

五味子不同炮制品对小鼠慢性不可预知性应激抑郁的改善作用

荆 然¹, 李慧峰¹, 程艳刚², 裴妙荣^{1*}

1. 山西中医学院, 山西 晋中 030619

2. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 评价五味子不同炮制品对小鼠慢性不可预知性应激抑郁的改善作用。**方法** ICR 小鼠随机分为对照组、模型组、氟西汀组以及生五味子组、酒五味子组、醋五味子组, 每组 10 只。对照组和模型组 ig 蒸馏水, 氟西汀组 ig 盐酸氟西汀分散片 3.3 mg/kg, 生五味子、酒五味子和醋五味子组均 ig 相应药物 1.0 g/kg, 体积为 10 mL/kg, 给药 1 h 后采用 10 种刺激方法建立慢性不可预知性应激模型, 持续 28 d。以敞箱实验、悬尾实验、强迫游泳实验进行行为学观察, 采用酶联免疫法测定血清中 5-HT、多巴胺 (DA)、肾上腺皮质酮 (CORT) 水平, 对实验结果进行综合分析。**结果** 与模型组比较, 生五味子可以增加抑郁小鼠敞箱站立次数 ($P < 0.01$)、敞箱中央格穿越次数 ($P < 0.05$), 降低悬尾、强迫游泳不动时间 ($P < 0.05$); 酒五味子和醋五味子均对抑郁小鼠敞箱站立次数、敞箱中央格穿越次数无影响, 但可降低悬尾不动时间、强迫游泳不动时间 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 生五味子可显著升高抑郁小鼠血清中 5-HT、DA 水平, 降低 CORT 水平 ($P < 0.01$); 酒五味子和醋五味子可显著升高抑郁小鼠血清中 DA 水平, 降低 CORT 水平 ($P < 0.05, 0.01$), 对血清中 5-HT 水平无影响。**结论** 五味子不同炮制品均有一定的抗抑郁作用, 其中生五味子作用较强。

关键词: 五味子; 炮制品; 抑郁; 慢性不可预知性应激; 行为学指标; 血液指标

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2016)11-1698-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2016.11.003

Improvement of *Schisandrae Fructus* processed products on depressive mice induced by chronic unpredictable mild stress

JING Ran¹, LI Hui-feng¹, CHENG Yan-gang², PEI Miao-rong¹

1. Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: **Objective** To evaluate the improvement of *Schisandrae Fructus* processed products on depression of mice induced by chronic unpredictable mild stress. **Methods** ICR mice were randomly divided into control group, model group, fluoxetine group, and *Schisandrae Fructus*, *Schisandrae Fructus* processed with alcohol, and *Schisandrae Fructus* processed with wine groups, and each group had 10 mice. Mice in the control and model groups were ig administered with distilled water. Mice in the fluoxetine group were ig administered with Fluoxetine Hydrochloride Dispersible Tablets 3.3 mg/kg. Mice in the *Schisandrae Fructus* groups were ig administered with *Schisandrae Fructus* 1.0 g/kg with volume of 10 mL/kg. Ten kinds of unpredictable stimulations were adopted to establish the model of chronic unpredictable mild stress after last administration 1 h for 28 d. Behaviors of depressive mice in open field test, tail suspension test, and forced swimming test were observed. The contents of 5-HT, DA, and CORT in serum were determined by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. Results were analyzed by comprehensive analysis method. **Results** Compared with the model group, the open field stand times and open central grid crossing times were increased, but the time of hanging tail and room temperature forced swimming were decreased in the *Schisandrae Fructus* group ($P < 0.05, 0.01$). There were no differences on open field stand times and open central grid crossing times in *Schisandrae Fructus* processed with alcohol and wine groups, but the time of hanging tail and room temperature forced swimming were decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, contents of 5-HT and DA in serum of depressive mice were increased, but the contents of CORT in serum were decreased in the *Schisandrae Fructus* group ($P < 0.01$). The contents of 5-HT in serum of depressive mice were increased, but the contents of CORT in

