

【 实验研究 】

淡豆豉炮制中 γ -氨基丁酸含量测定及其抗抑郁作用研究

陈青峰^{1, 2*}, 贺婧^{3*}, 谢小梅¹, 王立元¹, 谢卫华¹, 苏明声¹, 罗小泉^{1*}, 龙凯^{1*}

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004
2. 江西省中西医结合医院, 江西 南昌 330003
3. 南昌大学 转化医学研究院, 江西 南昌 330031

摘要: 目的 检测淡豆豉炮制过程中各样本 γ -氨基丁酸(GABA)含量并研究其抗抑郁作用。方法 应用柱前在线衍生-高效液相色谱技术测定原料黑大豆(H)、发酵第6天(F6)、再闷6d(Z6)、再闷15d(Z15)样本水煎液中GABA含量;将昆明种小鼠随机分成对照组、模型组、盐酸氟西汀(阳性对照, 0.01 g/kg)组、GABA(0.012 8 g/kg)组、H(1.52 g/kg)组、F6(1.52 g/kg)组、Z6(1.52 g/kg)组和Z15低、中、高剂量(0.76、1.52、3.04 g/kg)组,采用单笼饲养加慢性温和不可预知性应激(CUMS)制备小鼠抑郁模型,各组在造模同时开始ig给药,每日应激前1h给药,连续28d。检测各组小鼠体质量、糖水偏好、敞箱、悬尾、强迫游泳等行为学指标的变化。结果 H和F6样本水煎液未检出GABA, Z6、Z15样本的GABA质量分数分别为5.559、8.421 mg/g。与对照组比较,模型组小鼠的体质量、糖水偏好、跨格数和直立数均显著减少($P < 0.01$),悬尾及游泳不动时间显著增加($P < 0.05, 0.01$),表明CUMS抑郁模型制备成功。与模型组比较,盐酸氟西汀组、GABA组、Z6组和Z15高剂量组糖水偏爱度、敞箱实验跨格数和直立数均显著增加($P < 0.05, 0.01$),Z15中剂量组糖水偏爱度和敞箱实验直立数显著增加($P < 0.05, 0.01$);盐酸氟西汀组、GABA组、Z6组及Z15高、中剂量组悬尾实验的不动时间均显著减少($P < 0.05, 0.01$);各组小鼠强迫游泳实验的不动时间均显著缩短($P < 0.05, 0.01$)。结论 发现淡豆豉炮制后期出现高含量GABA;淡豆豉显著改善小鼠的快感缺失、行为绝望等抑郁症状,具有良好的抗抑郁作用并与GABA含量可能有关。

关键词: 淡豆豉;“再闷”; γ -氨基丁酸;慢性温和不可预知性应激;抗抑郁作用;行为学指标

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2021) 04-0688-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.04.002

Determination of content of γ - aminobutyric acid and its antidepressant effect at different time points during processing of *Sojae Semen Praeparatum*

CHEN Qingfeng^{1, 2}, HE Jing³, XIE Xiaomei¹, WANG Liyuan¹, XIE Weihua¹, SU Mingsheng¹, LUO Xiaoquan¹, LONG Kai¹

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China
2. Jiangxi Provincial Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanchang 330003, China
3. Institute of Translational Medicine, Nanchang University, Nanchang 330031, China

Abstract: Objective To study the content of γ - aminobutyric acid (GABA) and its antidepressant effect of each sample at different time points during the processing of *Sojae Semen Praeparatum* (SSP). **Methods** The GABA content in the decoction of raw black soybean (H), fermentation day 6 (F6), "secondary fermentation" for 6 days (Z6) and 15 days (Z15) was determined by pre-column on-line high performance liquid chromatography (HPLC). KM mice were randomly divided into control group, model group, fluoxetine hydrochloride (positive control, 0.01 g/kg) group, GABA (0.012 8 g/kg) group, H (1.52 g/kg) group, F6 (1.52 g/kg) group,

收稿日期: 2020-07-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81660664);江西省重点研发计划一般项目(20192BBGL70051);江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ190636、GJJ180655、GJJ170719)

