

哈蟆油石油醚提取物的抗抑郁作用及其机制

游杰舒¹, 张瑞睿², 郭建友², 刘勇¹, 史淑宁¹, 候文慧¹, 石晋丽^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

2. 中国科学院心理研究所 心理健康重点实验室, 北京 100101

摘要: **目的** 研究哈蟆油石油醚提取物(PERO)对慢性温和应激抑郁模型大鼠的抗抑郁作用及其作用机制。**方法** 将大鼠随机分为对照组、模型组、盐酸氟西汀(10 mg/kg)阳性对照组和PERO各剂量(30、100、300 mg/kg)组,每天给药1次,连续给药21 d。PERO和模型组末次给药后1 h、盐酸氟西汀于末次给药后0.5 h,每天进行慢性应激刺激,制备抑郁模型,连续21 d。观察大鼠体质量变化;采用旷场实验和蔗糖偏好实验检测大鼠行为学变化;酶联免疫吸附(ELISA)法测定大鼠血清皮质酮的水平;Western blotting法检测大鼠海马中脑源性神经营养因子(BDNF)蛋白的表达。**结果** 与对照组相比,模型组大鼠的体质量、蔗糖偏爱度下降,在旷场实验中的运动距离明显减小,血清中皮质酮水平显著升高,海马中BDNF蛋白表达显著下降。与模型组相比,PERO各剂量组均能不同程度地改善抑郁大鼠体质量的下降,增加蔗糖偏爱度和在旷场实验中的运动距离,降低大鼠血清皮质酮的水平,增加大鼠海马中BDNF的蛋白表达。**结论** PERO具有明显的抗抑郁作用,其机制可能与调节下丘脑-垂体-肾上腺轴功能和提高BDNF蛋白的表达有关。

关键词: 哈蟆油石油醚提取物;抗抑郁;慢性应激抑郁模型;下丘脑-垂体-肾上腺轴;皮质酮;脑源性神经营养因子

中图分类号: R971.43

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2013)19-2717-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.19.016

Antidepressive effects of petroleum ether extract from *Ranae Oviductu* and its possible mechanism

YOU Jie-shu¹, ZHANG Rui-rui², GUO Jian-you², LIU Yong¹, SHI Shu-ning¹, HOU Wen-hui¹, SHI Jin-li¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

2. Key Laboratory of Mental Health, Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Objective To study the antidepressive effect of the petroleum ether extract from *Ranae Oviductus* (PERO) on chronic mild stress depressive rat model and its mechanism. **Methods** The rats were divided into control, model, Fluoxetine (10 mg/kg, positive control), and different doses (30, 100, and 300 mg/kg) of PERO groups. The rats in PERO groups were administered once daily for 21 d, while the rats in the control and model groups were administered with equivalent normal saline. After 1 h for the rats in PERO and model groups and 0.5 h for the rats in Fluoxetine group of the last administration, the chronic unpredictable mild stress for 21 d was used to induce the depression in rats. The body weight was measured and the depressive-like behaviors were evaluated by the open-field test and sucrose preference test. Then the corticosterone level in the rat plasma was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels in the hippocampus were measured by Western blotting analysis. **Results** Compared with the control group, the body weight, sucrose preference, and motion distance in open-field test of rats were decreased, the corticosterone level in plasma was increased, and the BDNF level in hippocampus was decreased. Compared with the model group, PERO treatment alleviated the body weight decreasing, increased the sucrose preference and motion distance, reduced the corticosterone level in the plasma of rats, and increased the BDNF level in hippocampus of rats. **Conclusion** The antidepressive effect of PERO is likely mediated by modulating the function of hypothalamic-pituitary-adrenal axis and increasing the expression of BDNF in brain tissues.

