

基于斑马鱼模型不同提取方法人源胎盘冻干粉抗抑郁活性及作用机制研究

任季禹¹, 高代丽^{2, 4}, 辛秀秀¹, 张姗姗^{2, 4}, 杨 凯³, 刘可春^{2, 4}, 臧传宝¹, 靳 梦^{2, 4*}

1. 银丰低温医学科技有限公司, 山东 济南 250000

2. 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物研究所, 山东 济南 250103

3. 聊城市食品药品检验检测中心, 山东 聊城 252001

4. 山东省人类疾病斑马鱼模型与药物筛选工程技术研究中心, 山东 济南 250103

摘 要: 目的 明确人源胎盘冻干粉是否具有抗利血平诱发斑马鱼抑郁症的活性, 比较不同提取方法胎盘冻干粉抗抑郁活性并探索其作用机制。方法 将6月龄野生型斑马鱼AB随机分为8组: 对照组、模型组、丁螺环酮(阳性药, 3 mg·L⁻¹)组和胎盘冻干粉酶解、水提、50%醇提、醇提、二氯甲烷提(均为5 mg·L⁻¹)组, 每组12条。除对照组外, 各组以利血平处理20 min造模, 而后更换相应含药养鱼用水, 至14 d, 每天换水。14 d时用Zebrafish斑马鱼行为分析仪对各组斑马鱼进行新型水槽测试, 分析其行为变化。收集鱼脑, 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测抑郁、神经调控相关基因(*bdnf*、*pomc*、*hcrt*、*mao*、*nf-κb*、*ppary*)的mRNA表达; 试剂盒法检测氧化应激相关超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性。结果 与对照组比较, 模型组斑马鱼进入新型水槽上部次数显著减少($P < 0.001$), 上部游动距离及时间比例均显著减少($P < 0.001$); 与模型组比较, 丁螺环酮、胎盘冻干粉酶解组斑马鱼进入上部次数显著增加($P < 0.05$), 上部游动距离及时间比例均显著增加($P < 0.05$)。与对照组比较, 模型组中的*bdnf*、*pomc*、*hcrt*和*mao*基因表达显著上调($P < 0.01$ 、 0.001), *nf-κb*和*ppary*基因表达显著下调($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, 经不同提取方法胎盘冻干粉处理后*bdnf*、*pomc*和*mao*基因表达显著下调($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 酶解、水提、醇提组*hcrt* mRNA水平显著降低($P < 0.05$ 、 0.001), 酶解、水提组*nf-κb* mRNA水平和酶解组*ppary* mRNA水平显著上调($P < 0.01$)。与对照组比较, 模型组CAT活性显著升高($P < 0.001$), SOD活性升高, 但没有统计学意义; 与模型组比较, 经不同提取方法胎盘冻干粉处理后CAT活性显著降低($P < 0.001$), SOD活性有不同程度的降低。结论 人源胎盘冻干粉具有抗利血平诱发斑马鱼抑郁症的活性, 且胎盘冻干粉酶解抗抑郁活性最好, 作用机制可能与改善氧化应激状态有关。

关键词: 胎盘冻干粉; 提取方法; 斑马鱼; 抑郁症; 氧化应激

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)01-0116-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.01.016

Comparison of anti-depressant activity and mechanism investigation among human placenta freeze-dried powder extracted by different methods by zebrafish model

REN Jiyu¹, GAO Daili^{2, 4}, XIN Xiuxiu¹, ZHANG Shanshan^{2, 4}, YANG Kai³, LIU Kechun^{2, 4}, ZANG Chuanbao¹, JIN Meng^{2, 4}

1. Yinfeng Low Temperature Medical Technology Co., Ltd., Jinan 250000, China

2. Institute of Biology, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China

3. Food and Drug Inspection and Testing Center of Liaocheng, Liaocheng 252001, China

4. Zebrafish Model of Human Diseases and Drug Screening Engineering Technology Research Center of Shandong Province, Jinan 250103, China

Abstract: **Objective** To determine whether human placenta freeze-dried powder has the activity of anti-depressant in zebrafish depression model induced by reserpine, as well as compare the anti-depressant activity of dried human placenta extracted by different methods and explore the underlying mechanism. **Methods** The 6-month-old wild-type zebrafish AB were divided into eight

收稿日期: 2022-07-13

基金项目: 济南市“新高校20条”项目(2021GXRC106、2021GXRC111); 山东省重大科技创新工程(2021CXGC010507)

第一作者: 任季禹(1985—), 男, 本科, 中级工程师, 主要从事冻干技术产品和服务的开发及应用。E-mail: renjiyu@yinfeng.com.cn

*共同通信作者: 靳 梦(1985—), 女, 博士, 研究员, 主要从事抗神经系统疾病活性物质的发现和作用机制研究。E-mail: mjin1985@hotmail.com

