

逍遥丸对皮质酮诱导小鼠抑郁样行为的干预机制[※]

● 王双双¹ 易立涛^{1▲} 董淑琦¹ 李成付² 陈学勤³

摘要 目的:观察逍遥丸对皮质酮诱导小鼠抑郁样行为的干预作用,并探讨其分子机制。方法:将50只ICR雄性小鼠,随机分为5组:正常组、皮质酮模型组、阳性对照氟西汀组(20 mg/kg)、低剂量逍遥丸(200 mg/kg)组、高剂量逍遥丸组(600 mg/kg),通过皮下注射皮质酮诱导小鼠抑郁模型。持续35天后,采用糖水偏好实验和强迫游泳实验评价动物抑郁样行为;采用ELISA方法测小鼠血清中皮质酮含量及小鼠海马组织中脑源性神经营养因子(BDNF)的含量。结果:皮质酮可以降低糖水偏好值、增加小鼠强迫游泳的不动时间,而逍遥丸可以显著提高糖水偏好值、减少小鼠不动时间;长期注射皮质酮可增加血清皮质酮水平,降低海马组织中BDNF含量,而逍遥丸可以降低小鼠血清中皮质酮的含量并且能够提高海马组织中BDNF含量。结论:逍遥丸可以有效降低小鼠血清中皮质酮的含量并增加小鼠海马中BDNF含量,改善神经营养系统,产生抗抑郁样作用。

关键词 皮质酮;逍遥丸;抑郁症;脑源性神经营养因子

抑郁症是一种情绪障碍,伴随着悲伤、绝望、情绪低落、失眠、兴趣低下等,为目前全球三大疾病负担之一^[1]。目前临床常用抗抑郁药物(如三环类)均为化学药物,只能缓解部分症状,且作用位点单一,毒副作用较大,因此,研究开发疗效好、毒副作用少的抗抑郁药物成为近些年来研究的热点^[2]。

逍遥丸出自宋代《太平惠民和剂局方》,方中的柴胡可以疏肝解郁,以顺肝性;当归、白芍能养肝血,柔肝体,帮助柴胡恢复肝正常的顺达之性;白术、茯苓可

以益气健脾,促进气血生化;甘草则配合茯苓、白术以益气健脾,配白芍以缓急止痛;薄荷辛凉,助柴胡以疏肝气、解郁热;煨姜辛温,助柴胡、薄荷疏肝,助茯苓、白术以健脾胃^[3]。因其具有疏肝解郁、健脾养血的功效,常作为中医调理情志病的经典药方。近年来研究显示逍遥丸具有一定的抗抑郁作用^[4],本文则以皮质酮诱导的小鼠抑郁模型进一步探讨逍遥丸基于改善神经营养系统的抗抑郁机制。

1 材料

1.1 药物 盐酸氟西汀(购自常州四药制药有限公司);皮质酮(购自美国Sigma-Aldrich公司);逍遥丸(购自北京同仁堂科技发展股份有限公司)。

1.2 动物 雄性ICR小鼠,清洁级,体重(22±2)g,8周龄,购自上海斯莱克动物中心,实验动物许可证:SCXK(沪)2012-002。小鼠10只/笼,室温(22±2)°C,光暗周期为12h/12h(光照时间07:00-19:00),自由获得饲料与饮水,适应环境一周后开始实验。

1.3 试剂 BDNF ELISA试剂盒(购自上海生工生物

※基金项目 福建省卫生教育联合攻关计划项目(No.2019-WJ-38);厦门市科技计划项目(No.3502Z20179012; No.3502Z20179013)

▲通讯作者 易立涛,男,生物学博士,副教授。研究方向:中药神经精神药理学。E-mail:litaoyi@hqu.edu.cn

• 作者单位 1.华侨大学(福建 厦门 361021);2.福建中医药大学附属厦门中医院(福建 厦门 361009);3.厦门大学附属第一医院(福建 厦门 361000)

有限公司);小鼠皮质酮ELISA试剂盒(购自武汉博士德生物工程有限公司)。

1.4 仪器 电子分析天平(购自北京赛多利斯仪器系统有限公司);超声波清洗器(购自昆山市超声仪器有限公司);酶标仪(购自美国 Thermo 公司);台式冷冻离心机(购自德国 KENDRD 公司)。

2 方法

2.1 动物模型的建立 适应环境 7 天后,所有的小鼠随机分为 5 组(每组 10 只):正常组、皮质酮组、逍遥丸组(低剂量及高剂量组的剂量分别为 200mg/kg、600 mg/kg)、阳性对照氟西汀组(剂量为 20 mg/kg)。皮质酮用 0.1% 的二甲亚砷和 0.1 % 的吐温-80 混合液溶解;逍遥丸和氟西汀混悬于生理盐水中。除了正常组,其它组每天皮下注射皮质酮(40 mg/kg),持续 35 天。逍遥丸和氟西汀于皮质酮注射前 30 min 灌胃给药,剂量为 10 ml/kg,实验持续 35 天。