#共同第一作者: 陈青峰, 药师, 从事药学研究。E-mail: 1397608735@qq.com

贺婧, 讲师, 主要从事微生物学研究。E-mail: 876401812@qq.com

*通信作者: 龙凯, 高级实验师, 从事中药学研究。E-mail: longkai2006@163.com

罗小泉, 教授, 从事实验动物学教学及动物模型研制。E-mail: lxqj1@126.com

Z6 group (1.52 g/kg) and Z15 low, high, medium and doses (0.76, 1.52 and 3.04 g/kg). The mouse depression model was prepared by single cage feeding plus chronic mild unpredictable stress, each at the same time in the building began to give drugs. The drug was given 1 h before daily stress for 28 consecutive days. The body weight, sugar water preference and open box of each group were detected. Changes in behavioral indicators such as hangovers and forced swimming were detected. **Results** GABA content in each sample decoction: H and F6 were not detected, and the content of Z6 and Z15 were 5.559, 8.421 mg/g. Antidepressant effects of each sample: Compared with control group, the weight, syrup preference, cross-grid number and erect number of model group were significantly decreased ($P < 0.01$), and the time of suspension and swimming was significant. An increase ($P < 0.05$ or 0.01) indicates that the CUMS depression model was successfully constructed. Compared with model group, the preference for sugar water, the cross-cell number and the upright number of open box experiment in metformin hydrochloride group, GABA group, Z6 group and Z15 high-dose group were significantly increased ($P < 0.05$ or 0.01), and the preference for sugar water and the upright number of open box experiment in Z15 medium-dose group were significantly increased ($P < 0.05$ or 0.01). The immovable time of tail suspension test in metformin hydrochloride group, GABA group, Z6 group and Z15 high-dose and medium-dose groups were significantly decreased ($P < 0.05$ or 0.01). The immobility time of forced swimming test was significantly shortened in all groups ($P < 0.05$ or 0.01). **Conclusion** It was found that there was high content of GABA in the later stage of processing of *Sojæ Semen Praeparatum*, *Sojæ Semen Praeparatum* significantly improved the depression symptoms of mice, such as lack of pleasure and behavior despair, which had good antidepressant effect and might be related to the content of GABA.

Key words: *Sojæ Semen Praeparatum*; "secondary fermentation"; γ -aminobutyric acid; chronic unpredictable mild stress; antidepressant effects; behavioral indicators

淡豆豉 *Sojæ Semen Praeparatum* 以黑色种皮品系大豆为主要原料、桑叶和青蒿为辅料经发酵炮制加工而成。历代本草和历版《中国药典》记载并列入卫生部首批药食两用名单。淡豆豉既有食物的营养价值还有中药的功效,功能与主治为解表、除烦、宣发郁热,用于感冒、寒热头痛、烦躁胸闷、虚烦不眠^[1]。

本课题组前期首次发现淡豆豉中存在较高含量 γ -氨基丁酸(GABA)^[2],并已筛选鉴定出产 GABA 的优势微生物^[3],GABA 是一种非蛋白质组成天然氨基酸,是哺乳动物中枢神经系统首要抑制性神经递质,具有镇静、抗焦虑、增强记忆及改善睡眠的作用,对抑郁、失眠、自主神经失调等疾病有明显改善作用^[4-6],与淡豆豉传统功效“除烦”、主治“烦躁胸闷,虚烦不眠”相吻合,推测淡豆豉可能有抗抑郁作用。慢性温和和不可预知性应激(CUMS)模型是经典的抑郁模型,本实验应用 CUMS 模型研究淡豆豉炮制过程中不同时间点各样本 GABA 含量及其抗抑郁作用。研究结果将为药食两用淡豆豉开发成安全有效、价格低廉的天然抗抑郁药提供科学依据,并对揭示淡豆豉传统功效“除烦”的科学涵义、规范淡豆豉炮制工艺等有重要意义。

1 材料

1.1 药材及主要试剂

黑大豆、桑叶、青蒿均购自安国冷背药材有限公司,由江西中医药大学附属医院杨安金主任中药师鉴定,分别为豆科大豆属植物大豆 *Glycine max*

(L.) Merr. 的成熟种子,桑科桑属植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶,菊科蒿属植物黄花蒿 *Artemisia annua* Linn. 的干燥地上部分。淡豆豉,按本实验室建立的规范炮制工艺制备^[7],储藏 4 °C 冰箱;GABA,批号 11509001,质量分数 99%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;盐酸氟西汀胶囊,礼来苏州制药有限公司,批号 6621A。