臧传宝(1984—), 男, 硕士, 高级工程师, 主要从事组织工程材料的开发和干细胞研究。E-mail: chuanbaozang@163.com

groups including blank control group, model group, buspirone (positive control, $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) group, dried human placenta enzymatic hydrolysate, water extract, alcohol extract, 50% alcohol water extract and dichloroethane extract ($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) group, with 12 fish in each group. Among them, the model group was treated with reserpine for 20 min, and the other groups were subsequently treated with samples for 14 days. The medium was changed every day. After 14 days treatment, the novel tank assay was conducted in adult zebrafish to analyze the behavior changes of each group. The zebrafish brains were collected after behavior assays, which were used to test the expression of depression and neuromodulation related genes (*bdnf*, *pomc*, *hcrt*, *mao*, *nf-kb*, *ppary*) by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) method. In addition, the activities of anti-oxidative enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were detected by kits. **Results** Compared with control group, the number of zebrafish entering the upper part of the new tank was significantly reduced ($P < 0.001$), and the proportion of swimming distance and time in the upper part was significantly decreased ($P < 0.001$) in model group. Compared with model group, the number of zebrafish entering the upper part in buspiroone and placenta lyophilized powder enzymolysis groups was significantly increased ($P < 0.05$), and the proportion of upper swimming distance and time was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with control group, *bdnf*, *pomc*, *hcrt* and *mao* gene expressions were significantly up-regulated ($P < 0.01$, 0.001), while *nf-kb* and *ppary* gene expressions were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01) in model group. Compared with model group, the expressions of *bdnf*, *pomc* and *mao* genes were significantly down-regulated ($P < 0.05$, 0.01 , 0.001) after human placenta freeze-dried powder treatment with different extraction methods, and *hcrt* mRNA levels were significantly decreased in hydrolysate, water extract and alcohol extract groups ($P < 0.05$, 0.001). The mRNA levels of *nf-kb* and *ppary* of hydrolysate and water extract were significantly up-regulated ($P < 0.01$). Compared with the control group, CAT activity in model group was significantly increased with statistical significance ($P < 0.001$), while SOD activity was increased with no statistical significance. Compared with model group, CAT activity decreased significantly ($P < 0.001$) and SOD activity decreased to different degrees after human placenta freeze-dried powder treatment with different extraction methods. **Conclusion** human placenta freeze-dried powder had the activity against depression induced by reserpine in zebrafish, among which the enzymatic hydrolysate of dried human placenta has the best anti-depressant activity. Mechanism investigation suggested that anti-depressant activity may be related to the anti-oxidative action.

Key words: human placenta freeze-dried powder; extraction methods; zebrafish; depression; oxidative stress

抑郁症是1种常见的情绪障碍综合征,以心情低落或兴趣、愉悦感缺乏为主要特征^[1]。本病具有患病率高、复发率高、致残率高的特点,且医疗成本较高^[2]。随着现代生活节奏加快,社会压力增大,抑郁症发病率呈逐年上升趋势。世界卫生组织预计抑郁症会成为继缺血性心脏病后的第2大慢性疾病。西方国家对于抑郁症的疾病支付负担预测到2030年将位列首位,将给社会及家庭造成巨大的精神和经济负担^[1,3]。抑郁症涉及多种神经递质、脑区及通路,发病机制尚不明确。大量的实验和临床证据表明抑郁症患者中枢神经系统5-羟色胺(5-HT)和脑内去甲肾上腺素(NE)功能发生了一些改变^[4-5],另1个神经生物学基础的假说认为脑源性神经营养因子(BDNF)在抑郁和焦虑中发挥重要作用^[6]。近年来研究发现下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴异常活跃在重度抑郁症中发挥作用。此外,炎症因子也参与了抑郁症的发病机制^[7]。

人胎盘,古称紫河车,是将健康新鲜的人源胎盘除去羊膜及脐带,反复冲洗去净血液,蒸或煮后干燥而成。始载于《本草拾遗》,《本草纲目》释其名:“天地之先,阴阳之祖,乾坤之始,胚胎将兆,九

九数足,胎儿则乘而载之,遨游于西天佛国,南海仙山,飘荡于蓬莱仙境,万里天河,故称之为河车”。母体娩出时为红色,稍微放置转为紫色,故称为紫河车。现代药理研究表明胎盘冻干粉含有多种激素、免疫因子、氨基酸、细胞因子、酶及酶抑制剂等活性物质。这些活性物质使胎盘冻干粉具有增强机体免疫力、抗感染、抗病毒等功效,临床应用广泛,对于消化系统疾病、泌尿系统疾病、妇科疾病、男科疾病、肿瘤以及神经系统疾病均有一定的治疗效果^[8-11]。另外,紫河车配伍其他中药可降低阿尔茨海默病患者脑内 β 淀粉样蛋白含量^[12-13]。由于中药的提取和制备方式多样,其活性成分及效果有所区别,因此明确不同提取方法胎盘冻干粉的活性差异对于整体性评价具有重要意义。

斑马鱼因体外受精、繁殖发育速度快、胚胎和幼鱼身体透明等特点被越来越多的人所认可,应用范围也越来越广,已成为神经退行性疾病、药物筛选、药物安全性评价等研究的绝佳模式生物^[14]。斑马鱼基因图谱已经基本清晰,与人类基因组同源性高达87%,信号通路调控也与人类相似性较高^[15]。综合以上各种优势,本研究选用斑马鱼作为模型,

研究不同提取方法的胎盘冻干粉抗抑郁活性及其作用机制。本研究利用利血平诱导斑马鱼成鱼抑郁模型,通过观察其行为学变化,检测抑郁相关基因表达量的变化,比较超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性变化,探讨胎盘冻干粉是否具有抗抑郁活性及其作用机制。

1 材料

1.1 斑马鱼

野生型斑马鱼 AB 由山东省科学院生物研究所药物筛选平台提供,培养在循环水养殖系统(pH 7.0~8.0,电导率 $<30\ \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)中,8:30~22:30 给予光照,22:30 至次日 8:30 时黑暗,温度(28.0 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$,每日 10:00 时、15:00 时喂食颗粒状饵料和刚孵化的丰年虾。斑马鱼的使用符合齐鲁工业大学(山东省科学院)生物研究所实验动物福利伦理委员会要求(实验动物伦理批号 3701027331728)。

