

纯种发酵淡豆豉的抗抑郁作用研究

冯 驰, 马书伟, 周立分, 熊京京, 李翠英, 戴家齐, 谢小琴, 龙 凯*, 谢小梅*

江西中医药大学, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 初步研究纯种发酵淡豆豉的抗抑郁作用及其活性成分。方法 制备自然发酵淡豆豉和枯草芽孢杆菌纯种发酵淡豆豉, 采用显色鉴别、薄层鉴别、异黄酮和 γ -氨基丁酸(GABA)的含量测定对纯种发酵淡豆豉进行质量评价; 昆明小鼠按体重随机分为8组, 每组10只, 雌雄各半, 分别为对照组、模型组、盐酸氟西汀(阳性对照, $0.01\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组、 γ -氨基丁酸(GABA, $0.014\ 45\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组、异黄酮($0.003\ 05\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组、自然发酵淡豆豉醇提水洗脱物(水洗脱物, $1.82\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组、自然发酵淡豆豉总提物(自然发酵, $1.82\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组、纯种发酵淡豆豉总提物(纯种发酵, $1.82\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组, 除对照组外, 建立慢性温和不可预知应激(CUMS)小鼠抑郁模型, 边造模边给药, 每日应激前1 h ig给药, 连续给药28 d。实验第0、7、14、21、28天分别测定各组小鼠体重, 第28天给药1 h后, 进行悬尾、强迫游泳、糖水偏好、敞箱实验各行为学指标检测; HE染色后观察海马CA1区病理学变化; 超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)鉴定水洗脱物组、纯种发酵组的主要化学成分。结果 纯种发酵淡豆豉与自然发酵淡豆豉有相同的显色反应、显色斑点和GABA含量。与模型组相比, 各给药组在应激第14、21、28天时体重增加明显($P<0.01$), 悬尾及强迫游泳不动时间显著降低($P<0.01$); GABA组、异黄酮组、纯种发酵组、自然发酵水洗脱物组小鼠糖水偏好指数均显著增加($P<0.05, 0.01$); 盐酸氟西汀组、水洗脱物组、GABA组、纯种发酵组小鼠敞箱实验跨格数和直立数均显著增加($P<0.05, 0.01$); 各给药组海马CA1区细胞排列紧密有序, 边缘圆润, 细胞间隙正常。纯种发酵组与自然发酵总提物组、水洗脱物组小鼠的各项行为学指标均无显著差异。自然发酵醇提水洗脱物组、纯种发酵总提物组都含有大豆苷元、染料木素、GABA和各种氨基酸。结论 纯种发酵淡豆豉具有与自然发酵淡豆豉相似的抗抑郁作用, 抗抑郁作用的主要成分可能是GABA和异黄酮。

关键词: 纯种发酵; 淡豆豉; 抗抑郁; 异黄酮; γ -氨基丁酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)06-1224-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.06.006

Antidepressant effect of pure fermented *Sojae Semen Praeparatum*

FENG Chi, MA Shuwei, ZHOU Lifan, XIONG Jingjing, LI Cuiying, DAI Jiaqi, XIE Xiaoqin, LONG Kai, XIE Xiaomei

Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective A preliminary study on the antidepressant effect of pure-bred fermented *Sojae Semen Praeparatum* (PF-SSP) and its active components. **Methods** According to the established process in our laboratory, natural fermented *Sojae Semen Praeparatum* (NF-SSP) and PF-SSP by *Bacillus subtilis* were prepared. The quality evaluation of PF-SSP was carried out by colorimetric identification, thin-layer identification, and content determination of flavonoid and γ -aminobutyric acid (GABA). Divided Kunming mice into eight groups randomly by body weight, with 10 mice in each group, half male and half female. The groups were as follows: control group, model group, fluoxetine (positive control, $0.01\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, GABA ($0.014\ 45\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, flavonoid ($0.003\ 05\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, NF-SSP ethanol extract washout material (water washout material, $1.82\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, NF-SSP total extract (NF-SSP, $1.82\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, PF-SSP total extract group (PF-SSP, $1.82\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Except for the control group, an experimental model of chronic mild unpredictable stress (CUMS) in mice was established, and the mice were given drugs while being subjected to the model. Drugs were administered ig one hour before the stress every day for 28 consecutive days. Body weight was measured in mice at 0, 7, 14, 21, and 28 days. The behavioral indicators of the hanging tail, forced swimming, sucrose

收稿日期: 2024-01-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82060709, 82360772); 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ180655)