1.2 实验动物

清洁级 KM 小鼠 100 只,体质量(20±2) g,雌雄各半,由江西中医药大学动物中心提供,实验动物生产许可证号 SCXK(赣)2018-0003。适应性饲养 1 周,温度(25±1)°C,光照时间 7:00—19:00,环境湿度 40%~70%,期间自由摄食和饮水。

1.3 主要仪器

MILLI-Q 超纯水仪,美国 Millipore 公司;安捷伦 1260 高效液相色谱仪,安捷伦公司;超声波清洗器,上海科导超声仪器有限公司;V-1001 旋转蒸发器,上海爱朗仪器有限公司;BS124S 电子天平,北京赛多利斯科学仪器有限公司;20 cm×20 cm×30 cm 自制悬尾箱;36 cm×45 cm×30 cm 自制敞箱。

2 方法

2.1 淡豆豉的炮制和取样

本课题组前期按《中国药典》2015 年版建立了规范的淡豆豉炮制工艺^[7](历版《中国药典》记载的淡豆豉制法相同,含 2020 年版)。炮制过程简述如下:取桑叶 90 g、青蒿 100 g,分次加入 10、8 倍生药量的水煎煮 1 h,滤过,合并滤液并浓缩至 1 000 mL,

煎液拌入净黑大豆1000g中,待吸尽后,隔水蒸1.5h,取出,稍晾,置容器内,用煎过的桑叶、青蒿渣覆盖,置温度(30±2)°C、湿度70%的培养箱内发酵6d至豆粒表面均匀布满黄衣(称“黄衣上遍”,此过程在发酵第6天时取样,记为F6)。洗去黄衣,装入陶瓷容器中,置温度为(30±2)°C的培养箱再闷15d(称“再闷”,此过程在再闷第6、15天取样,记为Z6、Z15),至充分发酵,香气溢出时取出,略蒸,干燥,即为淡豆豉成品。成品性状和各项理化指标均符合《中国药典》2015年版要求,各样本置于4°C保存。

2.2 各给药组的药物制备

盐酸氟西汀(阳性对照)组:取盐酸氟西汀胶囊(20mg)加入20mL蒸馏水制成1mg/mL的混悬液;GABA组:精密称取12.8mg GABA,用10mL蒸馏水溶解配成质量浓度为1.28mg/mL的GABA溶液。

淡豆豉炮制过程中不同时间点各组样本:①黑大豆(H)、F6及Z6组,分别精密称取各样本15.2g,加入500mL蒸馏水,浸泡1h后煎煮3次,滤过合并3次滤液,于旋转蒸发器中浓缩至100mL得0.152g/mL的样品溶液。②Z15中剂量组:精密称取Z15的样本30.4g,加水煎煮3次,合并滤液,浓缩至200mL;Z15高剂量组:取Z15中剂量组样品100mL,浓缩至50mL即得;Z15低剂量组:取50mL Z15中剂量样品,用蒸馏水稀释至100mL即得。

2.3 各组样本中GABA的含量测定

将各组样品水煎煮液稀释至适宜浓度,本课题组已建立淡豆豉中GABA定量检测的柱前在线衍生-高效液相色谱法^[2],用该法对淡豆豉炮制过程中不同时间点样本的GABA含量进行检测。

2.4 分组与给药

小鼠适应性饲养1周后随机分组,将100只小鼠随机分成对照组、模型组、盐酸氟西汀(阳性对照,0.01g/kg)组、GABA(0.0128g/kg)组、H(1.52g/kg)组、F6(1.52g/kg)组、Z6(1.52g/kg)组和Z15低、中、高剂量(0.76、1.52、3.04g/kg)组,每组10只,雌雄各半。1.52g/kg相当于淡豆豉的成人60kg临床用量每天10g,ig给药,给药体积10mL/kg。模型组和对照组ig给予等体积双蒸水。各组在造模同时开始给药,每日应激前1h给药,连续28d。

