。核氧化还原蛋白(nucleoredoxin, NXN)是一种氧化还原酶,在氧化还原介导的信号转导中起重要作用。CORSI等<sup>[3]</sup>研究发现:NXN的缺失导致小鼠大脑代谢障碍,使其神经退行性疾病患病风险增加。因此, NXN表达水平可能影响PSD程度。水蛭素是从我国传统中药水蛭的唾液腺中提取出的一种活性成分,水蛭素除在临床治疗和预防各种血栓形成方面有着广阔的应用前景外,还在抗纤维化、抗肿瘤和抗高尿酸血症等疾病领域发挥不同的药理作用<sup>[4-6]</sup>。XIA等<sup>[7]</sup>研究表明:水蛭素具有抗氧化作用,可通过抗氧化途径促进脑缺血再灌注大鼠海马神经细胞修复,改善脑缺血后认知功能障碍。然而,水蛭素是否具有改善PSD的作用,其作用机制是否与调控NXN表达有关目前尚不明确。本研究拟建立PSD小鼠模型探讨水蛭素对PSD的影响,并阐明其作用机制,为改善脑卒中患者

PSD提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物、药物、主要试剂和仪器** 60只SPF级雄性C57BL/6小鼠,8周龄,体质量22~24 g,购自武汉大学动物实验中心,实验动物生产许可证号:SCXK(鄂)2019-0004,饲养于独立通风笼盒中,12 h明/暗交替,自由进食饮水。水蛭素(纯度 $\geq 95\%$ )购自上海源叶生物科技有限公司。无水葡萄糖和HE染色液购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司, NXN抗体和GAPDH抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司,丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)和活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)线栓(0.22 mm)购自北京西浓科技有限公司,强迫游泳设备和分析系统以及悬尾测试仪和分析系统购自上海玉研科学仪器有限公司, DM2500倒置生物显微镜购自德国Leica公司, Multiskan SkyHigh全波长酶标仪和7500实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)仪购自美国Thermo Fisher公司, 4600凝胶成像系统购自上海天能生命科学有限公司。

## 1.2 实验动物分组和小鼠PSD模型制备及处理

将60只C57BL/6小鼠随机分为对照组、PSD组、PSD+低剂量水蛭素组、PSD+中剂量水蛭素组和PSD+高剂量水蛭素组,每组12只。首先参考HEIN等<sup>[8]</sup>方法,采用MCAO法建立小鼠脑卒中模

型。MCAO术后1周,参考LI等<sup>[9]</sup>方法,采用慢性不可预见的中等应激刺激(chronic unforeseeable moderate stress stimuli, CUMS)结合孤养法持续3周建立小鼠PSD模型,造模过程中发生动物死亡,由备用小鼠及时替补,对照组小鼠正常饲养,不进行造模操作。MCAO模型建立后参考LONGA等<sup>[10]</sup>方法进行神经功能评分,检测小鼠神经功能缺陷情况,判定脑卒中模型是否建立成功。PSD+低剂量水蛭素组、PSD+中剂量水蛭素组和PSD+高剂量水蛭素组小鼠在CUMS刺激的同时分别经尾静脉注射10、20及40 U·kg<sup>-1</sup>水蛭素干预,对照组和PSD组小鼠给予同等剂量生理盐水干预,每日1次,连续3周。干预结束后,各组随机取6只小鼠进行体质量记录、行为学检测及脑组织HE染色和ROS检测,剩余6只小鼠取脑组织进行相关生化及分子检测。末次给药24 h后,对各组小鼠进行神经功能评分及行为学检测,随后立即麻醉小鼠,取小鼠脑组织,生理盐水冲洗净剩余血液,部分置于4%多聚甲醛中固定,部分液氮速冻后转入-80℃冰箱冻存备用。

### 1.3 各组小鼠体质量测量和神经功能评分方法

CUMS刺激前记为第0天,记录CUMS刺激第0、7、14和21天各组小鼠体质量。药物干预结束后,对各组小鼠采用LONGA法进行神经功能评分,0分:无神经损伤症状;1分:提尾时小鼠右前爪无法完全伸展;2分:行走时小鼠身体向右侧转圈;3分:行走时小鼠身体向右侧倾倒;4分:小鼠不能行走,意识丧失,得分越高表明小鼠神经功能损伤越严重。