2.2 糖水偏好实验 实验之前,先对小鼠进行糖水适应性训练:先给予小鼠两瓶 1% 蔗糖水,24 h 后,将其中一瓶换为普通水,再进行 24 h。糖水适应之后,将小鼠进行水食剥夺 24 h。糖水实验在上午 9 点半开始,每只小鼠置于单独的一个笼子中,分别给予一瓶 1% 蔗糖水,一瓶普通水(均已称初重)。经过 24 h,称量两个水瓶的末重,记录每只小鼠消耗的糖水及普通水的量,计算糖水偏好百分比[公式:糖水偏好百分比=糖水消耗量/(糖水消耗量+普通水消耗量)]。

2.3 强迫游泳实验 将小鼠置于温度(25±2)°C、水深 10 cm 的圆形玻璃容器(高 20 cm,直径 18 cm)中强迫游泳 6 分钟。判定不动的标准是小鼠在水中停止挣扎,呈漂浮状态,仅有细小的肢体运动以保持头部浮在水面。通过实验视频,记录小鼠在后 4 分钟的总不动时间。

2.4 血液和组织样本的获取 强迫游泳实验后,摘小鼠眼球快速收集血液,4°C 下 4000 rpm 离心 10 min,收集血清,-80°C 贮存。然后,断头处死小鼠,快速取出海马,立即用液氮冻结。所有的组织样本在-80°C 下贮存至分析完成。

2.5 血清皮质酮水平的测定 根据皮质酮 ELISA 试剂盒说明书测定血清皮质酮浓度。

2.6 海马脑源性神经营养因子(BDNF)水平测定 根据 BDNF ELISA 试剂盒说明书测定其浓度。

2.7 数据分析 所有的数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS 25.0 软件进行数据分析。统计差异用单

因素方差分析结合事后检验进行分析。

3 结果

3.1 糖水偏好测定结果 给药 5 周后,皮质酮组小鼠的糖水偏好值显著低于正常组($P<0.01$),提示皮质酮引起小鼠的快感缺失。逍遥丸高、低剂量组及阳性对照氟西汀组均能显著增加小鼠的糖水偏好值,与皮质酮组相比差异显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$),但逍遥丸高、低剂量组与阳性对照氟西汀组相比亦存在显著差异($P<0.05$)。见表 1。

表 1 逍遥丸和皮质醇对小鼠糖水偏好值的影响(n=10, $\bar{x}\pm s$)

组别	糖水偏好值(%)
正常组	0.86±0.09
皮质酮组	0.61±0.08 [#]
阳性对照氟西汀组	0.84±0.08 ^{**}
低剂量逍遥丸组	0.69±0.06 ^{*▲}
高剂量逍遥丸组	0.70±0.05 ^{*▲}

注:与正常组比较,[#] $P<0.01$;与皮质酮组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与阳性对照氟西汀组比较,[▲] $P<0.05$

3.2 强迫游泳实验测定结果 相对于正常组,皮质酮组的不动时间显著增加($P<0.05$)。与皮质酮组相比,低、高剂量逍遥丸和氟西汀均能显著减少小鼠的不动时间($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表 2。

表 2 逍遥丸和皮质酮对小鼠强迫游泳实验中不动时间的影响(n=10, $\bar{x}\pm s$)

组别	不动时间(s)
正常组	56.43±13.13
皮质酮组	88.99±11.23 [#]
阳性对照氟西汀组	54.01±8.36 [*]
低剂量逍遥丸组	50.57±11.45 [*]
高剂量逍遥丸组	43.98±12.11 ^{**}

注:与正常组比较,[#] $P<0.05$;与皮质酮组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$

3.3 皮质酮测定结果 皮质酮组小鼠血清中的皮质酮浓度显著增高,与正常组相比具有统计学差异($P<0.01$)。与皮质酮组相比,低、高剂量逍遥丸组及阳性对照氟西汀组均可显著降低小鼠血清中的皮质酮含量($P<0.01$)。见表 3。

3.4 BDNF 测定结果 与正常组相比,皮质酮组海马 BDNF 含量显著降低($P<0.01$)。与皮质酮组相比,低、高剂量逍遥丸组和阳性对照氟西汀组均可增加小鼠海马中 BDNF 的含量($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表 4。

表3 逍遥丸和皮质酮对小鼠血清皮质酮含量的影响
(n=10, $\bar{x}\pm s$)

组别	皮质酮(ng/mL)
正常组	37.45±3.22
皮质酮组	64.45±5.65 ^{##}
阳性对照氟西汀组	33.67±1.76 ^{**}
低剂量逍遥丸组	34.54±1.87 ^{**}
高剂量逍遥丸组	35.43±1.87 ^{**}

注:与正常组比较, ^{##} $P < 0.01$;与皮质酮组比较, ^{**} $P < 0.01$

表4 逍遥丸和皮质酮对小鼠海马中BDNF含量的影响(n=10, $\bar{x}\pm s$)

组别	BDNF(pg/mg protein)
正常组	193.25±14.53
皮质酮组	131.84±17.57 ^{##}
阳性对照氟西汀组	197.68±13.51 ^{**}
低剂量逍遥丸组	183.20±19.39 [*]
高剂量逍遥丸组	202.73±9.38 ^{**}