2.5 CUMS模型的制备^[10-12]

除对照组外,其他组均采用单笼饲养给予以下慢性应激刺激:禁食24h、禁水24h、潮湿垫料、夹尾

1min(以小鼠发出哀鸣声为宜)、45°C热水刺激3min、斜笼24h、4°C冷水刺激3min、震荡2min、通宵照明24h共9种刺激,每天随机选取1种应激,持续应激28d,使小鼠无法预知将要给予的应激。

2.6 小鼠行为学指标的测试^[10-12]

2.6.1 体质量 应激前及应激第7、14、21、28天分别测定各组小鼠体质量。

2.6.2 糖水偏好实验 应激第1、28天进行糖水偏好实验,蔗糖饮水实验是根据动物对甜味的偏好而设计的一种检测方法,当小鼠出现抑郁样行为时,其对糖水的嗜度降低。操作简述如下:在进行糖水偏好实验前训练小鼠使其习惯对糖水的饮用,训练完成后各组小鼠均禁食禁水24h后进行2h的糖水偏好实验。每笼同时放置事先称好质量的一瓶1%蔗糖水溶液和1瓶蒸馏水,1h后位置互换,2h后同时取下所有瓶子称质量,计算蔗糖溶液和蒸馏水的消耗量。

糖水偏爱度=1%蔗糖溶液消耗量/(1%蔗糖溶液消耗量+蒸馏水消耗量)

2.6.3 敞箱实验 应激前及应激第28天进行敞箱实验,用来评价实验动物在陌生环境中自主行为、探究行为与紧张度。制作1个36cm×45cm×30cm的敞箱,敞箱四周涂黑,箱底用记号笔划分为4×5个边长为9cm方格。实验开始时先将小鼠放入箱中适应1min,再将其置于方格中央并记录3min内的行为:水平穿越格子数(3支爪及以上进入同一格中)、竖直次数(两前足离地后到放下计为1次)。

2.6.4 悬尾实验 造模结束后进行悬尾实验,悬尾后拼命挣扎企图逃脱但又无法成功逃脱,从而放弃挣扎并因此进入特有的“抑郁不动状态”,反映了一种“行为绝望状态”。将小鼠用胶带在尾部2cm处固定于铁架台的试管夹上,使小鼠成倒置状态,小鼠身体置于20cm×20cm×30cm的自制悬尾箱中,头部离悬尾箱底30cm。实验时使小鼠倒挂适应2min,适应后记录4min内的累计不动时间。不动标准:小鼠倒挂静止不动放弃挣扎。

2.6.5 强迫游泳实验 造模结束后进行强迫游泳实验,动物被迫放在局限且不可逃避的游泳环境中,其将拼命游动试图逃脱,随之感到逃脱无望,便不再挣扎和游动,此状态称为“行为绝望”。将小鼠放入高30cm,直径20cm,水深10cm的玻璃缸中,水温25°C。小鼠先适应2min,适应后记录4min内的累计不动时间。不动标准:小鼠在水中保持漂浮不挣扎的状态。

2.7 统计分析

使用统计学软件SPSS 21.0进行分析和统计处理。利用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行组间比较,当方差齐时选用LSD法,方差不齐时选用Tamhane's T2(M)法。

3 结果

3.1 淡豆豉炮制过程中不同时间点样本的GABA含量检测

如图1所示,H、F6样本不含GABA,Z6、Z15的GABA含量分别为5.559、8.421 mg/g。GABA组的用药剂量相当于Z15中剂量对应的GABA含量。

3.2 体质量指标

如表1所示,应激前各组小鼠体质量无差异。与对照组比较,模型组小鼠体质量在应激第7、14、21、28天均极显著降低($P < 0.01$),表明CUMS抑郁小鼠的体质量增加缓慢。与模型组比较,盐酸氟西汀组、GABA组、Z6组在应激第7、14、21、28天体质量显著增加($P < 0.05$),Z15高剂量组在应激第21、28天体质量显著增加($P < 0.05$),Z15中剂量组在应激第14、21、28天显著增加($P < 0.05$),H组、F6组及Z15低剂量组在应激第7、14、21、28天均无差异。表明Z6和Z15高、中剂量能显著改善CUMS抑郁小鼠的体质量增加缓慢的状态。