### 1.4 糖水偏好实验、悬尾实验和强迫游泳实验检测各组小鼠糖水偏好率、悬尾及强迫游泳不动时间

药物干预结束后,对各组小鼠进行行为学检测。  
①糖水偏好实验:于正式实验开始前5 d,每日以1%蔗糖水溶液替换纯水喂养小鼠6 h,使动物适应饮用蔗糖水;正式实验时小鼠单笼饲养,每笼提供等量1%蔗糖水溶液和纯水各1瓶,12 h后将2个水瓶互换位置,继续喂养12 h后,分别测定蔗糖水和纯水剩余量,计算糖水偏好率。糖水偏好率=蔗糖水溶液消耗量(mL)/[蔗糖水溶液消耗量(mL)+纯水消耗量(mL)]×100%。  
②悬尾实验:用胶带将小鼠尾端距鼻尖约1 cm处固定于悬尾箱顶部,使小鼠倒挂于悬尾箱中,共悬挂6 min并记录后5 min内的小鼠不动时间(s)。  
③强迫游泳

实验:将小鼠置于水深30 cm的圆柱形透明塑料桶中,调整水温至25℃±2℃,使小鼠尾部无法触底,共观察6 min并记录后4 min内小鼠累积不动时间(s)。

**1.5 HE染色观察各组小鼠内侧前额叶皮层(medial prefrontal cortex, mPFC)脑区组织病理形态表现** 药物干预结束后,取各组小鼠脑组织置于4%多聚甲醛中浸泡固定24 h,石蜡包埋组织后作组织切片,将切片脱蜡至水,入高清恒染预处理液处理1 min,随后经苏木素染液染色3 min、分化液分化5 s、返蓝液返蓝处理1 min和伊红染液染色30 s,随后经无水乙醇脱水、二甲苯透明,最后中性树胶封片,于显微镜下200倍处观察各组小鼠mPFC脑区组织病理形态表现。

**1.6 采用生化试剂盒检测各组小鼠mPFC脑区组织中MDA和GSH水平及SOD活性** 药物干预结束后,取0.1 mg小鼠mPFC脑区组织加入1 mL提取液进行冰浴匀浆,4 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,取上清,测定总蛋白浓度,随后严格按照试剂盒说明书操作,设置空白孔,测定各组小鼠mPFC脑区组织中MDA和GSH水平及SOD活性。

**1.7 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)荧光探针法检测各组小鼠mPFC脑区组织中ROS阳性率** 药物干预结束后,取小鼠mPFC脑区组织,制备单细胞悬液。细胞收集后悬浮于预设浓度为10 μmol·L<sup>-1</sup>的DCFH-DA荧光探针中,于37℃细胞培养箱内孵育20 min,同时设置阳性对照组,采用流式细胞仪计算各组小鼠mPFC脑区组织中ROS阳性率。

**1.8 RT-qPCR法检测各组小鼠mPFC脑区组织中NXN mRNA表达水平** 药物干预结束后,取小鼠mPFC脑区组织均分后备用。取部分mPFC脑区组织加入TRIzol溶液,提取总RNA,反转录合成cDNA,设计合成引物,引物序列:NXN上游引物,5'-TG-GTGGGAAAATGAATAGCC-3',NXN下游引物,5'-GCTGAATCTTGGGAAGATGG-3'; GAPDH上游引物,5'-CCAATGTGTCCGTCGTGGATC-3',GAPDH下游引物,5'-CCAATGTGTCCGTCG-TGGATC-3',将2 μL cDNA产物与SYBR预混液16 μL、上下游引物各1 μL混合进行PCR扩增反应。反应条件:95℃预变性15 s,60℃退火30 s,72℃延伸45 s,循环40次。采用RT-qPCR仪分析

计算每个样本Ct值,以GAPDH为内参,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算NXN mRNA表达水平。