Key words: petroleum ether extract from *Ranae Oviductus*; antidepression; chronic mild stress depressive model; hypothalamic-pituitary-adrenal axis; corticosterone; brain-derived neurotrophic factor

收稿日期: 2013-04-15

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09102-201-018); 北京中医药大学研究生自主课题(2011JYB22XS-072)

作者简介: 游杰舒(1988—), 湖南常德人, 硕士研究生, 研究方向为精神药理学。E-mail: youyaling@163.com

*通信作者 石晋丽 Tel/Fax: (010)84738623 E-mail: shijl@vip.sina.com

抑郁症是一种以持续性情绪低落、悲观内疚、兴趣缺失和行动迟缓等为主要特征的综合性精神疾病^[1]。市场上以单胺类神经递质为靶标研制而成的一线抗抑郁药物仅对30%的抑郁症患者起作用^[2]。因此,探究抑郁症的其他机制,研发高效低毒的天然抗抑郁新药已成为研究热点。近年来大量研究表明,抑郁症的发生与下丘脑-垂体-肾上腺轴和脑源性神经营养因子(BDNF)密切相关。临床观察发现抑郁症患者的下丘脑-垂体-肾上腺轴功能亢进,血浆皮质醇水平明显升高,进一步导致海马形态与功能的损伤,并引起脑组织中BDNF表达的下降,而部分抗抑郁药通过调节下丘脑-垂体-肾上腺轴水平,增加脑中BDNF的量,阻止或逆转海马神经元的萎缩和损伤,从而改善抑郁症状^[3-4]。

哈蟆油为蛙科动物中国林蛙 *Rana temporaria chensinensis* David 雌蛙的输卵管,经采制干燥而得,味甘、咸,性平,归肺、肾经,具补肾益精、养阴润肺的功效,用于治疗病后体弱、神疲乏力、心悸失眠、盗汗、劳嗽咳血。哈蟆油石油醚提取部位含有脂肪酸类成分,且一些不饱和脂肪酸具有抗抑郁作用,结合哈蟆油的传统功效和化学成分,推测哈蟆油石油醚提取部位可能具有抗抑郁作用^[5-6]。前期研究也发现哈蟆油石油醚提取物(PERO)能显著降低小鼠在悬尾和强迫游泳试验中的不动时间,表现出抗抑郁作用。本实验采用慢性应激抑郁大鼠模型进一步观察PERO的抗抑郁作用,并通过测定大鼠血清中皮质酮的水平及脑组织海马中BDNF的蛋白表达探讨其抗抑郁的作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

哈蟆油,中国药材公司,批号20120317,经北京中医药大学石晋丽教授鉴定原动物为蛙科动物中国林蛙雌蛙的输卵管,符合《中国药典》2010年版哈蟆油药材项下的规定。盐酸氟西汀(百忧解),苏州制药有限公司,批号A333341,用时以生理盐水配成所需浓度,新鲜配制;大鼠皮质酮ELISA检测试剂盒(美国R&D公司);兔抗人BDNF多抗、山羊抗人 β -actin多抗、ECL发光底物显色试剂盒,美国Sant Cruz公司;兔抗山羊IgG-HRP,北京中杉公司;其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 动物

SPF级雄性SD大鼠,体质量200~220 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证

号SCXK(京)2007-0001。大鼠饲养于SPF级动物房,12 h光照,室温(22±2)℃,自由进食、饮水,实验前适应环境7 d,每天对其进行抚摸。

1.3 仪器

DMS-2 Morris水迷宫系统,中国医学科学院药物研究所;Allegra 64R型高速冷冻离心机,美国Beckman Coulter公司;Multiskan Ex Primary EIA V.2.3酶标仪,Finland Thermo公司;UV-2800紫外分光光度计,尤尼柯上海仪器有限公司;垂直板电泳转移装置,美国Bio-Rad公司。

2 方法

2.1 提取物制备

哈蟆油经粉碎后过60目筛,加入8倍量石油醚,超声3次,滤过,合并滤液,浓缩干燥得石油醚浸膏(PERO,得率为2.3%),经GC-MS法测定,主要含脂肪酸类,其中棕榈酸质量分数为28.98%。

2.2 分组与给药

大鼠根据体质量随机分为6组(每组10只):对照组,模型组,盐酸氟西汀(10 mg/kg)阳性对照组,PERO低、中、高剂量(30、100、300 mg/kg)组。各给药组每天ig给药1次,给药量1 mL/200 g,连续给药21 d,对照组及模型组每天ig等量生理盐水。

2.3 慢性温和应激抑郁模型的建立

PERO各剂量组和模型组末次给药1 h后、盐酸氟西汀组给药后0.5 h,于每天8:00~14:00时,参照文献方法^[7]建立抑郁大鼠模型,即冰水游泳5 min,常温分别游泳10、15 min,夹尾分别60、90 s,光照24 h,禁食、禁水22 h等刺激,每天随机安排1种,每种刺激至少出现2次,同种刺激不能连续出现,刺激持续21 d,第21天进行行为学测试。