3.3 糖水偏好指标

各组糖水偏爱度见表2,各组在应激前均无差异。应激结束后各组小鼠出现不同程度差异,与对照组比较,模型组对糖水偏爱度极显著降低($P < 0.01$),表明CUMS模型小鼠的糖水

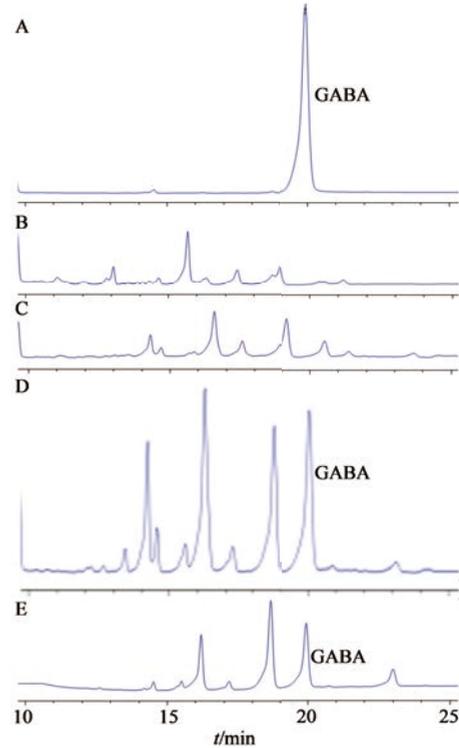


图1 GABA标准品(A)、H(B)、F6(C)、Z6(D)、Z15(E) 样本高效液相色谱图

Fig. 1 High-performance liquid chromatogram of GABA (A), H(B), F6 (C), Z6 (D) and Z15 (E) each sample

消耗降低、快感缺失明显。与模型组比较,盐酸氟西汀组、GABA组、Z6组糖水偏爱度均极显著增加($P < 0.01$);Z15高、中剂量组的糖水偏爱度均显著增加($P < 0.05$);H组、F6、Z15低剂量组均无显著差异。结果表明,Z6组和Z15高、中剂量组能显著改善CUMS抑郁小鼠的糖

表1 各组小鼠的体质量变化($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Comparison of weight results of different group mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g				
		造模0 d	造模第7天	造模第14天	造模第21天	造模第28天
对照	—	23.82±1.93	30.10±3.56	34.06±4.87	35.91±5.18	37.37±5.16
模型	—	23.88±1.72	26.33±2.83 ^{##}	28.51±3.59 ^{##}	30.75±3.46 ^{##}	29.62±2.28 ^{##}
盐酸氟西汀	0.01	23.83±2.22	29.48±2.19 [*]	32.95±3.30 ^{**}	34.87±3.98 [*]	33.49±3.59 [*]
GABA	0.012 8	23.92±1.46	29.26±1.73 [*]	32.44±2.25 [*]	35.08±3.14 [*]	33.50±2.13 [*]
H	1.52	23.58±1.93	28.38±2.42	31.20±3.12	32.77±2.50	31.87±2.91
F6	1.52	23.83±1.85	27.87±2.66	30.51±3.29	32.74±3.69	31.73±3.43
Z6	1.52	23.96±1.92	29.10±3.14 [*]	32.25±3.47 [*]	34.68±3.72 [*]	32.93±2.91 [*]
Z15	3.04	24.00±1.80	28.07±3.64	31.63±4.11	34.49±4.43 [*]	32.93±5.18 [*]
	1.52	23.64±1.70	28.68±3.65	31.97±3.95 [*]	34.88±4.34 [*]	33.26±3.69 [*]
	0.76	24.08±1.77	29.06±3.67	31.58±4.17	34.36±4.61	32.85±3.99

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

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

表2 各组小鼠糖水偏爱度变化($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 2 Changes in sugar and water preferences of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	糖水偏爱度	
		第1天	第28天
对照	—	0.47±0.09	0.54±0.05
模型	—	0.48±0.04	0.40±0.04 [#]
盐酸氟西汀	0.01	0.47±0.09	0.52±0.07 ^{**}
GABA	0.012 8	0.53±0.05	0.51±0.08 ^{**}
H	1.52	0.48±0.06	0.43±0.07
F6	1.52	0.51±0.06	0.44±0.05
Z6	1.52	0.47±0.04	0.51±0.06 ^{**△}
Z15	3.04	0.45±0.06	0.46±0.04 [*]
	1.52	0.46±0.08	0.47±0.06 [*]
	0.76	0.48±0.04	0.43±0.08

