

甘味颗粒对小鼠急性应激诱导行为绝望抑郁的改善作用及其机制研究

薛晓娜, 李慧峰, 荆 然, 程艳刚, 裴妙荣*

山西中医学院, 山西 晋中 030600

摘 要: **目的** 考察甘味颗粒对急性应激诱导行为绝望抑郁小鼠行为的影响, 并探讨其作用机制。 **方法** ICR 小鼠随机分为对照组、模型组、逍遥丸组、氟西汀组以及甘味颗粒 2.11、6.33、19.00 g/kg 组, 每组 15 只。模型组和对照组均 ig 给予蒸馏水, 逍遥丸组 ig 给予逍遥丸 1.50 g/kg, 氟西汀组 ig 给予盐酸氟西汀分散片 3.3 mg/kg, 甘味颗粒组 ig 给予甘味颗粒 2.11、6.33、19.00 g/kg。1 次/d, 连续给药 10 d。各组小鼠悬尾 5 min 和常温强迫游泳 6 min 进行急性应激诱导行为绝望抑郁模型, 观察应激小鼠的行为学效应。采用酶联免疫吸附 (ELISA) 法检测小鼠血浆中皮质醇水平以及脑组织中单胺类神经递质 5-羟色胺 (5-HT)、去甲肾上腺素 (NE)、多巴胺 (DA) 水平。 **结果** 与模型组比较, 甘味颗粒 6.33、19.00 g/kg 组的悬尾不动时间显著减少, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01); 甘味颗粒 2.11、6.33、19.00 g/kg 组的强迫游泳不动时间显著减少, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组比较, 甘味颗粒 6.33、19.00 g/kg 组血浆皮质醇水平明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 甘味颗粒 6.33、19.00 g/kg 组 5-HT 水平明显升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01), 甘味颗粒 2.11、6.33、19.00 g/kg 组 DA、NE 水平显著升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01)。 **结论** 甘味颗粒对急性应激诱导行为绝望抑郁小鼠行为具有显著的改善作用, 可能是通过升高单胺类神经递质 5-HT、DA、NE 水平, 降低血浆皮质醇水平而发挥其抗抑郁作用。

关键词: 甘味颗粒; 行为绝望抑郁; 行为学; 单胺类神经递质

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2016)01-0017-04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2016.01.004

Improvement of Ganwei Granules on mice with behavioral despair and depression induced by acute stress and its mechanism

XUE Xiao-na, LI Hui-feng, JING Ran, CHENG Yan-gang, PEI Miao-rong

Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 30600, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Ganwei Granules on mice with behavioral despair and depression induced by acute stress and explore its mechanism. **Methods** ICR mice were randomly divided into control group, model group, Xiaoyao Pills group, fluoxetine group, and Ganwei Granules (2.11, 6.33, and 19.00 g/kg) groups, and each group had 15 mice. Mice in control and model groups were ig administered with distilled water, mice in Xiaoyao Pills group were ig administered with Xiaoyao Pills 1.50 g/kg, and mice in fluoxetine group were ig administered with Fluoxetine Hydrochloride Dispersible Tablets 3.3 mg/kg. Mice in Ganwei Granules groups were ig administered with Ganwei Granules 2.11, 6.33, and 19.00 g/kg, respectively. All animals were ig administered once daily, and treated for 10 d. Behavioral despair and depression model induced by acute stress was built by tail suspension for 5 min test and forced swimming for 6 min test. The behavioral effects were observed. The levels of cortisol in plasma and monoamine neurotransmitter serotonin (5-HT), norepinephrine (NE), dopamine (DA) in brain were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared with the model group, the fixed time of tail suspension in Ganwei Granules 6.33 and 19.00 g/kg groups were significantly reduced, and there were differences between two groups ($P < 0.05$, 0.01), while the fixed time of forced swimming in Ganwei Granules 2.11, 6.33, and 19.00 g/kg groups were significantly reduced, with significant differences between two groups ($P < 0.05$, 0.01). Compared with the model group, the levels of cortisol in plasma of Ganwei Granules 6.33 and 19.00 g/kg groups were significantly decreased, with significant differences between two groups ($P < 0.05$). Compared with

收稿日期: 2015-10-14

基金项目: 山西省实验动物专项资金项目 (2015K06)

