

厚朴酚改善 LPS 诱导的小鼠抑郁行为和大脑细胞因子的研究[※]

● 高厚明* 刘志承 石巧玲 冯四林

摘要 目的:研究厚朴酚对脂多糖(LPS)诱导的小鼠抑郁行为及其大脑细胞因子表达的影响。方法:厚朴酚($10, 20\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和阳性药盐酸氟西汀($15\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)连续灌胃给药7天后,腹腔注射 LPS $0.83\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,采用糖水实验观察厚朴酚对糖水偏好值的影响,采用强迫游泳实验观察厚朴酚对不动时间的影响,并采用 RT-PCR 检测厚朴酚对大脑白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的 mRNA 表达的影响。结果:行为学实验表明 LPS 显著降低小鼠糖水偏好值,增加小鼠不动时间;分子生物学实验表明 LPS 显著增加大脑 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 的表达量。厚朴酚($10, 20\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和盐酸氟西汀($15\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)给药7天后,显著改善上述异常。结论:厚朴酚对大脑促炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的抑制作用可能是厚朴酚抗抑郁作用机制之一。

关键词 厚朴酚 抗抑郁 促炎性细胞因子

当今社会竞争日趋激烈,人们不断承受来自各方面的压力,导致人类精神性疾病发病率与日俱增。据报道,目前全球约有 17% 人口患有精神性疾病——抑郁症,该病在世界十大疾病中排位第四,但据 WHO 预测,到 2020 年抑郁症将会上升至第二,仅次于癌症^[1]。促炎性细胞因子是由淋巴细胞和巨噬细胞等免疫细胞分泌的调节免疫应答的信号分子,目前研究发现促炎性细胞因子在中枢神经系统调节神经生化,神经内分泌和行为的改变,参与抑郁症的发生和抗抑郁药的治疗^[2]。

厚朴酚是传统中药厚朴的主要活性成分,具有抗衰老、抗肿瘤、降低胆固醇、抗抑郁和抗炎等药理活性。本研究基于促炎性细胞因子与抑郁症之间存在的复杂关系为基础,研究厚朴酚对 LPS 小鼠抑郁模型的行为学影响,并进一步研究厚朴酚抗抑郁的可能作用机制。

※基金项目 广东省深圳市科技研发资金(No. JCYJ20150401163247216)

*作者简介 高厚明,男,副主任中药师,研究方向:中药药理与临床。

•作者单位 广东省深圳市中医院(518033)

1 材料

1.1 动物 SPF 级健康 ICR 雄性小鼠,体重 18~22 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,动物合格证号:SCXK(沪)2012-0005。小鼠糖水适应性 3 次后开始实验。

1.2 试剂 厚朴酚(批号:110729)购自中国药品生物制造检定所,盐酸氟西汀(批号:20130701)购自常州四药制药有限公司;PCR 相关试剂购买自海门碧云天公司;IL-1 β 引物:上游:5'-AAGATGAAGGCT-GCTTCCAAACC-3',下游:5'-ATACTGCCTGCCT-GAAGCTCTTGT-3';IL-6 引物:上游:5'-CCA-GAAACCGCTATGAAGTTCCT-3',下游:5'-CAC-CAGCATCAGTCCCAAGA-3';TNF- α 引物:上游:5'-CGTCAGCCGATTTGCTATCT-3',下游:5'-CG-GACTCCGCAAAGTCTAAG-3'; β -actin 内参引物:上游:5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3',下游:5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3',均由上海生工生物技术有限公司合成。

1.3 仪器 7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);MK3 酶标仪(美国 Thermo 公司);3K-15 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司);LX-200-迷你离心机(海门其林

贝尔公司);JY92-IIIN-超声波细胞破碎仪(宁波新芝公司);HF R76 数码摄像机(日本佳能公司)。

2 方法

2.1 分组与给药 实验分为5组,每组10只小鼠,包括正常对照组、模型对照组、盐酸氟西汀组(15mg·kg⁻¹)、厚朴酚组(10,20mg·kg⁻¹)。小鼠连续给药7天,第7天给药后1小时注射LPS(0.83mg·kg⁻¹),于给药24小时后进行糖水实验,36小时后进行强迫游泳实验。

2.2 糖水实验^[3] 小鼠被水食剥夺12h,正式实验在20:30am开始进行:随机在每个鼠笼放置两瓶已称重的100mL蔗糖水和已称重的100mL清水,并记录重量,12h之后,把两个水瓶取下,并立即再次称重,记录数据。糖水偏好值=糖水消耗/(糖水消耗+清水消耗)×100%。