收稿日期: 2016-07-27

作者简介: 荆 然 (1989—), 女, 山西大同人, 硕士研究生, 研究方向: 中医方剂化学。Tel: 18734867073 E-mail: 1263186269@qq.com

*通信作者 裴妙荣 (1956—), 女, 山西阳曲人, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医方剂化学。Tel: (0351)3179900 E-mail: peimr602@163.com

serum were decreased in the *Schisandrae Fructus* processed with alcohol and wine groups ($P < 0.05, 0.01$), but there had no differences on contents of DA in serum. **Conclusion** *Schisandrae Fructus* processed products have antidepressant effect on depression of mice induced by chronic unpredictable mild stress, and *Schisandrae Fructus* has stronger effect in them.

Key words: *Schisandrae Fructus*; processed product; depression; chronic unpredictable mild stress; behavior indicators; biochemical indicators

五味子为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实, 其味酸、性温, 具有收敛固涩、益气生津、宁心安神等功效, 临床用于治疗咳嗽虚喘、梦遗滑精、久泻不止、自汗盗汗、心悸失眠等症^[1]。常用的五味子为生品、醋制品和酒制品, 现代药理学研究表明, 五味子具有神经保护作用, 能够抑制海马神经凋亡^[2-3], 另外对神经系统具有双向调节作用, 不仅可以镇静催眠, 还可以兴奋中枢神经^[4-5]。抑郁症的“慢性应激学说”表明, 长期处于慢性应激的机体可导致下丘脑-垂体-肾上腺轴功能亢进, 海马萎缩和神经细胞凋亡, 进而导致体内激素、神经递质分泌紊乱^[6]。目前临床常用的抗抑郁药虽然对抑郁症有一定的治疗效果, 但作用范围狭窄, 且副反应较多。近年来, 从植物药中寻找抗抑郁药成为研究热点。本实验以五味子不同炮制品为研究对象, 探讨其对慢性不可预知性应激诱导的抑郁小鼠的改善作用, 为开发一种副作用小且作用稳定的抗抑郁药及扩大五味子的临床应用提供依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 ICR 小鼠 60 只, 雌雄各半, 体质量 18~22 g, 均购自中国食品药品检定研究院, 动物使用许可证号 SCXK (京) 2014-0013。

1.2 仪器

RE52AA 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); FA2104 型分析天平 (万分之一, 上海精科天平厂); ZH-YLS-18 型悬尾测定仪 (安徽正华生物仪器设备有限公司); SHA-C 型振荡仪 (金坛市杰瑞尔电器有限公司); DNM-9602 型酶标分析仪 (北京普朗新技术有限公司); TD6M 型湘立离心机 (湖南湘立科学仪器有限公司)。

1.3 药材和试剂

盐酸氟西汀分散片 (礼来苏州制药有限公司分包装, 规格 20 mg/片, 批号 2012001); 五羟色胺 (5-HT)、多巴胺 (DA)、肾上腺素皮质酮 (CORT) ELISA 试剂盒 (Bio-Swamp 公司, 规格 96T); 五味子购自河北省安国市, 产地辽宁, 批号 20141110,

由山西中医学院中药学院中药鉴定教研室裴香萍副教授鉴定为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实。

2 方法和结果

2.1 炮制品的制备

2.1.1 生五味子 取五味子原药材, 除去果梗和杂质, 即得净五味子。用时捣碎, 作为生五味子。

2.1.2 酒五味子 取净五味子 100 g, 加绍兴黄酒 30 mL, 拌匀后闷润 30 min, 隔水蒸 2 h, 60 °C 烘干 12 h, 用时捣碎, 即得酒五味子。

2.1.3 醋五味子 取净五味子 100 g, 加东湖陈醋 30 mL, 拌匀后闷润 30 min, 隔水蒸 2 h, 60 °C 烘干 12 h, 用时捣碎, 即得醋五味子。