第一作者: 冯 驰(1981—), 男, 主治医师, 硕士, 从事泌尿外科临床工作。E-mail: 306583866@qq.com

*通信作者: 谢小梅(1964—), 女, 教授, 博士, 研究生导师, 从事微生物学研究。E-mail: jxxm1964@sina.com

龙 凯(1970—)男, 高级实验师, 从事中药化学研究。E-mail: longkai2006@163.com

preference, and open field test were detected 1 h after giving drugs on day 28. Hematoxylin and eosin (HE) staining was performed to observe pathological changes in the hippocampal CA1 area. UPLC-MS/MS was used to identify the main chemical components of the aqueous extract and pure strain fermentation products. **Results** PF-SSP and NF-SSP had the same color reaction, color spots and GABA content. Compared with model group, the body weight of each treatment group increased significantly at 14, 21, and 28 days after stress ($P < 0.01$), and the immobility time in the tail suspension and forced swimming test were significantly reduced ($P < 0.01$); the sucrose preference index of GABA group, isoflavone group, PF-SSP group, and water washout group mice were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$); the number of grid crossings and standing up in the open field test of fluoxetine hydrochloride group, washout group, GABA group, and PF-SSP group mice were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$); the cells in the CA1 region of the hippocampus in each treatment group were arranged tightly and orderly, with smooth edges and normal cell gaps. The behavioral indices of the pure fermentation group and the natural fermentation total extract group were not significantly different from those of the model group. The natural fermentation ethanol extract washout group and the pure fermentation total extract group both contained daidzein, genistein, GABA, and various amino acids. **Conclusion** PF-SSP had the similar antidepressant effect as NF-SSP, the main components of antidepressant effect may be GABA and isoflavones.

Key words: pure fermented; *Sojae Semen Praeparatum*; anti-depression; isoflavones; γ -aminobutyric acid

淡豆豉是以黑大豆为主料,青蒿、桑叶为辅料,经自然发酵炮制而成的发酵品。历代本草和历版《中国药典》均有记载,具有解表、除烦、宣发郁热的功效,临床用于感冒、寒热头痛、烦躁胸闷、虚烦不眠^[1]。淡豆豉自然炮制时间长,有多种微生物参与发酵。历版药典中对淡豆豉的炮制时间、温度、湿度等关键工艺参数并未明确规定,导致质量不稳定,安全性难以控制,严重影响淡豆豉临床应用的安全性和有效性^[2-3]。而纯种发酵淡豆豉是采用单一菌种或混合菌种进行发酵的现代技术,发酵产物质量稳定、安全可控,还可缩短发酵时间。

本课题组前期已建立规范的淡豆豉自然发酵炮制工艺,并建立了高富集 γ -氨基丁酸(GABA)的淡豆豉纯种发酵新工艺,应用经典的现代药理抑郁模型——慢性温和不可预知应激(CUMS)模型发现自然发酵淡豆豉能显著改善抑郁小鼠的快感缺失、行为绝望等抑郁症状^[4],已筛选出自然发酵淡豆豉的大孔树脂水洗脱物部位和纯种发酵淡豆豉总提物部位能较好地改善小鼠绝望行为(待发表)。本实验在此基础上,对纯种发酵淡豆豉进行质量评价、抗抑郁作用评价及其活性成分研究,为开发具有抗抑郁功效的纯种发酵淡豆豉提供实验依据。

1 材料

1.1 主要试剂

黑大豆、桑叶、青蒿,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* L. 的干燥地上部分;淡豆豉对照药材,本实验室自制,

本实验室已建立稳定规范的淡豆豉自然发酵炮制工艺;青蒿对照药材,安国冷背药材有限公司;盐酸氟西汀胶囊(上海上药中西制药有限公司,批号 H19980114);GABA 对照品(阿拉丁生化科技有限公司,批号 A104200,质量分数 99%);染料木素、大豆苷元(大连美仑生物技术有限公司,批号 J0306AS、A0409AS,质量分数均为 98%);HE 染色试剂盒、AB-8 大孔吸附树脂(北京索莱宝科技有限公司,批号 20211016、1203W011);脑心浸液肉汤培养基(青岛海博生物技术有限公司,批号 20201017);甲醇、乙腈、甲酸为质谱纯。

1.2 主要仪器

LITQ-Oribitrap Elite 线性离子阱-串联静电场轨道阱质谱仪(美国 Thermo Scientific 公司);RM2016 病理切片仪(上海徠卡显微系统有限公司);JJ-12J 脱水机、JB-P5 包埋机、JB-L5 冻台(武汉俊杰电子有限公司);Nikon Eclipse E100 正置光学显微镜、Nikon DS-U3 成像系统(Nikon 公司);1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),AB Sciex QTRAP 5500 三重四极杆线性离子阱串联质谱仪(美国 AB Sciex 公司)。

1.3 实验动物

昆明种小鼠,雌雄各半,体质量(20±2) g,120 只,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。实验方案及操作规程符合本单位动物伦理学审查标准(批准号 JZLLSC20220508)。