1.2 药物及主要试剂

利血平(阿拉丁公司,货号 J1817170);丁螺环酮(MCE 公司,货号 17539);总 SOD 活性检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司,货号 S0101M);CAT 活性试剂盒(碧云天生物技术有限公司,货号 S0051);RNA 试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司,货号 RN28);反转录试剂盒(近岸蛋白质科技有限公司,货号 E047);实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)试剂盒(近岸蛋白质科技有限公司,货号 E096);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司,货号 P0012)。

1.3 主要仪器

斑马鱼养殖饲养系统(北京爱生科技有限公司);AXIO-V16 蔡司荧光显微镜(卡尔·蔡司股份有限公司);NDoneC 微量分光光度计(基因有限公司);ZebraLab 3.3 斑马鱼成鱼行为分析系统(法国 viewpoint 公司);YXQ-LS-100G 高压灭菌锅(上海博迅实业有限公司);C1000 Touch 型 PCR 仪(Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 人源胎盘的前处理及不同提取方法

所有胎盘均来自山东省妇幼保健院产妇捐献,捐献及后续组织处理均已获当事人知情同意。在人源胎盘使用过程中,严格遵照《卫生部关于产妇分娩后胎盘处理问题的批复》(卫政法发(2005)123 号)相关规定,规范使用人源胎盘。人源胎盘前处理及不同样品提取制备方法见本课题组前期研究方法^[16],胎盘冻干粉分别经胰蛋白酶酶解提取、梯

度溶剂(依次为水、50%乙醇水、无水乙醇、二氯甲烷)提取,分别简称为胎盘冻干粉酶解、水提、50%醇提、醇提、二氯甲烷提。

2.2 实验分组及处理

将 6 月龄野生型斑马鱼 AB 随机分为 8 组:对照组、模型组、丁螺环酮(阳性药, $3\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)组和胎盘冻干粉酶解、水提、50%醇提、醇提、二氯甲烷提(均为 $5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,前期预试验结果显示质量浓度为 $8\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时斑马鱼出现死亡情况, $5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 是斑马鱼无畸形无死亡的最高浓度,故选用此浓度)组,每组 12 条成鱼。除对照组外,准确称量 60 mg 利血平溶于 3 L 养鱼水处理斑马鱼 20 min 制备抑郁症模型^[17-18]。准确称量 9 mg 丁螺环酮加入 3 L 养鱼水,准确称量 15 mg 不同提取方法胎盘冻干粉样品加入 3 L 养鱼水,处理造模完成的斑马鱼,对照组和模型组不加药。每天正常喂食,为了避免水质污染影响斑马鱼正常的发育生长,每 24 h 更换 1 次药液,连续 14 d。

2.3 新型水槽测试

斑马鱼测试缸是 1 个长 22 cm、宽 14 cm、高 14 cm 的长方体透明水槽。为了进行轨迹分析,将新型水槽人为分成上下 2 个区域。将斑马鱼测试缸摆放靠在 LED 灯箱的前面,打开 LED 灯使其照射上下 2 层,将药物处理结束后 20 min 的斑马鱼转移到测试缸中,每次 1 只,在测试缸中加入 3 L 当天的新鲜养鱼水,静置 10 min 待斑马鱼适应环境并位于水槽的中间位置以后,观察斑马鱼的运动轨迹并利用斑马鱼行为学记录仪记录 3 min。计算斑马鱼从水缸下层进入上部的次数和在水缸的上、下层的游动时间和距离。

2.4 qRT-PCR

将新型水槽测试后的各组斑马鱼成鱼解剖,得到尽量完整的鱼脑。每组取鱼脑($n=3$)进行 qRT-PCR 检测。RNA 的提取参照试剂盒说明书,利用超微量分光光度计测定提取的 RNA 浓度, A_{260}/A_{280} 应在 2.0~2.5;RNA 反转录为 cDNA 参照反转录试剂盒说明书;qRT-PCR 参照试剂盒说明书,引物序列见表 1。qRT-PCR 扩增结束后输出对照组和待测组目的基因 C_t 及内参基因 $rpl13a$ 的 C_t 值,以相对定量法用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算各组基因的相对表达量。

2.5 SOD、CAT 活性测定

将新型水槽测试后的各组斑马鱼成鱼解剖,得到尽量完整的鱼脑,PBS 清洗 3 次后加入裂解液,充

表1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因	序列(5'→3')
<i>rpl13a</i>	F:TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC R:AGACGCACAATCTTGAGAGCAG
<i>bdnf</i>	F:AACTCCAAAGGATCCGCTCA R:GCAGCTCTCATGCAACTGAA
<i>pomc</i>	F:GAATCCGCCGAAACGCTTCC R:GGGTCTTCTTTCCAAGTGGGTTT
<i>hcrt</i>	F:TCTACGAGATGCTGTGCCGAG R:CGTTTGCCAAGAGTGAGAATC
<i>mao</i>	F:CAACAACCTCTGGAGGACA R:GTTGCTGCATGGTCATCTT
<i>ppary</i>	F:TCTCCGCTGATATGGTGGAC R:GTCGATGCCTGATATGCTGC
<i>nf-κb</i>	F:GAGCCCTTTGTGCAAGAGAC R:TGGGATACGTCCTCCTGTTC

分匀浆后得到蛋白混悬液, $11\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 取上清即为总蛋白溶液。蛋白浓度测定参照试剂盒说明书; SOD、CAT 活性测定参照试剂盒说明书。