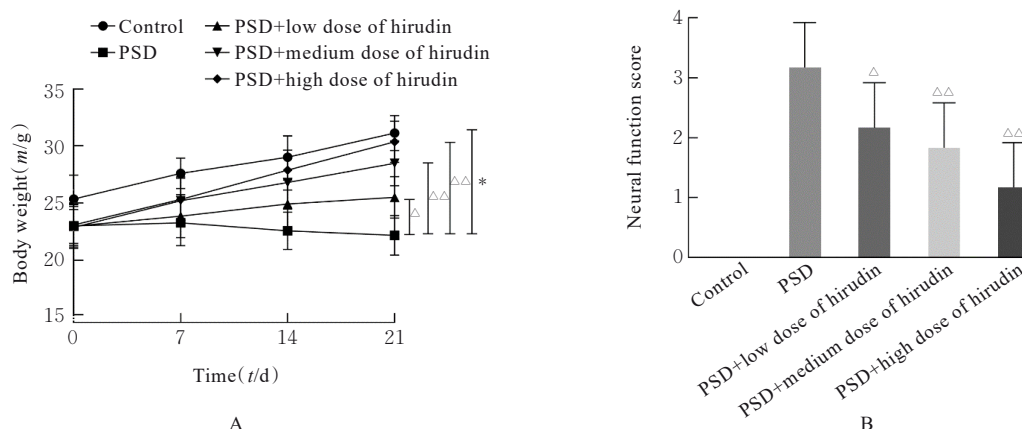
**1.9 Western blotting法检测各组小鼠mPFC脑区组织中NXN蛋白表达水平** 取另一部分小鼠mPFC脑区组织加入RIPA裂解液,于冰上研磨匀浆,BCA法定量总蛋白,沸水浴变性,蛋白经电泳、转膜后浸入5%脱脂牛奶室温封闭,加入一抗兔抗NXN和兔抗GAPDH(1:1000稀释),4℃孵育过夜,加入含辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5000稀释)室温孵育1h。凝胶成像系统显色成像,采用Image J软件分析蛋白条带灰度值,以GAPDH为内参,计算NXN蛋白表达水平。NXN蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

**1.10 统计学分析** 采用SPSS 26.0统计软件进行统计学分析,GraphPad Prism 7.0软件绘制图像。

各组小鼠体质量,神经功能评分,mPFC脑区组织中MDA和GSH水平及SOD活性以及ROS阳性率,mPFC脑区组织中NXN mRNA和蛋白表达水平均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组小鼠体质量及神经功能评分** 与对照组比较,CUMS刺激第0、7、14和21天PSD组小鼠体质量均明显降低( $P<0.05$ );与PSD组比较,CUMS刺激第14和21天PSD+低剂量水蛭素组、PSD+中剂量水蛭素组和PSD+高剂量水蛭素组小鼠体质量均明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),末次给药24h后神经功能评分均明显降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。见图1。



A: Body weight; B: Neurological function score. \* $P<0.05$  vs control group; ^ $P<0.05$ , ^^ $P<0.01$  vs PSD group.

图1 各组小鼠体质量和神经功能评分

Fig. 1 Body weights and neurological function scores of mice in various groups

**2.2 各组小鼠糖水偏好率、悬尾和强迫游泳不动时间** 与对照组比较,PSD组小鼠糖水偏好率明显降低( $P<0.01$ ),悬尾和强迫游泳不动时间均明显增加( $P<0.01$ );与PSD组比较,PSD+低剂量水蛭素组、PSD+中剂量水蛭素组和PSD+高剂量水蛭素组小鼠糖水偏好率均明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),悬尾和强迫游泳不动时间均明显减少( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。见表1。

### 2.3 各组小鼠mPFC脑区组织病理形态表现

对照组小鼠mPFC脑区组织细胞形态正常,结构清晰,大小分布均匀;PSD组和PSD+低剂量水蛭素组小鼠mPFC脑区组织细胞明显减少,并出现严重空泡样变性,核仁固缩;PSD+中剂量水蛭素组