2 方法

2.1 自然发酵淡豆豉和纯种发酵淡豆豉的制备

2.1.1 自然发酵淡豆豉的制备 按本实验室建立

的方法进行制备^[5]。

2.1.2 纯种发酵淡豆豉的制备 接种液制备:将实验室保藏的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, JX2)活化,将活化的单菌落接种至细菌种子培养基中,培养12 h,按5%的比例加入250 mL的脑心浸液肉汤液体培养基,在适宜条件下进行纯培养,取对数生长期的菌液,调整菌浓度为 1×10^7 cfu·mL⁻¹。

纯种发酵:模拟淡豆豉自然发酵过程进行。称取90 g桑叶、100 g青蒿,第1次量取10倍生药量的水浸泡1.5 h,再煎煮1 h;第2次量取8倍生药量的水再次煎煮1 h,合并2次煎煮液浓缩至1 000 mL晾凉备用,桑叶、青蒿药渣晒干。称取1 000 g净黑大豆,按黑大豆:桑叶、青蒿煎煮液比例为1:1分装至发酵瓶中,浸泡6 h至黑大豆膨胀饱满,待煎煮液吸尽,加入适量晒干后的桑叶、青蒿药渣至发酵瓶中,密封,在121 °C条件下灭菌15 min备用。将制备的接种液,按照6%接种至黑大豆中,置温度(30±2) °C、湿度为70%的恒温恒湿培养箱中培养15 d(此过程每3天翻动1次),取出,置37 °C干燥箱中干燥,得纯种发酵淡豆豉。成品性状:豆粒表面皱缩,香气浓郁,断面颜色深。

2.2 淡豆豉质量评价

2.2.1 显色鉴别 取纯种发酵淡豆豉、自然发酵淡豆豉粉末各1 g,研碎,加水10 mL,加热至沸,保持微沸数分钟,滤过,取滤液0.5 mL,点于滤纸上,待干,喷以1%吡啶-醋酸(10:1)的混合溶液,干后,在100~110 °C加热约10 min。

2.2.2 薄层鉴别 取纯种发酵和自然发酵淡豆豉粉末各1 g,加乙醇25 mL,超声30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇1 mL溶解,作为供试品溶液。另取淡豆豉对照药材1 g,青蒿对照药材0.2 g,同法分别制成对照药材溶液。再取大豆苷元对照品和染料木素对照品,分别加乙醇制成0.5 mg·mL⁻¹的溶液,作为对照品溶液。按照薄层色谱法(中国药典通则0502),吸取上述溶液各5~10 μL,分别点于同一硅胶GF254薄层板上,以甲苯-甲酸乙酯-甲酸(10:4:0.5)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(254 nm)下检视。

2.2.3 异黄酮、GABA含量测定 本课题组已建立淡豆豉中异黄酮、GABA定量检测的高效液相色谱法(HPLC)^[5]、超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)^[6],用该法对淡豆豉成品中异黄酮、GABA含量进行测定。

2.3 淡豆豉抗抑郁作用及其活性成分研究

2.3.1 药物的制备 (1)盐酸氟西汀(阳性对照):取1粒盐酸氟西汀胶囊(20 mg),用20 mL蒸馏水溶解,制成1 mg·mL⁻¹的混悬液。

(2)自然发酵淡豆豉总提物(自然发酵组)和纯种发酵淡豆豉总提物(纯种发酵组):分别精密称取16.38 g自然发酵和纯种发酵的淡豆豉粉末,加入500 mL蒸馏水,浸泡1 h,煎煮3次,滤过,合并3次滤液,浓缩至90 mL,即得0.182 g·mL⁻¹的样品溶液。

(3)自然发酵淡豆豉醇提水洗脱物(水洗脱物组):称取自然发酵淡豆豉用8倍量75%乙醇回流提取2 h,滤过,再向滤渣中加6倍量75%乙醇回流提取2 h,滤过,合并滤液,用大孔吸附树脂柱色谱分离,用水洗脱得水洗脱物组(大孔树脂后的分离得率为72.5%,换算生药量1.82 g·kg⁻¹)。

(4)GABA:精密称取14.45 mg GABA对照品,用10 mL蒸馏水溶解,配成质量浓度为1.445 mg·mL⁻¹(淡豆豉成品对应的GABA含量)的溶液。

(5)异黄酮:精密称取1.62、1.43 mg的大豆苷元、染料木素对照品,用10 mL蒸馏水溶解,配成质量浓度为0.162、0.143 mg·mL⁻¹(淡豆豉成品对应的异黄酮含量)的混悬液。

2.3.2 CUMS模型制备^[7-8]及分组 昆明小鼠适应性喂养1周后按体质量随机分为8组,每组10只,雌雄各半。分别为对照组、模型组、盐酸氟西汀(阳性对照,0.01 g·kg⁻¹)组、GABA(0.014 45 g·kg⁻¹)组、异黄酮(0.003 05 g·kg⁻¹)组、水洗脱物(1.82 g·kg⁻¹)组、纯种发酵(1.82 g·kg⁻¹)组、自然发酵(1.82 g·kg⁻¹)^[9]组。各组给药体积为10 mL·kg⁻¹,ig给药,对照组和模型组ig等体积0.9%氯化钠溶液,除对照组外,边造模边给药,每日应激前1 h ig给药,连续给药28 d。