2.4 体质量检测

分别于造模第1、7、14、21天称取大鼠体质量。

2.5 蔗糖偏好实验

蔗糖偏好实验前2 d,每笼同时放置2个水瓶,分别装有3%蔗糖水溶液和普通饮用水,进行糖水适应。正式实验时,大鼠在禁食、禁水22 h后,于第1、7、14和21天观察大鼠2 h内糖水消耗量以及水消耗量,计算糖水偏爱度(糖水偏爱度=糖水消耗量/总液体消耗量)。

2.6 旷场实验

实验场所为水迷宫系统(由大小两个圆形水池、图像自动采集和处理系统组成)的外侧圆形水池(100 cm×100 cm×50 cm),四周、底面全部涂黑。

实验前大鼠自由探究 5 min。实验时，将大鼠放入旷场的边缘区，采用视频跟踪分析系统自动记录大鼠 5 min 的活动情况。观察大鼠的运动距离和进入旷场中央（半径 33 cm 的圆形区域）的时间百分比。

2.7 ELISA 法检测血清皮质酮水平

行为学实验结束后，大鼠立即断头取血，4 ℃、3 000 r/min 离心 15 min，取上清液，-20 ℃保存待测。血清中皮质酮水平的检测按照试剂盒说明书操作，酶标仪上于 450 nm 波长处测定吸光度 (A) 值。

2.8 Western blotting 法检测 BDNF 蛋白表达

行为学实验结束后，大鼠立即断头，在冰上取海马组织，置 -80 ℃保存备用。大鼠海马组织总蛋白提取按总蛋白提取试剂盒（普利莱基因技术有限公司）说明书操作，考马斯亮蓝法测定蛋白的量。取总蛋白 50 μg，在 SDS-PAGE 凝胶上电泳分离 2 h，将凝胶湿转至 PVDF 膜。取出 PVDF 膜，浸于封闭液中，室温轻摇封闭 1 h，用 TBST (100 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、0.05% 聚山梨酯 20) 缓冲液漂洗干净，浸入 TBST 稀释的一抗（兔抗人 BDNF 抗体，1 : 2 000；山羊抗人 β-actin 抗体，1 : 2 000），室温下孵育 1~2 h，在 TBST 脱色摇床上室温下洗 2 次，每次 10 min；再用 TBS (100 mmol/L Tris-HCL、150 mmol/L NaCl) 洗 1 次，10 min。同法准备二抗（兔抗山羊 IgG-HRP 1 : 1 000）稀释液并与膜接触，室温下孵育 1~2 h 后用 TBST 在脱色摇床上室温下洗 2 次，每次 10 min；再用 TBS 洗 1 次，10 min。ECL 检测试剂盒显色，曝光、显影和定影，将胶片进行扫描或拍照，用凝胶图像处理系统分析目标带的相对分子质量和净光密度值。

2.9 统计学分析

用 SPSS 16.0 软件对数据进行统计，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用双侧 *t* 检验，多组间比较先用单因素方差分析，差异有显著性时再用 Dunnett' *t* 检验进行统计分析。

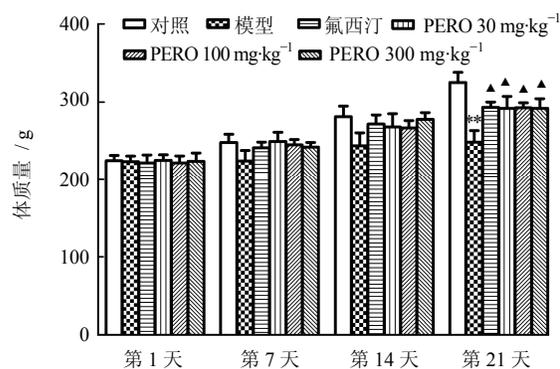
3 结果

3.1 对抑郁大鼠体质量的影响

在造模第 1、7、14 天，各组大鼠体质量均无显著性差异。在造模第 21 天，与对照组相比，模型组大鼠体质量显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组相比，氟西汀组和 PERO 各剂量组均能显著抑制大鼠体质量的下降 ($P < 0.05$)。结果见图 1。