作者简介: 薛晓娜, 女, 硕士研究生, 从事中药新产品的开发与应用研究。E-mail: 755268028@qq.com

*通信作者 裴妙荣, 教授, 博士生导师, 从事中药新产品的开发与应用研究。

the model group, the levels of 5-HT in plasma of Ganwei Granules 6.33, 19.00 g/kg groups were significantly increased, and the levels of DA and NE in plasma of Ganwei Granules 2.11, 6.33, and 19.00 g/kg groups were also obviously increased, and there were differences between two groups ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Ganwei Granules have significant improved effects on mice with behavioral despair and depression induced by acute stress, which may be related to the increase of monoamine neurotransmitter 5-HT, DA, and NE, and the reduction of cortisol in plasma.

Key words: Ganwei Granules; behavioral despair and depression; behavior; monoamine neurotransmitter

抑郁症是以精神障碍和情感障碍及认知功能的改变为主要特征的一种精神疾病,属中医情志病范畴,大多由于情志不疏、肝气郁滞所致^[1]。中医药强调整体观念,在治疗抑郁症的过程中具有身心整体调节优势,中药复方具有多靶点、多环节、多层次药理学作用,因此从中医药中寻找有效抗抑郁方法已经成为抑郁症防治研究的一种重要策略^[2],对抑郁症发病机制的深入研究,并开发出抗抑郁治疗作用明显,且机制较为明确的药物具有重要意义。甘味颗粒处方由柴胡、甘松、五味子、甘草组成,具有疏肝理气解郁、畅中和胃醒脾、补肾宁心安眠等作用。本研究采用急性应激制备小鼠行为绝望抑郁模型,观察甘味颗粒对抑郁模型小鼠行为学及血浆皮质醇、脑组织单胺类神经递质 5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)的影响,探讨在此模型上甘味颗粒的抗抑郁活性及其作用机制。

1 材料

1.1 动物

清洁级 ICR 小鼠 120 只,体质量 18~22 g,雌雄各半,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物合格证号 SYXK(京)2012-0024。

1.2 药物

甘味颗粒,每克内容物相当于 1.86 g 生药,批号 20150402,由山西中医学院方剂化学与制剂研究中心提供;盐酸氟西汀分散片,规格 20 mg/片,礼来苏州制药有限公司分包装,产品批号 0744A;逍遥丸,浓缩丸,每 8 丸相当于原药材 3 g,九芝堂股份有限公司生产,批号 201409012;大鼠皮质醇、5-HT、DA、NE 试剂盒均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 仪器

SB-5200DTDN 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);FA2014 型万分之一分析天平(上海精密科学仪器有限公司);LD5-10 离心机(北京医用离心机厂);ZH-YLS-18A 型悬尾测定仪(安徽正华生物仪器设备有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药

ICR 小鼠适应性饲养 3 d 后,按随机数字表法随机分为对照组、模型组、逍遥丸组、氟西汀组以及甘味颗粒 2.11、6.33、19.00 g/kg 组,每组 15 只。模型组和对照组均 ig 给予蒸馏水,逍遥丸组 ig 给予逍遥丸 1.50 g/kg,氟西汀组 ig 给予盐酸氟西汀分散片 3.3 mg/kg,甘味颗粒组 ig 给予甘味颗粒 2.11、6.33、19.00 g/kg。逍遥丸、盐酸氟西汀分散片的给药剂量依据临床用量,并按小鼠体表面积折算所得;甘味颗粒给药剂量参考文献报道^[3]。给药当天所有药物均以双蒸水进行新鲜配制。1 次/d,连续给药 10 d。

2.2 行为绝望抑郁模型的建立和行为学效应^[4]

给药 10 d 后,各组小鼠悬尾 5 min 和常温强迫游泳 6 min 进行急性应激,以诱导行为绝望抑郁模型,并以其行为学效应不动时间(即绝望)作为抑郁的程度指标。

于末次给药 1 h 后,悬尾(夹尾根 3/4 部位),约 2 cm 处,观察并记录 5 min 内悬尾不动时间。悬尾结束后,放入直径 13 cm,高 24 cm,装适量 22 ℃,10 cm 深的水中,1 只/次,强迫游泳,观察 6 min,记录后 4 min 内强迫游泳不动时间。