2.2 样品的制备

分别取生五味子、酒五味子、醋五味子粉末 (过 3 号筛) 适量, 用 8 倍量的 90% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1 h, 回收乙醇得浸膏, 60 °C 烘干得干膏。分别取生五味子、酒五味子、醋五味子干膏适量, 精密称定, 用水分散至以生药量计质量浓度为 0.1 g/mL。

2.3 分组和给药

ICR 小鼠随机分为对照组、模型组、氟西汀组以及生五味子组、酒五味子组、醋五味子组, 每组 10 只, 适应性喂养 1 周。对照组和模型组 ig 蒸馏水, 氟西汀组 ig 盐酸氟西汀分散片 3.3 mg/kg, 生五味子、酒五味子和醋五味子组均 ig 相应药物 1.0 g/kg, 体积为 10 mL/kg, 给药 1 h 后造模, 持续 28 d。

盐酸氟西汀分散片的给药剂量依据说明书的临床用量, 五味子不同炮制品给药剂量依据《中国药典》2015 年版中五味子最大给药剂量, 并按小鼠体表面积折算所得。

2.4 造模

对 Katz^[7]的方法加以改进, 并参照文献报道^[8]建立慢性不可预知性应激模型。10 °C 冷水中强迫游泳 5 min、高速摇晃 (2 次/s) 15 min、50 °C 热应激 5 min、鼠笼倾斜 60°、潮湿环境 24 h、禁水 24 h、禁食 24 h、空笼饲养 24 h、孤笼饲养 48 h、昼夜颠倒 10 种刺激方法, 1 种/d, 交替进行, 持续 28 d。

2.5 行为学观察^[9]

实验前禁食不禁水 12 h, 末次给药 1 h 后, 进行行为学观察。

敞箱实验: 敞箱由不透明材料构成, 为底边长 35 cm, 高 20 cm 的正方体, 敞箱底部中央画一 12 cm×12 cm 的正方形, 8:00~12:00 在安静房间内测试, 将小鼠置于敞箱中央, 观察其在 5 min 内的站立次数和中央格穿越次数。彻底清洁箱底后进行下一只小鼠测试。

悬尾实验: 敞箱试验后, 夹小鼠尾尖 1/4 处, 将小鼠悬尾固定于头部距桌面 5 cm 处, 观察其 5 min 内不动时间。

强迫游泳实验: 悬尾实验后, 将小鼠置于直径 13 cm, 高 24 cm, 注有 22 ℃、10 cm 深清水的透明玻璃装置中, 观察其在 6 min 内、后 4 min 的不动时间。

2.6 血液指标测定

行为学观察之后摘眼球取血, 3 000 r/min 离心 20 min, 分离血清, -80 ℃ 冷冻保存, 采用酶联免疫法测定血清中 5-HT、DA、CORT 水平。

2.7 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行处理, 结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较, 方差齐时用单因素方差分析, 多重比较采用 LSD-*t* 检验; 方差不齐时采用 Welch 检验, 多重比较采用 Tamhane's T2 检验。

3 结果

3.1 行为学观察

与模型组比较, 生五味子可以增加抑郁小鼠敞箱站立次数 ($P < 0.01$)、敞箱中央格穿越次数 ($P < 0.05$), 降低悬尾不动时间、强迫游泳不动时间 ($P < 0.05$); 酒五味子和醋五味子均对抑郁小鼠敞箱站立次数、敞箱中央格穿越次数无影响, 但可显著降低悬尾不动时间、强迫游泳不动时间 ($P < 0.05$), 见表 1。

3.2 血液指标比较

与模型组比较, 生五味子可显著升高抑郁小鼠血清中 5-HT、DA 水平, 降低 CORT 水平 ($P < 0.01$); 酒五味子和醋五味子可显著升高抑郁小鼠血清中 DA 水平, 降低 CORT 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 对血清中 5-HT 水平无影响, 见表 2。