小鼠适应性饲养1周后,按每天1种刺激随机交替(使小鼠不能预料应激刺激的发生),给予以下刺激:禁水24 h,禁食24 h,夹尾1 min,水平摇晃5 min,昼夜颠倒24 h,0 °C冰水游泳5 min,潮湿垫料24 h,45 °C环境5 min。连续28 d,对照组不给予任何刺激。

2.3.3 小鼠行为学指标检测 实验第0、7、14、21、28天分别测定各组小鼠体质量。第28天给药1 h后,进行悬尾、强迫游泳、糖水偏好、敞箱实验各行为学指标检测,具体方法参照本实验室已发表文献报道^[4]。

2.3.4 小鼠海马组织病理切片制作 行为学测试

结束后,采集各组小鼠全脑组织置于4%多聚甲醛溶液中固定,经脱水、浸蜡包埋、切片、脱蜡、HE染色、脱水、封固后,在光学显微镜下观察海马CA1区神经元形态。

2.3.5 成分鉴定 色谱条件:采用UnitaryC₁₈色谱柱(180 mm×2.1 mm, 2.8 μm),流动相:0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱:0~2 min, 0~5% B; 2~4 min, 5%~10% B; 4~13 min, 10%~100% B; 13.0~13.1 min, 100%~5% B; 13.1~16.0 min, 5% B,柱温25 °C,进样量3 μL,体积流量0.3 mL·min⁻¹。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),正、负离子监测模式,毛细管温度320 °C,鞘气体积流量30 L·h⁻¹,辅助气体体积流量10 L·h⁻¹,喷雾电压3 kV,毛细管电压-35 V,管透镜电压-110 V,样品采用全扫描模式,分辨率30 000,质量扫描范围 m/z 90~1 000,数据依赖性扫描DDA-MS₂;母离子列表PIL-MS₂;运用CID和HCD结合的裂解方式获得碎片离子。

数据分析^[10]:查阅国内外相关文献资料,检索淡豆豉的化学成分并建立数据库,采用Xcalibur 2.1软件处理数据,分析化合物的保留时间和一级、二级质谱碎片信息,并结合PubChem、MassBank 2.1.6、HMDB 5.0数据库的质谱信息,筛选出质量偏差 $<5 \times 10^{-6}$ 的化合物,鉴定水洗脱物、纯种发酵的主要化学成分。

2.4 统计分析

用统计软件SPSS 24.0进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差分析(One-way ANOVA)进行组间比较。

3 结果

3.1 淡豆豉质量评价

3.1.1 显色和薄层鉴别 自然发酵淡豆豉和纯种发酵淡豆豉在显色反应中,显紫红色;在薄层鉴别中,置紫外光灯(254 nm)下检视,供试品色谱中,在与淡豆豉对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。见图1。

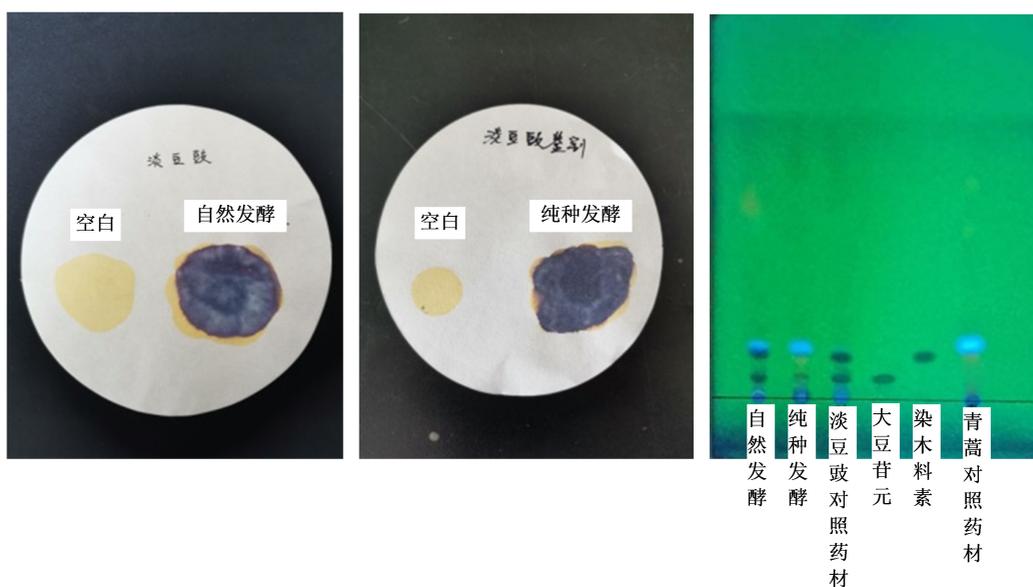


图1 淡豆豉的显色和薄层鉴别

Fig. 1 Color development and thin-layer identification of *Sojae Semen Praeparatum* (SSP)