2.3 强迫游泳实验^[4] 将小鼠放在圆柱型玻璃容器内,其内注有15cm高的水,用摄像机记录时间为6min,统计最后4min的实验数据,统计参数以秒为计时单位。统计此时间内小鼠的不动时间,即小鼠头部保持处于水面上方,四肢不动处于漂浮状态。

2.4 RT-PCR实验 组织样品1:10加入预冷的Trizol试剂,迅速充分匀浆。吸取匀浆液于1.5mL离心管中,室温放置5~10min。接着加入0.2mL三氯甲烷,剧烈震荡15s,室温放置3min。之后12000r·min⁻¹离心10min。吸取上清水相转移至干净的离心管中,加入等体积异丙醇,混匀,室温放置20min。12000r·min⁻¹离心10min,弃上清。底部出现的白色沉淀即RNA。加入1mL75%乙醇洗涤沉淀。12000r·min⁻¹离心3min,弃上清。室温干燥5~10min。加入30~50μL RNase-free ddH₂O,充分溶解RNA后将溶液置于-80℃保存。按照荧光定量试剂盒测定IL-1β、IL-6和TNF-α mRNA表达量。

2.5 数据统计处理 采用Student's t-检验双尾分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ (平均值±标准差)表示。 $P < 0.05$ 为

差异有显著性意义, $P < 0.01$ 为差异有极显著性意义。

3 结果

3.1 厚朴酚对LPS抑郁小鼠糖水偏好值的影响 腹腔注射LPS后,模型对照组小鼠糖水偏好值显著低于正常对照组($P < 0.01$)。盐酸氟西汀(15mg·kg⁻¹)和厚朴酚(10,20mg·kg⁻¹)给药7天显著升高糖水偏好值,与模型对照组相比均有极显著性差异($P < 0.01$)。见表1。

表1 厚朴酚对LPS抑郁小鼠糖水偏好值和不动时间的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(mg·kg ⁻¹)	糖水偏好值(%)	不动时间(s)
正常对照组	-	81.35 ± 6.16	79.31 ± 12.34
模型对照组	-	54.86 ± 4.31 ^{##}	142.63 ± 9.35 ^{##}
盐酸氟西汀	15	79.90 ± 5.53 ^{**}	85.05 ± 10.98 [*]
厚朴酚	10	74.13 ± 5.09 ^{**}	84.32 ± 12.03 [*]
	20	78.85 ± 9.64 ^{**}	74.53 ± 6.57 ^{**}

注:与正常对照组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型对照组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

3.2 厚朴酚对LPS抑郁小鼠不动时间的影响 腹腔注射LPS后,模型对照组小鼠不动时间显著高于正常对照组($P < 0.01$)。盐酸氟西汀(15mg·kg⁻¹)和厚朴酚给药7天显著降低不动时间,其中20mg·kg⁻¹厚朴酚与模型对照组相比有极显著性差异($P < 0.01$)。见表1。

3.3 厚朴酚对LPS抑郁小鼠大脑促炎性细胞因子IL-1β、IL-6和TNF-α mRNA表达量的影响 腹腔注射LPS后,模型对照组促炎性细胞因子IL-1β、IL-6和TNF-α mRNA表达量显著升高,与正常对照组相比均具有极显著性差异($P < 0.01$)。盐酸氟西汀(15mg·kg⁻¹)和厚朴酚(10,20mg·kg⁻¹)给药7天后3种促炎性细胞因子均显著降低,与模型对照组相比均有显著性差异($P < 0.01$)。见表2。

表2 厚朴酚对LPS抑郁小鼠大脑IL-1β、IL-6和TNF-α mRNA表达量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(mg·kg ⁻¹)	IL-1β	IL-6	TNF-α
正常对照组	-	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.09
模型对照组	-	3.13 ± 0.31 ^{##}	1.98 ± 0.34 ^{##}	4.59 ± 0.34 ^{##}
盐酸氟西汀	15	1.25 ± 0.32 ^{**}	1.14 ± 0.13 ^{**}	1.56 ± 0.24 ^{**}
厚朴酚	10	1.38 ± 0.16 ^{**}	1.27 ± 0.16 ^{**}	1.34 ± 0.19 ^{**}
	20	1.33 ± 0.07 ^{**}	1.16 ± 0.13 ^{**}	1.34 ± 0.11 ^{**}

注:与正常对照组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型对照组比较,^{**} $P < 0.01$ 。