2.3 ELISA 检测血浆皮质醇

小鼠强迫游泳结束后摘除眼球取血,抗凝管中静置 30 min 后,3 000 r/min 离心 15 min,分离血浆,-80 ℃冰箱保存备用。采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测小鼠血浆中皮质醇水平。

2.4 ELISA 检测脑组织中单胺类神经递质

眼球取血后处死小鼠,将小鼠脑组织在冰浴中迅速取出,-80 ℃冰箱保存备用。按 ELISA 试剂盒步骤检测脑组织中单胺类神经递质 5-HT、NE、DA 水平。

2.5 统计学处理

数据用 SPSS 13.0 软件进行处理,多组均数之间的比较采用单因素方差分析,每两组均数之间比较进行 t 检验,分析结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 甘味颗粒对急性应激行为绝望小鼠行为学的影响

与模型组比较, 甘味颗粒 6.33、19.00 g/kg 组

的悬尾不动时间显著减少, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$ 、 0.01); 甘味颗粒 2.11、6.33、19.00 g/kg 组的强迫游泳不动时间显著减少, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$ 、 0.01), 见表 1。

表 1 甘味颗粒对小鼠悬尾和强迫游泳不动时间的影响

Table 1 Effect of Ganwei Granules on motionless time in tail suspension and forced swimming test in mice

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物数/只	悬尾不动时间/s	强迫游泳不动时间/s
模型	—	14	58.78±19.60	92.78±21.56
逍遥丸	1.50	14	35.59±10.48 ^{##}	56.33±30.35 [#]
氟西汀	0.003 3	15	41.73±13.40 [#]	63.86±20.51 [#]
甘味颗粒	2.11	15	66.12±21.00	66.83±21.78 [#]
	6.33	15	38.94±10.27 [#]	45.24±15.60 ^{##}
	19.00	14	13.79±2.74 ^{##}	20.01±6.65 ^{##}

与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$

[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group

3.2 甘味颗粒对急性应激行为绝望小鼠血浆皮质醇的影响

与对照组比较, 模型组小鼠血浆皮质醇水平显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 甘味颗粒 6.33、19.00 g/kg 组血浆皮质醇水平均明显降低, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 2。

3.3 甘味颗粒对急性应激行为绝望小鼠脑组织单胺类神经递质的影响

与对照组比较, 模型组小鼠 5-HT、DA、NE 水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, 甘味颗粒 6.33、19.00 g/kg 组 5-HT 水平明显升高, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$ 、 0.01), 甘味颗粒 2.11、6.33、19.00 g/kg 组 DA、NE 水平显著升高, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$ 、 0.01), 见表 3。

表 2 甘味颗粒对急性应激行为绝望小鼠血浆皮质醇水平的影响

Table 2 Effect of Ganwei Granules on levels of cortisol in plasma of mice with depression induced by acute stress

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物数/只	皮质醇/(μg·L ⁻¹)
对照	—		97.82±24.38
模型	—	14	186.59±47.67 ^{**}
逍遥丸	1.50	14	146.58±30.11 [#]
氟西汀	0.003 3	15	151.48±27.87 [#]
甘味颗粒	2.11	15	193.08±26.09
	6.33	15	150.04±34.05 [#]
	19.00	14	150.65±22.17 [#]

与对照组比较: ^{**} $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$

^{**} $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group

表 3 甘味颗粒对急性应激行为绝望小鼠脑组织单胺类神经递质水平的影响

Table 3 Effect of Ganwei Granules on monoamine neurotransmitters of mice with depression induced by acute stress

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物数/只	5-HT/(μg·L ⁻¹)	DA/(μg·L ⁻¹)	NE/(μg·L ⁻¹)
对照	—	15	196.80±28.05	99.50±13.55	98.89±14.34
模型	—	14	99.60±21.10 [*]	61.12±15.42 ^{**}	49.28±12.32 ^{**}
逍遥丸	1.50	14	130.05±35.07 [#]	75.60±15.11 [#]	76.04±10.12 ^{##}
氟西汀	0.003 3	15	125.11±32.79 [#]	73.72±9.75 [#]	72.16±13.05 ^{##}
甘味颗粒	2.11	15	115.85±30.48	74.48±12.21 [#]	63.09±14.08 [#]
	6.33	15	168.34±26.04 ^{##}	87.58±16.76 ^{##}	75.84±8.56 ^{##}
	19.00	14	158.80±36.10 ^{##}	78.69±14.84 [#]	81.58±11.49 ^{##}