3.2 对抑郁大鼠蔗糖偏好度的影响

各组大鼠在造模第 1、7、14 天，蔗糖偏好度均



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ▲ $P < 0.05$, 图 2 同
** $P < 0.01$ vs control group; ▲ $P < 0.05$ vs model group, same as Fig.2

图 1 PERO 对抑郁大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Fig. 1 Effect of PERO on body weight of depressive rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

无显著差异。在造模第 21 天，与对照组相比，模型组大鼠蔗糖偏好度显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组相比，氟西汀组和 PERO 30、100 mg/kg 剂量组大鼠的蔗糖偏爱度均显著增加 ($P < 0.05, 0.01$)。结果见图 2。

3.3 对抑郁大鼠在旷场实验中行为的影响

在造模第 21 天，与对照组相比，模型组大鼠总运动距离显著减小 ($P < 0.01$)；与模型组相比，氟西汀组和 PERO 100、300 mg/kg 剂量组大鼠的总运动距离均显著增加 ($P < 0.05$)。各组大鼠的中央运动时间百分比无显著性差异。结果见表 1。

3.4 对抑郁大鼠血清皮质酮水平的影响

与对照组相比，模型组大鼠血清中皮质酮水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比，氟西汀组和

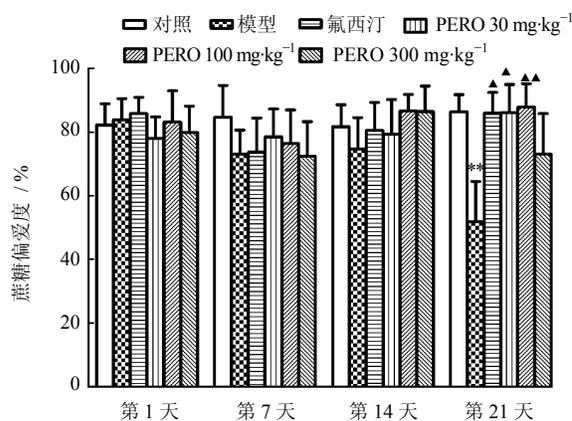


图 2 PERO 对抑郁大鼠蔗糖偏好度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Fig. 2 Effect of PERO on sucrose preference in depressive rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

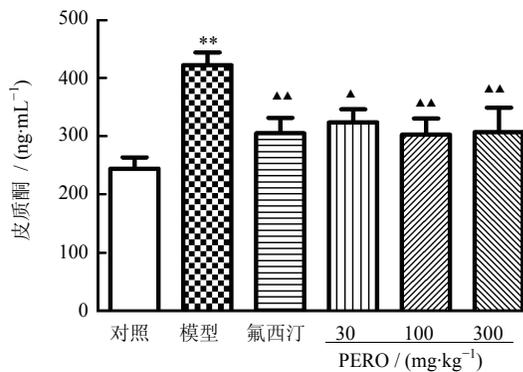
PERO 各剂量组大鼠血清中皮质酮水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见图 3。

表 1 PERO 对抑郁大鼠在旷场实验中行为的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of PERO on behaviors of depressive rats in open-field test ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	运动距离 / cm	中央区运动时间百分比 / %
对照	—	3 146.10 ± 183.95	3.26 ± 1.13
模型	—	2 330.89 ± 158.05**	2.73 ± 0.82
PERO	30	2 696.30 ± 182.88	2.93 ± 0.72
	100	2 777.61 ± 148.24 [▲]	3.79 ± 1.72
	300	2 767.00 ± 151.14 [▲]	2.16 ± 0.71
氟西汀	10	2 784.35 ± 174.41 [▲]	2.96 ± 0.77

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



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$
 下同
 ** $P < 0.01$ vs control group; [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs model group
 same as below

图 3 PERO 对抑郁大鼠血清皮质酮水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Effect of PERO on corticosterone levels in depressive rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.5 对抑郁大鼠海马中 BDNF 蛋白表达的影响

与对照组相比,模型组大鼠海马 BDNF 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$);与模型组相比,氟西汀组和 PERO 100、300 mg/kg 组大鼠海马 BDNF 蛋白表达均显著上调 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见图 4。