4 讨论

现在临床上广泛应用的抗抑郁药物普遍具有恶心、出汗增多、头痛等副作用,所以急需发现副作用小的药物代替临床上的抗抑郁药物,同时也需要研究导致抑郁症发生的多种因素,从而为抑郁症的治疗提供更多的靶标因子,因此越来越多的研究开始聚焦于天然植物提取物或有效成分的研究。

大量临床研究表明,抑郁症患者外周血中促炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量显著高于正常人,抗抑郁药治疗之后可以抑制外周血中促炎性细胞因子水平的升高^[5,6]。同时,动物实验也清楚地表明,抑郁动物大脑和外周血促炎性细胞因子异常升高,给药之后均可降低促炎性细胞因子的水平,同时改善抑郁动物行为^[7,8]。提示抗炎药物具有潜在的抗抑郁活性,并且如果炎症的确是抑郁症的病因之一,那么抗炎作用应该参与抗抑郁药的作用机制。考虑到厚朴酚具有抗炎作用^[9],并且前期实验证明其具备抗抑郁作用,因此本实验着重探讨抗炎机制是否参与厚朴酚的抗抑郁作用。

研究发现厚朴酚可以增加抑郁小鼠的糖水偏好值,降低抑郁小鼠的不动时间,与前期实验的结果基本相符^[10,11],再次确认厚朴酚具有抗抑郁作用。并且厚朴酚给药7天后可以显著降低大脑促炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量,表明厚朴酚的抗抑郁作用与抗炎作用相关。但是,厚朴酚改善大脑 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达后,如何通过下游信号分子改善抑郁症状,还有待进一步的研究。

参考文献

[1] Duman RS, Li N, Liu RJ, et al. Signaling pathways underlying the rapid

antidepressant actions of ketamine[J]. *Neuropharmacology*, 2012, 62(1):35-41.

[2] Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9(1):46-56.

[3] 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, 93(3):358-364.

[4] Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. "Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine[J]. *Eur J Pharmacol*, 1978, 51(3):291-294.

[5] Maes M. The cytokine hypothesis of depression: inflammation, oxidative & nitrosative stress (IO&NS) and leaky gut as new targets for adjunctive treatments in depression[J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2008, 29(3):287-291.

[6] Jacoby AS, Munkholm K, Vinberg M, et al. Cytokines, brain-derived neurotrophic factor and C-reactive protein in bipolar I disorder - Results from a prospective study[J]. *J Affect Disord*, 2016, 197:167-174.

[7] Zhao Y, Zhang Y, Pan F. The effects of EGb761 on lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviour in C57BL/6J mice[J]. *Cent Eur J Immunol*, 2015, 40(1):11-17.

[8] Li R, Zhao D, Qu R, et al. The effects of apigenin on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice[J]. *Neurosci Lett*, 2015, 594:17-22.

[9] Wei W, Dejie L, Xiaojing S, et al. Magnolol inhibits the inflammatory response in mouse mammary epithelial cells and a mouse mastitis model[J]. *Inflammation*, 2015, 38(1):16-26.

[10] Li LF, Yang J, Ma SP, et al. Magnolol treatment reversed the glial pathology in an unpredictable chronic mild stress-induced rat model of depression[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 711(1-3):42-49.

[11] Li LF, Lu J, Li XM, et al. Antidepressant-like effect of magnolol on BDNF up-regulation and serotonergic system activity in unpredictable chronic mild stress treated rats[J]. *Phytother Res*, 2012, 26(8):1189-1194.

中医文化

谷雨节气的习俗

1、禁杀五毒

谷雨以后气温升高,病虫害进入高繁衍期,为了减轻病虫害对作物及人的伤害,农家一边进田灭虫,一边张贴谷雨贴,进行驱凶纳吉的祈祷。

2、渔家流行谷雨祭海

谷雨时节正是春海水暖之时,百鱼行至浅海地带,是下海捕鱼的好日子。俗话说"骑着谷雨上网场"。为了能够出海平安、满载而归,谷雨这天渔民要举行海祭,祈祷海神保佑。

3、走谷雨

古时有"走谷雨"的风俗,谷雨这天青年妇女走村串

亲,或者到野外走走,寓意与自然相融合,强身健体。

4、喝谷雨茶

传说谷雨这天的茶喝了会清火,辟邪,明目等,所以南方有谷雨摘茶习俗。

5、谷雨食香椿

北方则有谷雨食香椿的习俗。

6、谷雨祭祀文祖仓颉

"谷雨祭仓颉",是自汉代以来流传千年的民间传统。

7、洗澡消灾避祸

在西北地区,旧时,人们将谷雨的河水称为"桃花水",传说以它洗浴,可消灾避祸。