和PSD+高剂量水蛭素组小鼠mPFC脑区组织细胞较PSD组明显增多,空泡样变性和核仁固缩明显改善。见图2。

### 2.4 各组小鼠mPFC脑区组织中MDA和GSH水平及SOD活性以及ROS阳性率

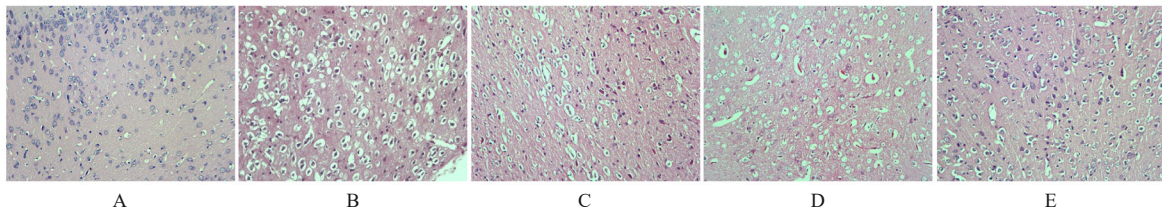
与对照组比较,PSD组小鼠mPFC脑区组织中GSH水平和SOD活性均明显降低( $P<0.01$ ),MDA水平和ROS阳性率均明显升高( $P<0.01$ );与PSD组比较,PSD+低剂量水蛭素组、PSD+中剂量水蛭素组和PSD+高剂量水蛭素组小鼠mPFC脑区组织中GSH水平及SOD活性均明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),MDA水平和ROS阳性率均明显降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。见表2。

表1 各组小鼠糖水偏好率、悬尾和强迫游泳不动时间

Tab. 1 Sugar-water preference rates, tail suspension time, and forced swimming immobility time of mice in various groups (n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	Sugar preference rate( $\eta/\%$ )	Tail suspension time(t/s)	Forced swimming immobility time(t/s)
Control	85.36 $\pm$ 5.65	6.01 $\pm$ 1.02	43.28 $\pm$ 3.34
PSD	62.33 $\pm$ 4.91*	22.14 $\pm$ 1.87*	81.70 $\pm$ 5.46*
PSD+low dose of hirudin	69.70 $\pm$ 4.52 $\Delta$	20.15 $\pm$ 1.56 $\Delta$	75.91 $\pm$ 4.88 $\Delta$
PSD+medium dose of hirudin	72.33 $\pm$ 6.13 $\Delta\Delta$	13.69 $\pm$ 1.32 $\Delta\Delta$	60.38 $\pm$ 4.60 $\Delta\Delta$
PSD+high dose of hirudin	81.28 $\pm$ 5.49 $\Delta\Delta$	8.82 $\pm$ 1.26 $\Delta\Delta$	51.49 $\pm$ 3.46 $\Delta\Delta$

\*P<0.01 vs control group;  $\Delta$ P<0.05,  $\Delta\Delta$ P<0.01 vs PSD group.



A: Control group; B: PSD group; C: PSD+low dose of hirudin group; D: PSD+medium dose of hirudin group; E: PSD+high dose of hirudin group.

图2 各组小鼠mPFC脑区组织病理形态表现(HE,  $\times 200$ )

Fig. 2 Pathomorphology of mPFC brain region tissue of mice in various groups(HE,  $\times 200$ )

表2 各组小鼠mPFC脑区组织中MDA和GSH水平、SOD活性及ROS阳性率

Tab. 2 Levels of MDA and GSH, and activities of SOD and positivity rates of ROS in mPFC brain regions tissue of mice in various groups (n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	MDA[ $m_B/(\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1})$ ]	GSH[ $\omega_B/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$ ]	SOD[ $\lambda_B/(\text{U}\cdot\text{mg}^{-1})$ ]	ROS( $\eta/\%$ )
Control	10.26 $\pm$ 1.83	7.25 $\pm$ 1.25	72.60 $\pm$ 4.67	12.54 $\pm$ 1.26
PSD	18.91 $\pm$ 2.64*	1.66 $\pm$ 0.45*	40.22 $\pm$ 3.45*	56.32 $\pm$ 3.31*
PSD+low dose of hirudin	16.27 $\pm$ 2.21 $\Delta$	3.12 $\pm$ 0.76 $\Delta$	46.15 $\pm$ 3.18 $\Delta$	52.16 $\pm$ 3.51 $\Delta$
PSD+medium dose of hirudin	13.06 $\pm$ 1.54 $\Delta\Delta$	4.64 $\pm$ 1.10 $\Delta\Delta$	58.44 $\pm$ 4.03 $\Delta\Delta$	37.88 $\pm$ 2.67 $\Delta\Delta$
PSD+high dose of hirudin	11.13 $\pm$ 1.21 $\Delta\Delta$	7.08 $\pm$ 1.52 $\Delta\Delta$	70.32 $\pm$ 5.05 $\Delta\Delta$	20.41 $\pm$ 1.74 $\Delta\Delta$