与对照组比较:[#] $P < 0.01$;与模型组比较:^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$;
与F6组比较:[△] $P < 0.05$

[#] $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group;
[△] $P < 0.05$ vs F6 group

水消耗降低和快感缺失现象。与F6组比较,Z6组的糖水偏爱度显著增加($P < 0.05$),Z15高、中、低剂量均无差异。

3.4 敞箱实验

应激前各组之间均无差异,应激结束后各组小鼠出现不同程度差异。与对照组比较,模型组小鼠的跨格数、直立数均极显著减少($P < 0.01$),表明CUMS模型小鼠对新环境的好奇探究程度降低,自发活动减弱,紧张度增加。与模型组比较,盐酸氟

西汀组和GABA组跨格数和直立数,Z15中、高剂量组和Z6组跨格数均极显著增加($P < 0.01$);Z15高剂量组的直立数显著增加($P < 0.05$),Z15中剂量组和Z6组直立数无显著差异;H组、F6组、Z15低剂量组跨格数、直立数均无显著差异。结果表明,Z6组和Z15高、中剂量组明显改善CUMS抑郁小鼠的自主活动、对新环境的探究和紧张度。与F6组比较,Z15高剂量组在应激28 d后跨格数显著增加($P < 0.05$),Z6组、Z15中、低剂量组均无差异;Z6组、Z15高、中、低剂量组应激28 d后直立数均无差异。各组小鼠敞箱实验结果见表3。

3.5 悬尾、强迫游泳实验

各组小鼠悬尾、强迫游泳实验的累计不动时间结果见表4。与对照组比较,模型组的悬尾、强迫游泳后4 min不动时间均显著增加($P < 0.05, 0.01$),表明CUMS抑郁小鼠行为绝望程度增加。与模型组比较,盐酸氟西汀组、GABA组的悬尾、强迫游泳不动时间均极显著减少($P < 0.01$),表明阳性药、GABA能显著改善CUMS抑郁小鼠的行为绝望程度。

悬尾实验中,与模型组比较,Z15高、中剂量组不动时间极显著减少($P < 0.01$)、Z6组显著减少($P < 0.05$);H组、F6组及Z15低剂量组均无显著差异,表明悬尾实验中,Z6和Z15高、中剂量组对CUMS抑郁小鼠的行为绝望程度有明显的改善作用。与F6组比较,Z15高剂量组悬尾累计不动时间显著减少($P < 0.05$),Z6组和Z15中、低剂量组均无显著差

表3 各组小鼠的敞箱行为变化($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 3 Open-field test results of different group mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	跨格数		直立数	
		第0天	第28天	第0天	第28天
对照	—	78.90±15.27	88.80±8.93	14.70±7.10	21.00±9.49
模型	—	88.00±17.03	67.30±13.44 [#]	20.20±5.45	10.90±3.72 [#]
盐酸氟西汀	0.01	86.60±14.78	92.30±12.72 ^{**}	20.20±6.25	22.70±7.51 ^{**}
GABA	0.012 8	75.70±18.31	85.90±12.56 ^{**}	17.50±7.53	21.00±6.88 ^{**}
H	1.52	79.00±11.93	75.89±10.89	18.55±7.80	18.50±8.59
F6	1.52	79.30±20.14	75.20±12.79	15.50±4.84	16.80±8.52
Z6	1.52	83.60±16.91	84.00±10.61 ^{**}	19.30±7.26	17.30±11.75
	1.52	85.37±18.84	87.22±14.68 ^{**△}	15.50±6.22	18.55±7.89 [*]
	1.52	76.56±15.75	84.56±9.02 ^{**}	15.50±8.41	16.56±7.48
Z15	0.76	80.63±11.79	73.87±12.82	16.12±7.49	14.87±5.72

与对照组比较:[#] $P < 0.01$;与模型组比较:^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$;与F6组比较:[△] $P < 0.05$