3.1.2 淡豆豉中异黄酮、GABA含量测定 纯种发酵15 d的淡豆豉中大豆苷元、染料木素和GABA质量分数分别为0.223、0.185、6.030 mg·g⁻¹,自然发酵“再闷”15 d的淡豆豉中大豆苷元、染料木素和GABA质量分数分别为0.886、0.787、7.940 mg·g⁻¹。纯种发酵淡豆豉异黄酮苷元含量符合《中国药典》2020年版要求,纯种发酵和自然发酵的淡豆豉中GABA含量相差不大。

3.2 抗抑郁作用

3.2.1 体质量 如表1所示,与对照组相比,模型组在应激第7、14、21、28天时,体质量增加缓慢,有显著性差异($P < 0.01$)。与模型组相比,盐酸氟西汀组、GABA组、异黄酮组、自然发酵组、自然发酵水洗脱物组、纯种发酵组在应激第14、21、28天时,体质量增加明显($P < 0.01$);纯种发酵组与各给药组无差异,说明各给药组均能够明显改善抑郁小鼠体质量增加缓慢的现象。

表1 各组小鼠的体重质量变化($\bar{x}\pm s, n=10$)

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

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	体质量/g				
		第0天	第7天	第14天	第21天	第28天
对照	—	28.37±1.30	32.57±1.25	35.77±0.99	37.28±1.22	40.81±1.03
模型	—	28.25±0.91	30.26±1.04 ^{##}	31.88±0.85 ^{##}	32.99±1.46 ^{##}	36.11±1.44 ^{##}
盐酸氟西汀	0.01	28.03±1.10	33.21±1.61*	33.40±1.76	36.07±1.84**	39.40±1.09**
GABA	0.014 45	27.75±0.92	32.89±1.56*	34.26±1.45**	37.10±1.63**	40.10±1.15**
自然发酵	1.82	28.12±1.23	31.73±1.87	34.74±1.27**	35.67±1.36**	39.49±1.10**
纯种发酵	1.82	28.98±1.12	33.55±1.61**	35.08±0.90**	36.75±1.19**	39.76±1.11**
水洗脱物	1.82	28.88±1.04	32.81±1.25**	35.07±0.82**	36.79±1.33**	39.86±1.14**
异黄酮	0.003 05	28.29±0.92	31.78±1.33	33.10±0.66**	35.27±0.95**	38.71±1.25**

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.

3.2.2 糖水偏好实验 如表2所示,与对照组相比,模型组小鼠的糖水偏好指数显著下降($P < 0.01$),表明CUMS抑郁模型小鼠糖水消耗度降低。与模型组相比,盐酸氟西汀组、GABA组、异黄酮组、纯种发酵组、自然发酵水洗脱物组小鼠糖水偏好指数均显著增加($P < 0.05, 0.01$),纯种发酵组与阳性组差异无显著意义,表明其可显著改善抑郁小鼠糖水消耗度降低的状况。

表2 各组小鼠糖水偏好指数变化($\bar{x}\pm s, n=10$)

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)	糖水偏好指数
对照	—	0.627±0.080
模型	—	0.470±0.097 ^{##}
盐酸氟西汀	0.01	0.575±0.068*
GABA	0.014 45	0.630±0.045**
异黄酮	0.003 05	0.620±0.058**
纯种发酵	1.82	0.544±0.071
自然发酵	1.82	0.607±0.082**
水洗脱物	1.82	0.587±0.049*

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.

3.2.3 强迫游泳实验 如表3所示,与对照组相比,模型组小鼠游泳后4 min不动时间延长($P < 0.01$),表明CUMS抑郁模型小鼠出现行为绝望的抑郁样行为。与模型组相比,盐酸氟西汀组、GABA组、异黄酮组、水洗脱物组、纯种发酵组、自然发酵组小鼠游泳后4 min不动时间极显著下降($P < 0.01$),纯种发酵组与其他各给药组无差异。结果表明,各给药

组可显著缩短游泳不动时间,改善抑郁小鼠绝望行为。

3.2.4 悬尾实验 如表3所示,与对照组相比,模型组小鼠的悬尾后4 min不动时间延长($P < 0.01$),表明CUMS抑郁小鼠绝望行为程度增加。与模型组相比,盐酸氟西汀组、GABA组、异黄酮组、水洗脱物组、纯种发酵组、自然发酵组小鼠悬尾后4 min不动时间显著缩短($P < 0.01$),纯种发酵组与其他各给药组无明显差异,说明各给药组可显著改善抑郁小鼠的绝望行为。