4 讨论

慢性不可预见性温和应激抑郁模型是目前最常用的一种抑郁模型,模型动物表现出的快感缺乏、兴趣丧失、自主活动减少和食欲降低等,与人抑郁

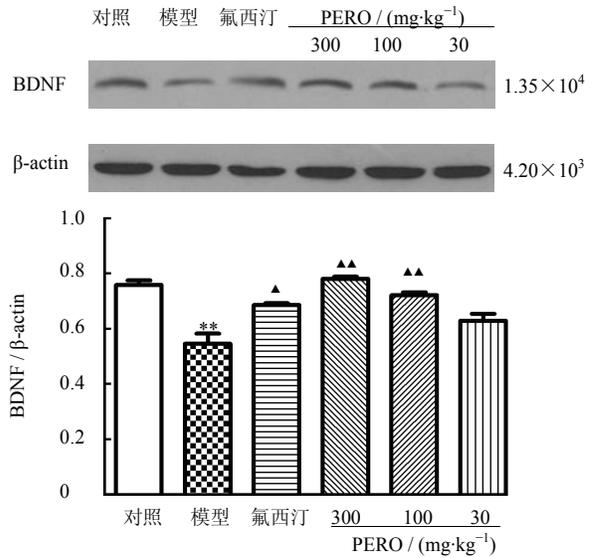


图 4 PERO 对抑郁大鼠海马中 BDNF 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 4 Effect of PERO on BDNF levels in hippocampus of depressive rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

症临床表现类似^[8]。蔗糖偏爱度是衡量快感缺失的重要客观指标,许多药理研究均以该指标作为抑郁模型成功以及抗抑郁药物效果的检验指标;旷场实验能够反映动物的运动情况^[9-11]。因此本实验采用慢性应激抑郁模型,通过检测大鼠体重、蔗糖偏爱度和旷场实验等,观察 PERO 对大鼠抑郁行为的影响及作用机制。结果表明,经 21 d 慢性应激后,大鼠表现出明显的抑郁行为;PERO 能明显改善大鼠的体质量下降,增加大鼠蔗糖偏爱度和在旷场中的运动距离,其低、中、高剂量具有不同程度的抗抑郁作用,100 mg/kg 与阳性药氟西汀的作用相当。PERO 对慢性应激大鼠的抗抑郁作用不具有典型的剂量相关性,前期药理实验中也出现类似的现象^[12],这可能是因为高剂量 PERO 或代谢产物具有肝药酶诱导剂的作用,可加快药物分解代谢,使其失去药理活性所致^[13]。

应激引起的抑郁症或焦虑症与下丘脑-垂体-肾上腺轴的过度活化和调节异常密切相关。在应激状态时,下丘脑释放的促肾上腺皮质激素能刺激脑垂体前体促肾上腺皮质激素释放激素分泌的增加,进而刺激肾上腺皮质分泌过多的皮质酮^[14-15]。Holsboer 等^[15]发现应激状态下下丘脑-垂体-肾上腺轴的激活可通过皮质酮量的增加有所反映,因此皮质酮的量可作为评价抑郁症的一个重要指标。本实验结果发现,慢性温和性应激引起的大鼠下丘脑-

垂体-肾上腺轴的亢进表现为血清中皮质酮水平显著升高; PERO 能明显降低抑郁大鼠血清皮质酮的水平, 提示 PERO 的抗抑郁作用可能是通过调节下丘脑-垂体-肾上腺轴功能来实现的。

许多学者提出“抑郁症的神经营养因子失调假说”, 其和“下丘脑-垂体-肾上腺轴假说”均着眼于抑郁症引发的海马区神经元的损伤。有研究表明, 脑内 BDNF 的减少可能会引起抑郁症, 但 BDNF 在抑郁症机制中的具体作用还不明确。BDNF 是最早发现的一种神经营养因子, 可以调节神经元和突触的可塑性, 对中枢神经元的增殖和修护有重要的意义^[11]。BDNF 主要与受体 TrkB 结合, 使受体发生二聚体化后, 通过激活受体内在的酪氨酸激酶参与神经营养因子作用的信号通路, 进而对神经元起保护、促进再生的作用^[16-17]。临床研究也表明^[18]抑郁症患者血清中 BDNF 水平降低, 抗抑郁药可使血清 BDNF 恢复到正常水平。本实验结果也表明, 慢性应激抑郁大鼠海马区 BDNF 的水平显著降低, PERO 能上调 BDNF 的水平下降, 效果甚至优于氟西汀, 其原因可能是 PERO 的抗抑郁作用更多地是通过神经元保护产生的, 而氟西汀作为一种 5-羟色胺再摄取抑制剂, 对 BDNF 的作用要弱于 PERO。