[#] $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs F6 group

表4 各组小鼠悬尾及强迫游泳不动时间的变化($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 4 Change of tail suspension and forced swimming time of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	悬尾后4 min不 动时间/s	游泳后4 min不 动时间/s
对照	—	94.81±8.28	146.00±31.51
模型	—	123.17±17.25 [#]	181.50±19.23 ^{##}
盐酸氟西汀	0.01	83.01±16.57 ^{**}	112.69±24.59 ^{**}
GABA	0.012 8	84.28±14.15 ^{**}	105.66±20.69 ^{**}
H	1.52	116.07±26.72	152.52±20.55 ^{**}
F6	1.52	119.49±23.01	160.21±17.76 [*]
Z6	1.52	91.33±15.94 [*]	135.08±18.65 ^{**△}
Z15	3.04	85.71±9.65 ^{**△}	119.80±10.31 ^{**△△}
	1.52	86.45±13.91 ^{**}	133.95±18.35 ^{**△△}
	0.76	92.10±15.91	126.99±26.53 ^{**△△}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与F6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; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs F6 group

异,表明“再闷”后较“再闷”前对抑郁小鼠的行为绝望程度改善作用更强。

强迫游泳实验中,与模型组比较,H、Z6、Z15高、中、低剂量组不动时间均极显著减少($P < 0.01$),F6组显著减少($P < 0.05$),表明强迫游泳实验中各给药组对CUMS抑郁小鼠的行为绝望程度均有改善作用。与F6组比较,Z6组、Z15高、中、低剂量组的强迫游泳不动时间均显著减少($P < 0.01$),表明“再闷”后较“再闷”前对抑郁小鼠的行为绝望程度改善作用更强。

4 讨论

目前对淡豆豉的研究主要集中在活性成分、炮制工艺优化、质量评价、药理作用等。药理研究表明淡豆豉具有抗肿瘤、心血管保护、防治骨质疏松、抗糖尿病等作用,大豆异黄酮类是其主要活性成分和质量评价指标^[8-10]。迄今未见淡豆豉的抗抑郁作用研究报道。

淡豆豉制作历史悠久,历代本草和历版《中国药典》记载的制法中均经过“黄衣上遍”和“再闷”两个主要环节。本研究应用本实验室建立的柱前在线衍生-高效液相色谱技术^[2]检测了淡豆豉炮制过程中各样本的GABA含量,发现黑大豆、发酵6 d的样本中不含GABA,进入“再闷”阶段GABA含量迅速增加(再闷6 d、再闷15 d的GABA含量分别为5.559、8.421 mg/g)。再次证明了《中国药典》记载淡

豆豉炮制中“再闷”的重要意义和“再闷”15~20 d的合理性。

抑郁症是一种以显著而持久的情绪低落为主要特征的心理疾病,严重影响全球约3.5亿人的健康和生活,目前仍缺乏有效治疗手段。CUMS是目前应用和研究最多的抑郁模型,采用单笼饲养加多种慢性、温和、不可预知性刺激,通过对新环境的探究、自主活动、紧张度、行为绝望程度等多种行为学指标的变化来评价其模型的可信度,该模型与临床抑郁症有高度相似性,可以引起一系列与抑郁症患者相似的行为和神经系统改变,是目前公认的经典抑郁模型之一^[11-13]。

本实验应用CUMS小鼠抑郁模型首次研究淡豆豉的抗抑郁作用,研究表明,小鼠给予28 d不可预见性刺激后,与对照组比较,模型组小鼠体质质量降低、对新奇事物的兴趣和探究降低、行为绝望程度显著增加,表明CUMS模型复制成功。对CUMS抑郁小鼠给予不同样本或不同剂量ig处理后,Z6和高、中剂量Z15等GABA含量高的样品对CUMS模型小鼠的抑郁行为有显著改善作用,而H和F6等不含GABA的样本或GABA含量低的样本低剂量Z15对CUMS模型小鼠的抑郁行为无改善作用。