表3 各组小鼠强迫游泳和悬尾不动时间的变化($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Changes of forced swimming and tail suspension immobility time of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

分组	剂量/ (g·kg ⁻¹)	游泳后4 min	悬尾后4 min
		不动时间/s	不动时间/s
对照	—	55.44±17.87	55.56±10.81
模型	—	81.78±24.87 ^{##}	104.00±27.06 ^{##}
盐酸氟西汀	0.01	42.22±16.03**	51.00±21.59**
GABA	0.014 45	35.55±11.99**	48.78±14.00**
异黄酮	0.003 05	43.56±13.79**	45.22±10.85**
纯种发酵	1.82	46.78±19.99**	46.11±12.35**
自然发酵	1.82	46.22±24.31**	63.44±22.52**
水洗脱物	1.82	39.78±17.68**	56.56±24.62**

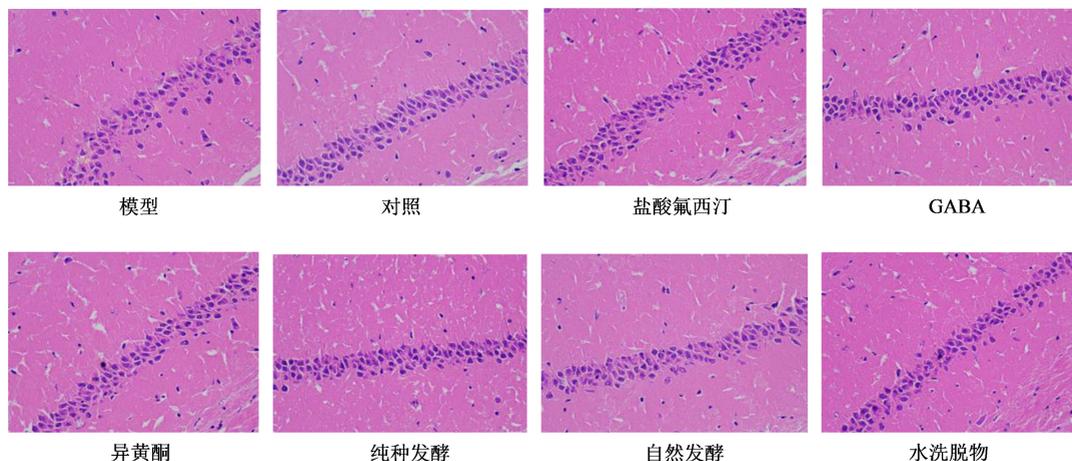
与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$ 。

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

3.2.5 敞箱实验 如表4所示,与模型组相比,盐酸氟西汀组、水洗脱物组、GABA组、纯种发酵组小鼠跨格数和直立数均显著增加($P < 0.05, 0.01$),说明上述各给药组均可显著改善CUMS抑郁模型小鼠

表4 各组小鼠的敞箱行为变化($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 4 Open-field test results of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	跨格数	直立数
对照	—	89.22±22.85	18.89±6.86
模型	—	73.56±17.46	12.44±8.38
盐酸氟西汀	0.01	110.44±20.29**	26.89±6.03**
GABA	0.014 45	121.56±15.22**	27.89±6.51**
异黄酮	0.003 05	108.89±20.39**	18.78±7.89
纯种发酵	1.82	127.89±21.83**	24.67±5.00**
自然发酵	1.82	105.89±28.74**	19.33±5.55
水洗脱物	1.82	107.11±14.69**	21.22±2.54*

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group.图2 各组小鼠海马CA1区HE染色($\times 400$)Fig. 2 HE staining of hippocampal CA1 region of mice in each group ($\times 400$)

3.3 成分鉴定

水洗脱物、纯种发酵样品都含有大豆苷元、染料木素、GABA和各种氨基酸。结果见表5。

4 讨论

抑郁症在中医属于“郁证”“脏燥”“百合病”等范畴,表现为心情抑郁、悲伤欲哭、胁肋胀痛、胸闷,或咽中如有炙脔等^[10]。抑郁症发病机制复杂,目前研究较多的发病机制主要有单胺类神经递质假说、细胞因子假说、下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴假说、神经可塑性假说等^[11],而HPA轴假说其作用机制是下丘脑分泌促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)不断升高,CRF可作用于脑垂体前叶,促使机体内促肾上腺皮质激素(ACTH)分泌增强,接着ACTH再作用于肾上腺,最终导致皮质醇(COR)过度分泌,COR过度分泌会减少海马神经元的形成,最终影响海马功能的发挥^[12]。临床上用于治疗抑郁症的药物也大都基于以上假说,如传统的抗抑郁药物单胺