2.6 数据分析

采用统计学软件 GraphPad Prism 7.0 进行统计分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析法 (One-Way ANOVA) 进行各组组间显著性差异分析。

3 结果

3.1 不同提取方法的胎盘冻干粉对斑马鱼抑郁模型运动行为的缓解作用

采用新型水槽测试斑马鱼成鱼的运动行为, 结果如图 1 所示, 与对照组比较, 利血平处理后斑马鱼的运动轨迹发生了明显变化, 在水缸上部的探索运动轨迹明显减少, 提示斑马鱼探索欲望降低; 经不同提取方法胎盘冻干粉处理后, 斑马鱼的运动轨迹再次发生变化, 在水缸上部的探索运动轨迹有不同程度的增多, 其中胎盘冻干粉酶解效果最明显。

与对照组比较, 模型组斑马鱼进入上部次数显著减少 ($P < 0.001$), 上部游动距离及时间比例均显著减少 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 丁螺环酮、胎盘冻干粉酶解组斑马鱼进入上部次数显著增加 ($P < 0.05$), 上部游动距离及时间比例均显著增加 ($P < 0.05$)。

3.2 不同提取方法的胎盘冻干粉对抑郁、神经调控相关基因表达的影响

采用 qRT-PCR 法检测各组抑郁相关基因 *bdnf*、*pomc*、*hcrt*、*mao* 和神经调控相关基因 *ppary*、*nf-κb* 在斑马鱼体内的表达水平, 结果见图 2。与对照组比较, 利血平模型组中的 *bdnf*、*pomc*、*hcrt* 和 *mao* 基因表达显著上调 ($P < 0.01$ 、 0.001), *nf-κb*、*ppary* 基因表达显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与利血平模型组比较, 经不同提取方法胎盘冻干粉处理后 *bdnf*、*pomc* 和

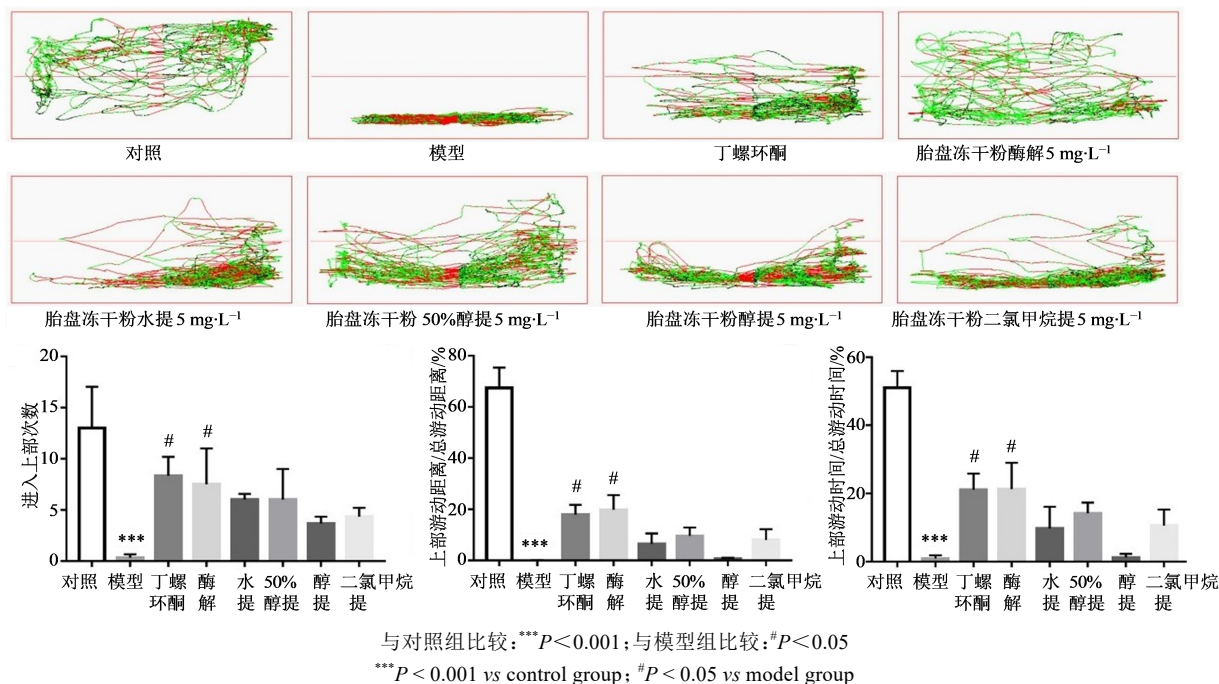


图1 不同提取方法的胎盘冻干粉对斑马鱼成鱼行为的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Fig. 1 Influence of anti-depressant activity of dried human placenta extracted by different methods on adult behavior of zebrafish ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

mao 基因表达显著下调 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 酶解、水提、醇提组 *hcrt* mRNA 水平显著降低 ($P < 0.05, 0.001$), 酶解、水提组 *nf- κ b* mRNA 水平和酶解组 *ppary* mRNA 水平显著上调 ($P < 0.01$)。实验结果显示, 经不同提取方法胎盘冻干粉共处理后, *bdnf*、*pomc*、*hcrt*、*mao* 和 *nf- κ b*、*ppary* 基因表达均趋向于对照组, 说明胎盘冻干粉对利血平造成的基因表达异常具有改善作用, 其中胎盘冻干粉酶解和水提作用效果较好。