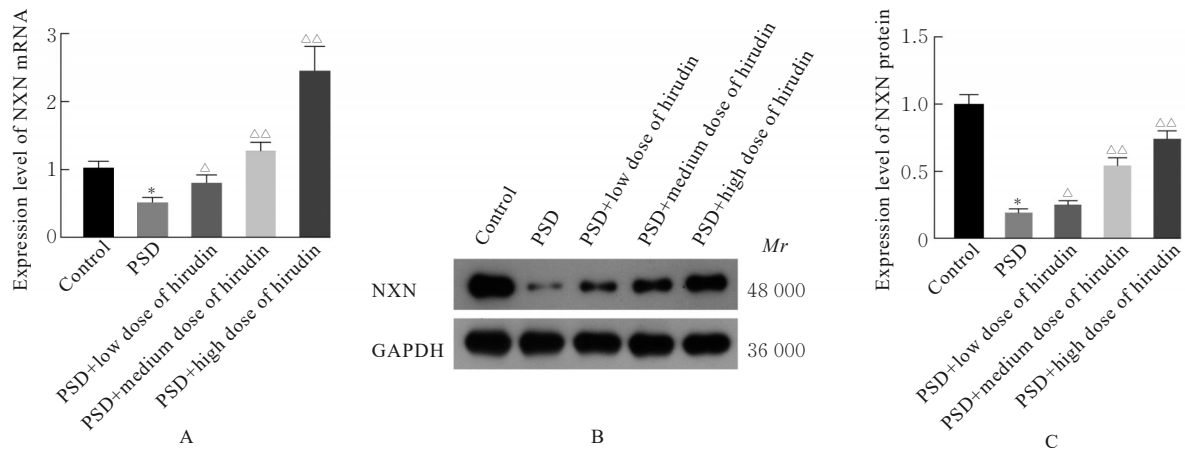
\*P<0.01 vs control group;  $\Delta$ P<0.05,  $\Delta\Delta$ P<0.01 vs PSD group.

2.5 各组小鼠mPFC脑区组织中NXN mRNA和蛋白表达水平 与对照组比较, PSD组小鼠mPFC脑区组织中NXN mRNA和蛋白表达水平均明显降低(P<0.01); 与PSD组比较, PSD+低剂量水蛭素组、PSD+中剂量水蛭素组和PSD+高剂量水蛭素组小鼠mPFC脑区组织中NXN mRNA及蛋白表达水平均明显升高(P<0.05或P<0.01)。见图3。

### 3 讨论

PSD属中医“中风”后“郁证”, 而血瘀是中风疾病的主要病因, 《神农本草经》记载: “水蛭, 味咸, 平。主逐恶血、瘀血、月闭, 破血癥、积聚、无子、利水道。”近年来, 关于水蛭的相关研

究逐渐深入, 水蛭素已在卒中和眩晕等脑组织相关疾病中表现出较好的治疗效果<sup>[11-12]</sup>。负责思考的前额叶皮层与负责情绪的边缘系统是抑郁症相关的大脑分区, 而前额叶皮层又被分为4个部分, 其中mPFC脑区偏重负责思考与情绪相关的事物, 抑郁症的发生与mPFC异常有关<sup>[13]</sup>。多项研究<sup>[14-15]</sup>表明: 天然活性成分干预, 可通过减少小胶质细胞介导的突触吞噬或抑制炎症反应等途径, 减轻mPFC脑区组织损伤, 改善大鼠神经功能和抑郁样行为。本研究结果显示: 与对照组比较, PSD组小鼠体质量逐渐减轻, 神经功能评分升高, 同时mPFC脑区组织细胞严重损伤, 行为学检测结果提示抑郁情绪发生, PSD组小鼠的抑郁样行为可能