与对照组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$

^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group

4 讨论

甘味颗粒由柴胡、甘松、五味子、甘草按照 10 : 6 : 10 : 6 的比例配伍而成。方中君以柴胡苦辛微寒,主归肝经,疏肝理气解郁,调达肝气;臣以甘松入脾开郁,芳香行散,舒通中焦气机,协助肝气畅达,与柴胡相合,以消除胁肋胀痛,脘腹胀满,纳呆食少等症;佐以五味子味酸甘性温,补肾宁心,益气生津,宁心安神,以治郁证的情志不安,失眠多梦,虚汗不止等症;使以甘草一以调和诸药,一以缓肝之急,用甘药以缓解郁证的性急易怒等症,全方合用,辛以散之,酸以收之,甘以缓之。

已有研究表明,甘味颗粒对行为绝望动物模型有明显的治疗作用,显示甘味颗粒具有明显的抗抑郁作用^[3]。急性应激(悬尾、强迫游泳)诱导的行为绝望抑郁模型以其不动时间(即绝望)为抑郁程度指标,该方法简单、快速、敏感,为经典的抑郁模型之一^[5]。本实验结果显示,与模型组比较,甘味颗粒组小鼠悬尾、强迫游泳不动时间显著减少,其抗抑郁效果与对照药逍遥丸、氟西汀相当,高剂量组作用更强于对照药组。

抑郁症的发病机制较为复杂,目前尚未完全确定,其主要的假说有单胺类神经递质假说^[6]、细胞分子机制假说^[7]、神经内分泌假说^[8]、受体假说等。单胺递质理论假说认为抑郁症主要由脑内单胺类神经递质(如 5-HT、NE、DA 等)缺乏导致的^[9],通过抑制突触前膜对 5-HT、NE、DA 的再摄取,使突触间隙内 3 种神经递质浓度增加或抑制单胺氧化酶和儿茶酚胺氧位甲基转移酶,减少 5-HT、NE、DA 神经递质的代谢,间接增加它们的浓度。本实验结果显示,模型组较对照组单胺类神经递质减少,血

浆皮质醇水平提高,甘味颗粒可明显增加单胺类神经递质 5-HT、NE、DA 水平,降低血浆皮质醇水平。

综上所述,甘味颗粒显著缓解了应激小鼠的抑郁行为,其机制可能是通过升高单胺类神经递质 5-HT、NE、DA 水平,降低血浆皮质醇水平而发挥其抗抑郁作用,为后续开发一种疗效确切作用机制较为明确的抗抑郁新药提供实验依据。

参考文献

- [1] 牟来品. 抑郁症中医药治疗的研究进展 [J]. 中医学报, 2013, 28(7): 1062-1064.
- [2] 夏 猛. 中医药治疗抑郁症的研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(8): 1657-1659.
- [3] 裴妙荣, 李慧峰. 一种抗抑郁药物组合物 [P]. 中国: CN104435298A, 2015-03-25.
- [4] Koji N, Kosuke T, Aya K, *et al.* Antidepressant-like effect of *Cordyceps sinensis* in the mouse tail suspension test. [J]. *Bio Pharm Bull*, 2007, 30(9): 1758-1762.
- [5] Yu H L, Deng X Q, Li Y J, *et al.* N-palmitoylethanolamide, an endocannabinoid, exhibits anti-depressant effects in the forced swim test and the tail suspension test in mice [J]. *Pharm Rep*, 2011, 63: 834-839.
- [6] 马宗国, 江 南, 余梦瑶, 等. 抑郁症发病机制及中药治疗研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(6): 548-553.
- [7] 蒋先仲, 李云峰, 张有志, 等. 抑郁症与脑内 CERB 的调节 [J]. 解放军药理学学报. 2007, 23(2): 127-129.
- [8] Steiger A, Holsboer F. Nocturnal secretion of prolactin and cortisol and the sleep EEG in patients with major endogenous depression during an acute episode and after full remission [J]. *Psychiatry Res*, 1997, 72(2): 81-88.
- [9] 刘春林, 阮克锋, 高君伟, 等. 抑郁症的多机制发病 [J]. 生理科学进展, 2013, 44(4): 253-258.