表 1 五味子不同炮制品对抑郁小鼠行为学的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effect of *Schisandrae Fructus* processed products on behavior of depressive mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	敞箱站立次数/次	敞箱中央格穿越次数/次	悬尾不动时间/s	强迫游泳不动时间/s
对照	—	23.00±3.024	10.00±3.817	95.75±4.590	122.88±9.403
模型	—	6.13±1.885 ^{##}	4.63±3.159 ^{##}	137.75±14.300 [#]	168.88±15.009 [#]
氟西汀	0.003 3	18.28±2.200 ^{**}	8.13±2.900 [*]	94.00±6.459 [*]	108.50±6.525 [*]
生五味子	1.0	13.88±1.553 ^{**}	8.13±2.642 [*]	88.75±6.018 [*]	90.75±13.403 [*]
酒五味子	1.0	6.50±1.927	4.75±2.121	101.00±7.521 [*]	106.50±6.024 [*]
醋五味子	1.0	6.75±5.036	5.88±1.808	100.13±10.656 [*]	116.88±8.442 [*]

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

表 2 五味子不同炮制品对抑郁小鼠血液指标影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effect of *Schisandrae Fructus* processed products on blood indexes of depressive mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	5-HT/(ng·mL ⁻¹)	DA/(ng·mL ⁻¹)	CORT/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	17.86±0.703	65.21±3.155	18.22±1.299
模型	—	10.77±0.590 ^{##}	51.15±2.225 ^{##}	29.59±1.901 ^{##}
氟西汀	0.003 3	16.74±1.849 ^{**}	77.99±4.554 ^{**}	16.37±2.990 ^{**}
生五味子	1.0	14.35±1.593 ^{**}	68.82±4.865 ^{**}	16.64±1.175 ^{**}
酒五味子	1.0	11.53±0.230	67.94±2.536 ^{**}	11.68±1.158 ^{**}
醋五味子	1.0	10.12±0.519	61.44±2.441 ^{**}	22.10±1.490 [*]

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

3.3 综合分析

参照文献报道对实验结果进行综合分析^[10]。设定行为学指标和血液指标的权重系数均为 0.5。敞箱站立次数、敞箱中央格穿越次数、血清中 5-HT 和 DA 水平为正向指标, 设定疗效率 (V) = $(Y-M) / M \times 100\%$; 悬尾不动时间、强迫游泳不动时间、血清中 CORT 水平若为负向指标, 设定疗效率 (V) =

$(M-Y) / M \times 100\%$ (Y : 给药组指标值, M : 模型组指标值), 见表 3。

以疗效率设立评价等级和等级的权重系数, 见表 4。每个给药组的综合权重评价分值为 P , $P = [\sum (\text{等级个数} \times \text{等级权重系数})] \times A \text{ 指标权重} + [\sum (\text{等级个数} \times \text{等级权重系数})] \times B \text{ 指标权重}$, 结果见表 5。

表 3 五味子不同炮制品对抑郁小鼠的疗效率

Table 3 Therapeutic efficiency of of *Schisandrae Fructus* processed products on depressive mice

组别	行为学指标				血液生化指标		
	敞箱站立次数	敞箱中央格穿越次数	悬尾不动时间	强迫游泳不动时间	5-HT	DA	CORT
生五味子	126.43	75.59	35.57	46.26	33.24	34.55	43.76
酒五味子	6.04	2.59	26.68	36.94	7.06	32.83	60.53
醋五味子	10.11	27.00	27.31	30.79	-6.04	20.12	25.31

表 4 评价等级

Table 4 Levels of evaluation

疗效率	>70%	70%~40%	40%~10%	<10%
评价等级	显著有效	有效	显效	无效
权重系数	0.4	0.3	0.2	0.1

表 5 综合权重评价分值

Table 5 Comprehensive weight evaluation score

组别	行为学指标				血液指标			P 值
	敞箱站立次数	水平穿越次数	悬尾不动时间	强迫游泳不动时间	5-HT	DA	CORT	
生五味子	显著有效	显著有效	显效	有效	显效	显效	有效	2.0
酒五味子	无效	无效	显效	显效	无效	显效	有效	1.2
醋五味子	显效	显效	显效	显效	无效	显效	显效	1.3