A: Expression level of NXN mRNA; B: Electrophoregram of expression of NXN protein; C: Histogram of expression of NXN protein.  
\* $P < 0.01$  vs control group;  $^{\Delta}P < 0.05$ ,  $^{\Delta\Delta}P < 0.01$  vs PSD group.

图3 各组小鼠mPFC脑区组织中NXN mRNA和蛋白表达水平

Fig. 3 Expression levels of NXN mRNA and protein in mPFC brain region tissue of mice in various groups

是脑卒中后mPFC脑区组织损伤导致的；经不同浓度的水蛭素干预后，PSD小鼠体重恢复增长、神经功能评分降低，同时mPFC脑区组织细胞损伤和抑郁行为明显改善，与秦露等<sup>[16]</sup>研究结果一致。提示水蛭素可能通过逆转卒中后mPFC脑区组织损伤，改善小鼠神经功能，进而减少PSD小鼠抑郁行为的发生。

关于PSD的发病机制目前存在神经递质、免疫功能紊乱和神经再生等多种假说，氧化应激已被证实是其主要机制之一<sup>[17]</sup>。研究<sup>[18-19]</sup>表明：脑卒中发生时，机体内ROS自由基与SOD和GSH等抗氧化自由基失衡，膜脂质发生过氧化反应产生MDA，破坏细胞的正常结构和功能，使神经元受到损伤，最终导致神经疾病的发生。本研究结果显示：PSD组小鼠mPFC脑区组织中MDA水平和ROS阳性率较对照组升高，而SOD活性和GSH水平降低，提示PSD是因脑卒中过程中的脑组织发生氧化应激损伤，进而破坏神经元功能导致的，而水蛭素干预可明显降低PSD小鼠mPFC脑区组织氧化应激水平。NXN是一种主要定位于细胞质中的氧化还原酶，通过以氧化还原依赖的方式调节不同的信号通路促进细胞氧化还原平衡，从而影响细胞的生长、分化和代谢等过程<sup>[20]</sup>。同时，NXN的表达水平与小鼠神经疾病和行为学表现有密切关联，NXN基因的敲除可导致小鼠平衡氧化还原功能损伤，感觉神经元出现异常，从而丧失探索驱动力，并在体内表现出多发性神经病样异常冷敏感性和热“疼痛”<sup>[21-22]</sup>。本研究结果显示：PSD组小鼠mPFC脑区组织中

NXN mRNA和蛋白表达水平较对照组均降低，提示PSD组小鼠脑区组织损伤可能与NXN基因异常表达导致的氧化还原功能丧失有关。水蛭素干预后，PSD小鼠mPFC脑区组织中NXN mRNA和蛋白表达水平明显升高，表明水蛭素可能通过调节NXN表达促进机体的氧化还原平衡，修复PSD小鼠mPFC脑区组织细胞损伤。

综上所述，本研究初步验证了水蛭素处理可降低PSD小鼠mPFC脑区组织氧化应激水平，并上调NXN基因和蛋白表达水平，进而改善小鼠PSD。

#### 利益冲突声明：

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明：

赵丹参与实验方案设计、数据分析和论文撰写，史博和魏志玄参与实验操作及数据收集，崔群建参与数据分析和文献整理。

#### [参考文献]

- [1] 蔡李佳, 张亚男, 张筱彤, 等. 认知行为疗法联合药物治疗失眠[J]. 中国实用内科杂志, 2024, 44(10): 793-797.
- [2] 赵丰, 徐志云. 老年急性缺血性脑卒中患者炎症因子、血脂和氧化应激水平的变化[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(21): 4515-4517.
- [3] CORSI M, JAILLARD C, LÉVEILLARD T. Nucleoredoxin-like 2 metabolic signaling impairs its potential contribution to neurodegenerative diseases[J]. Neural Regen Res, 2023, 18(3): 529-530.
- [4] 宋景春, 丁仁彧, 吕奔, 等. 脓毒症性凝血病诊疗