3.3 不同提取方法的胎盘冻干粉对 SOD、CAT 活性的影响

结果如图3所示, 与对照组比较, 利血平模型组 CAT 活性显著升高 ($P < 0.001$), SOD 活性升高, 但没有统计学意义, 表明利血平处理促进了斑马鱼氧化应激; 与模型组比较, 经不同提取方法胎盘冻干粉处理后 CAT 活性显著降低 ($P < 0.001$), 酶解、水提组 SOD 活性有不同程度的降低, 斑马鱼氧化应激受到抑制。胎盘冻干粉酶解和水提下调 CAT 活性

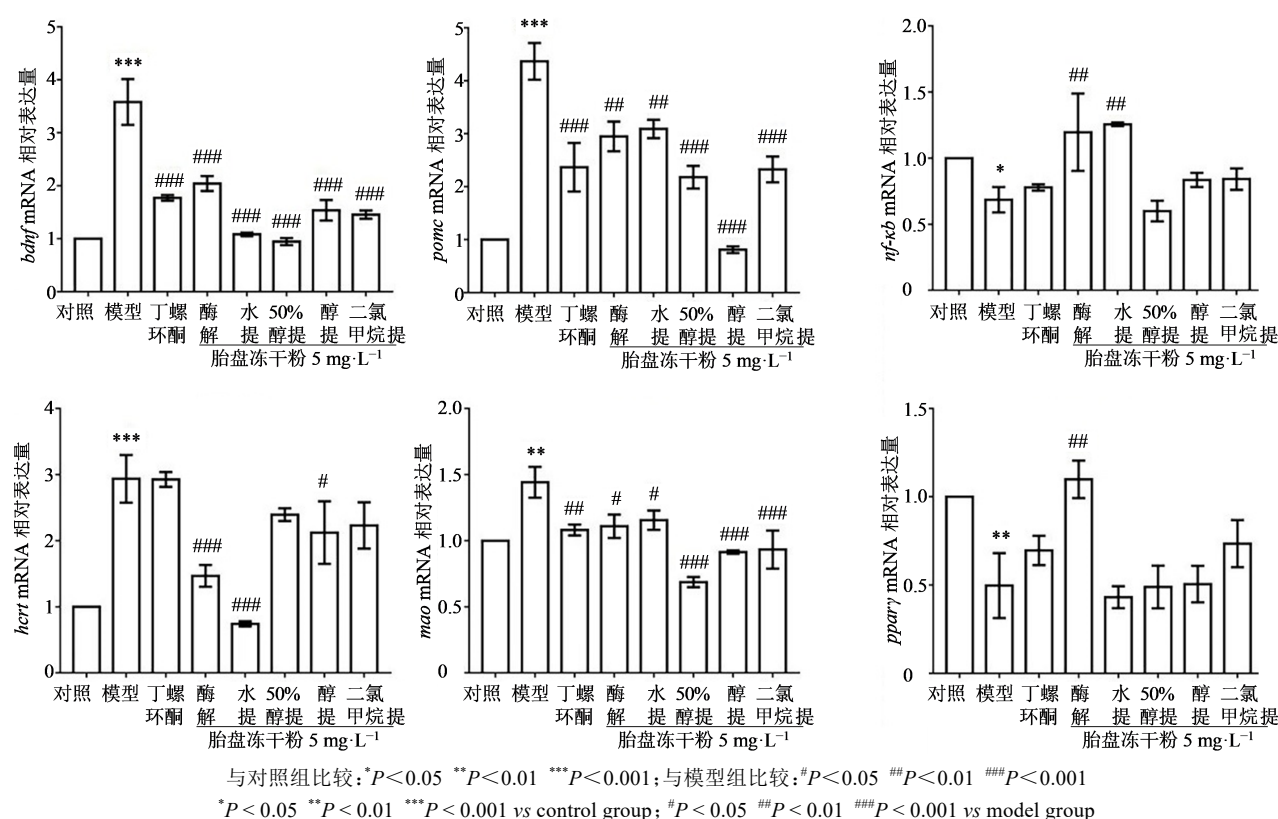


图2 不同提取方法的胎盘冻干粉对斑马鱼基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Fig. 2 Effect of dried human placenta extracted by different methods on zebrafish genetic expression ($\bar{x} \pm s, n=12$)

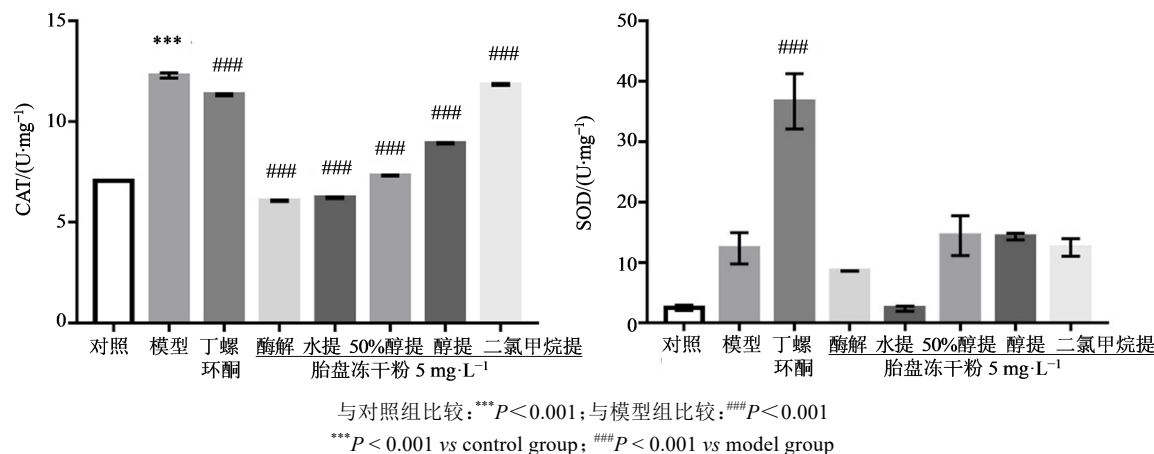


图3 不同提取方法的胎盘冻干粉对斑马鱼 CAT、SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Fig. 3 Effect of dried human placenta extracted by different methods on CAT and SOD activity of zebrafish ($\bar{x} \pm s, n=12$)