注:与正常组比较, ^{##} $P < 0.01$;与皮质酮组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

4 讨论

本实验采用糖水偏好实验和强迫游泳实验来观察皮质酮对小鼠产生的快感缺失和绝望行为,以及逍遥丸是否具有改善的作用。结果发现,在糖水偏好实验中,皮质酮显著降低了小鼠对糖水的偏好,阳性对照氟西汀组的糖水偏好得到了显著改善,服用逍遥丸也可以增加抑郁小鼠的糖水偏好值;在强迫游泳实验中,皮质酮显著增加了小鼠的不动时间,而与皮质酮组相比,逍遥丸组和氟西汀组的不动时间均得到了显著降低。这一点与之前报道的加味逍遥丸能够缩短小鼠在强迫游泳中的不动时间不谋而合^[5]。

本实验结果表明,注射皮质酮导致小鼠血清皮质酮浓度显著升高,而氟西汀和逍遥丸均可逆转其浓度。长期或者急性高度应激会使体内的糖皮质激素达到一个极高的水平,导致海马损伤^[6]。而经过氟西汀和逍遥丸治疗,可以有效调节血清皮质酮的含量稳定,避免大脑海马受到过多的损伤。

BDNF作为神经营养素家族的主要成员,源于神经元及其靶细胞并逆向影响神经元。抑郁患者海马BDNF含量明显低于正常人,传统抗抑郁药及电休克治疗均可增加BDNF含量,从而改善抑郁症状,提示BDNF可作为抗抑郁药的治疗靶点和检测指标^[7-8]。本实验中,皮质酮组的小鼠海马BDNF含量明显低于正常组,说明皮质酮降低了小鼠海马中的BDNF含量。

而氟西汀、逍遥丸均可增加小鼠海马中的BDNF含量,与皮质酮组相比存在明显差异,表明氟西汀和逍遥丸的抗抑郁作用与改善海马神经营养系统有关。

中医学认为疾病不是单独发生于某个部位的病变,而是一个有机整体的病变。抑郁症属于中医的情志疾病,从中医学角度来讲,抑郁症不仅仅是某个部位的病变,它很大程度上与肝的功能相关^[9]。逍遥丸中的柴胡可以疏肝解郁,在中医学看来,逍遥丸是通过补肝体、助肝用、理气养血、调和肝脾而起到改善抑郁的作用^[10]。本研究结果表明逍遥丸确实能提高大脑海马BDNF的含量,至于其是否通过调节小鼠肝的功能,改善肝对皮质酮水平的调节,从而影响了海马中神经递质的表达水平,可作为下一步研究的方向。

综上所述,长期注射皮质酮能够降低正常小鼠的糖水偏好值以及增加强迫游泳的不动时间,产生抑郁样的行为,并可增加血清皮质酮含量以及降低海马BDNF含量。相反,逍遥丸能够逆转皮质酮诱导的小鼠抑郁样行为,并且能够降低血清皮质酮的含量以及升高海马BDNF的含量,产生抗抑郁样的作用。

参考文献

- [1] Rehm J, Shield KD. Global Burden of Disease and the Impact of Mental and Addictive Disorders[J]. *Curr Psychiatry Rep*, 2019, 21(2): 10.
- [2] Lamb T, Pachana NA, Dissanayaka N. Update of Recent Literature on Remotely Delivered Psychotherapy Interventions for Anxiety and Depression[J]. *Telemed J E Health*, 2019, 25(8): 671-677.
- [3] 魏睦新, 王霞. 从逍遥丸的组成探源肝不忘理脾 理气当防伤阴[J]. *中华中医药学刊*, 2010, 38(9):9-11.
- [4] 高耀, 高丽, 高晓霞, 等. 基于网络药理学的逍遥散抗抑郁活性成分作用靶点研究[J]. *药学报*, 2015, 50(12):1589-1595.
- [5] 宝丽, 陈婧, 黄琳, 等. 逍遥丸对小鼠行为绝望和应激性抑郁的影响[J]. *中药材*, 2008, 31(9):1360-1364.
- [6] Hui J, Zhang J, Pu M, et al. Modulation of GSK-3 β / β -Catenin Signaling Contributes to Learning and Memory Impairment in a Rat Model of Depression[J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2018, 21(9):858-870.
- [7] Begni V, Riva MA, Cattaneo A. Cellular and molecular mechanisms of the brain-derived neurotrophic factor in physiological and pathological conditions[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131(2):123-138.
- [8] Zhang JC, Yao W, Hashimoto K. Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)-TrkB Signaling in Inflammation-related Depression and Potential Therapeutic Targets[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2016, 14(7):721-731.
- [9] 钱梦, 谢鸣, 张媛凤, 等. 肝郁证雌雄大鼠神经-内分泌变化的比较[J]. *北京中医药大学学报*, 2019, 42(7):549-554.
- [10] 薛银萍, 李莲, 张冲. 逍遥丸对亚健康-免疫-内分泌系统的影响[J]. *世界中医药*, 2017, 12(4):52-54.

(收稿日期:2019-06-23)

(本文编辑:金冠羽)