- 中国专家共识(2024版)[J].解放军医学杂志,2024,49(11):1221-1236.
- [5] MA Y, WU S B, ZHAO F Y, et al. Hirudin inhibits glioma growth through mTOR-regulated autophagy[J]. J Cell Mol Med, 2023, 27(18): 2701-2713.
- [6] 吴林秀,梁红,赵应学,等.水蛭素对高尿酸血症大鼠尿酸盐转运体OAT1、URAT1、GLUT9表达的影响[J].中草药,2020,51(22):5776-5780.
- [7] XIA X F, LI M, WEI R X, et al. Intracerebral hirudin injection alleviates cognitive impairment and oxidative stress and promotes hippocampal neurogenesis in rats subjected to cerebral ischemia[J]. Neuropathology, 2023, 43(5): 362-372.
- [8] HEIN M, ZOREMBA N, BLEILEVENS C, et al. Levosimendan limits reperfusion injury in a rat middle cerebral artery occlusion (MCAO) model[J]. BMC Neurol, 2013, 13: 106.
- [9] LI Y F, YAN J C, ZHU X L, et al. Dilated Virchow-Robin spaces in the hippocampus impact behaviors and effects of anti-depressant treatment in model of depressed rats[J]. J Affect Disord, 2017, 219: 17-24.
- [10] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [11] 乔天慈,吴宏赞,李浩然,等.灸黄芪-水蛭治疗阿替普酶静脉溶栓的气虚血瘀型急性脑梗死的临床疗效观察[J].中医药学报,2022,50(4):63-67.
- [12] 王丽伟,张巍,李平.李平教授从痰论治眩晕经验[J].新疆中医药,2021,39(4):38-41.
- [13] 王栋,张亚男,周俊芳,等.mPFC-VTA通路在抑郁中的作用机制[J].中风与神经疾病杂志,2023,40(4):379-381.
- [14] 刘羽,刘林,易亚乔,等.百事乐加味方对脑卒中后抑郁大鼠海马-前额叶皮层环路炎症平衡的影响[J].中华中医药学刊,2020,38(3):95-99,266-269.
- [15] LI C C, LIU B, XU J Y, et al. Phloretin decreases microglia-mediated synaptic engulfment to prevent chronic mild stress-induced depression-like behaviors in the mPFC[J]. Theranostics, 2023, 13(3): 955-972.
- [16] 秦露,唐静,梁芯,等.跑步对CUS抑郁模型小鼠内侧前额叶皮质内PV<sup>+</sup>中间神经元的影响[J].陆军军医大学学报,2023,45(3):209-218.
- [17] 许宗英,潘永惠.氧化应激与脑卒中后抑郁的关系[J].医学综述,2016,22(21):4182-4185.
- [18] LIU D Q, WANG H L, ZHANG Y G, et al. Protective effects of chlorogenic acid on cerebral ischemia/reperfusion injury rats by regulating oxidative stress-related Nrf2 pathway[J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14: 51-60.
- [19] YANG Z, JIANG Y X, XIAO Y, et al. Di-Huang-Yin-Zi regulates P53/SLC7A11 signaling pathway to improve the mechanism of post-stroke depression[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 319: 117226.
- [20] IDELFONSO-GARCÍA O G, ALARCÓN-SÁNCHEZ B R, VÁSQUEZ-GARZÓN V R, et al. Is nucleoredoxin a master regulator of cellular redox homeostasis? its implication in different pathologies[J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(4): 670.
- [21] TRAN B N, VALEK L, WILKEN-SCHMITZ A, et al. Reduced exploratory behavior in neuronal nucleoredoxin knockout mice[J]. Redox Biol, 2021, 45: 102054.
- [22] VALEK L, TRAN B N, TEGEDER I. Cold avoidance and heat pain hypersensitivity in neuronal nucleoredoxin knockout mice[J]. Free Radic Biol Med, 2022, 192: 84-97.