最明显,水提下调SOD活性最明显。

4 讨论

人源胎盘生物活性成分复杂多样,用于临床保健和治疗均有较好的效果。《本草拾遗》中记载:主气血羸瘦,妇人劳损,面黧皮黑,腹内诸病渐瘦悴者。《本草纲目》中记载:紫河车味甘、咸,性温、无毒,有补气、益精和养颜的功效。现代医学认为:胎盘中含有丰富的免疫活性肽、微量元素和激素等活性物质,可以提高机体免疫功能,改善激素水平,对一些顽固性疾病的治疗也有良好效果。胎盘具有的免疫调节作用和抗炎作用,提示其在神经系统疾病防治中的潜在应用价值,使其抗抑郁功效成为可能。

利血平是目前最常用的构建斑马鱼抑郁症模型的方法之一。临床观察和研究发现利血平可能导致抑郁样症状。研究人员对经利血平处理后的斑马鱼幼鱼进行行为学测试,与对照组比较其游动距离和速度均显著降低,对光和声刺激的敏感度也明显降低;检测发现利血平处理组斑马鱼的丘脑前多巴胺能神经元减少,单胺水平显著降低^[17]。另有研究发现斑马鱼暴露于利血平后,不稳定运动行为增加,探索行为减少;皮质醇和酪氨酸羟化酶表达水平增加,造成斑马鱼抑郁表型和认知障碍^[18]。

由于基础成分的差异,不同提取方法制备胎盘提取物的生物活性有所区别。范三红等^[19]对不同提取方法紫苏籽粕蛋白功能性质进行了研究,发现超声分离提取蛋白比闪式提取分离蛋白有更好的自由基清除能力和还原力等。孙玉姣等^[20]分别采用水提法、酸法和碱法提取茯茶多糖活性成分,并比较不同提取方法对茯茶多糖理化性质和抗氧化作用的影响,结果显示酸法和碱法可显著提高多糖得率,且抗氧化效果更显著。既往有关胎盘活性研究多集中于单一提取方法的产物,缺乏对不同方法提取物活性差异的对比。本研究以不同提取方法分离制备胎盘冻干粉提取物,每种提取物包含的大、中、小极性成分有所差别,通过体内动物实验和生化指标检测不同提取方法的胎盘冻干粉抗抑郁效果。结果显示,胎盘冻干粉酶解、水提和50%醇提具有一定抗抑郁活性,其中酶解效果显著,胎盘冻干粉醇提和二氯乙烷提无显著抗抑郁作用。目前尚无实验表明胎盘冻干粉在抗抑郁中的应用价值,明确胎盘冻干粉的抗抑郁活性并比较不同提取方法间的效果差异对抑郁症的预防和治疗具有重要参考意义。

抑郁症是一个涉及多种神经递质、脑区及环路疾病,脑内其他诸多生化物质和系统也参与了抑郁症的病理学过程。一般认为抑郁症与生物化学、自身遗传及社会、环境等因素有关,但至今没有清晰统一的认识。以往研究表明,过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)能有效提高CAT和SOD活性,抑制核转录因子 κ B(NF- κ B)通路,控制机体氧化应激^[21-22]。因此本实验选择神经调控相关基因 $nf-\kappa b$ 、 $ppar\gamma$ 和抑郁症相关基因 $bdnf$ 、 $pomc$ 、 $hcrt$ 、 mao 进行qRT-PCR检测。BDNF是中枢神经系统中发挥重要作用的生长因子,与抑郁症的发展及治疗有关^[23]。本研究发现经利血平处理后, $bdnf$ 基因表达上调,而经不同提取方法胎盘冻干粉处理后 $bdnf$ 基因表达明显下调,提示利血平可能对机体造成损伤,机体自我保护从而提高 $bdnf$ 表达,而不同提取方法胎盘冻干粉处理使 $bdnf$ 基因表达下调,提示不同提取方法胎盘冻干粉能够缓解利血平造成的机体损伤,对机体有保护作用。阿片黑素促皮质激素原($pomc$)是促肾上腺皮质激素、内啡肽和促黑色素的前体^[24],已有研究表明 β -内啡肽系统的紊乱可能导致抑郁^[25],源自 $pomc$ 的促肾上腺皮质激素与抑郁障碍的发生密切相关^[26]。本研究发现经利血平处理后, $pomc$ 基因表达明显上调,经不同提取方法胎盘冻干粉处理后 $pomc$ 表达显著下调,提示胎盘冻干粉可能通过下调内啡肽和促肾上腺皮质激素的表达发挥抗抑郁作用。NF- κ B是免疫和炎症反应的重要调节因子^[27]。NF- κ B与树突的生长和发育、神经元存活有关。在条件神经元NF- κ B缺陷小鼠中,NF- κ B信号通路的缺失会损害突触传递,影响学习记忆能力^[28]。经利血平处理后, $nf-\kappa b$ 表达量降低,而经不同提取方法胎盘冻干粉处理后 $nf-\kappa b$ 基因表达上调,提示不同提取方法胎盘冻干粉能够缓解利血平造成的树突和神经元损伤,对机体有保护作用。脑内神经突触间隙中单胺类递质水平低下是抑郁症的主要发病机制之一,在抑郁症患者的大脑中可以观测到单胺氧化酶(MAO)的活性升高^[29]。经利血平处理后, $hcrt$ 、 mao 的基因表达明显上调;经不同提取方法胎盘冻干粉共处理后,二者基因表达量下降,表明利血平造成机体损伤从而迅速启动自我保护机制,不同提取方法胎盘冻干粉能够缓解利血平造成的机体损伤,对机体有保护作用。PPAR γ 是一种核受体蛋白,其激活可抑制小胶质细胞炎性因子表达^[30-31],可通过抑制转录因子活性从而抑制基因表达^[32],Jiang等^[33]研究发现激活 $ppar\gamma$