根据综合分值 P 的高低, 对评价对象进行分析和评价, 结果综合权重评价分值分别为 >1.19%、1.19%~0.84%、<0.84%, 等级分别为好、中等、一般。结果提示五味子不同炮制品均有一定的抗抑郁作用。

3 讨论

本实验对小鼠进行慢性不可预知性应激, 结果显示与对照组比较, 模型组小鼠敞箱站立次数、敞箱中央格穿越次数降低, 悬尾、强迫游泳时间不动时间升高, 表明小鼠对陌生环境探索兴趣降低, 紧张程度升高, 试图逃离困境和束缚的时间升高, 表现出抑郁行为, 且模型组小鼠血清中 5-HT、DA 水平升高, CORT 水平下降, 表明实验所用造模方法可以成功复制抑郁模型。

脑中单胺类神经递质及其受体能够调节机体的精神活动, 单胺类神经递质分泌减少是抑郁症发病机制之一。另有研究表明, 下丘脑-垂体-外周内分泌腺系统 (HPA 轴) 功能亢进, 可引起外周血糖皮质激素水平升高, 从而引发抑郁症^[11], 临床常用的抗抑郁药可增加神经元细胞突触间神经递质的利用率或降低 HPA 轴兴奋性, 从而治疗抑郁症。单胺类神经递质的释放与中枢神经有关, 且有研究表明, 海马神经元细胞增殖能力直接影响 HPA 轴亢奋或抑制^[12]。本实验结果显示, 五味子不同炮制品可以增加脑内单胺类神经递质的分泌, 降低 HPA 轴兴奋性, 从而不同程度地改善小鼠的抑郁症状, 且有文献报道称五味子对中枢神经系统的调节作用, 对神经细胞的营养作用^[13], 因此本研究也为五味子不同

炮制品抗抑郁作用机制研究提供了参考。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 66-67.
- [2] 谢云亮. 五味子有效成分分离纯化及对记忆障碍模型小鼠学习记忆的影响 [D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [3] 李海涛, 胡 刚. 五味子醇甲抑制 6-羟基多巴胺诱导 PC12 细胞凋亡的研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2004, 20(2): 96-98.
- [4] Ahn T S, Kim D G, Hong N R, *et al.* Effects of *Schisandra chinensis* extract on gastrointestinal motility in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 169(1): 163-169.
- [5] 张林魁, 钮心懿. 五味子醇甲对中枢神经系统单胺类递质的影响 [J]. 中国医学科学院学报, 1991, 13(1): 13-16.
- [6] Duman R S, Malberg J, Nakagawa S, *et al.* Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 299(2): 401-407.
- [7] Katz R J. Aniaml model of depression: Pharmacological sensitivity of a hedonic deficit [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1982, 16(6): 965-968.
- [8] Willner P, Towell A, Sampson D, *et al.* Reduction of sucrose preference by chronic mild stress and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. *Psychopharmacology* (Berl), 1987, 93(3): 358-364.
- [9] 魏 伟, 吴希美, 李元建, 等. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [10] 马瑞娟, 苗明三. 一种中药药效的多指标评价新方法-综合权重法 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(5): 569-572.
- [11] 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.
- [12] 费慧芝, 王 涵, 胡小娅, 等. 帕罗西汀抗抑郁作用涉及改善氧化应激状态、HPA 轴功能和海马源性神经营养因子表达 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2012, 17(10): 1137-1142.
- [13] 姜恩平, 王帅群, 王 卓, 等. 北五味子总木脂素对脑缺血模型大鼠神经细胞凋亡及 p-AKT 表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(9): 1680-1684.