本研究初步推测淡豆豉的抗抑郁作用与GABA含量可能有关。由于淡豆豉的化学成分比较复杂,淡豆豉抗抑郁作用的物质基础及作用机制将在后续研究中进一步探索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2020:342-343. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020: 342-343.
- [2] 任佳秀,黄越燕,梁永红,等.应用柱前在线衍生-高效液相色谱技术测定淡豆豉中 γ -氨基丁酸含量[J].中华中医药杂志,2018,33(9):3900-3904. Ren J X, Huang Y Y, Liang Y H, et al. First discovery of high γ -aminobutyric acid in fermented soybean by pre-column online derivatization-HPLC [J]. CJTCMP, 2018, 33(9): 3900-3904.
- [3] 熊京京,任佳秀,周姝含,等.淡豆豉炮制过程中产 γ -氨基丁酸微生物的筛选和鉴定[J].中国中药杂志,2019,44(11):2266-2273. Xiong J J, Ren J X, Zhou S H, et al. Screening and identification of GABA-producing microbes in fermentation process of *Sojae Semen Praeparatum* [J].

- China J Chin Mater Med, 2019, 44(11): 2266-2273.
- [4] Kim N H, Kim K Y, Jeong H J, et al. Antidepressant-like effect of altered Korean red ginseng in mice [J]. Behav Med, 2011, 37(2): 42-46.
- [5] Daglia M, Di Lorenzo A, Nabavi S F, et al. Improvement of antioxidant defences and mood status by oral GABA tea administration in a mouse model of post-stroke depression [J]. Nutrients, 2017, 9(5): 1-20.
- [6] Mabunga D F, Gonzales E L, Kim H J, et al. Treatment of GABA from fermented rice germ ameliorates caffeine induced sleep disturbance in mice [J]. Biomol Ther, 2015, 23(3): 268-274.
- [7] 李刚, 梁永红, 龙凯, 等. 再闷过程影响淡豆豉炮制工艺研究 [J]. 中草药, 2014, 45(8): 1083-1088.
- LI G, Liang Y H, Long K, et al. Effect of secondary fermentation on processing technology for fermented soybeans [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2014, 45(8): 1083-1088.
- [8] 冯薇, 刘敏彦, 李琛, 等. 淡豆豉化学成分及其体外促成骨细胞增殖活性研究 [J]. 中国药学杂志, 2016, 51(3): 203-206.
- Feng W, Liu M Y, Li C, et al. Chemical constituents of *Semen Sojae Praeparatum* and their proliferation activity on rat osteoblasts [J]. Chin Pharm J, 2016, 51(3): 203-206.
- [9] 柴川, 崔小兵, 戴贞丽, 等. 淡豆豉炮制前后异黄酮成分的测定及炮制工艺的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(12): 72-76.
- Chai C, Cui X B, Dai Z L, et al. Content determination of isoflavones in *Sojae Semen Praeparatum* and the optimization of the fermentation process [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2014, 20(12): 72-76.
- [10] 陈青峰, 任佳秀, 周姝含, 等. 淡豆豉炮制中影响 γ -氨基丁酸富集的主次因素初步分析 [J]. 中草药, 2019, 50(11): 2583-2588.
- Chen Q F, Ren J X, Zhou S H, et al. Preliminary analysis of primary and secondary factors of γ -aminobutyric acid enrichment in fermentation process of *Sojae Semen Praeparatum* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(11): 2583-2588.
- [11] 薛涛, 邬丽莎, 刘新民, 等. 抑郁症动物模型及评价方法研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(3): 321-326.
- Xue T, Wu L S, Liu X M, et al. Research progress on animal models of depression and their evaluation methods [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2015, 23(3): 321-326.
- [12] 关宇鹏, 王帅, 孟宪生, 等. 大鼠抑郁模型的建立及其综合评价研究 [J]. 亚太传统医药, 2015, 11(9): 3-5.
- Guan Y P, Wang S, Meng X S, et al. Establishment of a rat model of depression and comprehensive evaluation [J]. Asia Pacif Tradit Med, 2015, 11(9): 3-5.
- [13] 郑兴宇, 高晓霞, 刘晓节, 等. 基于代谢组学技术应激抑郁动物模型的评价 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 175-179.
- Zheng X Y, Gao X X, Liu X J, et al. Evaluation on stress animal models of depression based on metabonomics [J]. Drug Eval Res, 2010, 33(3): 175-179.

[责任编辑 兰新新]