可增强海马BDNF系统,显著增强小鼠抗抑郁作用。本实验中不同提取方法胎盘冻干粉显著降低了由利血平引起的 $ppary$ 表达上调,表明 $ppary$ 在抑郁症发病过程中起着重要作用。体内抗氧化酶活性降低,脂质过氧化物含量升高亦是抑郁症发病的重要机制之一。SOD、CAT是体内重要的抗氧化酶,能有效清除机体自由基^[34],反映机体氧化应激损伤程度。利血平处理后机体自由基产生过多导致SOD、CAT活性增加,不同提取方法胎盘冻干粉处理后SOD、CAT活性降低,证明斑马鱼体内自由基趋于正常水平。

人源胎盘冻干粉具有抗利血平诱发斑马鱼抑郁症的活性,5种不同提取方法得到的产物中,胎盘冻干粉酶解抗抑郁症活性最好,其作用机制可能与改善氧化应激状态有关,本研究为人源胎盘冻干粉的开发利用提供了新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 黄洁云. 抑郁症的发病机制与治疗进展 [J]. 中国疗养医学, 2013, 22(3): 233-235.
Huang J Y. Pathogenesis and treatment progress of depression [J]. Chin J Conval Med, 2013, 22(3): 233-235.
- [2] 胡随瑜, 王素娥, 张春虎. 抑郁症临床症状分层与中医辨证分型的关系 [J]. 中西医结合学报, 2011, 9(9): 933-936.
Hu S Y, Wang S E, Zhang C H. Relationship between symptom stratification and syndrome differentiation of traditional Chinese medicine for depressive episode [J]. J Chin Integr Med, 2011, 9(9): 933-936.
- [3] 周学东, 陈兴宝. 抑郁症经济负担研究进展 [J]. 上海医药, 2006, 27(12): 539-541.
Zhou X D, Chen X B. Research progress on economic burden of depression [J]. Shanghai Med Pharm J, 2006, 27(12): 539-541.
- [4] Maes M, Yirmiya R, Norberg J, et al. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: Leads for future research and new drug developments in depression [J]. Metab Brain Dis, 2009, 24(1): 27-53.
- [5] Lin Y, Sarfraz Y, Jensen A, et al. Participation of brainstem monoaminergic nuclei in behavioral depression [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2011, 100(2): 330-339.
- [6] Martinowich K, Manji H, Lu B. New insights into BDNF function in depression and anxiety [J]. Nat Neurosci, 2007, 10(9): 1089-1093.
- [7] Peng G J, Tian J S, Gao X X, et al. Research on the pathological mechanism and drug treatment mechanism of depression [J]. Curr Neuropharmacol, 2015, 13(4): 514-523.
- [8] Postlethwait J H, Woods I G, Ngo-Hazelett P, et al. Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes [J]. Genome Res, 2000, 10(12): 1890-1902.
- [9] 张淑二, 陶勇, 张运海, 等. 胎盘的有效成分及其应用 [J]. 动物医学进展, 2007, 28(9): 103-107.
Zhang S E, Tao Y, Zhang Y H, et al. Active components of placenta and their application [J]. Prog Vet Med, 2007, 28(9): 103-107.
- [10] 房克慧, 徐加兵. 中药饮片紫河车的研究历史与现状及现存问题分析 [A]//第十九届全国药学史本草学术研讨会暨2017年江苏省药学会药学史专业委员会年会 [C]. 苏州: 江苏省药学会, 2017.
Fang K H, Xu J B. Analysis of Research history, current situation and existing problems of Chinese Herbal Decoction piece Ziheche [A]// The 19th National Symposium on Materia Medica of Pharmaceutical History and the 2017 Annual Meeting of Pharmaceutical History Committee of Jiangsu Pharmaceutical Society [C]. Suzhou: Jiangsu Pharmaceutical Society, 2017.
- [11] 郭广英, 刘家安. 紫河车功效及药理作用探析 [J]. 中国民间疗法, 2014, 22(11): 77-78.
Guo G Y, Liu J A. Study on efficacy and pharmacological action of Ziheche [J]. China's Naturopathy, 2014, 22(11): 77-78.
- [12] 程保智. 紫河车临床研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(3): 211-212.
Cheng B Z. Progress of clinical research on Ziheche [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2010, 12(3): 211-212.
- [13] 李雪飞. 老年痴呆病的中医辨证治疗分析 [J]. 中国卫生标准管理, 2015, 6(17): 129-131.
Li X F. TCM dialectical treatment in senile dementia [J]. China Heal Stand Manag, 2015, 6(17): 129-131.
- [14] 范琦琦, 李芝奇, 陈美琳, 等. 基于斑马鱼模型的吴茱萸提取物肝毒性评价 [J]. 中草药, 2022, 53(6): 1768-1775.
Fan Q Q, Li Z Q, Chen M L, et al. Hepatotoxicity evaluation of *Euodiae Fructus* extract based on zebrafish model [J]. Drug Eval Res, 2022, 53(6): 1768-1775.
- [15] 袁梦石, 陈向良, 周德生, 等. 紫河车对阿尔茨海默病模型大鼠脑组织内 β 淀粉样蛋白及 β 淀粉样前体蛋白mRNA表达的影响 [J]. 中国医师杂志, 2007(5): 600-603.
Yuan M S, Chen X L, Zhou D S, et al. Effect of Ziheche on β -amyloid, β -amyloid precursor protein mRNA in brain tissue of rat model of Alzheimer's disease [J]. J Chin Phys, 2007(5): 600-603.
- [16] 任季禹, 杨凯, 靳梦, 等. 不同干燥与提取方式处理的人