对新环境的好奇探究程度降低、自发活动减弱、紧张度增加的现象。

3.2.6 海马CA1区HE染色 对照组小鼠的海马CA1区细胞排列紧密有序,边缘圆润,细胞间隙正常;模型组海马CA1区细胞排列松散紊乱,无规则,细胞间隙较大,细胞与周围组织联系不紧密。与模型组相比,盐酸氟西汀组、GABA组、异黄酮组、水洗脱物组、纯种发酵组、自然发酵组海马CA1区细胞排列紧密有序,边缘圆润,细胞间隙正常,纯种发酵组与其他各给药组无明显差异,说明各给药组均对抑郁小鼠海马神经元的损伤有一定的修复作用。结果见图2。

氧化酶抑制剂(MAOI)、三环类药物(TCAs)、选择性5-羟色胺(5-HT)再摄取抑制剂(SSRIs)等,但这些药物大都存在起效慢、效果不显著、容易复发,且有不良反应如性功能下降等缺点,使抑郁患者得不到理想的治疗^[13],所以寻找副作用小,效果好的抗抑郁药非常有必要。本课题组以自然发酵淡豆豉中分离的枯草芽孢杆菌建立了高产GABA的纯种发酵工艺,采用HPLC法和UPLC-MS/MS法,对纯种发酵淡豆豉中主要活性成分进行检测,均符合《中国药典》2020年版要求。

本研究应用小鼠CUMS抑郁模型,通过行为学指标和病理切片观察小鼠海马CA1区细胞形态的变化来评价纯种发酵淡豆豉与自然发酵淡豆豉及其不同极性部位提取物的抗抑郁作用。实验结果表明,对小鼠实行慢性温和和不可预知应激刺激4周后,模型组小鼠出现了体质量增长缓慢、糖水偏好程度明显下降、对新鲜环境的好奇程度显著降低、

表 5 成分鉴定

Table 5 Ingredient identification

物质	水洗脱物样品	纯种发酵样品
大豆苷元	+	+
染料木素	+	+
GABA	+	+
咖啡酸	-	+
黄豆黄素	+	+
6-O-乙酰黄豆苷	-	+
乙酰染料木素苷	-	+
丙二酰大豆黄苷	+	+
丙二酰染料木苷	+	+
丙二酰化黄豆苷	+	+
黄豆黄苷	-	+
川芎嗪	+	+
染料木苷	+	+
大豆苷	+	+
异黄酮素	+	-
6"-O-乙酰黄豆黄苷	-	+
芹菜素	+	+
丁香醛	+	+
谷氨酸	+	+
丝氨酸	+	+
组氨酸	+	+
苏氨酸	+	+
丙氨酸	+	+
精氨酸	+	+
酪氨酸	+	+
缬氨酸	+	+
甲硫氨酸	+	+
异亮氨酸	+	+
苯丙氨酸	+	+
赖氨酸	+	+

“+”表示有;“-”表示无。

"+" indicates presence; "-" indicates none.

精神运动迟滞及行为绝望等抑郁症的主要症状,说明 CUMS 模型制备成功。与模型组相比,GABA 组、异黄酮组、水洗脱物组、自然发酵组、纯种发酵组小鼠的糖水消耗量、跨格数增加以及悬尾实验和强迫游泳不动时间减少,纯种发酵组小鼠跨格数增加,悬尾实验和强迫游泳不动时间减少,纯种发酵组的多个行为学指标与其他各给药组无统计学差异。通过 HE 染色观察各组小鼠海马 CA1 区神经细胞发现,模型组的细胞排列松散紊乱,无规则,细胞间隙较大,细胞与周围组织联系不紧密,各给药组海马 CA1 区神经细胞排列紧密有序,边缘圆润,细

胞间隙正常,表明各给药组对抑郁小鼠的神经细胞损伤具有保护作用。综上,纯种发酵淡豆豉、自然发酵淡豆豉及其不同极性部位提取物对 CUMS 模型小鼠的抑郁行为和神经细胞受损均有良好的改善作用。

通过质谱分析鉴定,水洗脱物、纯种发酵样品中均含有大豆苷元、染料木素、GABA 和各种氨基酸,推测淡豆豉抗抑郁的有效组分可能为 GABA 和异黄酮,GABA 作为中枢神经系统重要抑制性神经递质具有从根本上起到镇静安神、抗焦虑作用^[14]。来自宾州州立大学的 1 项研究表明,增强 GABA 能神经元活性,提升 GABA 神经递质水平在抑郁症模型小鼠中具有抗抑郁效果,说明中枢抑制性神经递质 GABA 与抗抑郁作用有密切的关联。异黄酮能够选择性地抑制大肠杆菌的生长,促进有益菌乳酸杆菌的生长,调节肠道微生物的微生态平衡^[15]。肠道微生物中的益生菌可减轻机体炎症反应和氧化应激,刺激肠上皮黏蛋白的产生,促进肠黏膜的修复,提高肠道内 5-HT 浓度等,肠道乳酸菌含量升高时,能逆转海马区的免疫变化^[16]。

本研究结果表明,纯种发酵淡豆豉具有抗抑郁作用,后续本实验室将进一步研究其抗抑郁作用机制。

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. Pharmacopocia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.