综上, PERO 对慢性不可预期性温和应激抑郁大鼠具抗抑郁作用, 该作用可能通过调节下丘脑-垂体-肾上腺轴功能状态、提高脑组织海马中 BDNF 的水平实现的。而 PERO 对海马神经元和 BDNF 作用受体 TrkB 及其信号通路的影响有待进一步研究。

参考文献

- [1] Carnevali L, Mastorci F, Graiani G, *et al.* Social defeat and isolation induce clear signs of a depression-like state, but modest cardiac alterations in wild-type rats [J]. *Physiol Behav*, 2012, 106(2): 142-150.
- [2] Guo J Y, Li C Y, Ruan Y P, *et al.* Chronic treatment with celecoxib reverses chronic unpredictable stress-induced depressive-like behavior via reducing cyclooxygenase-2 expression in rat brain [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 612(1/3): 54-60.
- [3] Liu W N, Zhou C L. Corticosterone reduces brain mitochondrial function and expression of mitofusin, BDNF in depression-like rodents regardless of exercise preconditioning [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2012, 37(7): 1057-1070.
- [4] Sapolsky R M. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders [J]. *Arch Gen Psychiat*, 2000, 57(10): 925-935.
- [5] 王永生, 姜大成, 王恩思. 哈蟆油脂溶性化学成分的研究 [J]. *中成药*, 2006, 28(1): 93-94.
- [6] 郭晓云. ω -3 多不饱和脂肪酸对 CMS 抑郁症大鼠模型神经生化及海马基因表达的影响 [D]. 上海: 复旦大学, 2007.
- [7] Kumar B, Kuhad A, Chopra K. Neuropsychopharmacological effect of sesamol in unpredictable chronic mild stress model of depression: behavioral and biochemical evidences [J]. *Psychopharmacology*, 2013, 44(1): 108-115.
- [8] 李金兵, 李翼鹏, 田俊生, 等. 基于慢性温和不可预期应激模型 [J]. *中草药*, 2011, 36(10): 1342-1347.
- [9] Garza J C, Guo M, Zhang W, *et al.* Leptin restores adult hippocampal neurogenesis in a chronic unpredictable stress model of depression and reverses glucocorticoid-induced inhibition of GSK-3 β / β -catenin signaling [J]. *Mol Psychiatry*, 2012, 17(8): 790-808.
- [10] Hennebelle M, Balasse L, Latour A, *et al.* Influence of omega-3 fatty acid status on the way rats adapt to chronic restraint stress [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e42142.
- [11] Lu X Y, Kim C S, Frazer A, *et al.* Leptin: a potential novel antidepressant [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(5): 1593-1598.
- [12] 张仲一, 高 岚, 路 军. 中药量效关系动物实验观察 [J]. *天津中医学院学报*, 1994, 6(3): 31-32.
- [13] Merali Z, Du L, Hrdina P, *et al.* Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABA (A) receptor subunits in frontal cortical brain region [J]. *J Neuro Sci*, 2004, 24(6): 1478-1485.
- [14] O'Brien D, Skelton K H, Owens M J, *et al.* Are CRF receptor antagonists potential antidepressants? [J]. *Hum Psychopharmacol*, 2001, 16(1): 81-87.
- [15] Holsboer F, Gerken A, Stalla G K, *et al.* ACTH, cortisol, and corticosterone output after ovine corticotropin-releasing factor challenge during depression and after recovery [J]. *Biol Psychiat*, 1985, 20(3): 276-286.
- [16] Saarelainen T, Hendolin P, Lucas G, *et al.* Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(1): 349-357.
- [17] Monteggia L M, Barrot M, Powell C M, *et al.* Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function [J]. *P Nat Acad Sci USA*, 2004, 101(29): 10827-10832.
- [18] Aydemir C, Yalcin E S, Aksaray S, *et al.* Brain derived neurotrophic factor (BDNF) changes in the serum of depressed women [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2006, 30(7): 1256-1260.