- 源胎盘防治贫血活性差异研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(8): 1592-1596.
- Ren J Y, Yang K, Jin M, et al. Anti-anemia activity of human placenta from different drying and extraction methods [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(8): 1592-1596.
- [17] Wang S, Duan M, Guan K Y, et al. Developmental neurotoxicity of reserpine exposure in zebrafish larvae (*Danio rerio*) [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2019, 223: 115-123.
- [18] Zhang S H, Liu X D, Sun M Z, et al. Reversal of reserpine-induced depression and cognitive disorder in zebrafish by sertraline and traditional Chinese medicine (TCM) [J]. Behav Brain Funct, 2018, 14(1): 13.
- [19] 范三红, 贾槐旺, 张锦华, 等. 不同提取方法对紫苏籽粕蛋白功能性质的影响 [J]. 中国调味品, 2021, 46(12): 61-69.
- Fan S H, Jia H W, Zhang J H, et al. Effects of different extraction methods on the functional properties of *Perilla* seed meal protein [J]. China Condiment, 2021, 46(12): 61-69.
- [20] 孙玉姣, 马芸皓, 王凡, 等. 不同提取方法对茯茶多糖理化性质和抗氧化作用的影响 [J]. 陕西科技大学学报, 2021, 39(5): 31-38.
- Sun Y J, Ma Y H, Wang F, et al. Influence of different extraction methods on physicochemical properties and antioxidant effects of Fu Brick tea polysaccharides [J]. J Shaanxi Univ Sci Technol, 2021, 39(5): 31-38.
- [21] Giampietro L, Gallorini M, de Filippis B, et al. PPAR- γ agonist GL516 reduces oxidative stress and apoptosis occurrence in a rat astrocyte cell line [J]. Neurochem Int, 2019, 126: 239-245.
- [22] Collino M, Aragno M, Mastrocola R, et al. Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR- γ agonists in the *Hippocampus* of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion [J]. Eur J Pharmacol, 2006, 530(1/2): 70-80.
- [23] Bathina S, Das U N. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications [J]. Arch Med Sci, 2015, 11(6): 1164-1178.
- [24] Slominski A. *POMC* gene expression in mouse and hamster melanoma cells [J]. FEBS Lett, 1991, 291(2): 165-168.
- [25] Hegadoren K M, O'Donnell T, Lanius R, et al. The role of beta-endorphin in the pathophysiology of major depression [J]. Neuropeptides, 2009, 43(5): 341-353.
- [26] Sandman C A, Hetrick W, Talyor D, et al. Uncoupling of proopiomelanocortin (POMC) fragments is related to self-injury [J]. Peptides, 2000, 21(6): 785-791.
- [27] Gupta S C, Sundaram C, Reuter S, et al. Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as a therapeutic strategy [J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1799(10/11/12): 775-787.
- [28] Kaltschmidt B, Ndiaye D, Korte M, et al. NF-kappaB regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signaling [J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(8): 2936-2946.
- [29] Meyer J H, Wilson A A, Sagrati S, et al. Brain monoamine oxidase A binding in major depressive disorder: Relationship to selective serotonin reuptake inhibitor treatment, recovery, and recurrence [J]. Arch Gen Psych, 2009, 66(12): 1304-1312.
- [30] Dehmer T, Heneka M T, Sastre M, et al. Protection by pioglitazone in the MPTP model of Parkinson's disease correlates with I kappa B alpha induction and block of NF kappa B and iNOS activation [J]. J Neurochem, 2004, 88(2): 494-501.
- [31] He X Q, Feng L, Meng H W, et al. Rosiglitazone protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity through inhibition of microglia activation [J]. Int J Neurosci, 2012, 122(9): 532-540.
- [32] Ricote M, Li A C, Willson T M, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation [J]. Nature, 1998, 391(6662): 79-82.
- [33] Jiang B, Huang C, Zhu Q, et al. WY14643 produces antidepressant-like effects in mice via the BDNF signaling pathway [J]. Psychopharmacology, 2015, 232(9): 1629-1642.
- [34] 宗阳, 何书芬, 孙冰婷, 等. 甘草抗抑郁作用机制研究及应用概况 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(10): 194-198.
- Zong Y, He S F, Sun B T, et al. Antidepressant mechanism and application of *Glycyrrhiza Radix* et *Rhizoma* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2016, 22(10): 194-198.

[责任编辑 兰新新]