[2] 林王敏, 翁倩倩, 邓爱平, 等. 淡豆豉的发酵工艺沿革及过程控制概述 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(11): 222-232. Lin W M, Weng Q Q, Deng A P, et al. An overview of fermentation technology evolution and process control of *Sojæ Semen praeeparatum* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2021, 27(11): 222-232.

[3] 吴振宁, 王琦, 秦雪梅, 等. 肠道菌群及其代谢产物在中药治疗抑郁症中的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(14): 4713-4721. Wu Z N, Wang Q, Qin X M, et al. Research progress on gut microbiota and its metabolites in treating depression with traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(14): 4713-4721.

[4] 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.
- [5] 周妹含. 淡豆豉炮制中微生物在GABA形成中的作用. [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2020.
Zhou S H. The role of microorganisms in the formation of GABA in the processing of light fermented soybean [D]. Nanchang: Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, 2020.
- [6] 王超楠, 江川, 王华, 等. 基于BDNF通路探讨樱桃叶水煎液对CUMS大鼠的抗抑郁作用机制 [J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33(3): 342-348.
Wang C N, Jiang C, Wang H, et al. Exploring antidepressant mechanism of cherry leaves decoction on CUMS rats based on BDNF pathway [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2022, 33(3): 342-348.
- [7] 高静, 赖名殷, 梅氏清心, 等. 胆碱能过活化状态下"疏肝调神" 针法对CUMS抑郁大鼠行为学的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(3): 635-639.
Gao J, Lai M Y, MAI S Q X, et al. Effect of "Shugantiaoshen" acupuncture on behaviors of depressed CUMS rats with cholinergic hyperactivation state [J]. *Chin J Gerontol*, 2022, 42(3): 635-639.
- [8] 薛涛, 鄢丽莎, 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 Animalis Sci Sin*, 2015, 23(3): 321-326.
- [9] 陈青峰, 贺婧, 谢小梅, 等. 淡豆豉炮制中 γ -氨基丁酸含量测定及其抗抑郁作用研究 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(4): 688-694.
Chen Q F, He J, Xie X M, et al. Determination of content of γ -aminobutyric acid and its antidepressant effect at different time points during processing of *Sojae Semen Praeparatum* [J]. *Drug Eval Res*, 2021, 44(4): 688-694.
- [10] 朱红梅. 基于现代医案的郁证证治理论研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2021.
Zhu H M. Research on the theory of depression syndrome treatment based on modern medical cases [D]. Changsha: Hunan University of Traditional Chinese Medicine, 2021.
- [11] 吴振宁, 王琦, 秦雪梅, 等. 肠道菌群及其代谢产物在中药治疗抑郁症中的研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(14): 4713-4721.
Wu Z N, Wang Q, Qin X M, et al. Research progress on gut microbiota and its metabolites in treating depression with traditional Chinese medicine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(14): 4713-4721.
- [12] 张晓富, 闫晨静, 周茜, 等. 牛磺酸对CUMS致抑郁小鼠的干预作用 [J]. *中国食品学报*, 2021, 21(6): 123-130.
Zhang X F, Yan C J, Zhou Q, et al. Intervention of taurine on CUMS-induced depression in mice [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2021, 21(6): 123-130.
- [13] 冯殿伟. 抑郁症治疗靶标及其药物研发进展 [J]. *中国医院药学杂志*, 2018, 38(4): 443-449.
Feng D W. Progress of development and research on targets and drugs for major depressive disorder [J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2018, 38(4): 443-449.
- [14] 付艳娇, 王银雁, 刘岩, 等. 富含 γ -氨基丁酸黑豆芽益生菌发酵酸乳研究 [J]. *现代农业科技*, 2022(3): 211-213, 216.
Fu Y J, Wang Y Y, Liu Y, et al. Study on probiotics fermented yoghurt of black bean sprouts riched in γ -aminobutyric acid [J]. *Mod Agric Sci Technol*, 2022(3): 211-213, 216.
- [15] 李明, 卢慧, 徐振江. 黄酮类天然产物调控肠道微生物改善炎症性肠病的研究进展 [J]. *河南工业大学学报: 自然科学版*, 2020, 41(3): 118-129.
Li M, Lu H, Xu Z J. Research progress on inflammatory bowel disease alleviation by flavonoids natural products through regulating intestinal microbiota [J]. *J Henan Univ Technol: Nat Sci Ed*, 2020, 41(3): 118-129.
- [16] 王振鑫. 基于肠-脑轴初步探讨二甲基甘氨酸缓解热应激下肉鸡肠道屏障损伤的机制研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2021.
Wang Z X. Preliminary study on the mechanism of dimethylglycine alleviating intestinal barrier injury in broilers under heat stress based on intestinal-brain axis [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2021.

[责任编辑 兰新新]